



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0083806  
(43) 공개일자 2016년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/12 (2006.01) A61K 31/22 (2006.01)  
A61K 31/366 (2006.01) A61K 31/47 (2006.01)  
A61K 31/496 (2006.01) A61K 31/497 (2006.01)  
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/5375 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/12 (2013.01)  
A61K 31/22 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0189030

(22) 출원일자 2015년12월29일

심사청구일자 없음

(30) 우선권주장

1020140193528 2014년12월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

박상욱

서울특별시 서대문구 연희동 현대빌라 302호

이현숙

인천광역시 서구 승학로 457, 401동 602호 (검암동, 삼보해피하임)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 정안

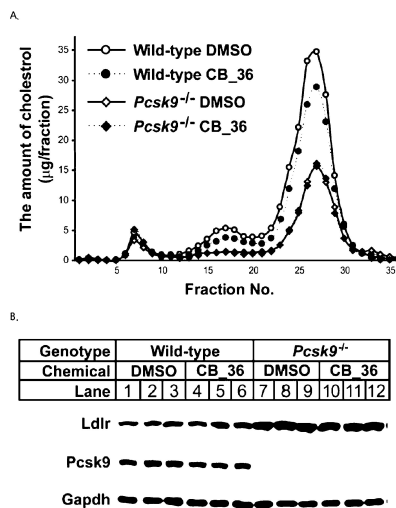
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물

### (57) 요약

본 발명은 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는 PCSK9과 LDLR의 결합을 억제하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물로서, 간에서 PCSK9 및/또는 LDLR의 발현량을 직접적으로 조절하지 않아 이로 인한 부작용을 낮출 수 있으며, PCSK9과 LDLR의 결합을 효과적으로 억제하여 혈장의 총 콜레스테롤 수치는 효과적으로 낮추는 동시에 스타틴 계열의 약물과 병용투여 시 스타틴 계열 약물의 치료 효과를 더욱 상승시킬 수 있을 것으로 기대된다.

### 대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

**A61K 31/366** (2013.01)  
**A61K 31/47** (2013.01)  
**A61K 31/496** (2013.01)  
**A61K 31/497** (2013.01)  
**A61K 31/519** (2013.01)  
**A61K 31/5375** (2013.01)

(72) 발명자

**민동국**

인천광역시 서구 도요지로189번길 104, 101동 903호 (검암동, 검암마젤란21아파트)

**이나래**

대전광역시 대덕구 동춘당로23번길 13, 103동 603호 (송촌동, 서오아파트)

**이찬주**

서울특별시 은평구 은평로8길 7, 4층 (응암동)

**양가을**

충청북도 청주시 상당구 수영로 327, 110동 602호 (용담동, 세영첼시빌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0030086
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터-기초의약학분야(MRC)
연구과제명	구조기반 대사조절 물질 연구
기 여 율	1/3
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.07 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0011550
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	일반연구자지원(기본연구)
연구과제명	TRAIL 유도에 의한 PCSK9의 발현 변화와 세포사멸 조절 기전 규명
기 여 율	1/3
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	313-2008-2-E00086
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	기초연구지원기초과학
연구과제명	AMP-activated protein kinase를 통한 PCSK9 발현 조절 기전 규명
기 여 율	1/3
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2008.11.01 ~ 2009.10.31

---

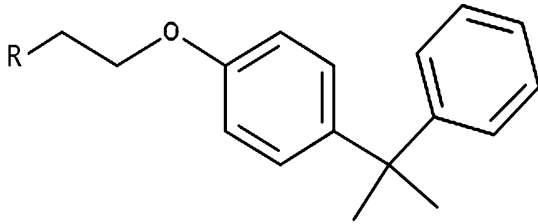
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물:

[화학식 1]



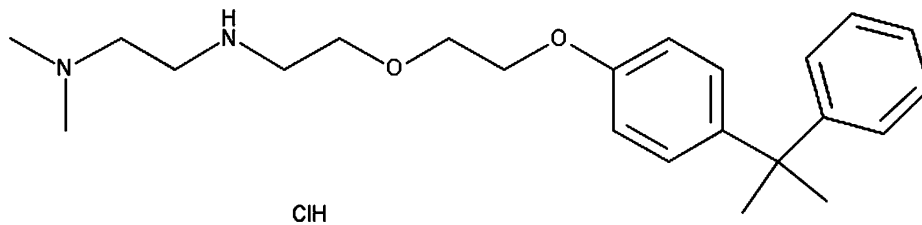
R은  $N(CH_3)_2$ ,  $N(CH_2)_4NH$ ,  $CH_2NH(CH_2)_3OCH_3$ ,  $CH_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$ ,  $NH(CH_2)_3$  또는  $O(CH_2)_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$  중 어느 하나이다.

#### 청구항 2

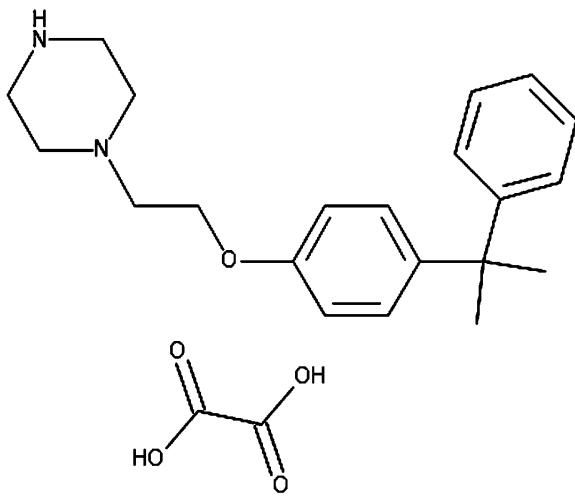
제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 2 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

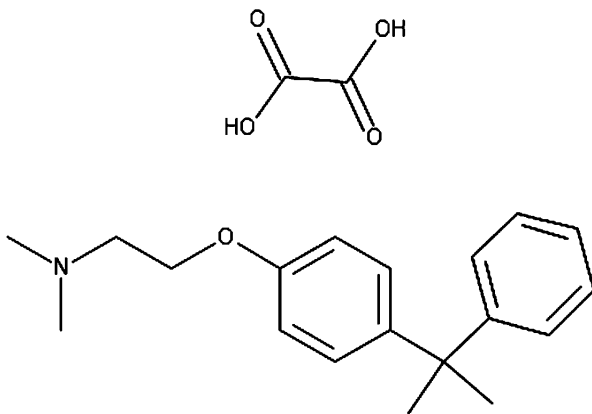
[화학식 2]



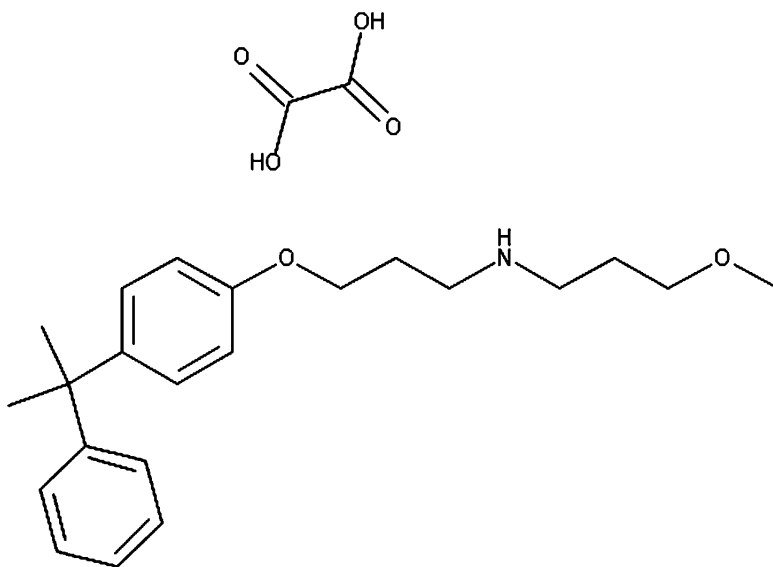
[화학식 3]



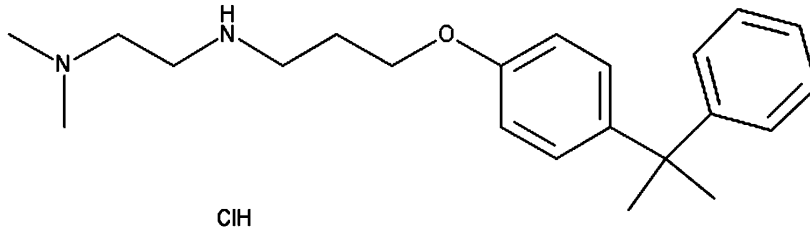
[화학식 4]



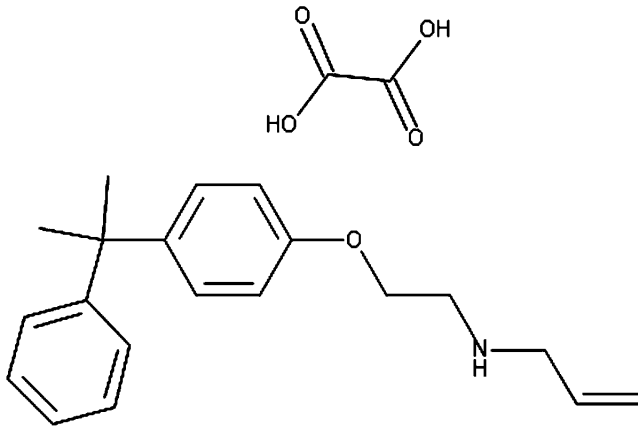
[화학식 5]



[화학식 6]



[화학식 7]



### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 콜레스테롤 관련 질환은 대사성 질환(metabolic disease) 또는 이상지질혈증(dyslipidemia) 질환인 것을 특징으로 하는, 조성물.

### 청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 또는 심장혈관 질환(cardiovascular disease)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

### 청구항 5

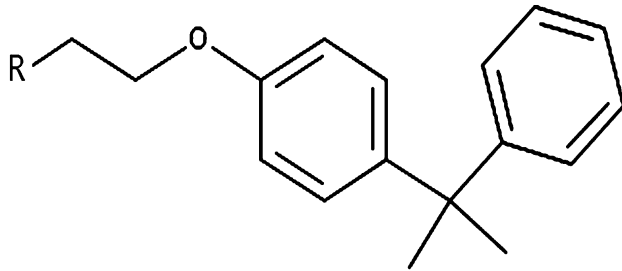
제 3 항에 있어서,

상기 이상지질혈증 질환은 혈중에 총 콜레스테롤, 저밀도지질단백질-콜레스테롤(LDL-cholesterol), 또는 중성지방이 증가된 상태로서, 고지혈증, 고중성지방혈증, 또는 고콜레스테롤혈증인 것을 특징으로 하는, 조성물.

### 청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, PCSK9 및 LDLR 결합 억제용 조성물:

[화학식 1]



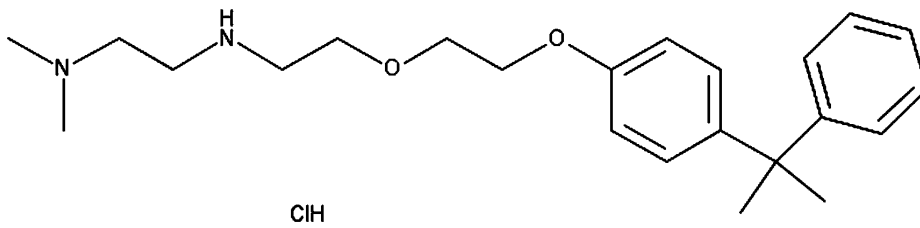
R은  $N(CH_3)_2$ ,  $N(CH_2)_4NH$ ,  $CH_2NH(CH_2)_3OCH_3$ ,  $CH_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$ ,  $NH(CH_2)_3$  또는  $O(CH_2)_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$  중 어느 하나이다.

### 청구항 7

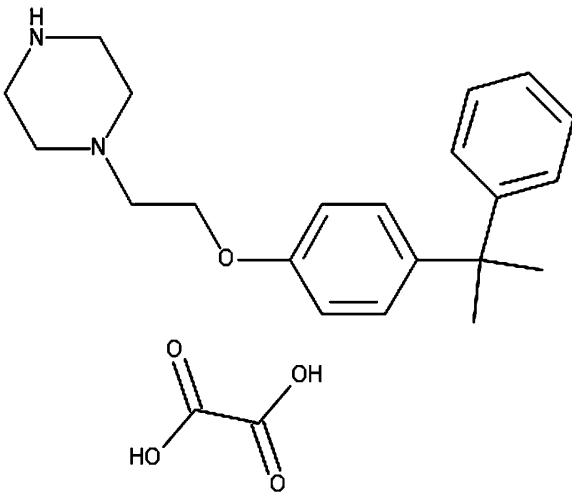
제 6 항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 2 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

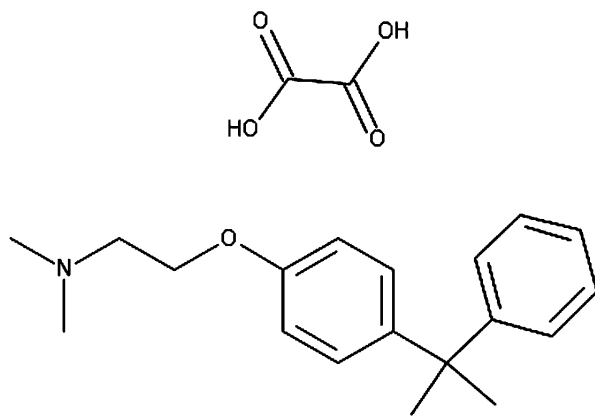
[화학식 2]



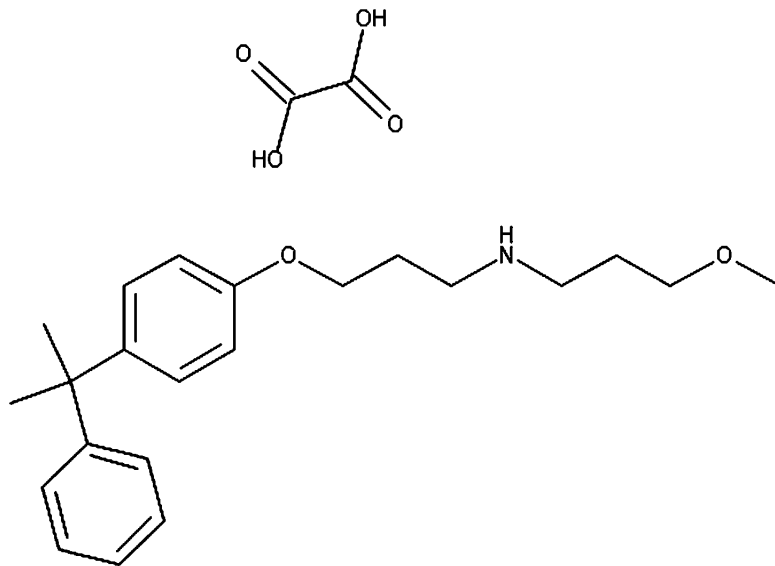
[화학식 3]



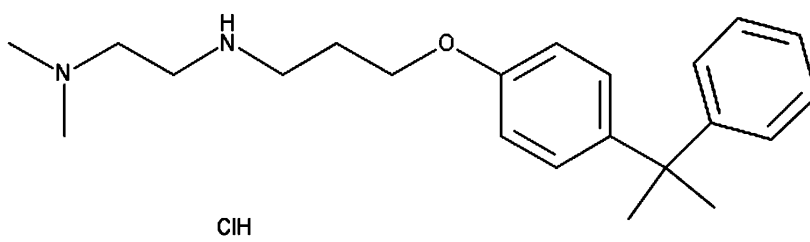
[화학식 4]



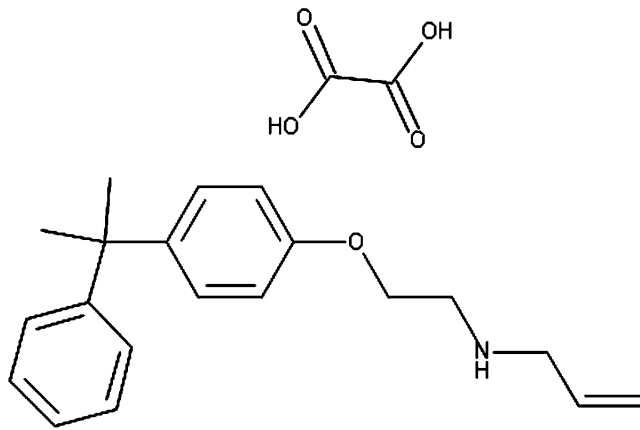
[화학식 5]



[화학식 6]



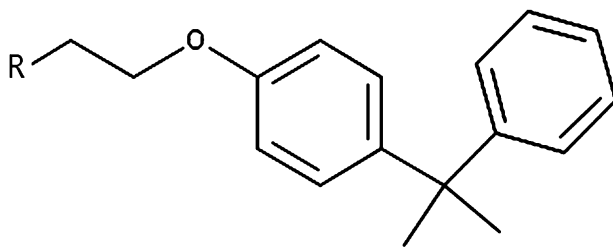
[화학식 7]



#### 청구항 8

스타틴계 화합물 및 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물:

[화학식 1]



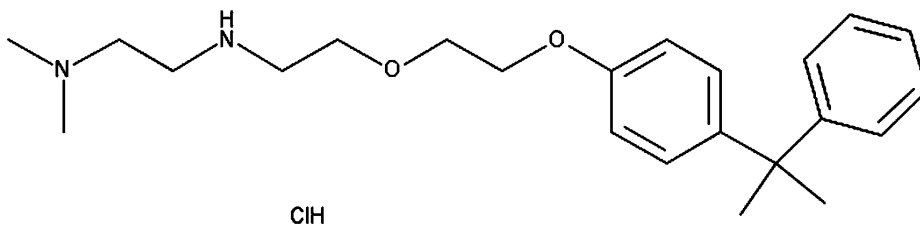
R은  $N(CH_3)_2$ ,  $N(CH_2)_4NH$ ,  $CH_2NH(CH_2)_3OCH_3$ ,  $CH_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$ ,  $NH(CH_2)_3$  또는  $O(CH_2)_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$  중 어느 하나이다.

