

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0042306 (43) 공개일자 2010년04월26일
(51) Int. Cl. A61K 31/366 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0101392 (22) 출원일자 2008년10월16일 심사청구일자 2008년10월16일	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기 획팀 (72) 발명자 박일선 서울특별시 강남구 도곡동 역삼우성아파트 2-108 우은란 광주 동구 산수동 두암타운 아파트 107동 1005호 (74) 대리인 유종완	

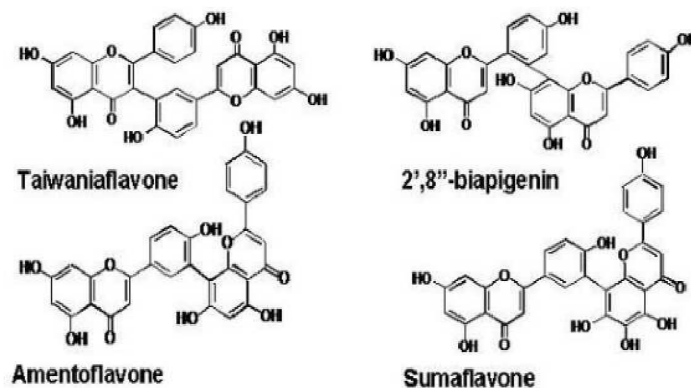
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 베타아밀로이드 독성억제제로서의 플라본이합체

(57) 요약

본 발명은 베타아밀로이드의 독성억제 및 피브릴형성의 억제를 위한 약제 및 영양 제품의 제조를 위한 플라본이합체(dimeric flavone) 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염들 중 하나를 함유한 약제조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 플라본이합체는 부처손(*Selaginella tamariscina*)으로부터 분리된 화합물인 taiwania flavone(TF), 2',8"-biapigenin, amentoflavone, sumafavone을 포함한다. 우리는 상기 플라본이합체들이 베타아밀로이드에 노출된 세포의 생존률을 높이는 데 유력한 효과를 가짐을 확인하였다. 또한 우리는 상기 플라본이합체들이 베타아밀로이드가 독성의 응집체로 진행되는 과정을 초기단계 및 확장단계에서 효과적으로 억제할 수 있음을 분자동력학적 측정으로 확인하였다. 상기 화합물을 함유한 약제조성물은 알츠하이머병과 같이 베타아밀로이드의 독성에 의해 진행되는 뇌신경계 질병에 대한 예방제 및 치료제로서 유용하다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

알츠하이머병에 관여하는 베타아밀로이드의 독성억제를 위한 예방제 및 치료제의 제조를 위한 플라본이합체(dimeric flavone) 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염들 중 하나의 용도.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 플라본이합체는 taiwaniaflavone, 2',8"-blapigenin, amentoflavone, 및 sumafavone 으로 이루어진 일군에서 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 플라본이합체(dimeric flavone) 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염들 중 하나의 용도.

청구항 3

알츠하이머병에 관여하는 베타아밀로이드 독성억제제로서의 플라본이합체(dimeric flavone) 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염들 중 하나를 함유하는 약제조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 의약으로서 유용한 플라본이합체(dimeric flavone) 또는 그의 염의 용도, 및 상기 화합물을 함유한 약제조성물에 관한 것이다. 본 발명의 플라본이합체 또는 그의 염은 알츠하이머 병과 같은 신경학상 질병의 진행에서 중요한 역할을 하는 베타아밀로이드의 독성을 억제할 수 있는바 상기 질병들의 예방제 및 치료제로서 유용하다.

배경기술

[0002] 베타아밀로이드(A β) 펩타이드는 뇌신경퇴행성의 알츠하이머병(AD)의 진행에서 중요한 역할을 한다. A β 펩타이드의 수용성 단량체는 건강한 사람의 혈액이나 뇌척수액에서는 정상적인 대사 생성물로서 소량으로 존재하나, 그 농도는 AD 진행에 따라 현저히 증가한다. 베타아밀로이드는 구성 아미노산 잔기에 따라 다양한 종이 알려져 있으나, AD 환자의 뇌에서는 아미노산 잔기의 수가 각각 40 및 42개인 A β_{40} 및 A β_{42} 가 주성분으로 검출된다. 이 중 A β_{40} 가 더 일반적으로 관찰되나, A β_{42} 는 자발적으로 회합되어 피브릴을 형성하는 경향이 있으며, AD 질병의 병리상태와 밀접하게 관련된 것으로 보고되고 있다.

[0003] A β_{40} 에 비해 A β_{42} 의 회합성향이 큰 이유는 Ile41 및 Ala42 위치에서 추가적으로 존재하는 두 소수성 잔기들이 교차 베타-시트(cross β -sheet) 구조로의 변환을 야기하기 때문이다. A β 펩타이드는 핵생성(nucleation)에 의해 촉진되는 중합과정을 거쳐 점차 피브릴로 전환된다. 이 과정에서 수용성인 올리고머 및 프로토피브릴(protofibril)이 생기는데, 이들이 A β 피브릴형성의 중간체인 것으로 여겨진다. A β 펩타이드에 의해 야기되는 뇌신경의 손상은 상기 수용성 물질들의 축적과 깊은 상관관계를 가지는데, 이들이 AD 발현에 있어서의 주요인자로 여겨진다. 다만, A β 펩타이드의 피브릴형성에 의한 세포사멸의 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다.

[0004] 현재 AD에 대한 치료제는 만족한 수준이 아닌바, 상기 질병의 증상을 완화시키기 위한 다양한 치료제의 개발이 진행되고 있다. 그 예로는 특이성을 가진 항원을 이용하여 A β 독성을 중화시키는 방법, β - 또는 γ -세크리타제의 활성을 조정하는 방법, 항산화성 항염증 화합물을 투여하는 방법, 콜레스테롤을 감소시키는 의약품을 투여하는 방법 등을 들 수 있다. 그러나 상기 방법들은 아직 만족할만한 치료효과를 보이지 못하고 있다.

[0005] AD의 발병에 있어서의 A β 펩타이드의 자기회합의 중요성이 광범위하게 인지되면서, A β 의 피브릴형성의 억제를 통한 치료방안에 대하여 관심이 높아지고 있다. 이러한 이유로, A β 의 피브릴형성의 초기단계를 효과적으로 억제하고 A β 를 비독성 형태로서 안정화시킬 수 있는 소형 분자들이 유력한 AD 치료로서 검토되고 있다. 그 예로는, 커큐민(curcumin), resveratrol, epigallocatechin gallate, rosmarinic acid와 같은 소형 폴리페놀 분자들이 있다. 이 중 최근 주목을 받고있는 커큐민은 피브릴형성을 유발하는 형태(conformation)를 가진 A β 펩타이드에 부착되어 상기 수용성의 올리고머 및 프로토피브릴의 양을 감소시킨다. 커큐민의 아밀로이드독성 억제

활성은 nordihydroguaiaretic acid(NGDA), chrysamine G, RS-0406, 및 콩고레드(congo red)와 같은 다른 소형 분자들에 필적하거나 더 우수하다.

- [0006] 다른 한편으로, 천연 플라보노이드(flavonoid)가 풍부한 식품은 AD 및 기타 뇌신경 이상증상을 감소시키는 것으로 보고되고 있다. 은행나무(Ginkgo biloba) 추출물인 EGb761은 AD에 관련된 치매 및 신경이상증에 도움이 된다. 그러나, 플라보노이드가 제거된 은행나무 추출물 HE208은 아밀로이드 독성을 억제하지 못하는바, 상기 추출물에서 플라보노이드 성분이 아밀로이드 독성 및 세포사멸을 억제하는데 주요 역할을 함을 알 수 있다. 상기 플라보노이드는 AD 치료제로서 광범위하게 연구되고 있으나 이것이 어떠한 작용기제를 통하여 A β 의 회합 및 세포독성을 억제하는 지는 아직 분명히 밝혀지지 않았다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 베타아밀로이드의 회합체 및 프로토피브릴의 형성을 억제하는 물질을 찾아내어, 이를 알츠하이머 질환과 같은 뇌신경계 질병의 치료제로서 개발하고자하는 것이다. 구체적으로, 본 발명에서는 부처손(selaginella tamariscina)의 추출액 중에서 분리한 여러 종류의 플라보노이드 물질들에 대한 조직실험을 통하여, 아밀로이드 독성 및 세포사멸을 억제할 수 있는 일정한 화합물 또는 그의 염의 용도, 및 이를 함유한 약제 조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

- [0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 알츠하이머병에 관여하는 베타아밀로이드 독성억제를 위한 예방제 또는 치료제의 제조를 위한 플라본이합체(dimeric flavone) 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염들 중 하나의 용도를 제공한다.
- [0009] 다른 방법으로, 상기 플라본이합체는 taiwaniaflavone, 2',8"-biapigenin, amentoflavone, 및 sumaflavone으로 이루어진 일군에서 선택된 하나일 수 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 알츠하이머병에 관여하는 베타아밀로이드 독성억제제로서의 플라본이합체(dimeric flavone) 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염들 중 하나를 함유하는 약제조성물을 제공할 수 있다.

