(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0125144
(43) 공개일자 2023년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7048 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A23L 33/125 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2023-0107483(분할)
(22) 출원일자 2023년08월17일
심사청구일자 2023년08월17일
(62) 원출원 특허 10-2022-0159196
원출원일자 2022년11월24일
심사청구일자 2022년11월24일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
장문석
서울특별시 용산구 이촌로64길 15, 105동 102호
박성규
서울특별시 송파구 올림픽로 269, 102동 1908호
(74) 대리인
위병갑

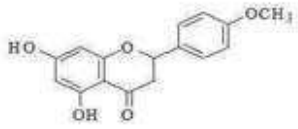
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **플라바논 유도체를 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방또는 치료용 조성물**

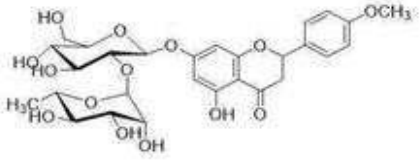
(57) 요 약

본 발명은 플라바논 유도체를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 플라바논 유도체는 AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 또는 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)의 과발현 또는 과활성에 의하여 유발되는 퇴행성 신경질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

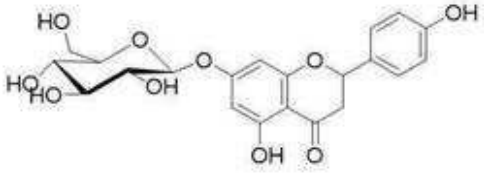
대 표 도 - 도1



Naringenin



Poncirin



Didymin

(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)

명 세 서

청구범위

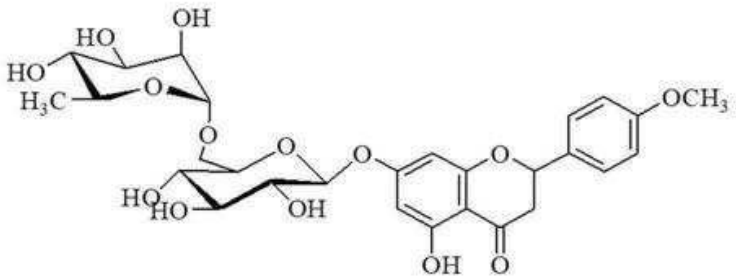
청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 디다이민 (didymin)을 유효성분으로 포함하는, 아밀로이드 단백질의 β-시트(sheet) 구조; 및 AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) 효소의 과발현 또는 과활성;에 의해 유발되는 알츠하이머의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 디다이민은 상기 알츠하이머에서, AChE, BChE 및 BACE1 효소의 과발현 또는 과활성을 억제하여 알츠하이머를 치료하고,

상기 조성물은 AChE, BChE 및 BACE1의 과발현 또는 과활성을 갖는 환자를 대상으로 투여되는 것인, 약학 조성물

[화학식 1]



Didymin

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 아밀로이드 단백질은 $A\beta_{25-35}$ 인 것인 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 알츠하이머는 sAPPβ (soluble N-terminal fragment) 및 C99 (12-kDa C-terminal fragment)의 과발현에 의하여 유발되는 것인 약학 조성물.

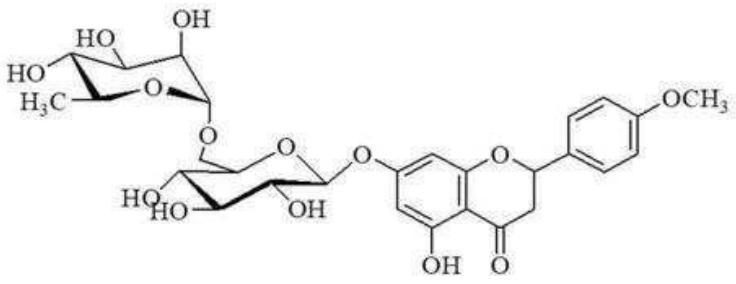
청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 디다이민 (didymin)을 유효성분으로 포함하는, 아밀로이드 단백질의 β-시트(sheet) 구조; 및 AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) 효소의 과발현 또는 과활성;에 의해 유발되는 알츠하이머의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서,

상기 디다이민은 상기 알츠하이머에서 AChE, BChE 및 BACE1 효소의 과발현 또는 과활성을 억제하여 알츠하이머를 개선시키고,

상기 조성물은 AChE, BChE 및 BACE1의 과발현 또는 과활성을 갖는 환자를 대상으로 투여되는 것인, 건강기능식품

[화학식 1]



Didymin

.