#### 청구항 9

제 8 항에 있어서,

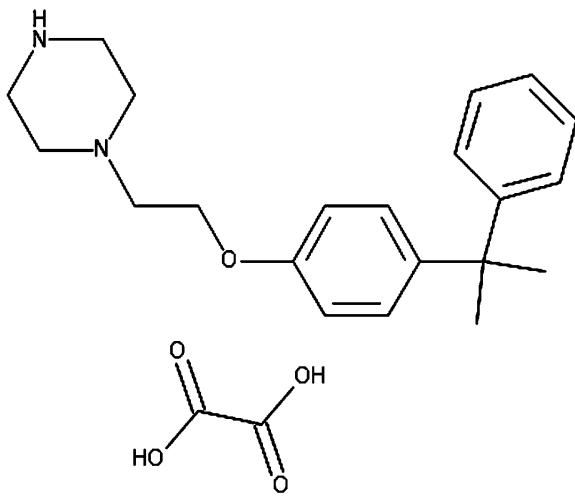
상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[화학식 2]

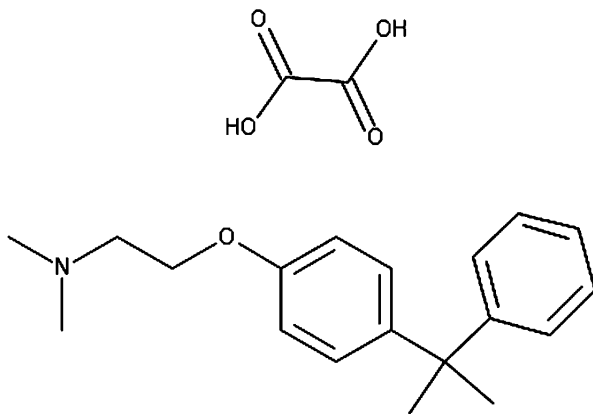




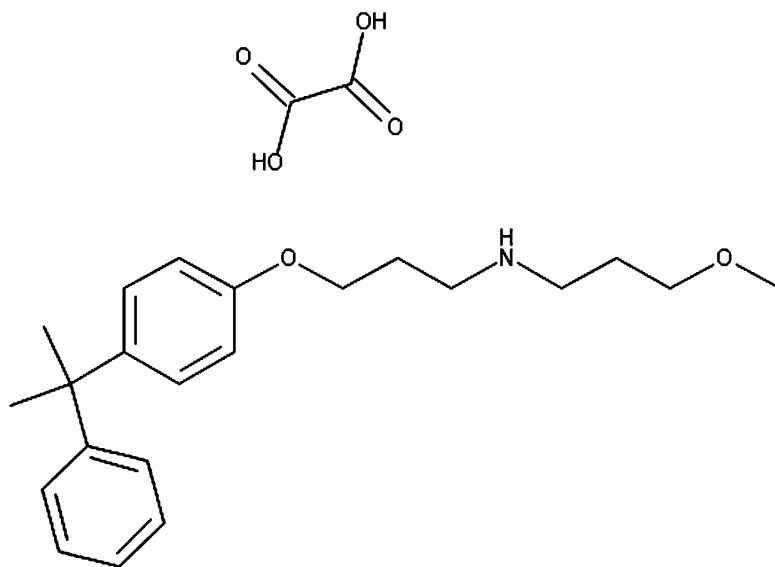
[화학식 3]



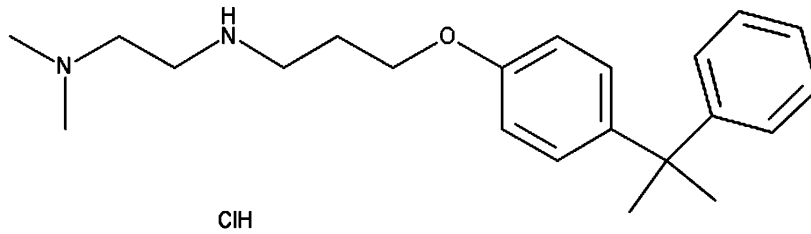
[화학식 4]



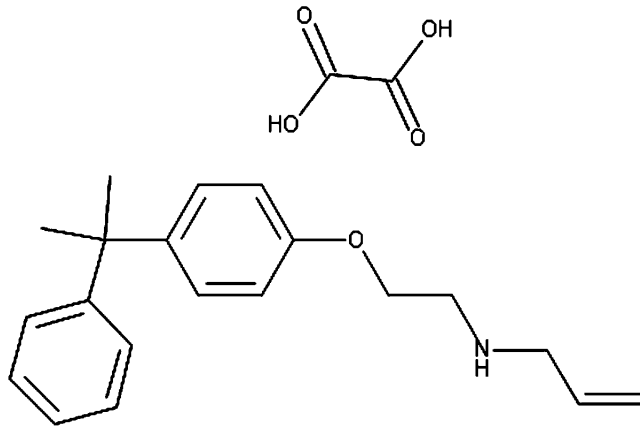
[화학식 5]



[화학식 6]



[화학식 7]



#### 청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 콜레스테롤 관련 질환은 대사성 질환(metabolic disease) 또는 이상지질혈증(dyslipidemia) 질환인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 또는 심장혈관 질환(cardiovascular disease)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 이상지질혈증 질환은 혈중에 총 콜레스테롤, 저밀도지질단백질-콜레스테롤(LDL-cholesterol), 또는 중성지방이 증가된 상태로서, 고지혈증, 고중성지방혈증, 또는 고콜레스테롤혈증인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 13

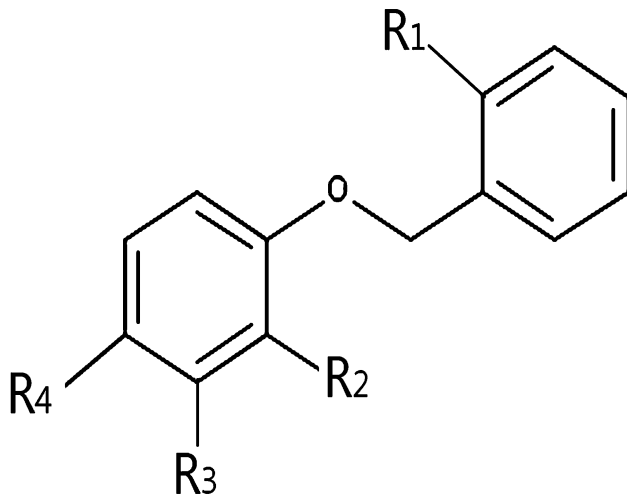
제 8 항에 있어서,

상기 스타틴계 화합물은 로바스타틴(lovastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin), 세리바스타틴(cerivastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin) 또는 이들의 염 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 14

하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물:

[화학식 8]



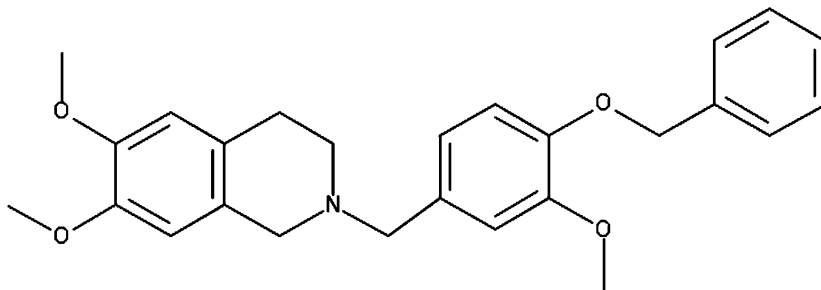
$R_1$ 은 H, Cl 또는  $CH_3$  중 어느 하나이고,  $R_2$ 는 H,  $OCH_3$  또는  $O(CH_2)_4NH(CH_2)_2N(CH_2)_4O$  중 어느 하나이고,  $R_3$ 는 H,  $CH_2N(CH_2)_4CHCON(CH_2)_2CH_3C(CH_3)_5$ ,  $CH_2NHCH_2C(CH_3)_3O$  또는  $CH_2N(CH_2)_4CHCON(CH_2)_4$  중 어느 하나이고,  $R_4$ 는  $CH_2N(CH_2)_3C_2(CH_2)_2C_2(OCH_3)_2$ ,  $CH_2N(CH_2)_4CHCONH(CH_2)_2N(CH_2CH_3)_2$ , 또는  $CH_2NH(CH_2)_2N(CH_2)_4O$  중 어느 하나이다.

#### 청구항 15

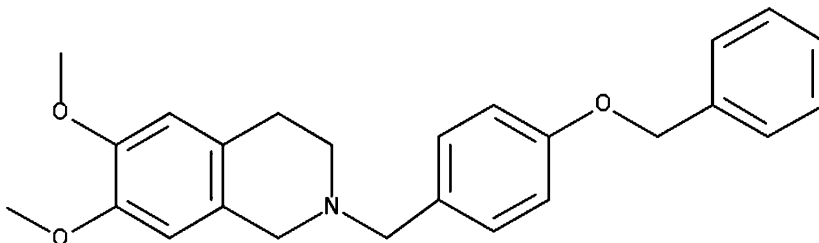
제 14 항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 9 내지 16으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

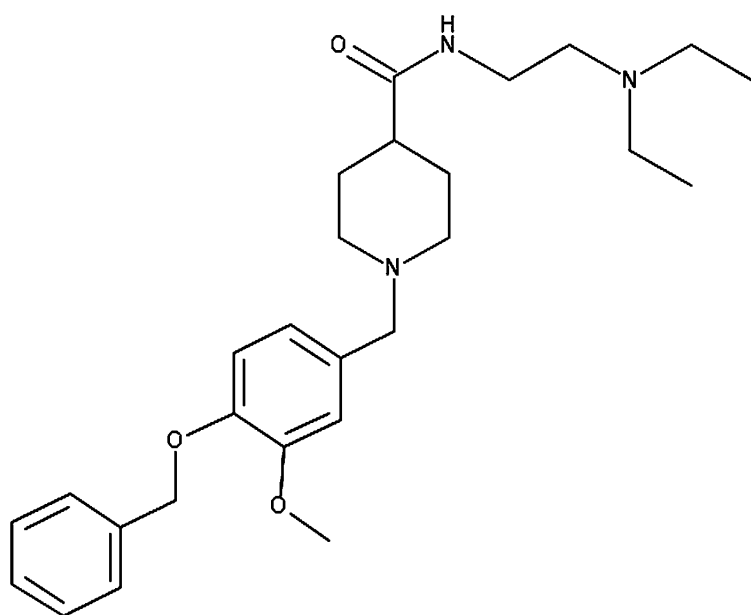
[화학식 9]



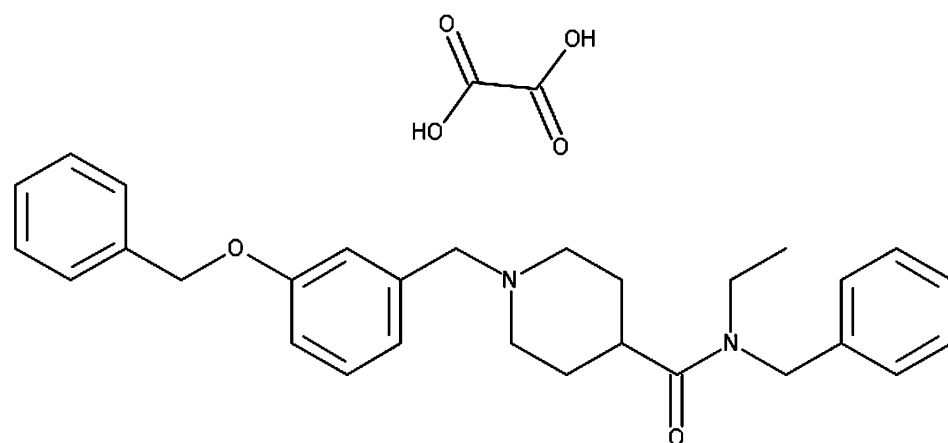
[화학식 10]



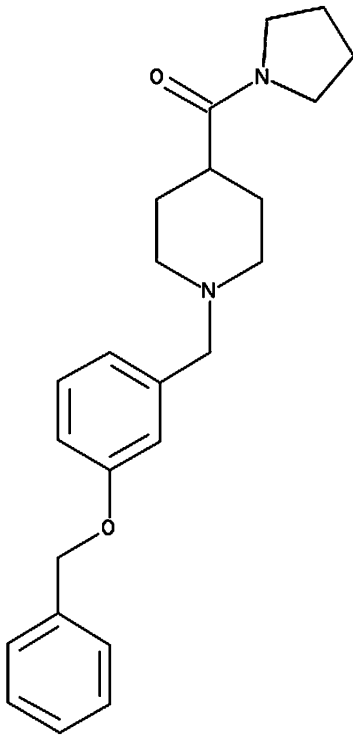
[화학식 11]



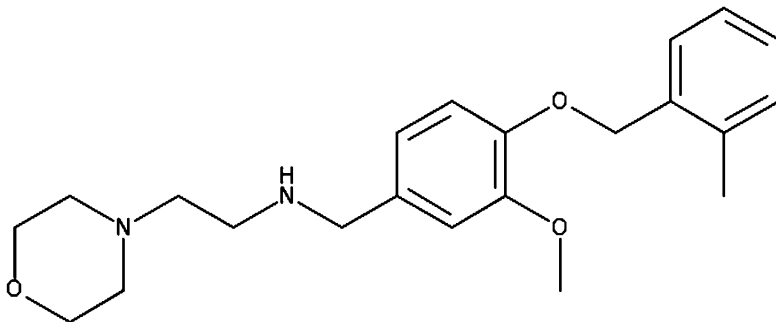
[화학식 12]



[화학식 13]



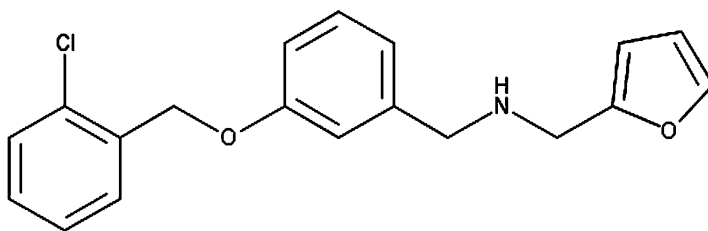
[화학식 14]



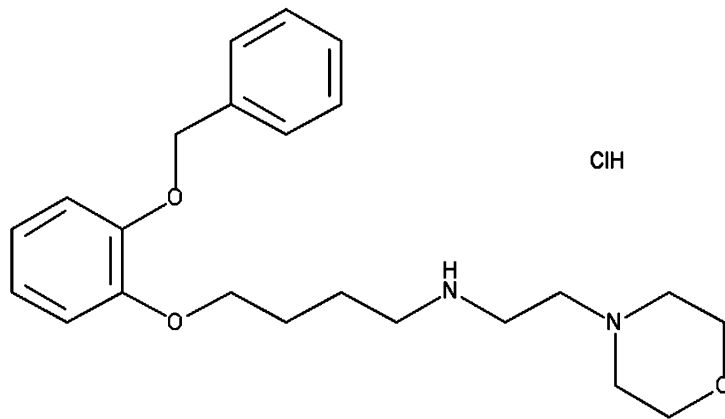
ClH ClH

[화학식 15]

ClH



[화학식 16]



#### 청구항 16

제 14 항에 있어서,

상기 콜레스테롤 관련 질환은 대사성 질환(metabolic disease) 또는 이상지질혈증(dyslipidemia) 질환인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 17

제 16 항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 또는 심장혈관 질환(cardiovascular disease)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 18

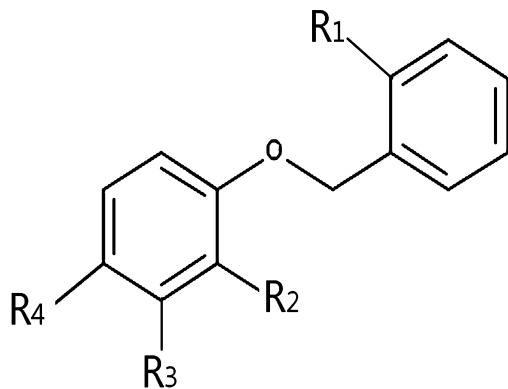
제 16 항에 있어서,

상기 이상지질혈증 질환은 혈중에 총 콜레스테롤, 저밀도지질단백질-콜레스테롤(LDL-cholesterol), 또는 중성지방이 증가된 상태로서, 고지혈증, 고중성지방혈증, 또는 고콜레스테롤혈증인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 19

하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, PCSK9 및 LDLR 결합 억제용 조성물:

[화학식 8]



$R_1$ 은 H, Cl 또는  $CH_3$  중 어느 하나이고,  $R_2$ 는 H,  $OCH_3$  또는  $O(CH_2)_4NH(CH_2)_2N(CH_2)_4O$  중 어느 하나이고,  $R_3$ 는 H,  $CH_2N(CH_2)_4CHCON(CH_2)_2CH_3C(CH)_5$ ,  $CH_2NHCH_2C(CH)_3O$  또는  $CH_2N(CH_2)_4CHCON(CH_2)_4$  중 어느 하나이고,  $R_4$ 는

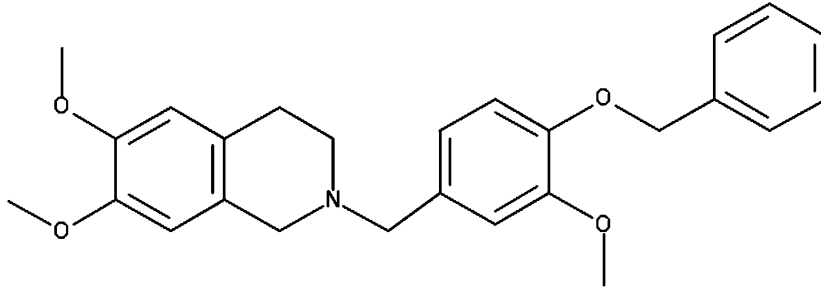
$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{C}_2(\text{CH})_2\text{C}_2(\text{OCH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CHCONH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ , 또는  $\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{O}$  중 어느 하나이다.