효 과

- [0011] 본 발명에 따르면, 베타아밀로이드의 독성억제제로서의 taiwaniaflavone(TF), 2',8"-biapigenin, amentoflavone, sumaflavone 등을 포함하는 플라본이합체(dimeric flavone) 또는 그의 염의 용도, 및 이를 함유한 의약조성물을 제공한다. 우리는 상기 플라본이합체들이 베타아밀로이드에 노출된 세포의 생존률을 높이는 데 유력한 효과를 가짐을 확인하였다. 또한 우리는 상기 플라본이합체들이 베타아밀로이드가 독성의 응집체로 진행되는 과정을 초기단계 및 확장단계에서 억제하는 효과를 가지는 것을 분자동력학적으로 측정하는데 성공하였다. 상기 화합물을 함유한 약제조성물은 알츠하이머병과 같이 베타아밀로이드의 독성에 의해 진행되는 뇌신경계 질병들에 대한 예방제 및 치료제로서 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 베타아밀로이드의 독성 및 피브릴형성을 무력화시킬 수 있는 비교적 작은 크기의 분자를 탐색하는 데서 출발하였다. 이를 위하여 본 발명자들은 부처손(Selaginella tamariscina)의 추출액에 포함된 성분을 중심으로, A β 에 의해 야기되는 세포사멸을 선택적으로 억제할 수 있는 소형 분자를 탐색하였다.
- [0013] 그 결과, 우리는 부처손의 추출액으로부터 분리된 플라본이합체가 상기 기능을 가짐을 관찰한바, 이에 상기 화합물이 알츠하이머병과 같은 뇌신경계 질병들의 치료제로서 사용될 수 있음을 확인하였다. 우리는 특히, 플라보노이드 계열의 화합물 중 플라본이합체가 그 단량체 형태에 비해 아밀로이드 회합체형성 및 독성 억제를 위하여 보다 더 선택적이고 효과적으로 제공될 수 있음을 확인하였다.
- [0014] 도 1은 본 발명에서 다루는 플라본이합체들의 화학구조식들이다.
- [0015] 도 1을 참조하면, 상기 화합물들은 이합체 특유의 대칭적인 구조를 가지며, 코어는 강한 소수성을 가지면서도 그 외각 부위는 복수의 수산기들에 의해 친수성을 가지는바, 이에 따라 다양한 pH의 물에 용해될 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 후술하는 실시 예에 기재된 화합물들로 한정되는 것은 아니고, 상기 플라본이합체로

정의되는 동종 화합물 또는 그의 제약학적으로 허용되는 염도 모두 포함될 수 있다.

[0016] 이하에 본 발명의 화합물에 따른 대표적인 실시예를 설명한다.

[0017] <실시예>

[0018] <물질들>

[0019] 제조합 베타아밀로이드 펩타이드($A\beta_{42}$)는 문헌(Shahanwaz 등, Biochem Biophys Res Commun 359, 801-805, 2007)에 제시된 방법에 의해 정제되었다. Taiwaniaflavone(TF), 2',8"-biapigenin, amentoflavone, 및 sumafavone는 문헌(Pokharel 등, Nitric Oxide 15, 217-225, 2006)에 제시된 방법에 근거하여 분리하였다. Apigenin(AP), thioflavin-T, 및 dimethylsulphoxide(DMSO)는 시그마(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 인산 완충액(Phosphate buffered saline; PBS)은 Amresco(Ohio, USA)로부터 구입하였다. Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 및 Fetal bovine serum(FBS)는 Welgene(대구, 한국)으로부터 구입하였다. 카스파제 기질(caspase substrate)은 A.G. Scientific Inc.(San Diego, USA)로부터 구입하였다. ECL plus western blotting detection kit 는 Amersham biosciences(Piscataway, USA)로부터 구입하였다. 단일클론항체(monoclonal antibody) 6E10는 Signet laboratories(Massachusetts, USA)로부터 구입하였다.

[0020] < $A\beta_{42}$ 용액, 올리고머, 및 피브릴의 제조>

[0021] 정제된 $A\beta_{42}$ 펩타이드는 문헌(Klein 등, Neurochem Int 41, 345-352, 2002)에 제시된 방법에 따라 HFIP 내에서 단량체로서 제조되어, 질소 분위기 하에서 건조되고, 30분간 진공하에 건조된 후 -20°C 에서 보관되었다. 상기 펩타이드는 0.1% NH_4OH 에 의해 2 mg/ml 농도로 용해되어 10분간 소니케이션 된 후, 동일한 부피의 PBS(10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 137 mM NaCl, 및 2 mM KCl)와 혼합되어 본 실험에 제공되었다.

[0022] $A\beta_{42}$ 펩타이드의 올리고머를 제조하기 위하여, 상기 펩타이드는 낮은 농도(1 mM)로 세포배양액에 희석되고, 30 초간 보텍스 된 후, 4°C 에서 24 h 동안 인큐베이트되었다. 이어서, 상기 반응물을 16000 x g 하에서 15 min 동안 원심분리하였다.

[0023] $A\beta_{42}$ 피브릴은 상기 펩타이드의 고농도 용액으로부터 제조되었다. 이를 위하여, $A\beta_{42}$ (50 mM)를 0.02% sodium azide가 있는 PBS 용액에서 37°C 하에서 4 days 동안 인큐베이션 하였다. 상기 시료를 16000 x g 하에서 30 min 동안 원심분리하였고, 그 펠렛상 분획(pellet fraction; fibril)을 PBS를 사용하여 3회 세정하였다. 상기 피브릴은 10분간 소니케이션 되고, 브래드포드 방법(Bradford method)에 의해 정량화되어 즉각 사용되거나 -80°C 에 보관되었다.

[0024] <세포배양 및 독성분석>

[0025] Human neuroblastoma SH-SY5Y 세포는 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS) 및 1% 항생제가 보충된, Dulbecco's modified Eagles Medium 및 Ham's F12(1:1)내에서 5% CO_2 분위기하에 37°C 에서 배양되었다. 상기 세포들은 96-well plates(Nunc, Denmark)내에서 15,000 cells/well의 농도로 시드되어(seeded) 오버나이트 동안 배양되었다. 상기 세포들은 serum-free medium에 다시 넣어져 12 h 동안 추가적으로 배양되었다. $A\beta_{42}$ 및 기타 화학 물질들은 DMSO 농도가 약 0.2%로 유지된 배양액에 재차 희석되었다. 상기 세포들은 다양한 농도의 플라본이합체가 존재하는 $A\beta_{42}$ (0.5 mM) 용액 또는 다른 용액들(toxic insults staurosporine(25 nM), brefeldin A(1 μM), 또는 etoposide(1 μM))에 의해 지시된 바에 따라 12 h 또는 24 h 동안 처리되었다. 상기 세포들에 대한 세포 생존능력 실험자료는 MTT 환원분석에 의해 얻어졌다. 구체적으로, 5 mg/ml MTT 용액(용매: PBS)을 각각의 웰(well)에 20 μl 씩 첨가한 후 배양되었다. 2 h 경과 후, 용해완충액[20% SDS solution in 50%(v/v) DMF(pH 4.7)] 100 μl 를 첨가하였다. 이어서, 12-16 h 후에 마이크로플레이트 리더가 장착된 Spectra Max 190(Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0026] <카스파제 분석 >