청구항 5

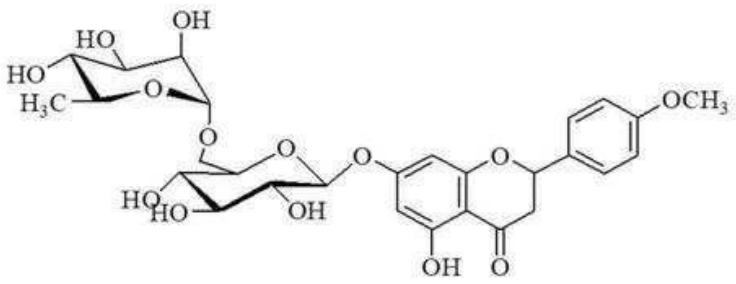
제 4항에 있어서,

상기 아밀로이드 단백질은 $A\beta_{25-35}$ 인 것인 건강기능식품.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 디다이민(didymin)을 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머에서 단백질의 β-시트(sheet) 구조의 생성 억제, AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) 효소의 과발현 또는 과활성을 억제하기 위한 약학적 조성물

[화학식 1]



Didymin

.

청구항 7

시험관 내(in vitro)에서, 세포에 후보물질을 처리하는 단계;를 포함하는 AChE, BChE 및 BACE1 효소의 과발현 또는 과활성; sAPPβ (soluble N-terminal fragment) 및 C99 (12-kDa C-terminal fragment) 과발현 억제제의 스크리닝 방법으로서,

상기 후보물질은 sAPPβ (soluble N-terminal fragment) 및 C99 (12-kDa C-terminal fragment)의 발현을 억제하여, 아밀로이드 단백질의 β-시트(sheet) 구조 형성을 억제하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 플라바논 유도체를 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머병(Alzheimer's disease)은 퇴행성 신경질환 중 하나로서 노인에서 주로 발생되는 질환이다. 65 세 이상의 노인 중 13 %가 알츠하이머병을 앓고 있고, 85세 이상이 되면 그 비율이 45 %로 증가되는 것으로 보고되고 있다 (Clin. Chim. Acta. 456 (2016)107-114). 알츠하이머병의 주요 메커니즘으로는 비정상적인 아밀로이드 플라크의 침전, 타우(tau) 단백질 응집, 과도한 금속 이온, 산화 스트레스, 감소된 염증 과정, 감소된 아세틸콜

린 (acetylcholine, ACh) 수치 등으로 알려져 있다 (Indian J. Psychiatry. 51(2009) 55-61). AChE (acetylcholinesterase) 및 BChE (butyrylcholinesterase)는 신경전달물질인 아세틸콜린을 가수분해하여 시냅스 전달을 방해함으로써 알츠하이머병의 병리생리학에 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 (JAMA. 273 (1995)1354-1359).