**청구항 20**

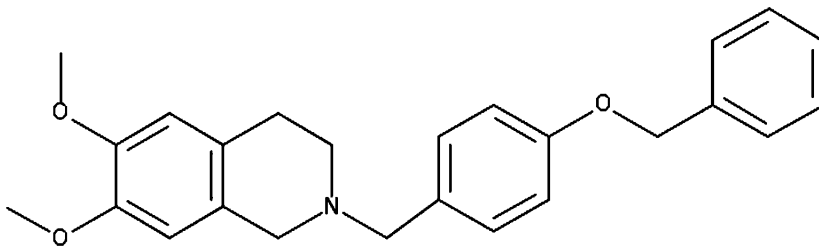
제 19 항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 9 내지 16으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

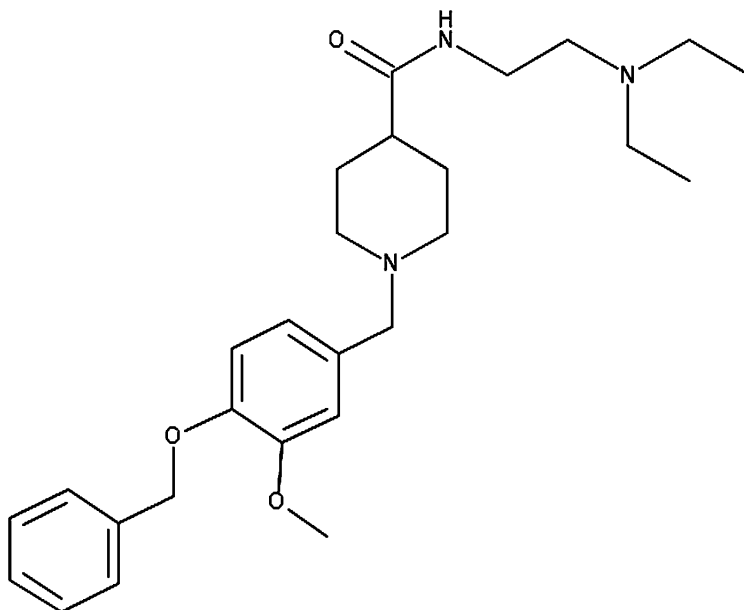
[화학식 9]



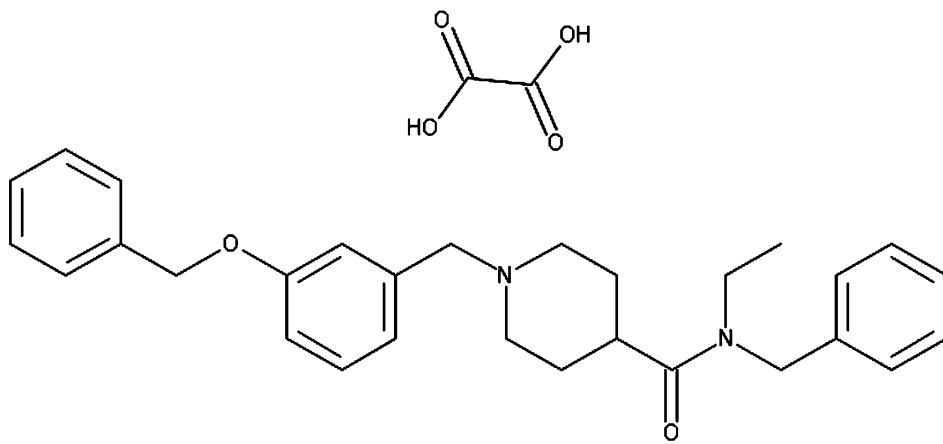
[화학식 10]



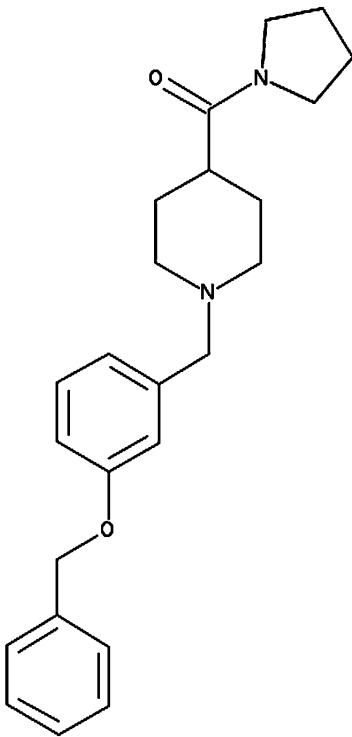
[화학식 11]



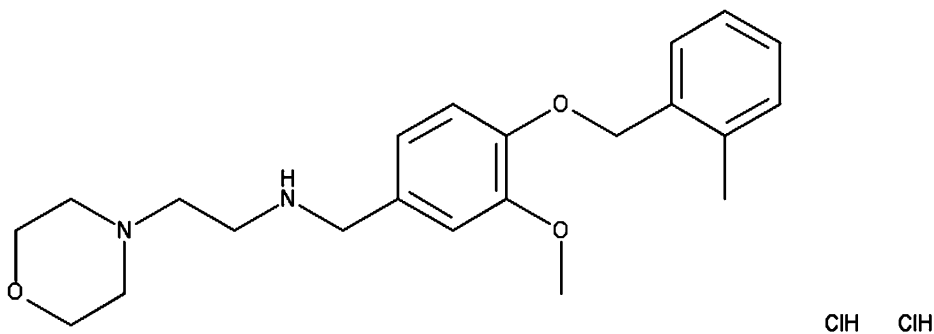
[화학식 12]



[화학식 13]



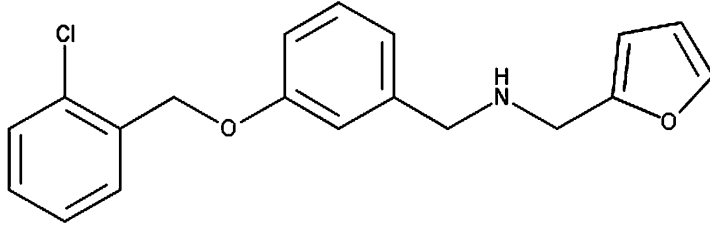
[화학식 14]





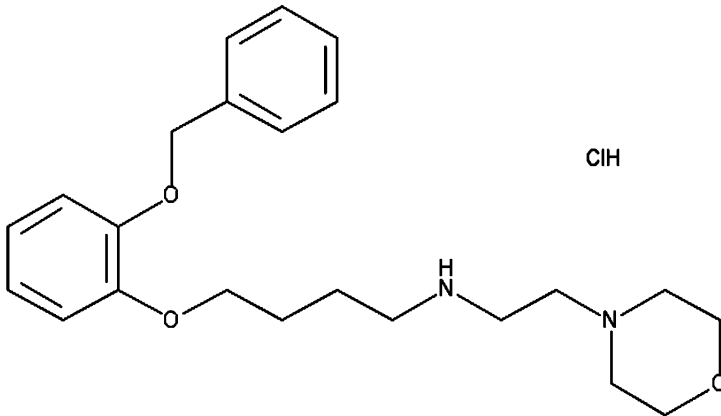
[화학식 15]

ClH



[화학식 16]

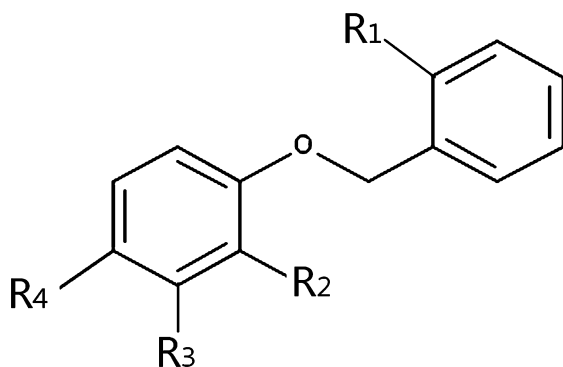
ClH



## 청구항 21

스타틴계 화합물 및 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물:

[화학식 8]



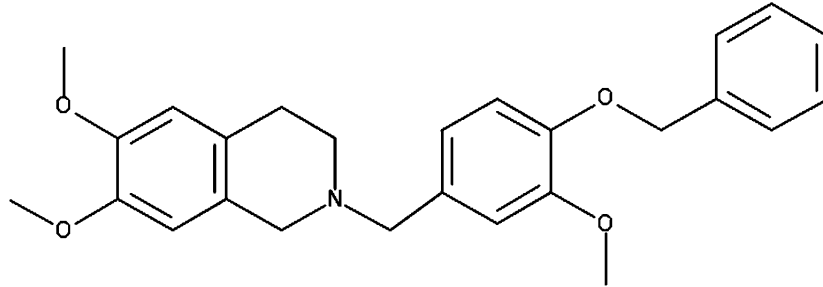
$R_1$ 은 H, Cl 또는  $CH_3$  중 어느 하나이고,  $R_2$ 는 H,  $OCH_3$  또는  $O(CH_2)_4NH(CH_2)_2N(CH_2)_4O$  중 어느 하나이고,  $R_3$ 는 H,  $CH_2N(CH_2)_4CHCON(CH_2)_2CH_3C(CH_3)_5$ ,  $CH_2NHCH_2C(CH_3)_3O$  또는  $CH_2N(CH_2)_4CHCON(CH_2)_4$  중 어느 하나이고,  $R_4$ 는  $CH_2N(CH_2)_3C_2(CH_2)_2C_2(OCH_3)_2$ ,  $CH_2N(CH_2)_4CHCONH(CH_2)_2N(CH_2CH_3)_2$ , 또는  $CH_2NH(CH_2)_2N(CH_2)_4O$  중 어느 하나이다.

## 청구항 22

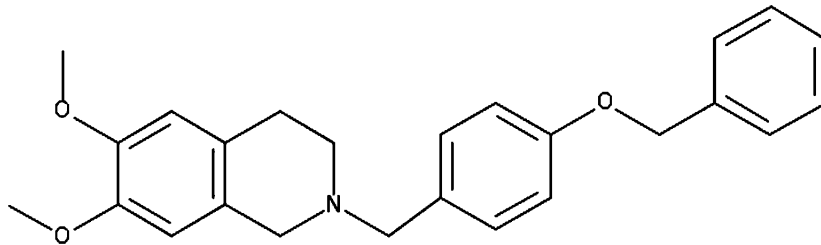
제 21 항에 있어서,

상기 화학식 8로 표시되는 화합물은 하기 화학식 9 내지 16으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

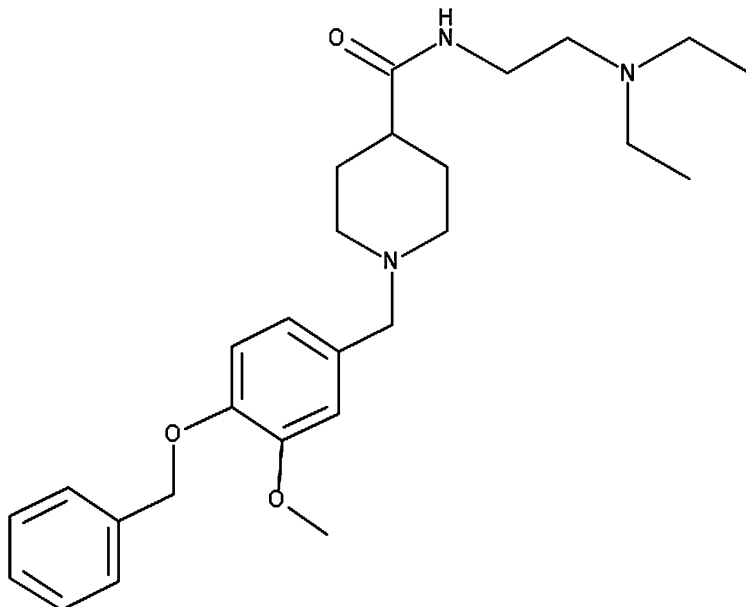
[화학식 9]



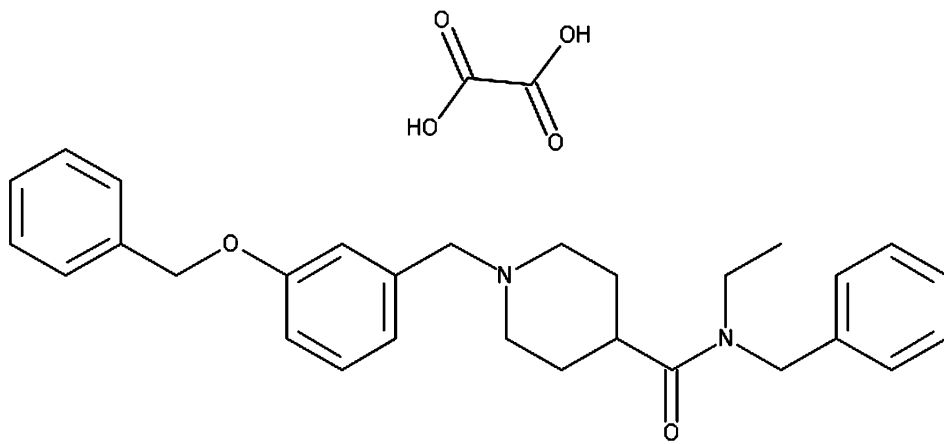
[화학식 10]



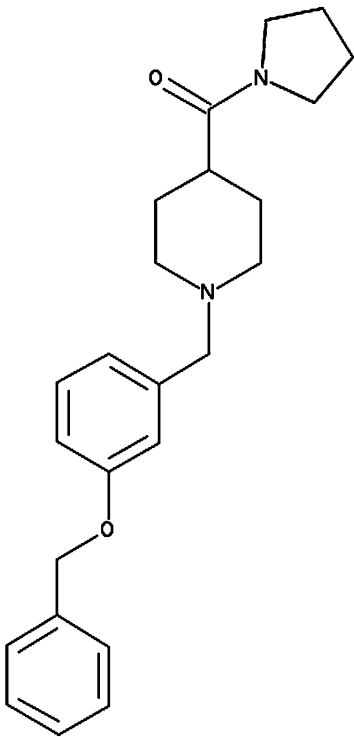
[화학식 11]



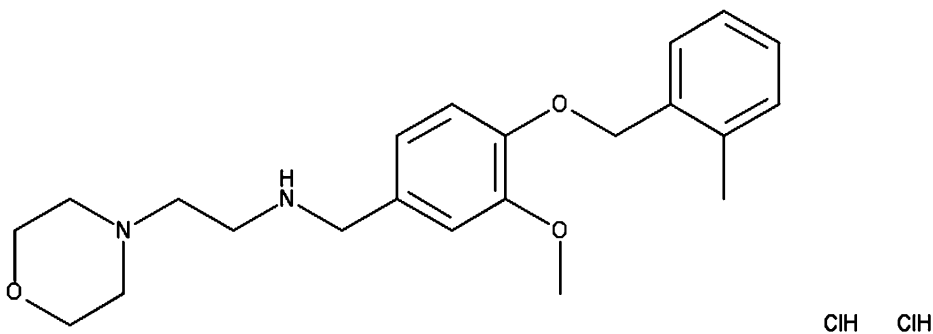
[화학식 12]



[화학식 13]



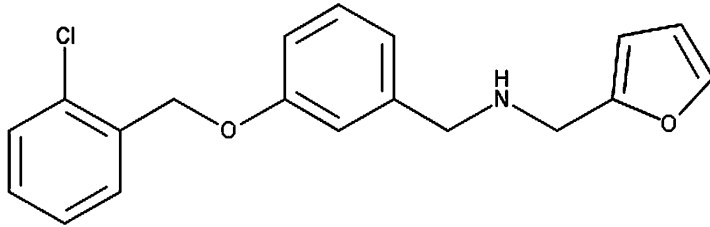
[화학식 14]



ClH ClH

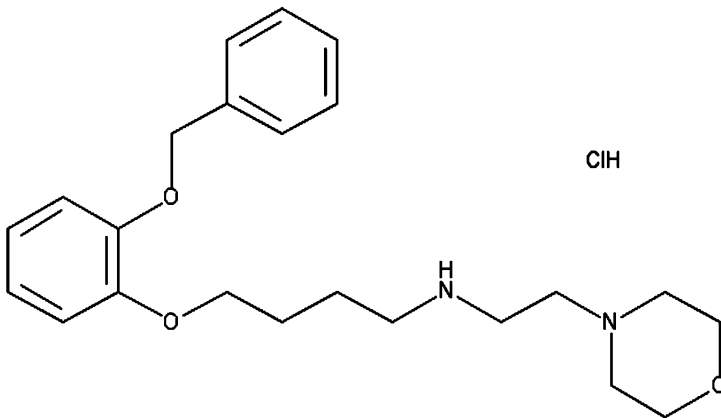
[화학식 15]

CIH



[화학식 16]

CIH



### 청구항 23

제 21 항에 있어서,

상기 콜레스테롤 관련 질환은 대사성 질환(metabolic disease) 또는 이상지질혈증(dyslipidemia) 질환인 것을 특징으로 하는, 조성물.

### 청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 또는 심장혈관 질환(cardiovascular disease)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

### 청구항 25

제 23 항에 있어서,

상기 이상지질혈증 질환은 혈중에 총 콜레스테롤, 저밀도지질단백질-콜레스테롤(LDL-cholesterol), 또는 중성지방이 증가된 상태로서, 고지혈증, 고중성지방혈증, 또는 고콜레스테롤혈증인 것을 특징으로 하는, 조성물.