- [0027] 상기 human neuroblastoma SH-SY5Y 세포들은 위에 기술한 바와 같이 다양한 농도의 TF 또는 AP의 존재하의 $A\beta_{42}$ (0.5 μ M) 용액 또는 staurosporine(25 nM) 용액에 의해 12 h 동안 처리되었다. 상기 처리된 세포들을 ice-cold PBS를 사용하여 두 번 세정하였다. 이어서, 각각의 웰(well)마다 세포용해완충액(20 mM Hepes-NaOH, pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM phenylmethanesulphonylfluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 5 mg/ml pepstatin A, 2 mg/ml aprotinin, 25 mg/ml ALLN)을 40 μ l 씩 첨가하여 얼음상에서 인큐베이트하였다. 20분이 지난 후, 10 μ M(최종농도)의 fluorogenic caspase-3 substrate(Ac-DEVD-AMC)를 함유하는 카스파제 분석 완충액(20 mM HEPES-NaOH pH 7.0, 20 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 및 10mM DTT) 60 μ l를 첨가하였다. 카스파제 활성화도 측정은 30° C에서 이루어졌고, AMC의 방출은 microplate spectrofluorometer Gemini-XS(Molecular Devices CA, USA)를 사용하여 여기파장 360 nm 및 방출파장 480 nm 조건에서 모니터되었다.
- [0028] <투과전자현미경>
- [0029] $A\beta_{42}$ (0.5 μ M)는 PBS 내에서 그 자체로서, 또는 TF 존재하에, 또는 AP 존재하에 37 °C에서 12 h 동안 인큐베이트되었다. 상기 인큐베이트 용액중 DMSO의 최종 농도는 약 0.2%로 유지되었다. 상기 시료 5 μ l를 Formvar-coated 200-mesh nickel grids 상에 15 min 동안 흡착시킨 후 밤새두었다. 상기 그리드(grid)는 2% 우라닐아세테이트로 1 min 동안 네거티브하게 스테인시키고 증류수로 세정되었다. 이후 상기 시료를 가속전압 80 kV 및 배율 40,000 x의 조건으로 투과전자현미경(Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.
- [0030] <웨스턴 블로팅>
- [0031] $A\beta_{42}$ (0.5 μ M)를 PBS 내에서 그 자체로서, 또는 TF 존재하에, 또는 AP 존재하에 37 °C에서 12 h 동안 인큐베이션 시킨 반응물을 문헌(Zou 등, J Neurosci 22, 4833-4841, 2002)에 제시된 방법에 근거하여 가교반응시켰다. 구체적으로, 상기 반응물에 glutaraldehyde를 5 min 동안 최종농도 0.01%로 첨가하였고, 2 x SDS sample buffer(50 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 및 0.1% β -mercaptoethanol)을 사용하여 상기 가교반응을 완결시켰다. 상기 반응물은 16% sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 상에서 분리되어져 polyvinylidene difluoride membrane(Bio-rad laboratories, Hercules, USA)으로 옮겨졌다. 상기 멤브레인은 0.2% Tween 20을 함유한 Tris-buffered saline 내에서 5% 밀크(milk)를 사용하여 블로킹(blocked)된 후, $A\beta$ (6E10)에 대한 일차단일항체 및 anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody와 함께 프로브(probe)되었다. 상기 멤브레인은 ECL plus reagent kit를 사용하여 영상화되었다.
- [0032] <원편광 이색성(Circular dichroism;CD) 분광분석>
- [0033] $A\beta_{42}$ (20 μ M)의 PBS 용액을 그 자체로서, 또는 TF 존재하에(20 μ M), 또는 AP 존재하에(20 μ M) 37 °C에서 12 h 동안 인큐베이션 하였다. CD 스펙트럼은 1 mm 경로 큐벳 및 Jasco Spectropolarimeter(Jasco Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 190-250 nm 구간에서 1 nm 분해능 및 50 nm/min 스캔속도로 0.5 nm 구간별로 25 ° C에서 기록한 후, 5번 스캔한 것을 평균하여 기록하였다. $A\beta$ 용액 자체(TF 또는 AP의 부존재)의 스펙트럼은 완충액(0.2% DMSO 및 0.004% NH_4OH 를 함유하는 PBS) 백그라운드 스펙트럼을 공제한 상태로 취하였다. 마찬가지로, TF 또는 AP의 존재하의 $A\beta$ 용액의 스펙트럼도 $A\beta$ 를 함유하지 않는 용액의 백그라운드 스펙트럼으로 공제하였다.
- [0034] <티오플라빈 바인딩 분석(Thioflavin binding assay)>
- [0035] $A\beta_{42}$ 피브릴형성에 대한 실험은 티오플라빈-T(thioflavin-T) 염료를 사용하여 37°C에서 수행되었고, 형광측정은 microplate spectrofluorometer(Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 여기파장 445 nm 및 방출파장 490 nm로 모니터하였다. 상기 중합반응의 분석을 위하여, $A\beta_{42}$ (20 μ M)의 PBS용액을 TF 존재하에(0-16 μ M), 또는 AP 존재하에(0-40 μ M) 셰이킹(shaking) 없이 최종 부피 300 μ l로 만들어서 37 °C에서 인큐베이트하였다.
- [0036] 지시된 경과시간들에서, 반응물 20 μ l를 5 mM 티오플라빈-T PBS 용액과 혼합한 후 형광을 측정하였다. 특징적인

S자형을 나타내는 티오플라빈-T의 형광곡선을 하기 식 따라 시간의 함수로서 도표화하였다.

$$\text{Log}[F(t) / \{A - f(t)\}] = at + b$$

여기에서, t 는 반응시간이며, $F(t)$ 는 형광세기를 나타낸다. A 는 $F(\infty)$ 의 수치로서 결정되며, a 및 b 는 각각 기울기 및 절편을 나타낸다.

상기 식을 미분하면 다음의 식을 얻을 수 있다.

$$F'(t) = B F(t) [A - F(t)]$$

여기에서, $B = a \ln 10 / A$ 이며, $F'(t)$ 는 주어진 시간에서 형광세기의 증가율을 나타낸다. $F(t)$ 가 $A/2$ 일때 $F(t)/A - F(t) = 1$ 이며, $F'(t)$ 는 최대치에 이른다. 이 시간은 $t/2$ 라고 칭한다.

첫째 실험으로서, $A\beta_{42}$ 섬유확장에 대한 분석을 위하여, $A\beta_{42}$ 피브릴($1.1 \mu\text{M}$)을 신선한 $A\beta_{42}$ ($20 \mu\text{M}$) 용액에 첨가하고 TF($0-16 \mu\text{M}$) 또는 AP($0-40 \mu\text{M}$)의 존재하에서 인큐베이션 하였다. TF 또는 AP를 첨가하지 않은 시료의 RFU(relative fluorescence unit)를 100%로 간주하면, IC_{50} (피브릴형성을 50% 억제하는데 요구되는 농도)는 형광세기(%)를 $\log(\mu\text{M})$ 단위의 TF 또는 AP 농도의 함수로 도표화함으로써 계산할 수 있다.(Ono 등, J Neurochem 87, 172-181, 2003)

둘째 실험인 피브릴형성 분석은 상기 섬유확장 분석에 비해 낮은 농도의 A_{42} 용액으로 수행되었다. 구체적으로, $A\beta_{42}$ ($0.5 \mu\text{M}$)를 지시된 농도의 2',8"-biapigenin, amentoflavone, 또는 sumafavone의 존재하에 0, 3, 6, 및 12 h 동안 인큐베이트하였다. 이어서, $180 \mu\text{l}$ 의 반응혼합물을 $20 \mu\text{l}$ 의 티오플라빈-T($50 \mu\text{M}$)와 혼합하였다. RFU는 완충액 백그라운드(0.2% DMSO 및 0.004% NH_4OH 를 함유한 PBS)를 제한 것이다.

<실험결과>

<Taiwaniaflavone는 $A\beta$ 독성억제 효력을 가진다>

플라본단량체인 apigenin(AP) 및 플라본이합체인 taiwaniaflavone(TF)의 존재가 $A\beta_{42}$ 또는 기타 유해물질들이 SH-SY5Y 세포에 미치는 독성을 억제하는 효과를 측정하였다. 세포생존률은 MTT 환원분석으로 얻어졌으며, 생존률(%)은 $A\beta_{42}$ 등에 의해 처리되지 아니한 세포들에 대비된 수치이다. 상기 실험자료는 3중실험의 $\text{mean} \pm \text{S.D}$ 로서 산출된 것이다.

도 2(A)는 $A\beta_{42}$ 등의 세포독성에 노출된 세포를 TF 또는 AP로 처리했을 때 그 농도에 따른 세포생존률의 변화를 나타낸 도표이다. $A\beta_{42}$ 외에도, 기타 세포유해물질들로서 staurosporine(STS; DNA 손상유발), brefeldin A(BFA; 소포체에 대한 스트레스 유발), etoposide(ETO; 미토콘드리아의 손상 유발)가 사용되었다. 여기서, 원형 또는 삼각형의 표기는 각각 $0.5 \mu\text{M}$ $A\beta_{42}$ (●), 25 nM STS(○), 1 μM BFA(▲), 1 μM ETO(△)에 의해 처리된 세포를 나타내며, 실선은 TF의 농도를 0부터 20 μM 까지, 점선은 AP의 농도를 0부터 40 μM 까지 변화시킨 것이다. 배양은 12 h($A\beta_{42}$, STS) 또는 24 h(BFA, ETO) 동안 진행되었으며, 세포생존률은 MTT 분석에 의해 얻어졌다.

도 2(A)를 참조하면, 플라본이합체인 TF는 $A\beta_{42}$ 에 의해 유발된 세포사멸을 효과적으로 억제함을 알 수 있다. TF는 또한 STS 독성에 대해서도 약간의 효과를 보이나, BFA 또는 ETO에 의해 유발된 세포사멸에 대해서는 효과가 없었다. 상대적으로, 플라본단량체인 AP는 $A\beta_{42}$ 등에 의해 유발된 세포사멸에 대한 억제효과가 플라본이합체인 TF에 비해 현저히 낮음을 알 수 있다.

도 2(B)는 TF 또는 AP의 농도에 따른 DEVDase 활성도를 나타낸 도표이다. 여기서, 원형의 표기는 각각 $0.5 \mu\text{M}$ $A\beta_{42}$ (●) 또는 25 nM STS(○)에 의해 처리된 세포를 나타낸다. 여기서, 실선은 TF의 농도를 0부터 20 μM 까지, 점선은 AP의 농도를 0부터 40 μM 까지 변화시킨 것이다. 배양은 12 h($A\beta_{42}$, STS) 또는 24 h(BFA, ETO) 동안 진행되었다. DEVDase 활성도는 세포사멸에 이르는 카스파제-3/7 유사 활성을 측정하는 방법으로 얻어졌다.

도 2(B)를 참조하면, 상기 주어진 실험조건에서는 STS에 의해 처리된 세포에 비하여, $A\beta_{42}$ 에 의해 처리된 세포

의 카스파제 활성이 낮음을 알 수 있다. 또한, STS에 의해 유발된 세포사멸 과정의 카스파제-3 활성의 억제에 있어서, AP가 유력한 역할을 하는 것으로 드러났다.

- [0051] 도 2(C)는 TF 또는 AP에 의해 미리 처리된 세포를 $A\beta_{42}$ 로 처리했을 때의 세포 생존율을 도표화한 것이다. 구체적으로, 상기 세포는 TF($10\ \mu\text{M}$) 또는 AP($10\ \mu\text{M}$)로 미리 처리된 상태로 12 h 방치된 후 TF 또는 AP의 제거를 위해 세정되고, 이어서 $A\beta_{42}$ 로 처리되었다.
- [0052] 도 2(C)를 참고하면, TP 또는 AP에 의해 미리 처리된 세포라 하더라도, 이후 TP 또는 AP가 제거된 이상 외인성으로 도입되는 $A\beta_{42}$ 의 독성을 억제하지는 못하는 것으로 나타났다.
- [0053] 상기 도 2(A) 내지 도 2(C)에서 도출된 바에 따르면, TF는 $A\beta$ 독성을 억제하는데 유력한 효과를 가짐을 알 수 있다. 세포괴사를 50% 방지하는데 필요한 TF의 농도는 약 $1\ \mu\text{M}$ 임을 알 수 있다.
- [0054] < $A\beta$ 피브릴형성의 전자현미경 분석>
- [0055] 자기회합이 가능한 $A\beta$ 펩타이드의 응집상태는 베타아밀로이드 독성과 관련되어 있다. 우리는 TF 또는 AP의 존재에 따른 $A\beta_{42}$ 의 형태의 변화 여부를 전자현미경을 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 $A\beta_{42}(0.5\ \mu\text{M})$ 의 PBS 용액 자체로, 또는 TF 또는 AP의 존재하에서 37°C 에서 12 h 동안 인큐베이션 시킨 $A\beta_{42}$ 용액의 TEM 이미지를 얻었다.
- [0056] 도 3은 TF 또는 AP의 존재하에서 인큐베이션 된 $A\beta_{42}$ 의 TEM 이미지이다.
- [0057] 도 3을 참조하면, $A\beta$ 자체만으로 인큐베이션 된 $A\beta$ 는 3-10 nm의 다양한 올리고머 및 200 nm 이하의 구슬상의 프로토피브릴 형상을 가짐을 알 수 있으며, 성숙한 파이버의 형상은 보이지 않았다. 이는 인큐베이션 된 $A\beta$ 의 독성에 따른 세포사멸은 올리고머 및 프로토피브릴에 기인한 것임을 암시한다.
- [0058] TF의 존재하에서는, 프로토피브릴 형상은 보이지 않았고, 다만 구형 입자, 소형 올리고머, 및 이들에 비해 극히 적은 수의 비정형 침전물이 관찰되었다. AP의 존재하에서는, TF에 비하여 비교적 큰 올리고머 및 구슬상의 프로토피브릴 형상이 관찰되었다. 상기 결과로 볼 때, TF에 의한 $A\beta$ 피브릴형성 억제효과는 유력함을 알 수 있으며, 이는 TF가 $A\beta$ 의 표면에 작용하여 그 회합과정을 방해하기 때문으로 보인다.
- [0059] <TF는 올리고머의 양을 증가시킨다>
- [0060] 상기 전자현미경 실험결과는 TF에 의한 올리고머의 생성을 보여주지만, 그림에도 불구하고, 상기 올리고머는 비독성이므로 TF가 아밀로이드 독성억제효력을 가질 수 있음을 보여준다. 이에 더 나아가, 우리는 TF 존재하에서 생성된 올리고머의 분석을 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. $A\beta_{42}(0.5\ \mu\text{M})$ 는 자체적으로, 또는 TF 또는 AP 존재하에서 3 h 또는 12 h 동안 인큐베이션 되었다. 상기 반응혼합물은 신선한 $A\beta_{42}$ (컨트롤) 용액외에는 glutaraldehyde(0.01%)에 의해 가교되었다. 이어서, 각 반응혼합물의 $20\ \mu\text{l}$ 시료를 16% SDS-PAGE 상에 장착시키고 PVDF 멤브레인에 이송시킨 후, $A\beta$ (6E10)에 대한 단일클론항체를 사용하여 프로브되었다.
- [0061] 도 4는 $A\beta_{42}$ 의 피브릴형성에 대한 생화학분석 결과이다.(A) 및(B)는 각각 $A\beta_{42}$ 의 인큐베이션 시간이 3 h 및 12 h임을 나타낸다. 레인-1은 $A\beta_{42}$ (컨트롤)이며, 레인-2는 $A\beta_{42}$ 자체로 인큐베이션된 것이며, 레인-3 내지 5는 각각 TF($2.5\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$) 존재하에 인큐베이션 된 것이며, 레인-6 내지 8은 각각 AP($2.5\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$) 존재하에 인큐베이션된 것이다.
- [0062] 도 4를 참조하면, $A\beta$ 용액 자체로 3 h 인큐베이션 후에는 고분자량 $A\beta$ (~100 kDa)가 생성되었음이 관찰되었다(A의 레인-2). 12 h 인큐베이션 후에는 $A\beta$ 단량체는 모두 회합됨을 알 수 있다(B의 레인-2). TF의 존재하에서는, 3 h 및 12 h 인큐베이션 모두 $A\beta$ 단량체의 상대적 밀도는 감소되지 아니하였으나, 이합체를 포함한 비교적 작은 크기의 올리고머가 관찰되었다.(A 및 B의 레인-3 내지 5) 상기 결과로 미루어볼 때, TF가 초기에 형성된 올리고머에 부착되어 상기 올리고머를 핵으로 하는 더 이상의 중합반응을 방지해주는 것으로 보인다. 반면, AP 존재하에서는 $A\beta$ 단량체의 밀도가 감소함과 동시에 비교적 커다란 올리고머가 생성됨을 알 수 있다.(A 및 B의 레인-6 내지 8).
- [0063] $A\beta$ 올리고머는 지금까지 알려진 가장 독성이 강한 물질 중 하나로 알려져 있다. 우리는 기형성된 $A\beta$ 올리고머

를 분리하여, 이를 분해하는데 대한 TF 및 AP의 효과를 시험하였다. 이를 위하여, 새로이 제조된 A β 올리고머 10 μ l를 16% SDS-PAGE 상에서 분리하여 PVDF 멤브레인에 이송하고 단일클론항체 6E10을 사용하여 프로브하였다. 이어서, 상기 분리된 A β 올리고머에 노출시킨 세포에 대한 MTT 환원분석을 수행하여 비처리된 세포에 대비한 세포생존률(%)을 측정하였다. 상기 실험은 3중의 시료에 대해 수행하여 mean $\pm$ S.D로 산출되었다.

[0064] 도 5(A)는 A β_{42} 올리고머의 분리실험결과이다. 여기서 레인-1은 신선한 A β_{42} (컨트롤)이며, 레인-2는 올리고머화 반응을 거친 반응혼합물내의 A β_{42} 이며, 레인-3은 원심분리한 후의 A β_{42} 올리고머(상등액)이며, 레인-4는 가교결합된 A β_{42} 올리고머이다.

[0065] 도 5(A)를 참조하면, A β 올리고머의 제조에 있어서, 원심분리 전후로 A β 올리고머의 변화가 거의 없음을 알 수 있다.(레인-2 및 3) 다만, 올리고머를 가교시킬 경우 다양한 종류의 올리고머의 존재를 확인할 수 있었다.(레인-4)

[0066] 도 5(B)는 0-10 μ M 농도의 TF(●) 및 0-20 μ M 농도의 AP(○) 존재하에서 A β_{42} 올리고머(0.5 μ M)로 처리된 세포의 생존율을 도시한 것이며, 도 5(C)는 0-10 μ M 농도의 TF(●) 및 0-20 μ M 농도의 AP(○) 존재하에서 A β_{42} 섬유(0.5 μ M)로 처리된 세포의 생존율을 도시한 것이다. 세포생존력은 MTT 환원분석으로 얻어졌으며, 세포생존률(%)은 A β 용액에 처리되지 아니한 세포에 대한 결과와 비교된 수치이다.