### 청구항 26

제 21 항에 있어서,

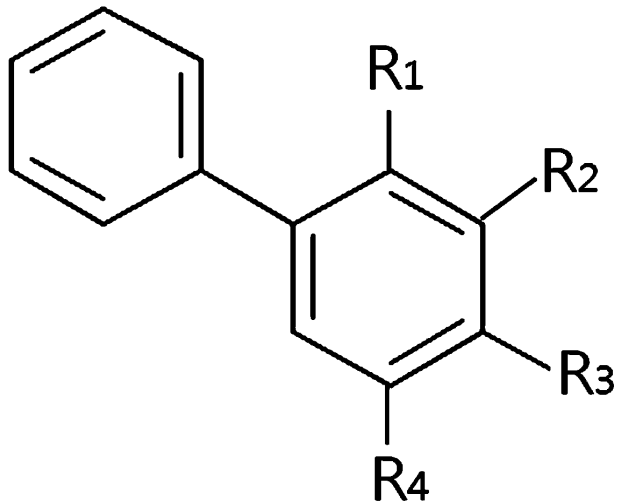
상기 스타틴계 화합물은 로바스타틴(lovastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin), 세리바스타틴(cerivastatin), 로수바스타틴

(rosuvastatin) 또는 이들의 염 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 27

하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물:

[화학식 17]



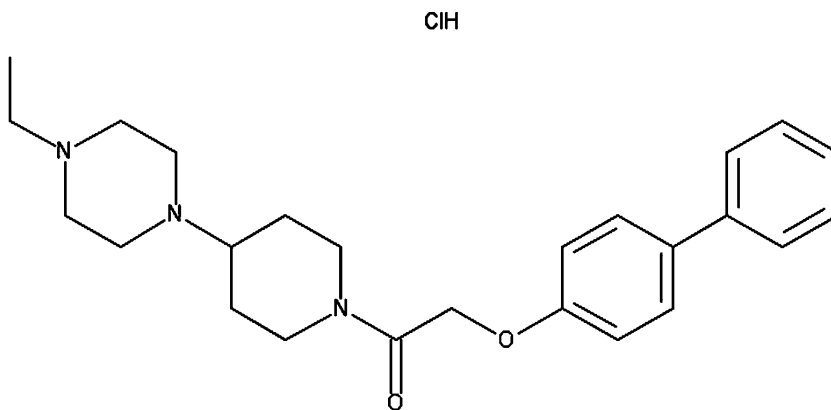
R<sub>1</sub>은 H 또는 O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 중 어느 하나이고, R<sub>2</sub>는 H이고, R<sub>3</sub>는 H, OCH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHN(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 또는 O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>O 중 어느 하나이고, R<sub>4</sub>는 H이다.

#### 청구항 28

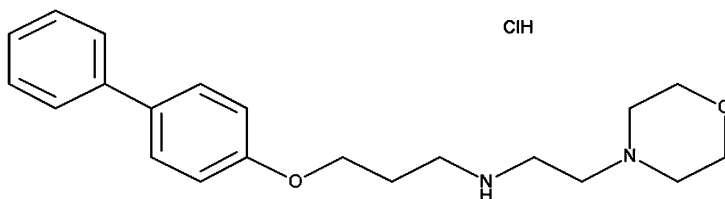
제 27 항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 19 내지 21로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

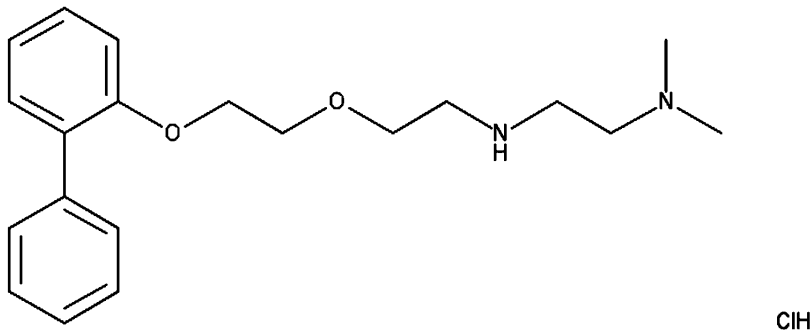
[화학식 19]



[화학식 20]



[화학식 21]



**청구항 29**

제 27 항에 있어서,

상기 콜레스테롤 관련 질환은 대사성 질환(metabolic disease) 또는 이상지질혈증(dyslipidemia) 질환인 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 30**

제 29 항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 또는 심장혈관 질환(cardiovascular disease)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 31**

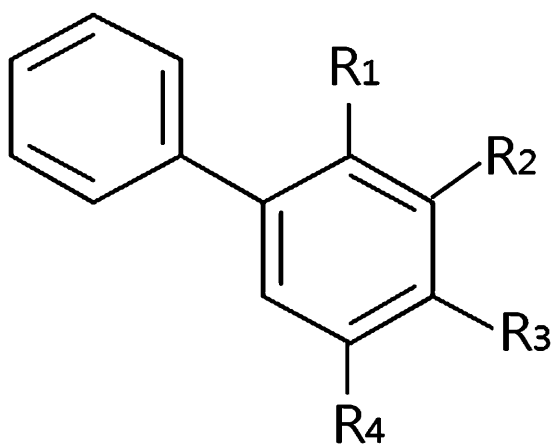
제 29 항에 있어서,

상기 이상지질혈증 질환은 혈중에 총 콜레스테롤, 저밀도지질단백질-콜레스테롤(LDL-cholesterol), 또는 중성지방이 증가된 상태로서, 고지혈증, 고중성지방혈증, 또는 고콜레스테롤혈증인 것을 특징으로 하는, 조성물.

**청구항 32**

하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, PCSK9 및 LDLR 결합 억제용 조성물:

[화학식 17]



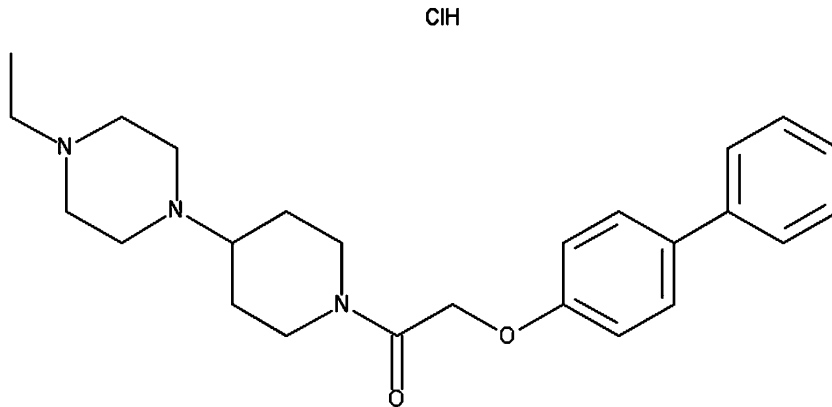
$R_1$ 은 H 또는  $O(CH_2)_2O(CH_2)_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$  중 어느 하나이고,  $R_2$ 는 H이고,  $R_3$ 는 H,  $OCH_2CON(CH_2)_4CHN(CH_2)_4NCH_2CH_3$  또는  $O(CH_2)_3NH(CH_2)_2N(CH_2)_4O$  중 어느 하나이고,  $R_4$ 는 H이다.

청구항 33

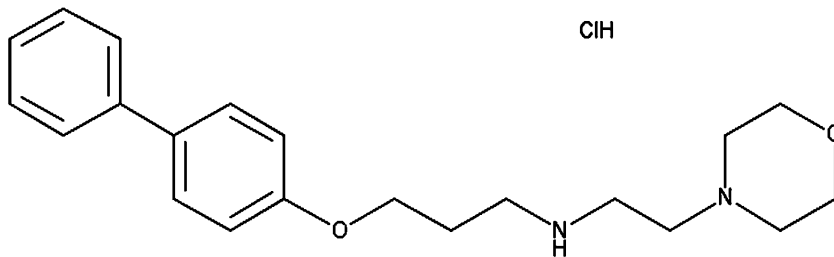
제 32 항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 19 내지 21로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

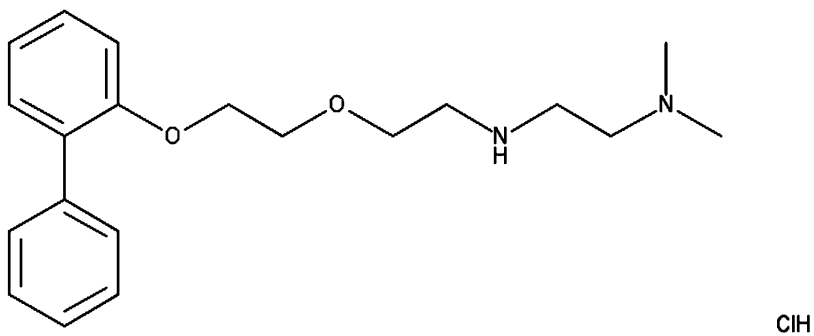
[화학식 19]



[화학식 20]



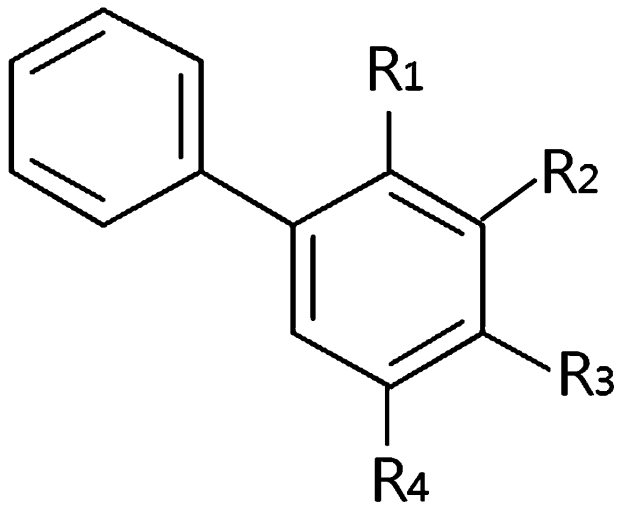
[화학식 21]



청구항 34

스타틴계 화합물 및 하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물:

[화학식 17]



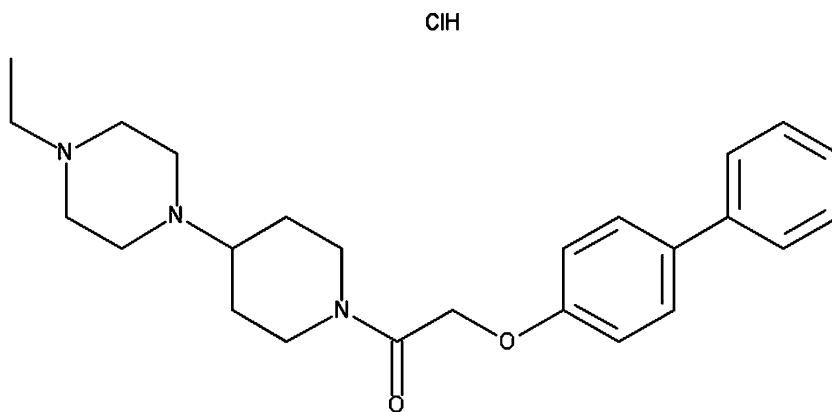
R<sub>1</sub>은 H 또는 O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 중 어느 하나이고, R<sub>2</sub>는 H이고, R<sub>3</sub>는 H, OCH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHN(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 또는 O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>O 중 어느 하나이고, R<sub>4</sub>는 H이다.

### 청구항 35

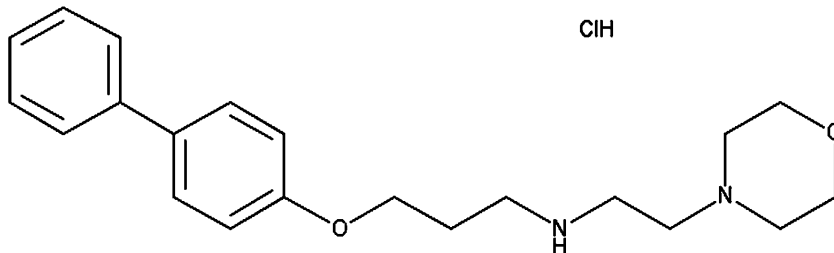
제 34 항에 있어서,

상기 화학식 17로 표시되는 화합물은 하기 화학식 19 내지 21로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

[화학식 19]

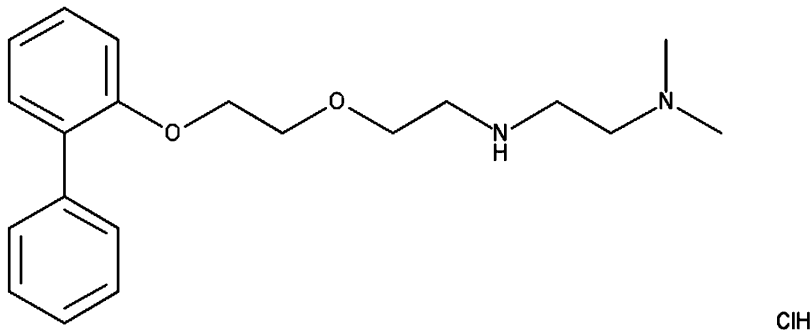


[화학식 20]





[화학식 21]



#### 청구항 36

제 34 항에 있어서,

상기 콜레스테롤 관련 질환은 대사성 질환(metabolic disease) 또는 이상지질혈증(dyslipidemia) 질환인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 37

제 36 항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 또는 심장혈관 질환(cardiovascular disease)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 38

제 36 항에 있어서,

상기 이상지질혈증 질환은 혈중에 총 콜레스테롤, 저밀도지질단백질-콜레스테롤(LDL-cholesterol), 또는 중성지방이 증가된 상태로서, 고지혈증, 고중성지방혈증, 또는 고콜레스테롤혈증인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 39

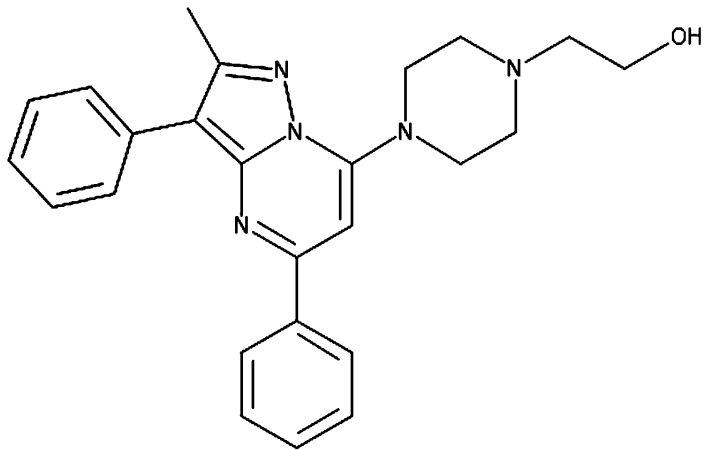
제 34 항에 있어서,

상기 스타틴계 화합물은 로바스타틴(lovastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin), 세리바스타틴(cerivastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin) 또는 이들의 염 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

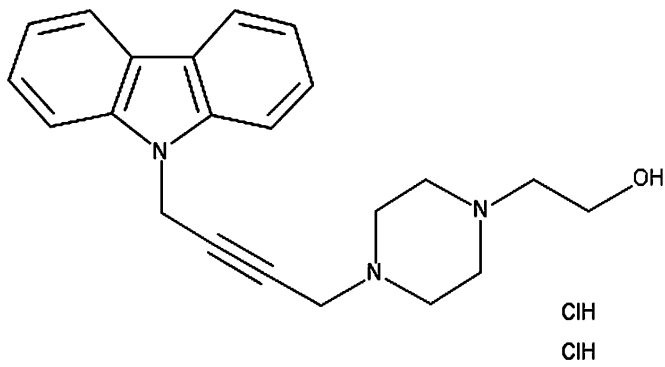
#### 청구항 40

하기 화학식 18, 화학식 22, 화학식 23, 화학식 24, 화학식 25 및 화학식 26으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물:

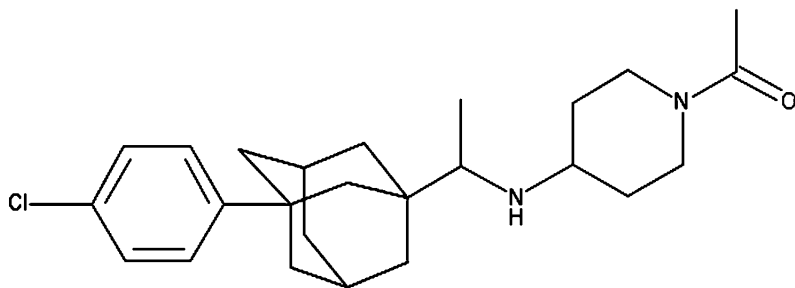
[화학식 18]



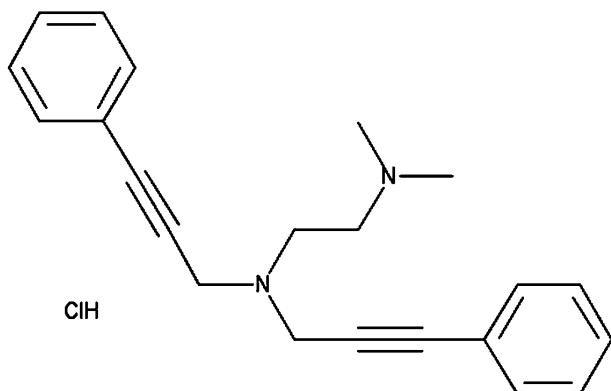
[화학식 22]



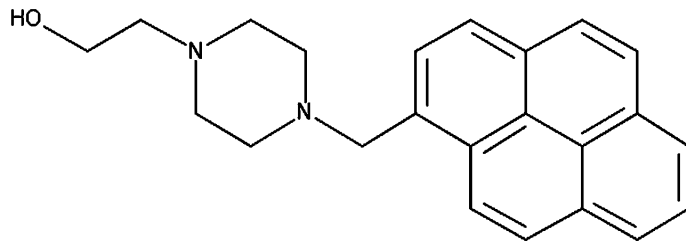
[화학식 23]



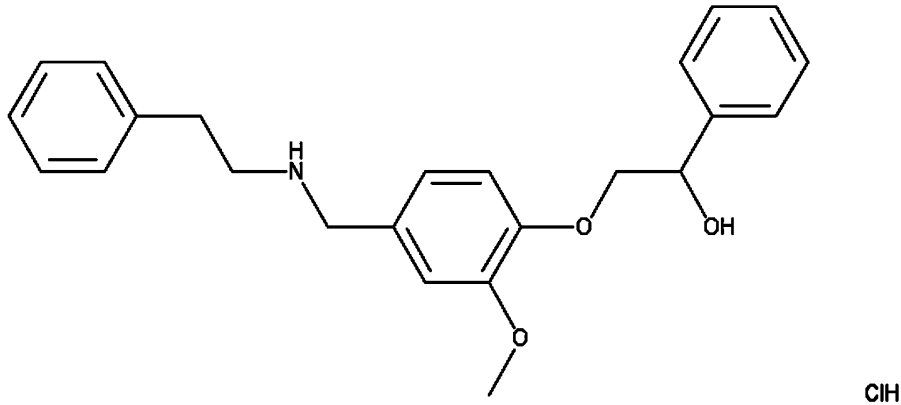
[화학식 24]



[화학식 25]



[화학식 26]



#### 청구항 41

제 40 항에 있어서,

상기 콜레스테롤 관련 질환은 대사성 질환(metabolic disease) 또는 이상지질혈증(dyslipidemia) 질환인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 42

제 41 항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 또는 심장혈관 질환(cardiovascular disease)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

#### 청구항 43

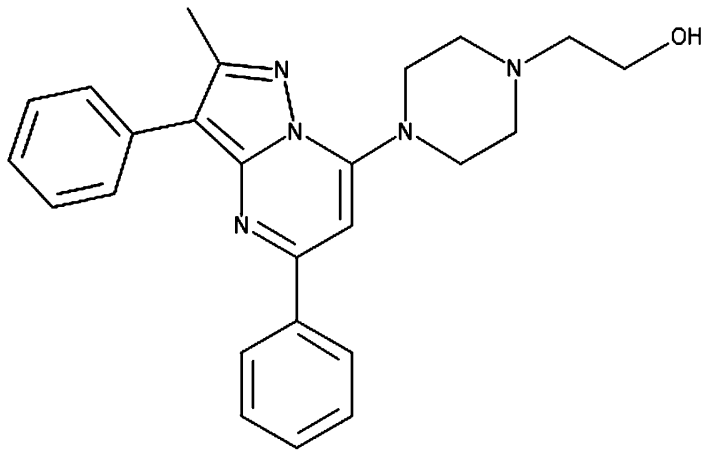
제 41 항에 있어서,

상기 이상지질혈증 질환은 혈중에 총 콜레스테롤, 저밀도지질단백질-콜레스테롤(LDL-cholesterol), 또는 중성지방이 증가된 상태로서, 고지혈증, 고중성지방혈증, 또는 고콜레스테롤혈증인 것을 특징으로 하는, 조성물.

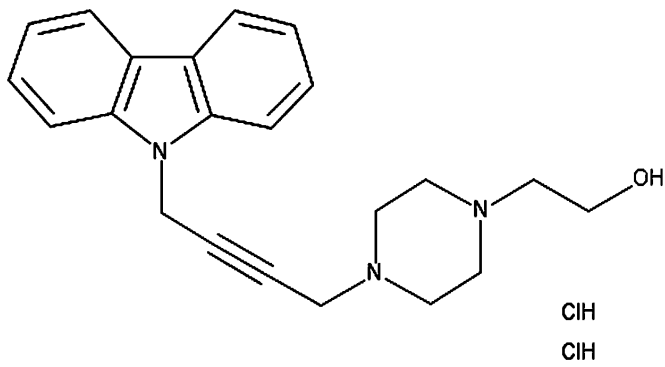
#### 청구항 44

하기 화학식 18, 화학식 22, 화학식 23, 화학식 24, 화학식 25 및 화학식 26으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, PCSK9 및 LDLR 결합 억제용 조성물:

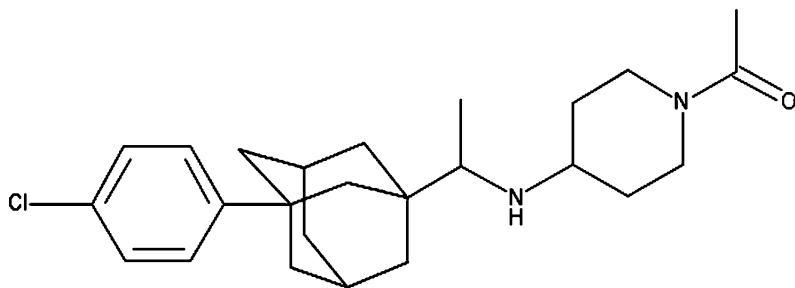
[화학식 18]



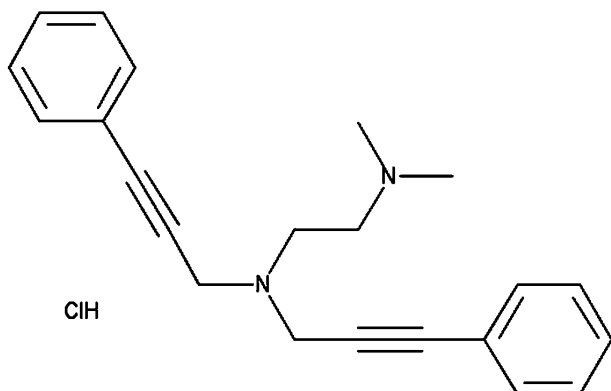
[화학식 22]



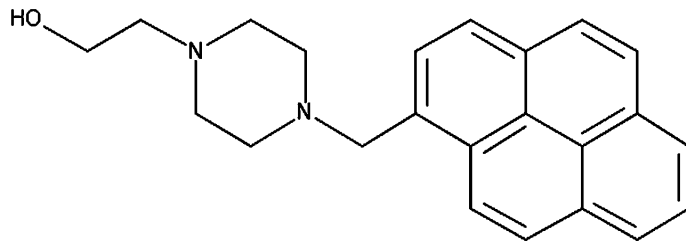
[화학식 23]



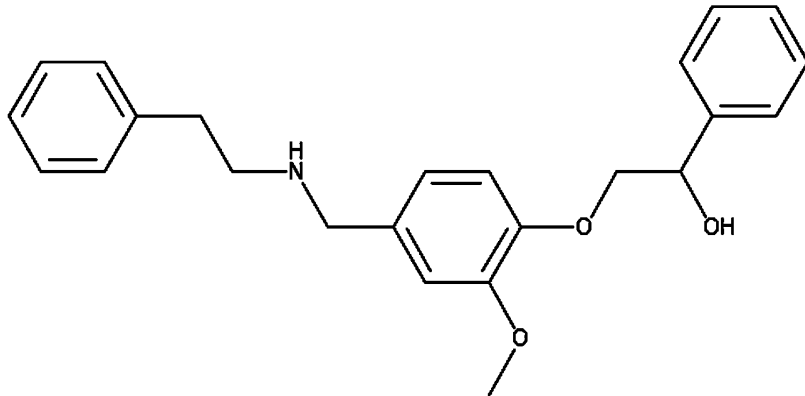
[화학식 24]



[화학식 25]



[화학식 26]

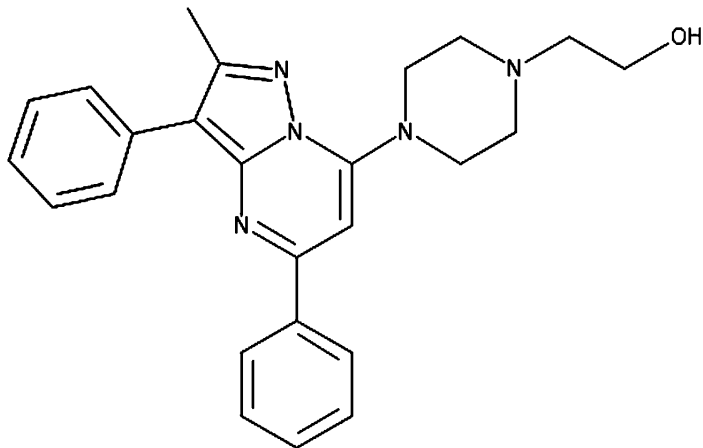


ClH

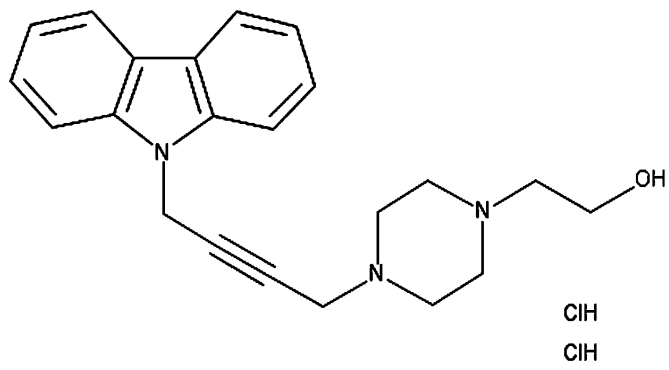
#### 청구항 45

하기 화학식 18, 화학식 22, 화학식 23, 화학식 24, 화학식 25 및 화학식 26으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물과 스타틴계 화합물을 유효성분으로 포함하는, 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물:

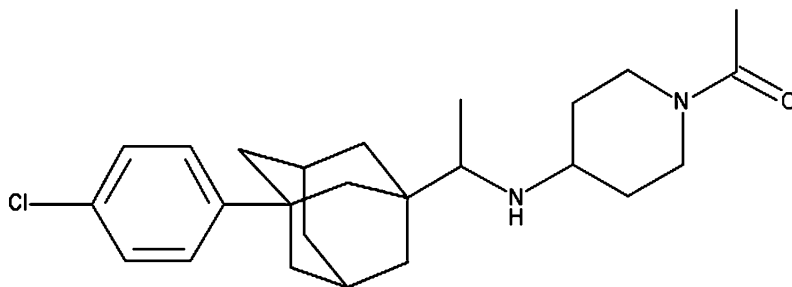
[화학식 18]



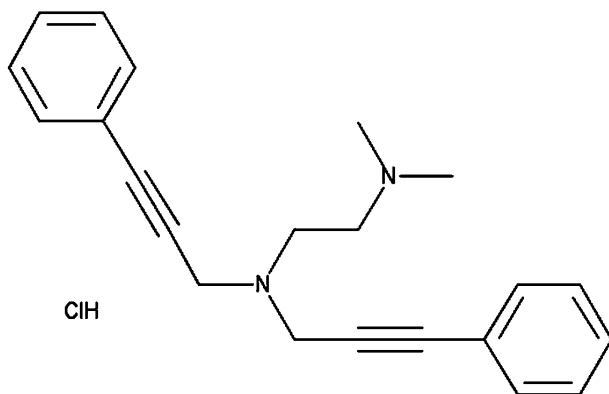
[화학식 22]



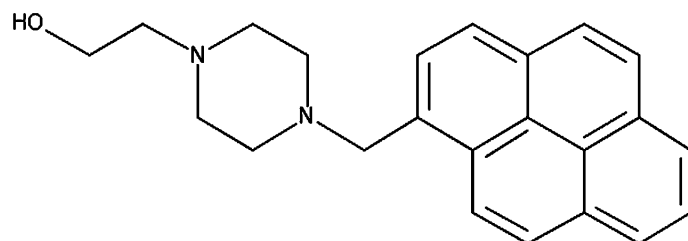
[화학식 23]



[화학식 24]



[화학식 25]





대사되어 배설되게 함으로써 최종적으로 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키는 방법이다.

[0003] 간에서 콜레스테롤의 생성을 억제하는 물질로 가장 많이 사용되는 약물은 스타틴(statin) 계열의 약물이다. 스타틴 계열의 약물은 콜레스테롤 합성 과정 중에 관여하는 HMG-CoA 환원효소(reductase)의 활성을 억제하여 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키며, 2차적으로 세포막의 저밀도지질단백질수용체의 발현을 증가시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 스타틴 계열의 약물은 근육 독성으로 인한 근육 통증, 혈당 증가로 인한 당뇨병의 발생, 정신착란, 혼미 등의 신경학적 이상 증가 등의 부작용을 종종 나타내는 것으로 알려져 있고, 스타틴 복용에도 콜레스테롤 농도가 조절되지 않는 환자들이 늘어남에 따라 새로운 혈중 콜레스테롤 수치를 낮출 수 있는 약물의 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 한편, 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 9형(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 단백질은 간에서 세포막에 존재하는 저밀도지질단백질수용체의 EGF-A 도메인(domain)과 결합하여 저밀도지질단백질수용체가 라이소좀(lysosome)에 의해서 분해되도록 함으로써, 저밀도지질단백질수용체의 양적인 감소를 초래하여 혈중 콜레스테롤 농도를 높이는 역할을 한다는 것이 밝혀지면서, PCSK9 억제제를 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추는데 사용하고자 하는 시도들이 활발히 일어나고 있다(Trends in Biochemical Sciences (2007) 32: 71-77).

[0005] 또한, 스타틴 계열의 약물의 경우 PCSK9의 발현을 증가시키는 작용을 하는 것으로 알려지면서, 스타틴 계열의 약물의 LDL-콜레스테롤 감소 효능이 투여 용량에 비례하여 증가하지 않는 이유를 저밀도지질단백질수용체를 감소시키는 PCSK9의 발현이 동시에 증가되기 때문으로 설명하게 되었고, 이는 스타틴 계열의 약물과 함께 PCSK9 억제제를 병용투여 한다면 치료 효과를 상승시킬 것을 시사하여 PCSK9 억제제에 대한 개발이 더욱 각광받고 있다. 그러나 최근 가장 활발히 개발되고 있는 간에서 PCSK9의 발현을 직접적으로 억제하는 약물들의 경우 다른 부작용들의 발생 위험성이 높아 이에 대한 논쟁이 계속되고 있는 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 직접 간에서 PCSK9의 발현을 억제하는 것이 아니라 PCSK9과 LDLR의 결합을 억제하는 화합물들을 선별하여, 이를 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0007] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물, 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예에는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

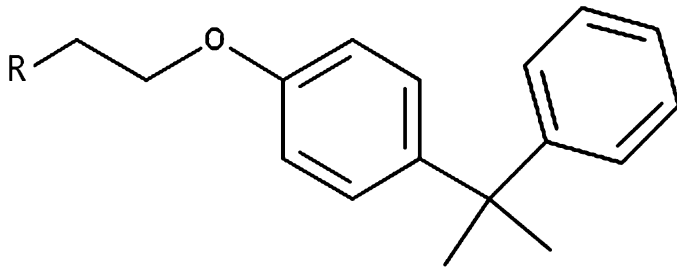
[0010] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 PCSK9 및 LDLR 결합 억제용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 스타틴계 화합물 및 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.



[0013] [화학식 1]

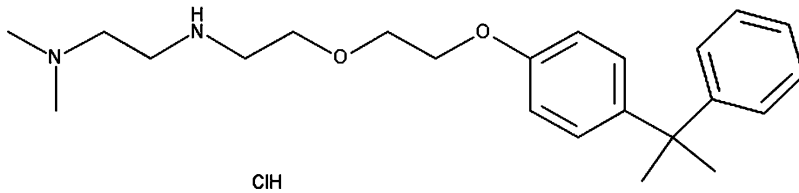


[0014]

[0015] R은  $N(CH_3)_2$ ,  $N(CH_2)_4NH$ ,  $CH_2NH(CH_2)_3OCH_3$ ,  $CH_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$ ,  $NH(CH_2)_3$  또는  $O(CH_2)_2NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$  중 어느 하나이다.

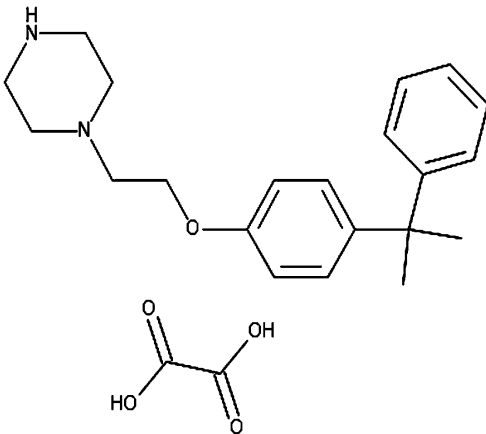
[0016] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 바람직하게는 하기 화학식 2 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0017] [화학식 2]



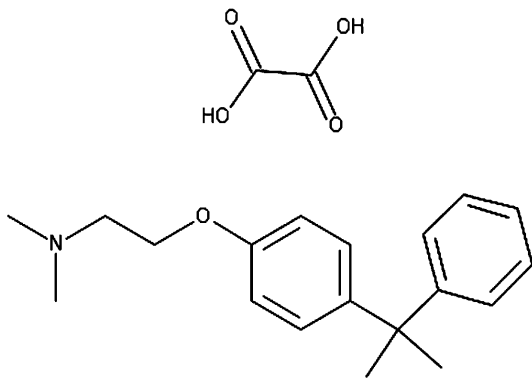
[0018]

[0019] [화학식 3]



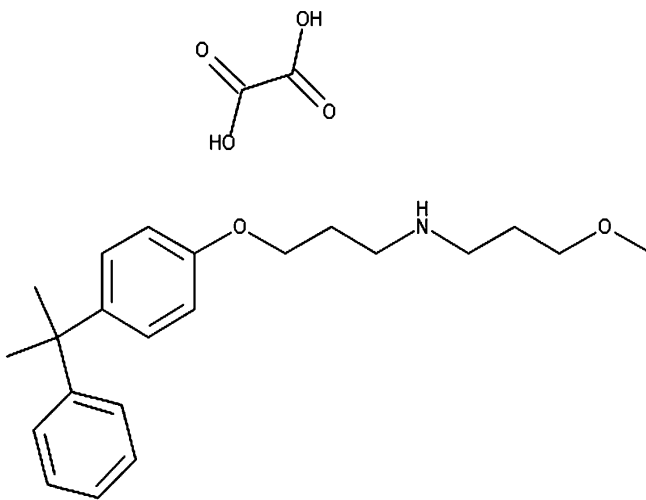
[0020]

[0021] [화학식 4]



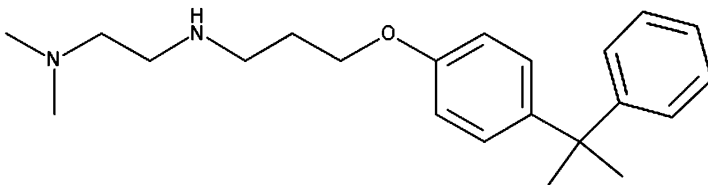
[0022]

[0023] [화학식 5]



[0024]

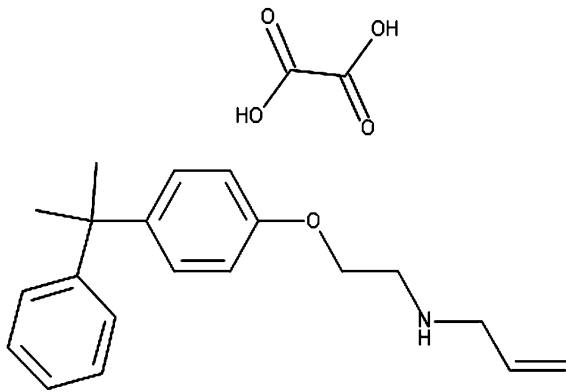
[0025] [화학식 6]



[0026]

ClH

[0027] [화학식 7]



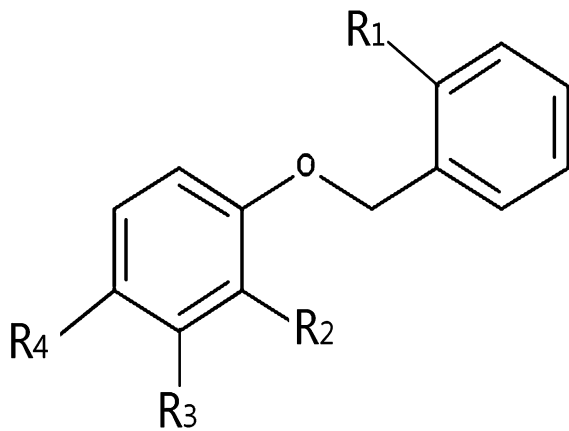
[0028]

[0030] 또한, 본 발명은 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 PCSK9 및 LDLR 결합 억제용 조성물을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 스타틴계 화합물 및 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0033] [화학식 8]

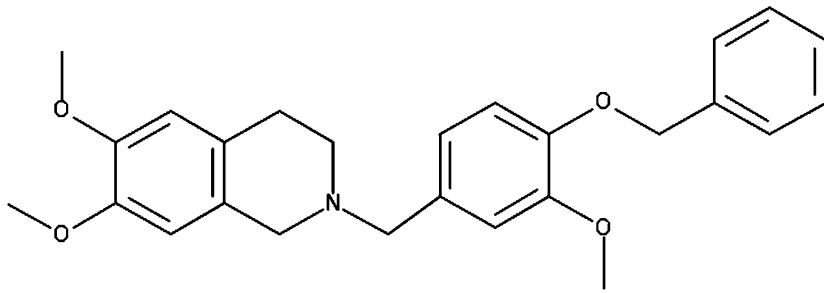


[0034]

[0035] R<sub>1</sub>은 H, Cl 또는 CH<sub>3</sub> 중 어느 하나이고, R<sub>2</sub>는 H, OCH<sub>3</sub> 또는 O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>O 중 어느 하나이고, R<sub>3</sub>는 H, CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHCON(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>O 또는 CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHCON(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> 중 어느 하나이고, R<sub>4</sub>는 CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C<sub>2</sub>(CH)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 또는 CH<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>O 중 어느 하나이다.