[0067] 도 2(A) 및 도 5(B)를 참조하면, 상등액의 A β 올리고머는 신선한 A β_{42} 에 비하여 12 h 이내의 세포사멸을 약 15% 더 일으킴을 알 수 있다. 도 5(B) 및 도 5(C)를 참조하면, TF는 A β 섬유의 독성뿐 아니라 A β 올리고머 독성의 억제에도 효과적이지만, AP는 거의 효과가 없음을 알 수 있다. 이러한 결과로 미루어볼 때, TF는 A β 피브릴형성 과정에 수반되어 생성되는 A β 올리고머 및 A β 섬유의 독성을 억제시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0068] <TF는 A β_{42} 의 구조적 전환을 억제한다>

[0069] A β 피브릴형성과정은 펩타이드 구조가 베타-시트 구조로 점차적으로 전이되는 현상을 수반한다.(Kikitadze 등, J Mol Biol 312, 1103-1119, 2001)

[0070] 도 6(A) 및 도 6(B)는 각각 20 μ M TF(A) 또는 20 μ M AP(B)의 존재하에서 A β_{42} (20 μ M)를 인큐베이션한 후 얻은 CD 스펙트럼이다. A β 의 인큐베이션은 PBS 용액에서 37℃에서 0 h 또는 12 h 수행되었으며, TF 또는 AP가 없는 상태에서의 CD 스펙트럼 측정도 이루어졌다. CD 스펙트럼은 완충액 백그라운드를 제거한 값으로 얻어졌다.

[0071] 도 6(A) 및 도 6(B)를 참조하면, 새롭게 용해된 A β_{42} (20 μ M)는 195 nm에서 음의 시그널을 보이는 랜덤코일 형태를 가지며, 12 h 인큐베이션 후에는 216 nm 근처에서 음의 타원곡선을 보이는바 상기 랜덤코일 형태가 베타-시트 구조로 전환되었음을 알 수 있다. 그러나 TF(20 μ M) 존재하에서는 A β 는 인큐베이션 이후에도 거의 랜덤코일 형태만을 가짐을 알 수 있다. 반면에, AP(20 μ M) 존재하에서는, 베타-시트 구조로의 전환을 막는 효과가 거의 없음을 알 수 있다. 상기 CD 스펙트럼결과는 TF가 A β 펩타이드의 형태변화를 효과적으로 방지할 수 있음을 입증해주고 있다.

[0072] <TF는 A β 의 회합을 억제하고 기형성된 피브릴을 용해시킨다>

[0073] 도 7(A) 내지 7(F)는 TF의 존재하에서의 A β_{42} 회합의 키네틱연구(kinetic study)를 위한 형광실험결과를 도시한 것이다.

[0074] 도 7(A) 및 7(B)는 A β_{42} (20 μ M) PBS용액을 0(●), 0.5(○), 1(■), 2(□), 4(◆), 8(◇), 및 16(▲) mM의 TF 존재하에서 37℃에서 0-12 h 인큐베이션한 결과이다. 도 7(C) 및 7(D)는 기형성된 피브릴 1.1 μ M과 혼합된 A β_{42} (20 μ M) PBS용액을 0(●), 0.5(○), 1(■), 2(□), 4(◆), 8(◇), 및 16(▲) mM의 TF 존재하에서 37℃에서 0-6 h 인큐베이션한 결과이다. 도 7(E)는 0(●) 또는 8 mM(○) TF 존재하에서 A β_{42} 의 농도(0-50 μ M)에 따른 A β_{42} 피브릴형성 초기속도를 도시한 것이다. 도 7(F)는 기형성된 A β_{42} 피브릴(20 μ M) 용액을 0(●), 1(○), 2(■), 4(□), 8(◆), 16(◇), 및 20(▲) mM의 TF 존재하에서 0-12 h 인큐베이션한 형광실험결과이다.

- [0075] 도 7(A)를 참조하면, 새롭게 용해된 $A\beta_{42}(20 \mu M)$ 를 $37^{\circ}C$ 에서 인큐베이트하면 S자형의 특성커브를 보이는데, 이는 $A\beta$ 회합과정이 핵형성에 의존하는(nucleation-dependent) 중합반응모델을 따름을 의미한다. TF($0-16 \mu M$) 존재하에서 형광곡선의 최종평형치는 TF 농도에 따라 감소함을 알 수 있다. 도 7(B)를 참조하면, 형광세기를 로그단위로 하여 시간축상에서 도표화하면 전술한 이론에 따른 방정식에 잘 맞는 것을 알 수 있다. 상기 방정식에 따라 계산할 경우 0, 0.5, 1, 2, 및 $4 \mu M$ 농도의 TF 존재하에서 $A\beta_{42}(20 \mu M)$ 의 는 각각 23.2, 26.0, 26.9, 및 29.2 min로 산출되었다.
- [0076] 도 7(C)를 참조하면, $A\beta_{42}(20 \mu M)$ 를 $1.1 \mu M$ 의 기형성된 $A\beta_{42}$ 피브릴(시드)과 함께 인큐베이트할 경우 그 형광세기는 지연상태(lag phase) 없이 포물선형으로 상승하여 전술한 S자형 형광곡선에 비해 훨씬 빨리 평형에 도달하였다. 상기 포물선형 형광곡선의 최종 평형에서의 형광세기는 TF 농도($0-16 \mu M$ 범위)에 의존한다. 한편, 도 7(D)를 참조할 경우, 상기 조건에서 얻은 형광세기를 로그단위로 하여 시간축상에서 도표화할 경우 그 기울기는 TF의 존재유무 및 농도에 의해 영향받지 않음을 알 수 있다.
- [0077] 도 7(E)를 참조하면, 시드로서 투입된 $A\beta$ 피브릴의 성장속도는 $A\beta_{42}$ 농도변화에 대해 선형으로 의존함을 알 수 있다. TF가 존재하지 않는 경우에 비하여, TF($8 \mu M$)의 존재하에서 상기 선형함수의 기울기가 감소하였다.
- [0078] 도 7(F)를 참조하면, 기형성된 $A\beta_{42}$ 피브릴 용액을 신선한 $A\beta_{42}$ 의 부존재하에서 인큐베이션 시킬 경우 상기 $A\beta$ 피브릴이 방출하는 형광세기는 인큐베이션 기간 동안에 거의 변하지 않음을 알 수 있다. 다만, TF의 농도를 $0 \mu M$ 부터 $20 \mu M$ 까지 증가시키에 따라 상기 피브릴의 형광세기가 감소하였다.
- [0079] 도 8(A) 내지 8(E)는 AP의 존재하에서의 $A\beta_{42}$ 회합의 키네틱연구를 위한 형광실험결과를 도표화한 것이다. 이는 티오플라빈-T 바인딩 분석에 의해 수행되었다.
- [0080] 도 8(A) 및 8(B)는 $A\beta_{42}(20 \mu M)$ PBS용액을 0(●), 1.25(○), 2.5(■), 5(□), 10(◆), 20(◇), 및 40(▲) mM의 AP 존재하에서 $37^{\circ}C$ 에서 0-12 h 인큐베이션한 형광실험결과이다. 도 8(C) 및 8(D)는 기형성된 피브릴 $1.1 \mu M$ 과 혼합한 $A\beta_{42}(20 \mu M)$ PBS용액을 0(●), 1.25(○), 2.5(■), 5(□), 10(◆), 20(◇), 및 40(▲) mM의 AP 존재하에서 0-6 h 인큐베이션한 형광실험결과이다. 도 8(E)는 기형성된 $A\beta_{42}$ 피브릴($20 \mu M$)용액을 0(●), 1.25(○), 2.5(■), 5(□), 10(◆), 20(◇), 및 40(▲) mM의 AP 존재하에서 0-6 h 인큐베이션한 형광실험결과이다.
- [0081] 도 8(A)를 참조하면, 새롭게 용해된 $A\beta_{42}(20 \mu M)$ 를 $37^{\circ}C$ 에서 인큐베이션 시키면 S자형의 특성곡선을 보이며, AP($0-40 \mu M$) 존재하에서는 상기 곡선의 최종평형치는 AP 농도에 따라 다소 감소함을 알 수 있다. 도 8(B)를 참조하면, 형광세기를 로그단위로 하여 시간축상에서 도표화하면 전술한 이론적인 수식에 잘 맞는 것을 알 수 있다. 이에 따라 0, 0.5, 및 $1 \mu M$ 농도의 AP 존재하에서 $A\beta_{42}(20 \mu M)$ 의 는 각각 27.1, 31.0, 및 28.3 min으로 산출되었다.
- [0082] 도 8(C)를 참조하면, $A\beta_{42}(20 \mu M)$ 를 $1.1 \mu M$ 의 기형성된 $A\beta_{42}$ 피브릴(시드)과 함께 인큐베이션 시키면, 형광세기는 지연상태(lag phase) 없이 포물선형으로 상승하여 S자형에 비해 평형에 빨리 도달하였다. 상기 형광곡선의 최종 평형세기는 AP의 농도($0-40 \mu M$ 범위)에 의존함을 알 수 있다. 그러나 도 8(D)를 참조할 경우, 형광세기를 로그단위로서 직선도표화할 경우 그 기울기는 AP의 존재유무 및 농도변화에 의해 영향받지 않았다.
- [0083] 도 8(E)를 참조하면, 기형성된 $A\beta_{42}$ 피브릴만으로 인큐베이션 시킬 경우 상기 피브릴의 형광세기는 인큐베이션 기간 동안에 거의 변하지 않는다. 다만, AP($0-40 \mu M$)의 농도가 커짐에 따라 상기 피브릴의 형광세기가 감소하였는데, AP의 존재에 의해 기형성된 $A\beta_{42}$ 피브릴의 안정성이 다소 낮아지는 것으로 보인다.
- [0084] 상기 형광실험결과로 미루어볼 때, TF 및 AP 모두 $A\beta_{42}$ 피브릴형성을 억제할 수 있으며, 다만 AP의 억제효과는 TF에 비해 약함을 알 수 있다.
- [0085] <TF 및 AP의 $A\beta$ 회합 억제효과의 비교>
- [0086] 우리는 플라보닌화체인 TF는 플라본단량체인 AP에 비해 $A\beta$ 의 자발적회합 및 $A\beta$ 피브릴의 성장에 대한 억제력이 큼을 관찰하였다. $A\beta$ 의 자발적회합의 경우, $A\beta$ 단량체는 초기에 자발적으로 뭉쳐 이합체, 사합체, 및 작은 크