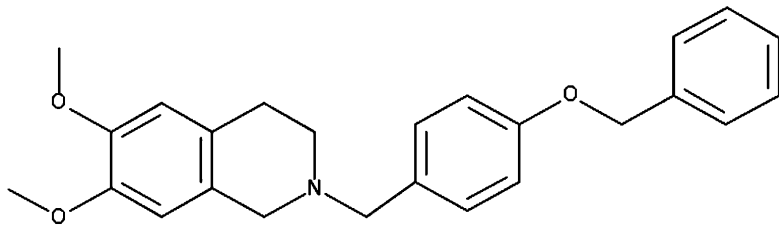
[0036] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 화학식 8로 표시되는 화합물은 바람직하게는 하기 화학식 9 내지 16으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0037] [화학식 9]



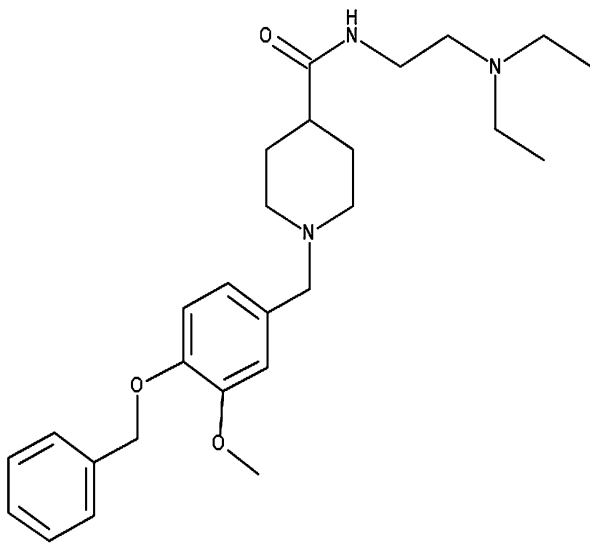
[0038]

[0039] [화학식 10]



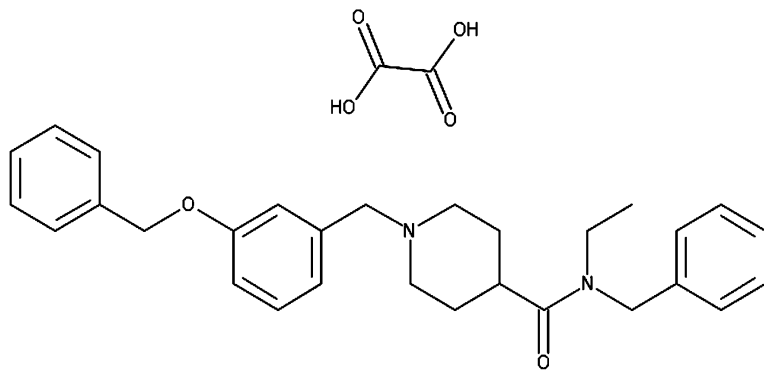
[0040]

[0041] [화학식 11]



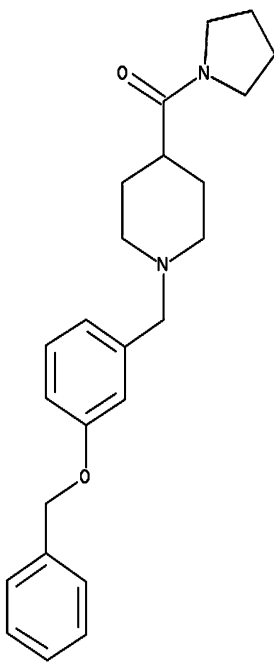
[0042]

[0043] [화학식 12]



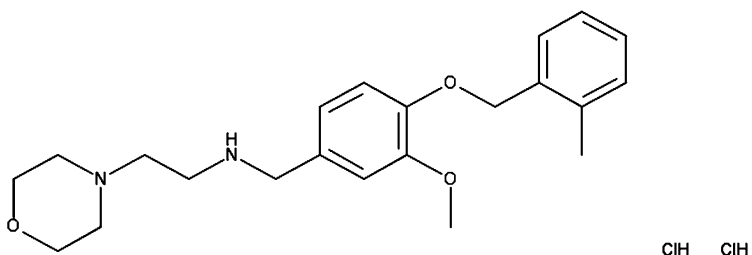
[0044]

[0045] [화학식 13]



[0046]

[0047] [화학식 14]

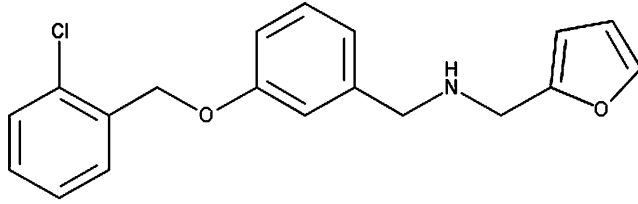


[0048]

ClH ClH

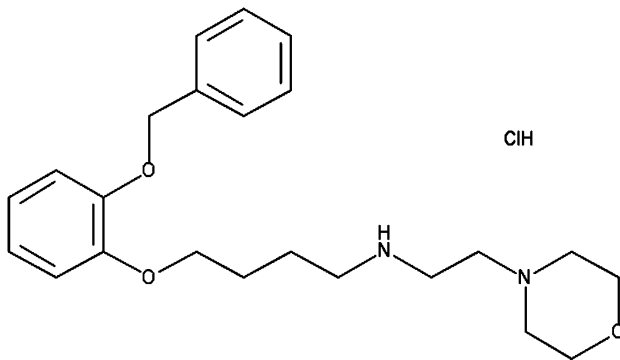
[0049] [화학식 15]

ClH



[0050]

[0051] [화학식 16]



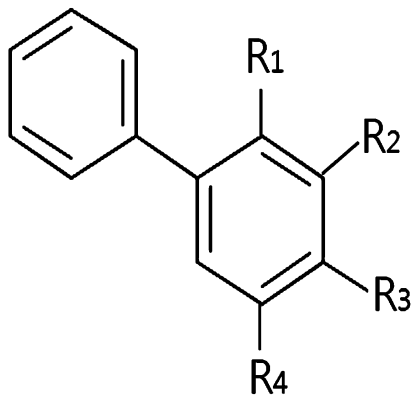
[0052]

[0054] 또한, 본 발명은 하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0055] 또한, 본 발명은 하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 PCSK9 및 LDLR 결합 억제용 조성물을 제공한다.

[0056] 또한, 본 발명은 스타틴계 화합물 및 하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0057] [화학식 17]

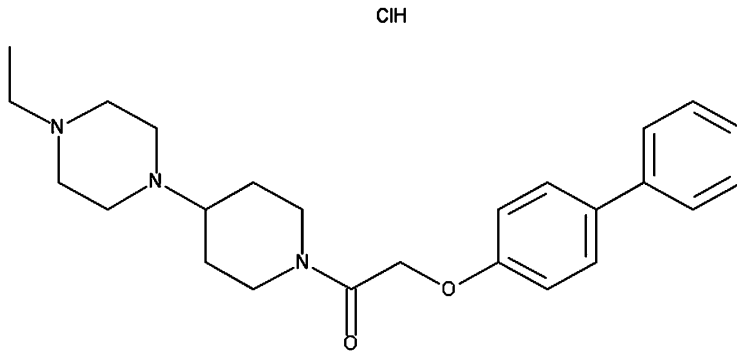


[0058]

[0059] R<sub>1</sub>은 H 또는 O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 중 어느 하나이고, R<sub>2</sub>는 H이고, R<sub>3</sub>는 H, OCH<sub>2</sub>CON(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CHN(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 또는 O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>O 중 어느 하나이고, R<sub>4</sub>는 H이다.

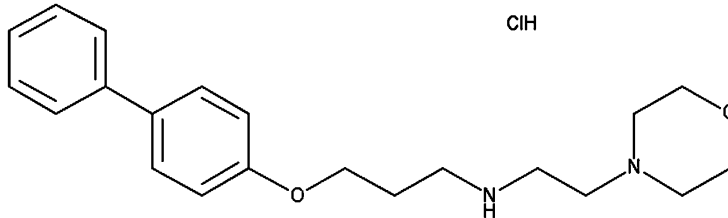
[0060] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 화학식 17로 표시되는 화합물은 바람직하게는 하기 화학식 19 내지 21로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0061] [화학식 19]



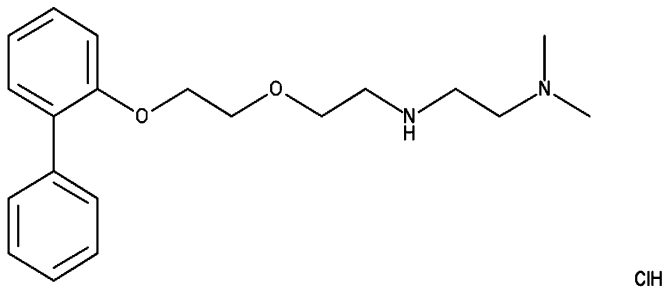
[0062]

[0063] [화학식 20]



[0064]

[0065] [화학식 21]



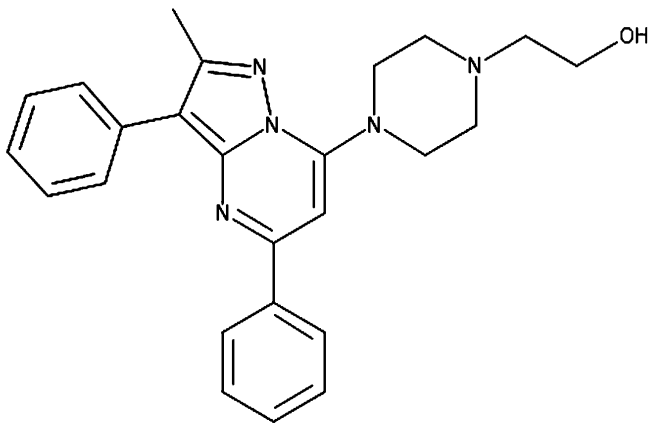
[0066]

[0068] 또한, 본 발명은 하기 화학식 18, 화학식 22, 화학식 23, 화학식 24, 화학식 25 및 화학식 26으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0069] 또한, 본 발명은 하기 화학식 18, 화학식 22, 화학식 23, 화학식 24, 화학식 25 및 화학식 26으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 PCSK9 및 LDLR 결합 억제용 조성물을 제공한다.

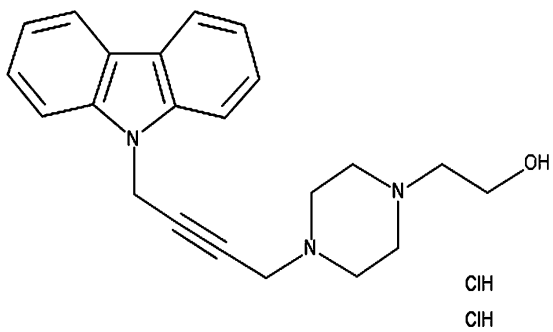
[0070] 또한, 본 발명은 스타틴계 화합물 및 하기 화학식 18, 화학식 22, 화학식 23, 화학식 24, 화학식 25 및 화학식 26으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0071] [화학식 18]



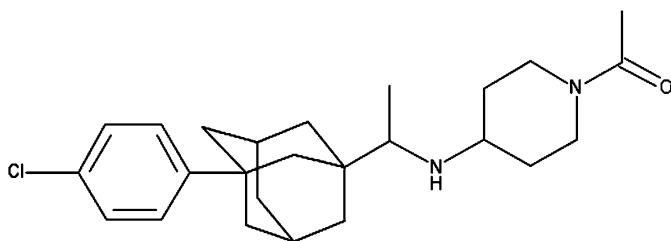
[0072]

[0073] [화학식 22]



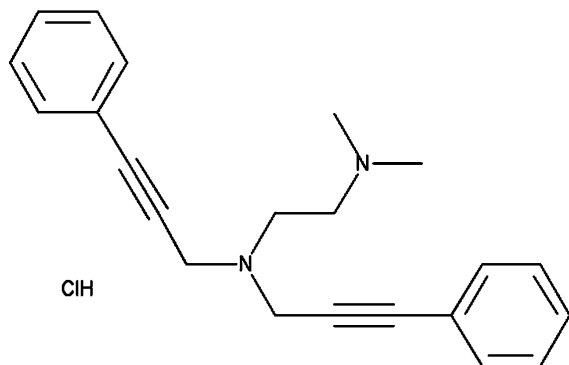
[0074]

[0075] [화학식 23]



[0076]

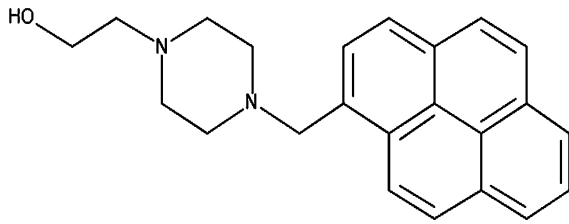
[0077] [화학식 24]



[0078]

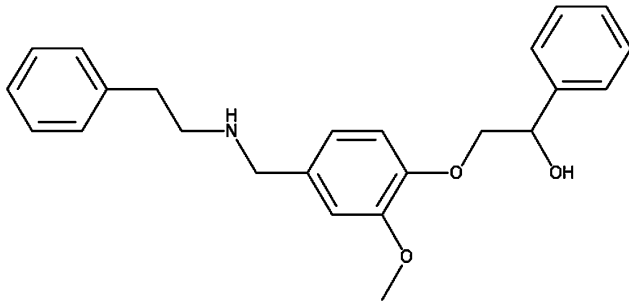


[0079] [화학식 25]



[0080]

[0081] [화학식 26]



ClH

[0082]

[0084] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 콜레스테롤 관련 질환은 바람직하게는 대사성 질환(metabolic disease), 이상 지질혈증(dyslipidemia) 질환 등일 수 있다. 상기 대사성 질환은 바람직하게는 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 심장혈관 질환(cardiovascular disease) 등일 수 있으며, 상기 이상지질혈증 질환은 혈중에 총 콜레스테롤, 저밀도지단백질-콜레스테롤(LDL-cholesterol), 또는 중성지방이 증가된 상태로서, 바람직하게는 고지혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤혈증 등일 수 있다. 그러나 혈중 콜레스테롤 수치가 증가된 상태(혈장 콜레스테롤 수치 포함) 및/또는 LDL-콜레스테롤이 증가되어 발생할 수 있는 질환이라면 이에 제한되지 않는다.

[0085] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 스타틴계 화합물은 바람직하게는 로바스타틴(lovastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin), 세리바스타틴(cerivastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin) 등일 수 있으나, HMG-CoA 환원효소(reductase) 억제제(inhibitor) 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0087] 본 발명에 있어서 상기 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0088] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0089] 본 발명에 따른 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0090] 본 발명의 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.