기의 올리고머를 형성한다. 이러한 물질들은 이후 단량체가 추가로 부착되는 프리커서(precursor)로 작용한다.

- [0087] 도 9(A) 내지 9(D)는 신선한 $A\beta_{42}$ 를 TF 및 AP의 존재하에서 인큐베이션시켰을때의 $A\beta$ 회합과정의 키네틱연구를 위한 형광실험결과이다.
- [0088] 도 9(A) 내지 9(C)는 TF(●) 및 AP(○)의 존재하에서 신선한 $A\beta_{42}$ (20 μ M)를 0 h(A), 3 h(B), 12 h(C) 동안 인큐베이션한 후 얻은 형광세기를 TF 또는 AP의 농도의 함수로 도시한 것이다. 도 9(D)는 $A\beta_{42}$ 피브릴의 성장속도에 대한 것으로서, TF(●) 및 AP(○)의 존재하에서 신선한 $A\beta_{42}$ (20 μ M)를 기형성된 $A\beta_{42}$ 섬유(1.1 μ M)와 함께 인큐베이션한 경우 초기 형광세기의 증가속도를 TF 또는 AP 농도의 함수로서 도시한 것이다.
- [0089] 도 9(A)를 참조하면, $A\beta$ 피브릴형성의 초기단계(0 h 인큐베이션)에서는 TF 또는 AP 모두 형광을 감소시킴을 알 수 있다.
- [0090] 그 반면, 도 9(B) 및 9(C)를 참조하면, $A\beta$ 피브릴형성의 급속한 확장단계 이후(3 h 및 12 h 인큐베이션)에는 $A\beta$ 피브릴성장에 대한 AP의 억제력은 미미하나, TF의 억제효과는 유력한 것으로 나타났다.
- [0091] 도 9(D)를 참조하면, 기형성된 $A\beta_{42}$ 섬유를 $A\beta_{42}$ 와 함께 혼합한 용액에서는 $A\beta$ 섬유성장의 초기속도는 TF 존재하에서 현저히 감소되나, AP 존재하에서는 그 감소효과가 작음을 알 수 있다.
- [0092] 상기 도 9(A) 내지 9(D)의 결과로부터, $A\beta$ 피브릴의 성장 및 $A\beta$ 섬유의 성장에 대한 억제효과면에서 볼 때, TF가 AP에 비해 우수함을 알 수 있다.
- [0093] <기타 플라본이합체들의 아밀로이드독성에 대한 억제효과>
- [0094] 본 발명에서 우리는 플라본이합체인 TF가 $A\beta$ 에 의한 세포사멸 및 $A\beta$ 피브릴형성에 대한 강한 억제력이 있음을 알 수 있었는데, 이에 더 나아가, TF와 함께 플라본이합체 그룹에 속하는 화합물들인 2',8"-biapigenin, amentoflavone, 및 sumafavone도 아밀로이드 독성억제에 있어서 TF와 유사한 효과가 있는지 조사하였다.
- [0095] 도 10(A) 내지 10(E)는 TF 외의 상기 플라본이합체들이 $A\beta_{42}$ 의 세포독성 및 피브릴형성에 미치는 억제효과를 보여주는 실험결과들이다.
- [0096] 도 10(A)는 2',8"-biapigenin(●), amentoflavone(○), 또는 sumafavone(Δ)의 존재하에서 $A\beta$ (0.5 μ M)에 의해 12 h 동안 처리된 세포의 생존율을 도시한 것이다. 도 10(B)는 상기 플라본이합체들의 존재 유무에 따른 $A\beta$ 회합체형성의 변화를 보여주는 TEM 이미지이다. 도 10(C)는 상기 플라본이합체들의 존재(0 μ M, 5 μ M, 10 μ M)에 따른 $A\beta_{42}$ (0.5 μ M)의 티오플라빈-T 분석결과를 RFU 수치로 도표화한 것이다. 여기에서, RFU 측정시의 인큐베이션 시간은 0 h(white bar), 3 h(black bar), 6 h(dotted bar), 및 12 h(hatched bar)이다. 도 10(D)는 0-16 μ M 범위의 2',8"-biapigenin(●), amentoflavone(○), 또는 sumafavone(Δ)의 존재하에서 신선한 $A\beta_{42}$ (20 μ M)와 함께 인큐베이션한 $A\beta$ 섬유(시드)의 초기성장속도를 도표화한 것이다. 도 10(E)는 상기 플라본이합체들의 존재 유무에 따른 $A\beta_{42}$ (0.5 μ M)의 피브릴형성에 대한 웨스턴블롯 분석결과이다. 여기에서, 레인-1은 $A\beta_{42}$ (컨트롤)이며, 레인-2는 12 h 동안 인큐베이션한 $A\beta_{42}$ 이며, 레인-3 및 4는 각각 5 μ M 및 10 μ M의 2',8"-biapigenin 존재하에서 인큐베이션한 $A\beta_{42}$ 이며, 레인-5 및 6은 각각 5 μ M 및 10 μ M의 amentoflavone 존재하에서 인큐베이션한 $A\beta_{42}$ 이며, 레인-7 및 8은 각각 5 μ M 및 10 μ M의 sumafavone 존재하에서 인큐베이션한 $A\beta_{42}$ 이다. 상기 플라본이합체들에 대한 실험들은 전술한 TF 또는 AP 실험에서 기술된 것과 동일한 조건에서 수행되었다.
- [0097] 도 10(A)를 참조하면, $A\beta$ 에 노출된 세포의 괴사를 50% 이상 억제할 수 있기 위한 상기 플라본이합체의 농도는 2.5 μ M 수준임을 알 수 있다.
- [0098] 도 10(B)를 참조하면, 상기 플라본이합체 부존재의 컨트롤 조건에서 $A\beta_{42}$ 는 커다란 응집체를 구성하나, 플라본이합체의 존재시 $A\beta_{42}$ 는 비교적 작은 구상 회합체 내지 소형 올리고머로서 존재함을 알 수 있다.
- [0099] 도 10(C)를 참조하면, 컨트롤 조건에 비하여, 플라본이합체의 존재시 형광이 감소되나, 이로부터 플라본이합체가 $A\beta$ 피브릴형성을 억제함을 알 수 있다.

[0100] 도 10(D)를 참조하면, 플라본이합체의 존재시 $A\beta_{42}$ (20 μ M)의 초기 섬유성장속도가 상기 플라본이합체의 농도에 따라 감소함을 알 수 있다. 도 10(A) 내지 10(E) 전체에 걸쳐 드러난 실험결과는 TF 외의 기타 플라본이합체들도 $A\beta$ 독성을 억제함에 있어서 TF와 유사한 유력한 효과를 가짐을 실증해주고 있다.

[0101] 표 1은 기형성된 $A\beta$ 피브릴의 부존재시의 자발적 $A\beta$ 회합, 또는 기형성된 $A\beta$ 피브릴의 존재시의 $A\beta$ 섬유의 성장을 컨트롤값의 50%로 감소시키는 플라본이합체들 및 AP의 IC_{50} 값을 나타낸 것이다. 상기 컨트롤값은 상기 화합물들의 부존재시의 평균 형광세기를 100%로 나타낸 것이다. 상기 화합물의 농도(μ M)의 로그값에 따른 형광세기(%)의 그래프는 S자형 곡선으로 나타났으며, 문헌(Ono 등, J Neurochem 87, 172-181, 2003)에 제시된 방법에 따라 IC_{50} 값을 산출하였다.

표 1

화합물	중합반응의 I_{50} (μ M)	피브릴확장의 I_{50} (μ M)	피브릴불안정화의 I_{50} (μ M)
TF	2.5	3.1	5.0
AP	25	40	>40
2',8"-biapigenin	3.1	3.5	6.3
amentoflavone	3.5	6.3	5.0
sumaf flavone	6.3	7.9	5.6

[0103] 표 1을 참조하면, 플라본이합체인 2',8"-biapigenin, amentoflavone, sumaf flavone 각각이 $A\beta$ 피브릴형성 억제와 관련하여 TF와 유사한 효과가 있음을 알 수 있다. 그 반면에, 플라본단량체인 AP는 플라본이합체 그룹에 비해 거의 1/10 수준의 미미한 효과를 보임을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1은 본 발명에서 다루는 플라본이합체들의 화학구조식들이다.

[0105] 도 2(A)는 $A\beta_{42}$ 등의 세포독성에 노출된 세포를 TF 또는 AP로 처리했을 때 그 농도에 따른 세포생존율의 변화를 나타낸 도표이며, 도 2(B)는 TF 또는 AP의 농도에 따른 DEVDase 활성도를 나타낸 도표이며, 도 2(C)는 TF 또는 AP에 의해 미리 처리된 세포를 $A\beta_{42}$ 로 처리했을때의 세포생존율을 도표화한 것이다.

[0106] 도 3은 TF 또는 AP의 존재하에서 인큐베이션한 $A\beta_{42}$ 의 TEM 이미지이다.

[0107] 도 4는 $A\beta_{42}$ 의 피브릴형성에 대한 생화학분석 결과이다.

[0108] 도 5(A)는 $A\beta_{42}$ 올리고머의 분리실험 결과이며, 도 5(B) 및 도 5(C)는 각각 0-10 μ M 농도의 TF(●) 및 0-20 μ M 농도의 AP(○) 존재하에서 0.5 μ M $A\beta_{42}$ 올리고머(B) 또는 0.5 μ M $A\beta_{42}$ 섬유(C)로 처리된 세포의 생존율을 도시한 것이다.

[0109] 도 6(A) 및 도 6(B)는 각각 20 μ M TF(A) 또는 20 μ M AP(B)의 존재하에서 $A\beta_{42}$ (20 μ M)를 인큐베이션하여 얻은 CD 스펙트럼이다.

[0110] 도 7(A) 내지 7(F)는 TF의 존재하에서의 $A\beta_{42}$ 회합의 키네틱연구(kinetic study)를 위한 형광실험결과를 도표화한 것이다.

[0111] 도 8(A) 내지 8(E)는 AP의 존재하에서의 $A\beta_{42}$ 회합의 키네틱연구를 위한 형광실험결과를 도표화한 것이다.

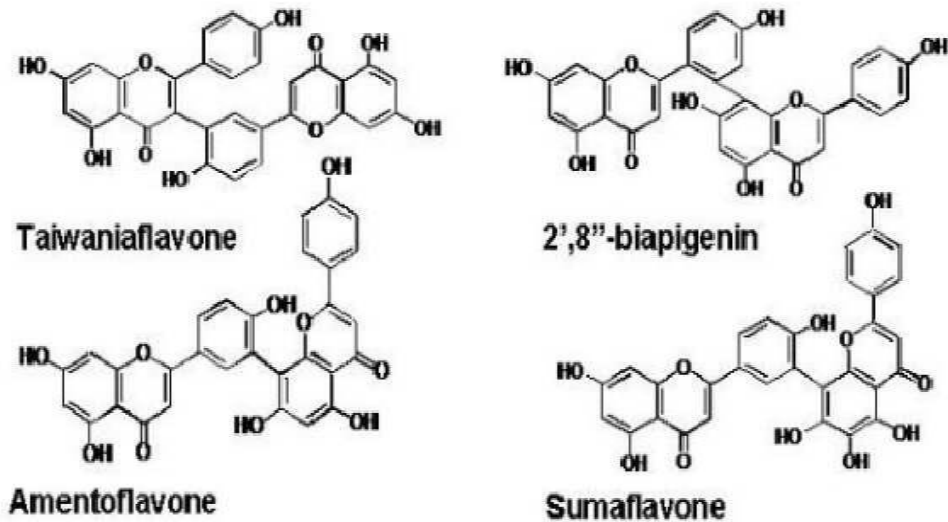
[0112] 도 9(A) 내지 9(C)는 TF(●) 및 AP(○)의 존재하에서 신선한 $A\beta_{42}$ (20 μ M)를 0 h(A), 3 h(B), 12 h(C) 동안 인큐베이션한 후 얻은 형광세기를 TF 또는 AP의 농도의 함수로 도표화한 것이며, 도 9(D)는 TF(●) 및 AP(○)의 존재하에서 신선한 $A\beta_{42}$ (20 μ M)를 기형성된 $A\beta_{42}$ 섬유(1.1 μ M)와 함께 인큐베이션한 경우 초기 형광세기의 증가속도를 TF 또는 AP 농도의 함수로서 도표화한 것이다.

[0113] 도 10(A)는 2',8"-biapigenin(●), amentoflavone(○), 또는 sumaf flavone(Δ)의 존재하에서 $A\beta$ (0.5 μ M)에 의해 12 h 동안 처리된 세포의 생존율을 도시한 것이며, 도 10(B)는 상기 플라본이합체들의 존재 유무에 따른 A

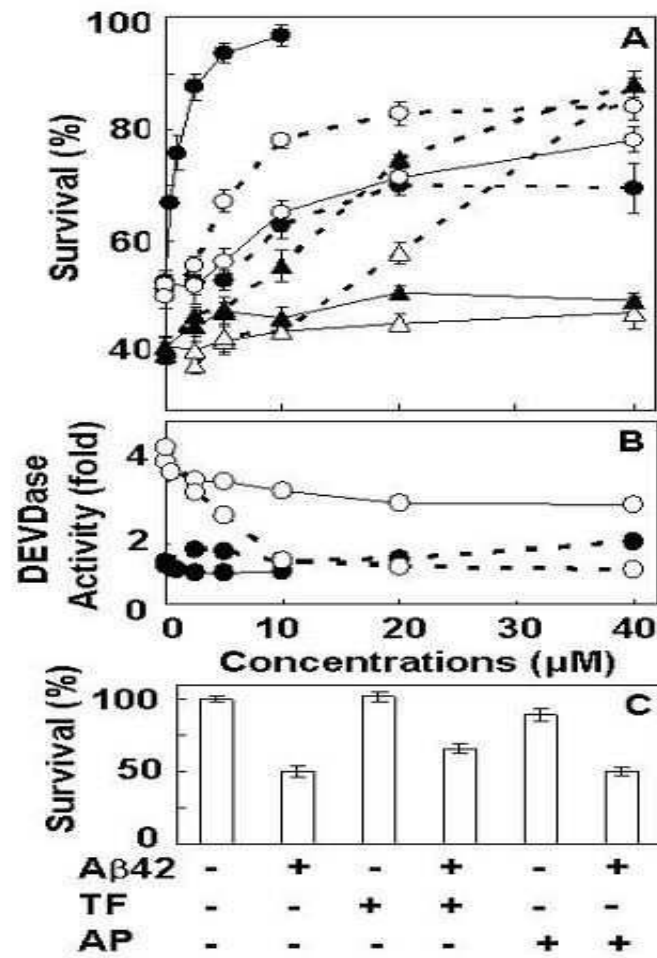
β 회합체형성의 변화를 보여주는 TEM 이미지이며, 도 10(C)는 상기 플라본이합체들의 존재(0 μ M, 5 μ M, 10 μ M)에 따른 $A\beta_{42}$ (0.5 μ M)의 티오플라빈-T 분석결과를 RFU 수치로 도표화한 것이며, 도 10(D)는 0-16 μ M 범위의 2',8''-biapigenin(●), amentoflavone(○), 또는 sumaflavone(Δ)의 존재하에서 신선한 $A\beta_{42}$ (20 μ M)와 함께 인큐베이션한 $A\beta$ 섬유(시드)의 초기성장속도를 도표화한 것이며, 도 10(E)는 상기 플라본이합체들의 존재 유무에 따른 $A\beta_{42}$ (0.5 μ M)의 피브릴형성에 대한 웨스턴블로트 분석결과이다.