### 발명의 효과

[0091] 본 발명에 따른 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물은 간에서 PCSK9 및/또는 LDLR의 발현량을 직접적으로 조절하지 않아 이로 인한 부작용을 낮출 수 있으며, PCSK9과 LDLR의 결합을 효과적으로 억제하여 혈장의 총 콜레스테롤 수치는 효과적으로 낮추는 동시에 스타틴 계열의 약물과 병용투여 시 스타틴 계열 약물의 치료효과를 더욱 상승시킬 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0092] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 in vitro 실험 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 in vivo 실험 결과를 나타낸 도면이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

### [0095] 실시예

#### [0097] 실시예 1: PCSK9-LDLR 결합 억제제의 선별

##### [0098] 1.1. PCSK9-LDLR 결합 억제 예상 화합물의 선별

[0099] 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 9형(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 단백질과 저밀도지질단백질수용체(low density lipoprotein receptor, LDLR)와의 결합(interaction)을 억제할 것으로 예상되는 화합물을 선별하기 위하여, 1차적으로 Protein Data Bank를 이용하여 중성 pH에서 LDLR의 EGF-A 도메인과 결합된 PCSK9 단백질의 3차 결정 구조를 결정하였다. LDLR과 결합하는 PCSK9 단백질의 부위는 PCSK9 단백질의 367번째 아미노산부터 381번째 아미노산까지의 부위로 설정하였다(Proceedings of National Academy of Science (2008) 105:1820-1825). 이후 결정 구조에서 EGF-A 도메인을 제거하고, 물 분자(water molecule) 및 수소 원자(hydrogen atoms)가 제거된 PCSK9의 결정 구조를 다시 재생성하였다. 그리고 ChemBridge Express collection이 보유하고 있는 약 450,000개의 화합물과 재생성된 PCSK9의 결정 구조와의 결합 수치(docking score)를 GOLD software(version 4.0.1)를 이용하여 각각 측정하였다(Proteins (2003) 52(4): 609-623). 측정 시에는 각각의 화합물 당 최고 10번의 결합 위치(docked poses)를 200%의 선별 효율(searching efficiency)을 가지고 결합 수치를 확인할 수 있도록 측정하였다. 측정된 결합 수치가 높은 상위 100개의 화합물을 선별하고, 선별된 화합물은 ChemBridge에서 구매하였다.

##### [0101] 1.2. PCSK9-LDLR 결합 억제 실험

[0102] 실시예 1.1에서 선별된 100개의 화합물이 PCSK9-LDLR 결합을 억제하는지 확인하기 위하여, CircuLex PCSK9-LDLR in vitro binding assay kit(MBL international)를 이용하여 PCSK9-LDLR 결합 억제 실험을 실시하였다. 각각의 화합물 10ug과 100ng의 His-tagged PCSK9을 100uL의 용량에서 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, LDLR의 EGF-AB 펩타이드(peptide)가 코팅되어 있는 ELISA용 플레이트로 옮겨 다시 1시간 동안 반응시켰다. 결합하지 않는 His-Tagged PCSK9을 세척하여 제거한 후 His-tag에 대한 항체 용액을 제조사의 방법에 따라 반응시킨 후 발색 시약을 첨가하여 His-tag과 ELISA 플레이트의 EGF-AB 펩타이드의 결합물을 확인하고, 대조군(화합물을 처리하지 않고 화합물의 용매로 사용된 DMSO가 처리된 군)과 비교하여 결합 억제율(Relative inhibition %)을 측정하였다. 예를 들어, relative inhibition이 40%라 함은 화합물이 존재할 경우 PCSK9과 EGF-AB의 결합력이 대조군에 비하여 60%임을, 즉, 결합물이 40% 감소되었음을 의미한다. 그 결과는 표 1에 나타내었다.

### [0104] 1.3. PCSK9 및 LDLR의 발현량 측정 실험

[0105] 실시예 1.1에서 선별된 100개의 화합물이 세포에서 PCSK9 및/또는 LDLR의 발현에 영향을 주는지 확인하기 위하여, HepG2 세포주(ATCC: HB-8065)를 이용하여 세포 내의 PCSK9 및 LDLR의 발현량을 측정하였다. 우선 HepG2 세포를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 첨가된 배지 A(medium A: 100unit/mL penicillin, 100ug/mL streptomycin sulfate, DMEM)에서 12-well plate의 각 well당  $2 \times 10^5$  cell이 되도록 배양하였다. 16시간 후에 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척하고, 10% 탈지된 혈청(delipidated serum, DLPS)이 첨가되어 있는 배지 A로 교환한 다음 시험하고자 하는 각각의 화합물을 10ug/mL이 되도록 첨가한 후에 24시간 동안 세포와 함께 배양하였다. 배양된 세포는 다시 PBS로 2회 세척한 다음 면역학적 분석(immunoblot analysis)을 위하여 회수하였다. 회수된 세포는 NUN 완충용액(0.33M NaCl, 1.1M urea, 1% Nonidet P-40, 25mM HEPES(pH7.6), proteinase inhibitors(1mM dithiothreitol, 10 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml pepstatin A, 1mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 및 50 µg/ml ALLN))을 이용하여 용해시켰다. 세포가 용해된 용액의 단백질의 양을 정량한 후에 Laemmli 시료용 완충용액을 처리하고, 100℃에서 5분간 가열하고 25ug의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide 겔을 이용하여 전기영동한 후 Hybond-ECL 막(membrane)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 blocking buffer A(1X PBS, 0.1% Tween 20, 5% nonfat milk)에 담가 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후에 1:1,000으로 희석한 다클론성 항체(polyclonal antibody)인 LDLR 항체 또는 PCSK9 항체를 각각 처리한 후에 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 막은 0.1% Tween 20이 첨가되어 있는 1X PBS를 이용하여 15분 동안 1회 세척하고, 5분간 2회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하고, 1:52,000으로 희석된 horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit IgG(Pierce, Rockford, IL USA)가 포함되어 있는 blocking buffer A에서 다시 반응시킨 후에 다시 동일한 방법으로 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 세척된 막은 ECL 용액을 사용하여 현상(developing)하였다. 기본값으로는 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)에 대한 항체를 이용하였다. 현상된 필름 상의 PCSK9과 LDLR에 해당하는 각각의 밴드의 강도를 ImageJ를 이용하여 측정하였고, 각각의 발현량은 대조군인 DMSO를 처리한 군과 비교하여 증가된 단백질의 양을 배수로 계산하였다. 즉, 발현량이 1.3이라면, 이는 대조군과 비교하여 단백질의 발현량이 1.3배 증가되었음을 의미한다. 그 결과는 표 1에 나타내었다.

### [0107] 1.4. LDL-콜레스테롤 흡수율 측정 실험

[0108] 실시예 1.1에서 선별된 100개의 화합물이 세포 내에서 저밀도지질단백질-콜레스테롤(low density lipoprotein(LDL)-cholesterol)의 흡수에 영향을 주는지 확인하기 위하여, HepG2 세포주(ATCC: HB-8065)를 이용하여 세포 내의 LDL 양을 측정하였다. 우선 HepG2 세포를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 첨가된 배지 A(medium A: 100unit/mL penicillin, 100ug/mL streptomycin sulfate, DMEM)에서 12-well plate의 각 well당  $2 \times 10^5$  cell이 되도록 배양하였다. 16시간 후에 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척하고, 10% 탈지된 혈청(delipidated serum, DLPS)이 첨가되어 있는 배지 A로 교환하여 주고 각각의 화합물을 10ug/mL이 되도록 첨가한 후에 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포는 다시 PBS로 2회 세척한 다음 형광이 표지된 Dil-LDL(Biomedical Technology Inc.)을 첨가하고 2시간 동안 추가 배양한 후에 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다. 또한, 관찰이 종료된 세포는 트립신(trypsin)-EDTA를 처리하여 회수한 후에 FACScalibur flow cytometer를 이용하여 세포 내의 형광량을 측정하고, 대조군(화합물을 처리하지 않은 실험군)과 비교하여 LDL 흡수율(Dil-LDL uptake)을 배수(fold value)로 나타내었다. 예를 들어, 화합물의 Dil-LDL uptake 값이 1.3이면, 이는 DMSO를 처리한 대조군과 비교하여 그 형광의 수치(형광량)가 1.3배 증가되었으며, 이는 Dil-LDL가 세포 내로

흡수된 정도가 대조군과 비교하여 1.3배 증가되었음을 의미한다. 그 결과는 표 1에 나타내었다. Lab No.는 검증 과정에 임의로 부여한 번호이고, ChemBridge ID는 ChemBridge사의 website에서 제공하는 화합물의 ID이다.

표 1

Lab No. *	Docking score	ChemBridge ID	분자량	Relative Inhibition	Dil-LDL Uptake	LDLR 발현량	PCSK9 발현량
CB_1	28.40	5323858	348.5	36.8%	1.55	1.72	0.97
CB_2	27.26	5422509	419.5	49.7%	1.97	1.58	0.97
CB_3	27.12	5423970	389.5	43.9%	1.85	1.42	0.53
CB_4	28.18	5428460	400.5	31.7%	1.35	0.93	0.60
CB_5	27.15	5573554	276.3	10.7%	1.08	1.03	0.29
CB_6	27.20	5646807	393.5	17.2%	0.85	0.91	0.68
CB_7	27.00	5679233	405.5	12.6%	1.11	0.77	0.75
CB_8	28.45	5781565	415	37.3%	1.49	1.40	1.07
CB_9	28.82	5834186	445.5	12.9%	0.90	0.84	0.57
CB_10	27.78	5851930	404.5	9.9%	0.85	0.93	0.76
CB_11	27.27	5862390	397.3	4.5%	0.94	0.81	0.49
CB_12	28.36	5865258	430.2	-2.0%	1.08	0.74	0.68
CB_13	28.17	6577494	455.6	41.4%	1.66	1.77	1.54
CB_14	27.13	6578587	442.6	46.6%	2.26	1.20	1.90
CB_15	27.10	6579857	379.5	22.9%	1.41	1.44	1.07
CB_16	27.37	7000500	388.5	14.1%	1.01	0.26	0.01
CB_17	28.26	7011653	327.5	45.0%	1.56	0.92	1.11
CB_18	27.90	7017850	299.4	49.9%	1.56	0.69	0.98
CB_19	27.50	7021996	341.5	38.3%	1.59	1.37	1.20
CB_20	29.19	7300311	380.5	-1.6%	1.05	0.87	0.86
CB_21	28.47	7319736	355.9	47.5%	1.36	1.09	0.72
CB_22	27.42	7497360	449.6	11.6%	0.97	1.19	1.23
CB_23	27.95	7596514	463.6	11.7%	0.87	1.15	0.99
CB_24	27.52	7597336	422.6	12.9%	0.80	0.80	0.75
CB_25	27.75	7682179	484	12.1%	1.06	1.18	0.66
CB_26	27.48	7732594	385.4	53.4%	0.94	0.56	0.59
CB_27	27.31	7736937	376.4	14.4%	0.95	0.88	0.86
CB_28	28.26	7796312	416.5	-4.5%	0.90	0.79	0.98
CB_29	27.12	7877851	416.5	3.3%	0.76	1.32	0.74
CB_30	27.83	7883245	408.3	20.2%	0.95	1.10	1.34
CB_31	27.05	7891362	354.4	13.0%	0.87	0.87	0.91
CB_32	27.04	7922733	385.8	19.0%	0.81	0.64	0.20
CB_33	28.85	7925242	341.5	52.7%	1.85	1.86	1.80
CB_34	27.05	7925467	382.4	-2.5%	0.73	0.87	0.52
CB_35	27.18	7926470	386.9	-12.0%	0.99	0.87	0.10
CB_36	29.63	7926604	371.5	49.3%	1.69	1.57	1.22
CB_37	27.06	7941561	416.6	11.3%	0.99	0.29	0.29
CB_38	28.99	7949973	437.5	-3.2%	0.95	1.37	0.40
CB_39	27.87	7962923	432.9	10.0%	1.05	0.81	1.01
CB_40	29.17	7966968	383.5	39.9%	1.57	1.08	1.00
CB_41	27.18	7968349	372.5	12.6%	1.09	0.76	0.55
CB_42	28.00	7969162	453.5	33.6%	1.07	0.93	0.81
CB_43	27.40	7983219	430.9	31.4%	1.49	1.04	0.80
CB_44	27.58	7984456	405.9	18.2%	1.46	1.43	1.15
CB_45	28.76	7990813	440.5	-6.5%	1.08	0.83	0.98
CB_46	27.70	7998682	384.4	30.9%	1.15	0.92	0.76
CB_47	27.38	9024196	384.5	22.9%	1.31	0.99	0.68
CB_48	27.11	9025824	346.5	25.0%	1.09	1.08	0.67
CB_49	27.63	9070071	371.5	30.5%	1.39	1.43	1.64
CB_50	27.47	9148410	415.5	38.7%	1.39	1.17	1.15

CB_51	26.99	7127155	468.5	-2.6%	0.95	0.74	0.85
CB_52	26.99	7010655	295.4	15.4%	1.80	1.41	0.60
CB_53	26.98	6707210	409.6	28.4%	1.74	1.16	0.75
CB_54	26.98	7980928	391.9	2.6%	1.74	1.09	0.87
CB_55	26.97	7059604	448.4	-5.3%	1.03	0.51	0.67
CB_56	26.95	9006787	370.4	26.1%	1.02	1.40	0.50
CB_57	26.94	6991769	318.5	12.5%	2.18	1.10	0.46
CB_58	26.89	7116267	469.6	-27.9%	1.49	1.43	0.23
CB_59	26.86	6587027	339.8	-5.8%	1.18	0.53	0.00
CB_60	26.85	5537034	332.4	4.6%	0.94	0.61	0.16
CB_61	26.84	6578162	459.6	14.9%	1.03	1.26	0.74
CB_62	26.81	9011745	356.4	4.7%	1.02	0.70	0.15
CB_63	26.81	7913488	402.5	-11.1%	0.90	0.45	0.57
CB_64	26.79	6447900	400.5	-0.6%	2.04	1.27	0.72
CB_65	26.79	7261073	353.5	-1.8%	1.17	0.98	0.26
CB_66	26.78	7943026	493.4	10.2%	1.93	0.83	0.60
CB_67	26.75	5252938	378.4	-10.6%	1.08	0.44	0.79
CB_68	26.74	5426872	389.5	10.0%	0.52	0.65	0.41
CB_69	26.74	7970741	345.5	5.8%	1.22	1.18	0.88
CB_70	26.73	9025813	348.4	9.8%	2.06	1.23	0.59
CB_71	26.69	7547620	361.4	-8.5%	1.01	0.68	0.41
CB_72	26.69	5723280	330.4	25.8%	1.21	1.06	1.28
CB_73	26.68	5425499	345.5	18.9%	1.93	1.76	1.26
CB_74	26.67	7968546	341.5	19.6%	1.94	1.48	1.49
CB_75	26.67	5665101	459.5	-1.5%	1.23	0.52	0.75
CB_76	26.66	7873145	381.5	7.0%	1.10	0.70	0.33
CB_77	26.66	9036091	337.4	16.0%	1.18	0.82	1.06
CB_78	26.64	7543524	368.4	-2.7%	1.44	0.77	0.23
CB_79	26.62	5427177	398.5	52.3%	1.76	0.98	0.62
CB_80	26.62	7924529	299.4	6.9%	1.49	1.36	1.18
CB_81	26.62	7232922	431.5	-10.0%	1.35	1.20	0.15
CB_82	26.61	6759201	397.6	12.1%	1.32	1.65	1.45
CB_83	26.61	9014232	327.8	22.5%	2.08	0.97	0.61
CB_84	26.59	7997500	377.5	11.9%	1.34	1.62	1.80
CB_85	26.59	7924880	329.5	18.6%	1.44	1.31	1.22
CB_86	26.58	9038237	348.4	8.4%	1.54	1.22	0.89
CB_87	26.55	7966644	385.5	11.2%	1.80	1.60	1.37
CB_88	26.48	7595292	373.9	3.3%	1.09	0.65	0.08
CB_89	26.48	7968661	475.5	3.2%	1.26	1.21	0.39
CB_90	26.47	7839314	389.4	6.2%	0.76	1.47	0.95
CB_91	26.44	7889540	366.4	2.5%	1.12	2.08	0.76
CB_92	26.43	9030034	422.4	1.1%	1.46	1.44	0.59
CB_93	26.41	6484579	375.5	2.3%	1.18	1.26	0.78
CB_94	26.39	7280568	366.5	-5.6%	1.11	1.03	0.91
CB_95	26.35	7934110	416.5	-12.5%	0.91	1.19	0.64
CB_96	26.34	6659178	403.4	-11.3%	1.01	0.59	0.86
CB_97	26.33	9019728	371.5	-0.2%	1.44	0.97	1.01
CB_98	26.32	7633305	397.4	6.0%	1.05	0.97	0.05
CB_99	26.31	7791626	434.6	11.5%	0.91	0.74	0.84
CB_100	26.24	7933432	444.5	-3.0%	0.85	0.62	0.68

### 1.5. 결합 수치와 실험 결과의 비교

GOLD 프로그램을 이용하여 측정한 결합 수치(docking score, 실시예 1.1)와 *in vitro* 실험을 통하여 측정한 효과(실시예 1.2 내지 1.4)의 연관관계를 확인하기 위하여, SPSS statistics software(version 20)을 이용하여

Spearman's rank order correlation coefficient method를 수행하였다. 그 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

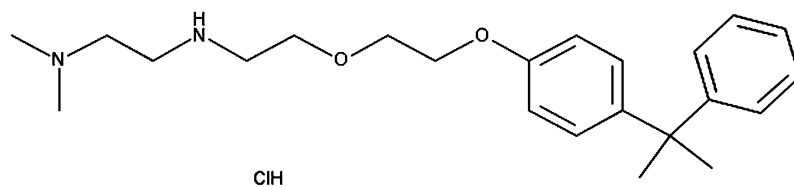
매개변수(parameter)	결합수치	결합 억제율	LDL 흡수	LDLR발현량	PCSK9발현량
결합수치(docking score)	1.000	0.444	-0.049	0.008	0.192
결합억제율(relative inhibition)	0.444	1.000	0.400	0.334	0.409
LDL흡수(Dil-LDL uptake)	-0.049	0.400	1.000	0.516	0.313
LDLR발현량(amount of LDLR)	0.008	0.334	0.516	1.000	0.478
PCSK9발현량(amount of PCSK9)	0.192	0.409	0.313	0.478	1.000

표 2에 나타난 바와 같이, 결합 수치는 결합 억제율과는 높은 연관관계( $\rho=0.444$ ,  $P<0.01$ )를 나타내는 반면, LDL 흡수 및 LDLR 발현량과는 연관관계가 낮은 것을 확인하였다. 그리고 결합 억제율의 경우에는 LDL 흡수( $\rho=0.400$ ,  $P<0.01$ ), LDLR 발현량( $\rho=0.334$ ,  $P<0.01$ ), 및 PCSK9 발현량( $\rho=0.409$ ,  $P<0.01$ )과 모두 높은 연관관계를 나타내는 것을 확인하였다. LDL 흡수는 LDLR 발현량과 가장 높은 연관관계( $\rho=0.516$ ,  $P<0.01$ )를 나타내는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 컴퓨터를 이용하여 측정한 결합 수치 만으로는 PCSK9-LDLR 결합을 효과적으로 억제할 수 있는 화합물을 선별하는데는 한계가 있으나, immunoblot 실험에 의한 PCSK9 혹은 LDLR의 발현량 변화, LDL 흡수력, PCSK9-LDLR 결합 억제력 측정 등의 추가적인 실험을 병행할 경우 효과적인 PCSK9-LDLR 결합 억제제(PCSK9-LDLR binding inhibitor)를 선별할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 실시예 2: 화합물의 농도의존적(dose-dependent) PCSK9-LDLR 결합 억제능 확인

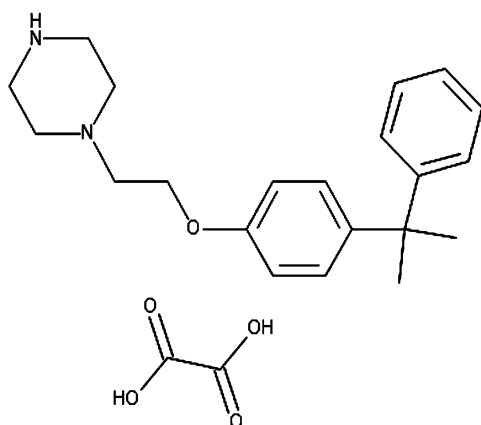
표 1에서 가장 높은 결합 수치를 나타냈던 N,N-디메틸-N'-(2-{2-[4-(1-메틸-1-페닐에틸)페녹시]에톡시}에틸)-1,2-에탄디아민 하이드로클로라이드([화학식 2], CB\_36, ChemBridge ID: #7926604, N,N-dimethyl-N'-(2-{2-[4-(1-methyl-1-phenylethyl)phenoxy]ethoxy}ethyl)-1,2-ethanediamine hydrochloride)와 구조적 유사체(3D analog)인 1-{2-[4-(1-메틸-1-페닐에틸)페톡시]에틸}피페라진 옥살레이트([화학식 3], ChemBridge ID: #7632817, 1-{2-[4-(1-methyl-1-phenylethyl)phenoxy]ethyl}piperazine oxalate) 및 N,N-디메틸-2-[4-(1-메틸-1-페닐에틸)페녹시]에탄아민 옥살레이트([화학식 4], ChemBridge ID: #7338220, N,N-dimethyl-2-[4-(1-methyl-1-phenylethyl)phenoxy]ethanamine oxalate)을 이용하여, PCSK9-LDLR 결합 억제능을 확인하였다.