도면

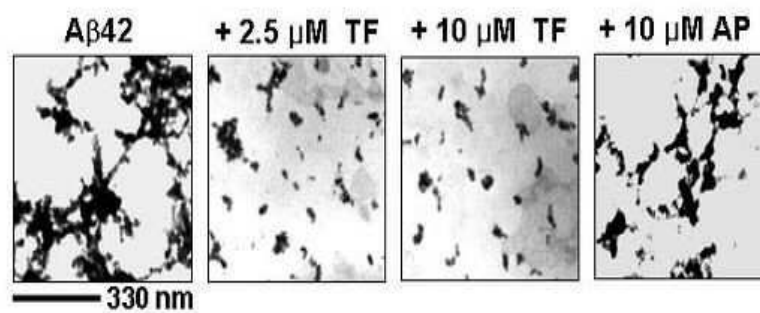
도면1



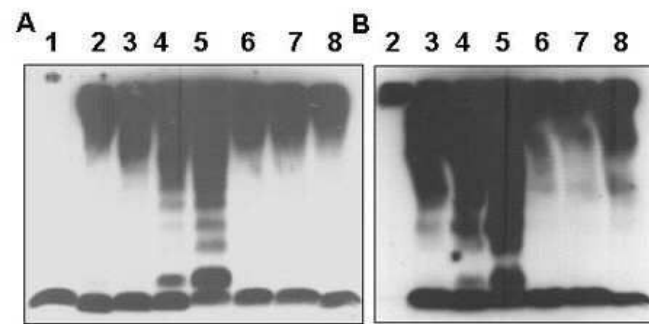
도면2



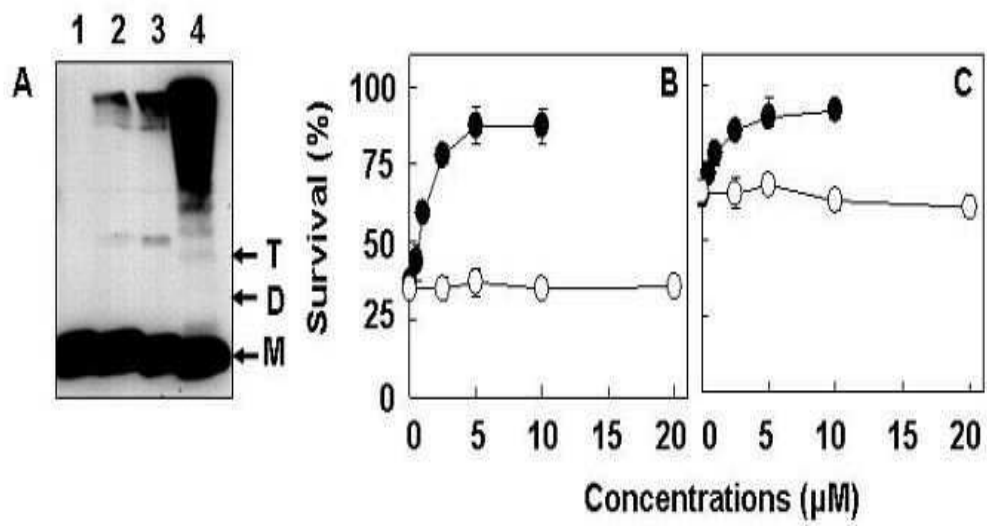
도면3



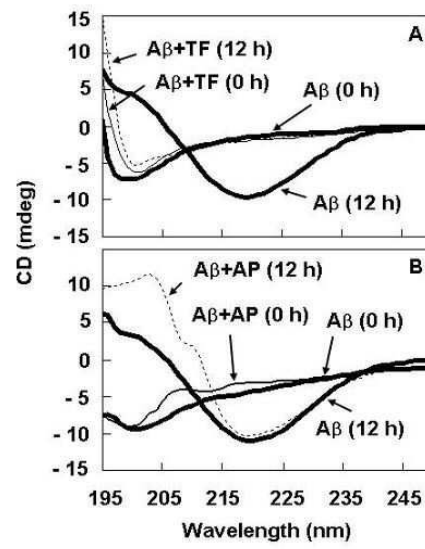
도면4



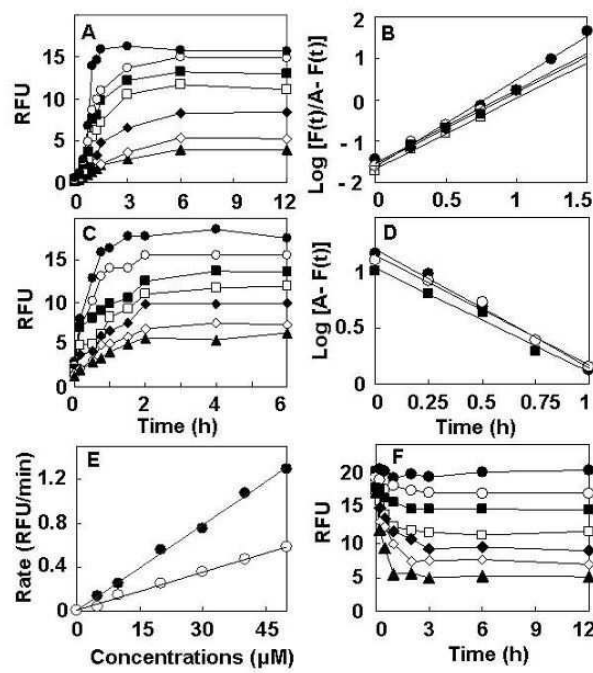
도면5



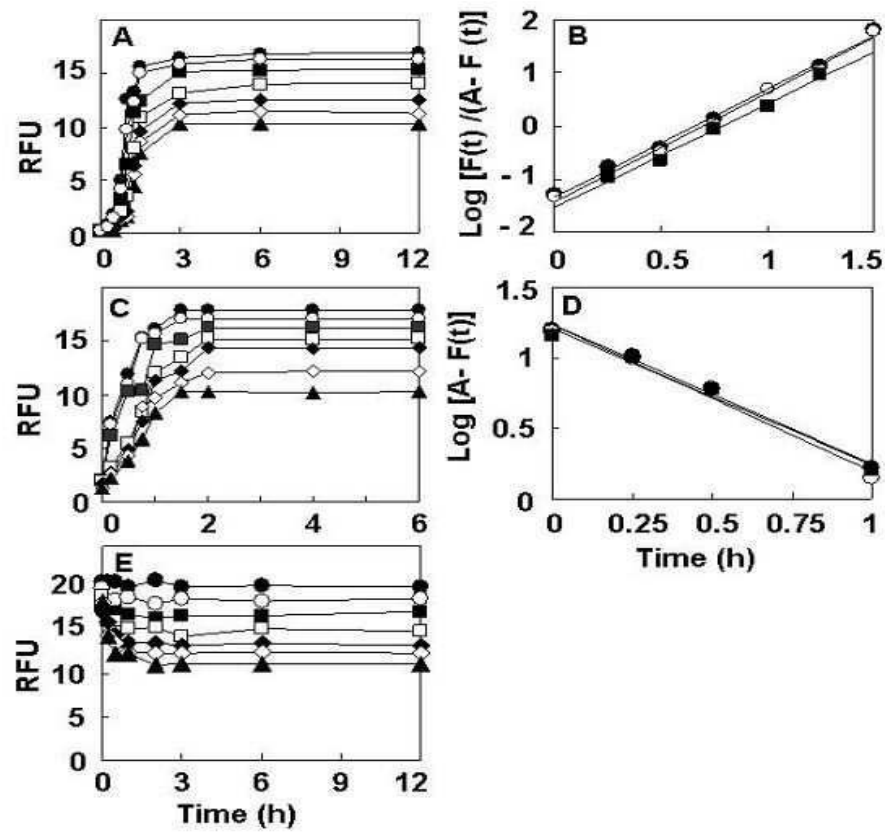
도면6



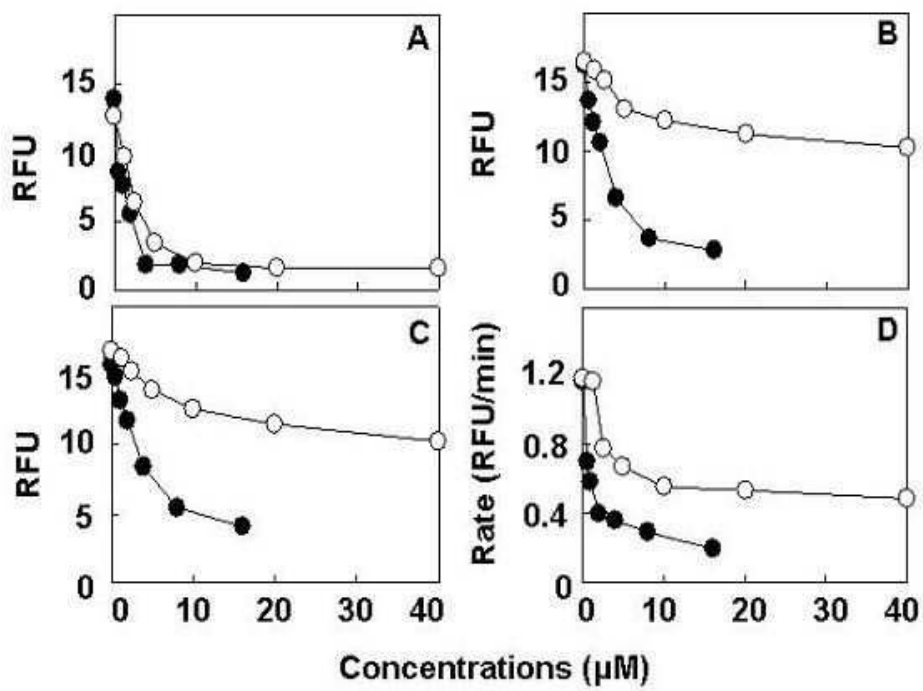
도면7



도면8



도면9



도면10

Fig. 10. Thapa et al.