#### [화학식 2]



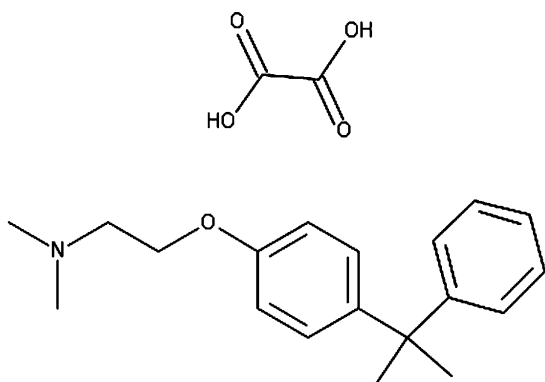


[0124] [화학식 3]



[0125]

[0126] [화학식 4]



[0127]

[0129] PCSK9-LDLR 결합 억제능은 실시예 1과 동일한 방법으로 LDLR 및 PCSK9 발현량, 그리고 DiI-LDL 흡수율을 측정하여 확인하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0130] 도 1에 나타난 바와 같이, 세 개의 화합물 모두 투여량에 따라 LDLR 및 PCSK9 발현량을 증가시키는 것을 확인하였다(도 1A). #7632817의 경우에는 20ug/mL에서 LDLR 및 PCSK9 발현량이 모두 감소되는 것을 확인하였으나, 이는 화합물에 의한 감소효과라고 판단되기보다 세포 독성(cytotoxicity)으로 인하여 세포가 사멸되었기 때문인 것으로 추정된다(도 1A). DiI-LDL 흡수율은 #7926604의 경우에는 5ug/mL의 농도로 처리하였을 때 대조군과 비교하여 1.69배 증가하였고, #7632817의 경우에는 10ug/mL의 농도로 처리하였을 때 2.13배 증가하여 가장 높은 흡수율을 나타내었으며, #7338220의 경우에는 30ug/mL의 농도로 처리하였을 때에도 1.37배 증가하여 가장 낮은 흡수율을 나타내는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, CB\_36 및 2개의 유사 구조 화합물의 경우 모두 HepG2 세포주에서 LDL-콜레스테롤의 흡수를 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였으며, 이를 통하여, 세 가지 화합물 모두 PCSK9-LDLR 결합 억제제로서 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키는데 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 결과들을 통하여, 본 발명자들이 사용한 방법에 의하여 선별된 화합물들이 콜레스테롤 관련 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있는 PCSK9-LDLR 결합 억제제로 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0132] 실시예 3: PCSK9-LDLR 결합 억제제의 추가 선별

[0133] 세포 독성을 나타내는 화합물을 제외하고, 나머지 화합물들의 PCSK9-LDLR 결합 억제능을 확인하기 위하여 실시예 2와 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 그 결과, CB\_1(#5323858; [화학식 22]; 2-{4-[4-(9H-carbazol-9-yl)-2-butyln-1-yl]-1-piperazinyl}ethanol dihydrochloride), CB\_2(#5422509; [화학식 9]; 2-[4-(benzyloxy)-3-methoxybenzyl]-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline), CB\_3(#5423970; [화학식 10]; 2-[4-

(benzyloxy)benzyl]-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline), CB\_8(#5781565; [화학식 23]; 1-acetyl-N-{1-[3-(4-chlorophenyl)-1-adamantyl]ethyl}-4-piperidinamine), CB\_13(#6577494; [화학식 13]; 1-[4-(benzyloxy)-3-methoxybenzyl]-N-[2-(diethylamino)ethyl]-4-piperidinecarboxamide), CB\_14(#6578587; [화학식 12]; N-benzyl-1-[3-(benzyloxy)benzyl]-N-ethyl-4-piperidinecarboxamide oxalate), CB\_15(#6579857; [화학식 13]; 1-[3-(benzyloxy)benzyl]-4-(1-pyrrolidinylcarbonyl)piperidine), CB\_19(#7021996; [화학식 5]; (3-methoxypropyl){3-[4-(1-methyl-1-phenylethyl)phenoxy]propyl}amine oxalate), CB\_33(#7925242; [화학식 6]; N,N-dimethyl-N'-{3-[4-(1-methyl-1-phenylethyl)phenoxy]propyl}-1,2-ethanediamine hydrochloride), CB\_49(#9070071; [화학식 14]; N-{3-methoxy-4-[(2-methylbenzyl)oxy]benzyl}-2-(4-morpholinyl)ethanamine dihydrochloride), CB\_50(#9148410; [화학식 18]; 2-[4-(2-methyl-3,5-diphenylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl)-1-piperazinyl]ethanol), CB\_52(#7010655; [화학식 7]; N-{2-[4-(1-methyl-1-phenylethyl)phenoxy]ethyl}-2-propen-1-amine oxalate), CB\_53(#6707210; [화학식 19]; 1-{1-[(4-biphenyloxy)acetyl]-4-piperidinyl}-4-ethylpiperazine hydrochloride), CB\_57(#6991769; [화학식 24]; N,N-dimethyl-N',N'-bis(3-phenyl-2-propyn-1-yl)-1,2-ethanediamine hydrochloride), CB\_73(#5425499; [화학식 25]; 2-[4-(1-pyrenylmethyl)-1-piperazinyl]ethanol), CB\_74(#7968546; [화학식 20]; [3-(4-biphenyloxy)propyl][2-(4-morpholinyl)ethyl]amine hydrochloride), CB\_83(#9014232; [화학식 15]; {3-[(2-chlorobenzyl)oxy]benzyl}(2-furylmethyl)amine hydrochloride), CB\_84(#7997500; [화학식 26]; 2-(2-methoxy-4-{[(2-phenylethyl)amino]methyl}phenoxy)-1-phenylethanol hydrochloride), CB\_85(#7924880; [화학식 21]; N'-{2-[2-(2-biphenyloxy)ethoxy]ethyl}-N,N-dimethyl-1,2-ethanediamine hydrochloride), 및 CB\_87(#7966644; [화학식 16]; {4-[2-(benzyloxy)phenoxy]butyl}[2-(4-morpholinyl)ethyl]amine hydrochloride) 화합물이 PCSK9-LDLR 결합을 억제하며, LDLR 및 PCSK9 발현량을 증가시키며, 동시에 HepG2 세포주에서 LDL-콜레스테롤의 흡수를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0135] 상기 결과들을 통하여, 결합 수치를 예측하여 선별된 100개의 화합물 중 총 23개의 화합물이 (i) PCSK9과 LDLR의 결합을 억제하며, (ii) HepG2 세포에서 Dil-LDL의 흡수(uptake)를 증가시키는 동시에 (iii) PCSK9과 LDLR의 결합 억제로 인하여 LDLR의 발현량이 증가되는 것을 확인하였으며, 이를 통하여, 상기 추가된 화합물들이 PCSK9-LDLR 결합 억제제로서 낮은 세포 독성을 나타낼 뿐만 아니라 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키는데 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

#### [0137] 실시예 4. 화합물에 의한 마우스에서 혈중 cholesterol 농도 감소능

[0138] in vitro 뿐만 아니라 in vivo 에서도 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키는지 확인하기 위하여, 실시예 1에서 선별된 CB\_36을 이용하여 in vivo 실험을 진행하였다. in vivo 실험을 위하여, 8주차 수컷 C57B/6J 수컷 마우스와 Pcsk9 녹아웃(Pcsk9<sup>-/-</sup>) 마우스를 Jackson Laboratory에서 구매하였고, 20mg/mL의 농도로 DMSO에 보관되어 있는 CB\_36 화합물은 PBS로 희석하여 1mg/kg/day의 농도로 이틀간 꼬리 정맥(tail vein)에 투여하였다. 두번째 투여하고 18시간 후에 실험에 사용한 마우스는 안락사시킨 후, 하대정맥(inferior vena cava)으로부터 채취한 혈액을 2mM EDTA 및 아프로테닌(aprotinin)을 첨가한후 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하였다. 각 마우스의 간(liver)은 immunoblot 분석을 위하여 -70℃에서 실험 전까지 보관하였다. 획득한 혈장의 트리아실글리세롤 농도(concentration of triacylglycerol, TG) 및 콜레스테롤 농도(concentration of total cholesterol, TC)는 Thermo Scientific사의 Infinity™ Triglycerides 및 Infinity™ Cholesterol 시약을 이용하여 측정하였으며 각각의 지질단백질 구성을 비교하기 위하여 FPLC(fast performance liquid chromatography)를 이용하여 콜레스테롤의 농도를 측정하였다. LDLR 및 PCSK9 발현량은 채취한 간 조직을 이용하여 실시예 1.3과 동일한 방법으로 immunoblot 분석을 실시하였다. 그 결과는 표 3 및 도 2에 나타내었다.

표 3

Parameter	Wild type		Pcsk9 <sup>-/-</sup>	
	Control	CB_36	Control	CB_36
Number of mice	6	6	5	5
Body weight(g)	26.5 ± 1.2	26.5 ± 0.3	26.1 ± 0.9	27.4 ± 1.4



Liver weight(g)	1.27 ± 0.12	1.24 ± 0.03	1.23 ± 0.11	1.31 ± 0.15
Liver weight/ Body weight(%)	4.76 ± 0.31	4.68 ± 0.04	4.72 ± 0.40	4.78 ± 0.34
Triglycerides(mg/dl)	77 ± 4	63 ± 5	38 ± 11	34 ± 3
Cholesterol(mg/dl)	71 ± 9	58 ± 10	58 ± 3	68 ± 11

[0142] 표 3에 나타난 바와 같이, CB\_36은 wild type에서 총 콜레스테롤 양을 18%( $P < 0.05$ )를 감소시키는 반면, Pcsk9 녹아웃 마우스에서는 유의성 있는 차이를 보여주지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, CB\_36은 PCSK9 과 LDLR의 결합을 억제하여 in vivo에서도 혈중 콜레스테롤 농도를 효과적으로 낮추는 것을 확인할 수 있었다.

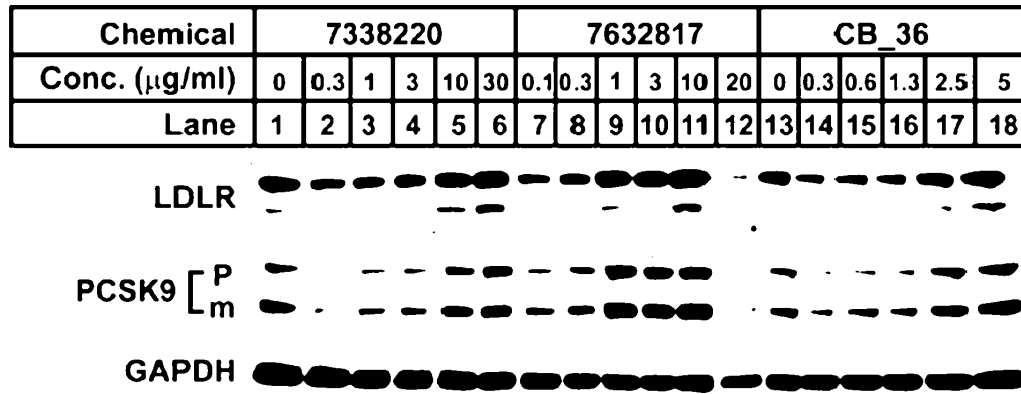
[0143] 또한, 도 2A에 나타난 바와 같이, CB\_36은 wild type 마우스에서 FPLC의 15 내지 22번째 시료인 저밀도지질단백질(low density lipoprotein) 뿐만 아니라 23 내지 30번째 시료인 고밀도지질단백질(high density lipoprotein)도 감소시켜 최종적으로는 혈장의 총 콜레스테롤 수치를 감소시키는 것을 확인하였으며, Pcsk9-/- 마우스에서는 콜레스테롤 수치에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 그리고 도 2B에 나타난 바와 같이, 간 조직에서는 CB\_36에 의해 LDLR 및 Pcsk9의 발현량이 변화하지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과들을 통하여, CB\_36은 혈장에서 총 콜레스테롤 수치를 감소시키지만, 간의 LDLR 및 PCSK9의 발현량에는 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여, PCSK9-LDLR 결합 억제제는 in vivo에서 LDLR 및/또는 PCSK9의 발현량에 영향을 주지 않아, 이로 인한 부작용을 낮출 수 있는 동시에 혈장의 총 콜레스테롤 농도는 효과적으로 감소시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0145] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

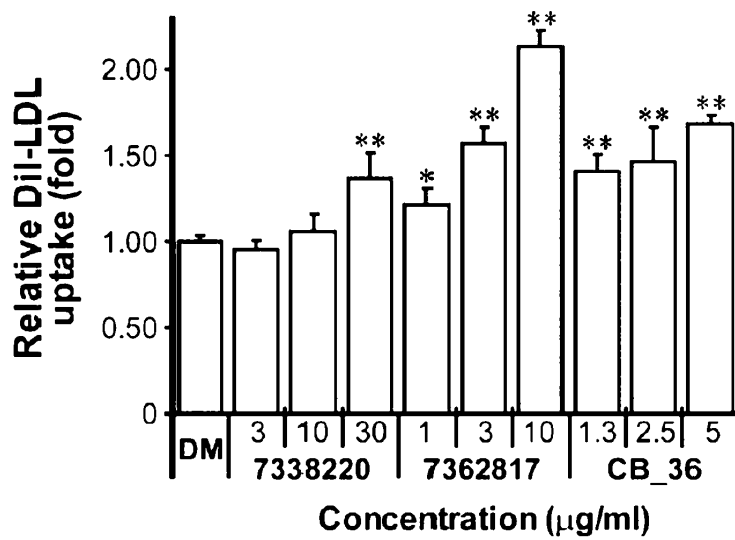
도면

도면1

A.

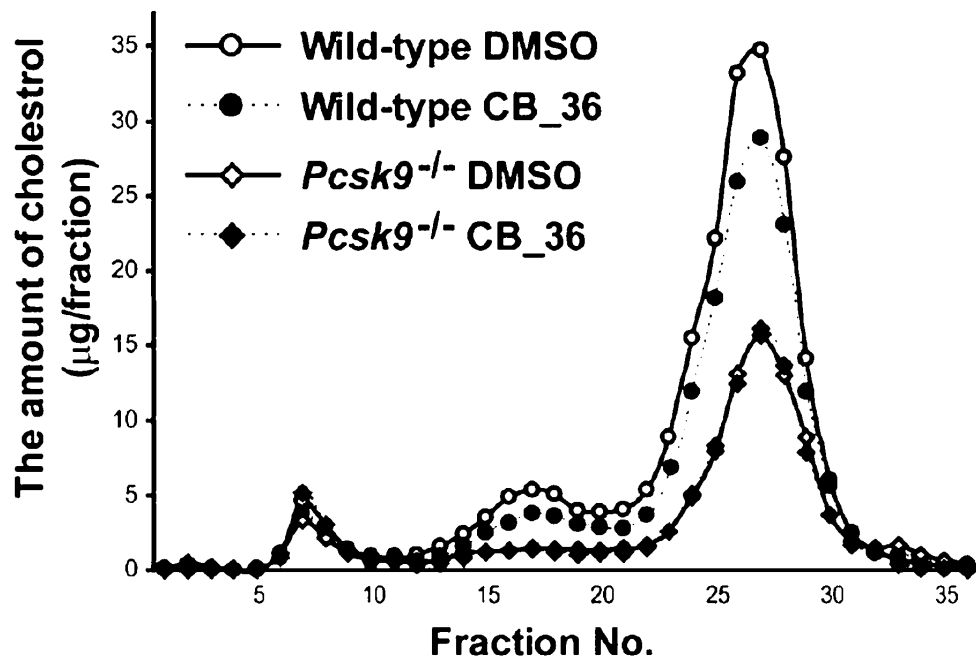


B.



도면2

A.



B.