[0003] 콜린에스테라아제 저해제(cholinesterase inhibitor)는 아세틸콜린을 분해하는 효소를 저해하여 뇌에서 니코틴성 수용체 및 무스카린성 수용체를 촉진시킬 수 있는 아세티콜린을 증가시킴으로써 콜린성 기능을 향상시킬 수 있다 (Curr. Neuropharmacol. 11 (2013) 315-335). 현재, 승인된 알츠하이머병 치료제는 AChE 저해제인 rivastigmine, tacrine, donepezil, galantamine, huperzine A 및 heptylphysostigmine와 N-methyl-D-aspartate receptor antagonist를 포함하고 있다 (Curr. Neuropharmacol. 11 (2013) 315-335; 및 Curr. Neuropharmacol. 11 (2013) 315-335). 그러나, 이러한 치료제는 단지 경증 또는 중등도 단계의 환자에서만 효과가 있어, 중증 환자에서도 효과가 있는 보다 근본적인 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 알츠하이머병의 주요 조직병리학적 특징은 APP (amyloid precursor protein)로부터 유래된 아밀로이드 베타 (amyloid beta, Aβ)의 세포외 응집체로 이루어진노인성 플라크(senile plaque)가 존재한다는 것이다 (Physiol. Rev. 81(2001) 741-766; 및 Cell 120 (2005) 545-555). 아밀로이드 베타는 β-secretase 및 γ-secretase 인 두 가지 aspartic protease에 의해 APP를 절단하여 생성된다 (Science 275 (1997) 630-631). 특히, β-secretase는 β-site에서 APP를 절단하여 BACE1 (β-site APP cleaving enzyme 1)으로 언급되고 있다. 아밀로이드 형성 경로에서 β-secretase는 APP를 절단하여 가용성의 N-말단 절편(soluble N-terminal fragment, sAPPβ) 및 12-kDa의 C-말단 절편(12-kDa C-terminal fragment, C99)을 생성한다. 또한, C99는 아밀로이드 베타를 생성하기 위하여 γ-secretase에 의해 절단될 수 있다 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 11049-11053).

[0005] $A\beta_{1-42}$의 25-35 잔기를 포함하는 절편, 즉, $A\beta_{25-35}$은 활성 상태로 남아있는 $A\beta_{1-42}$의의 가장 짧은 절편이다 (PLOS ON 9 (2014)1-18). $A\beta_{25-35}$은 전체 길이의 펩타이드와 동일한 물리적, 생물학적 및 독물학적 특성을 가진 큰 β-sheet 구조를 가진다 (PLOS ON 9 (2014)1-18; 및 J. Biosci. 34 (2009) 293-303). 또한, $A\beta_{25-35}$은 매우 빠른 응집성과 향상된 신경독성을 가지고 있어, 본 발명에서는 상기 펩타이드를 신경독소(neurotoxin)으로 사용하였다.

[0006] 플라보노이드(flavonoid)는 식물계에 널리 분포한 페놀계 화합물이다. 플라보노이드는 식물 유래의 식품, 특히, 과일, 씨앗 및 야채에 풍부한 반응성의 2차 대사산물이며 (Ann.N.Y. Acad. Sci. 854 (1998) 435-442; 및 Curr. Med. Chem. 18 (2011) 5289-5302), 천연 플라보노이드는 식물에서 거의 O-glycoside or C-glycoside 형태로 존재한다. 플라보노이드는 구조적으로 페닐프로파노이드(phenylpropanoid)에서 유래된 C6-C3-C6 backbone을 포함하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2018-0115916호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 플라바논 유도체를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 플라바논 유도체를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 플라바논 유도체를 유효성분으로 포함하는 신경세포 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 시험관 내(in vitro) 또는 생체 외(ex-vivo)에서 플라바논 유도체를 시료에 처리하는

단계를 포함하는 AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 또는 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)의 발현 또는 활성을 저해하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 플라바논 유도체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 아밀로이드 베타에 의해 유도된 신경독성으로부터 신경세포를 보호하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 플라바논 유도체를 포함하는 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)에 대한 결합제를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 플라바논 유도체를 포함하는 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)에 대한 길항제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 플라바논 유도체를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 플라바논 유도체는 디다이민 (didymin), 폰시린 (poncirin) 및 나린제닌 (naringenin)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)로 이루어진 군 중 하나 이상의 효소의 과발현 또는 과활성에 의하여 유발되는 퇴행성 신경질환인 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 아밀로이드 단백질의 β-시트(sheet) 구조에 의해 유발되는 퇴행성 신경질환인 것일 수 있고, 상기 아밀로이드 단백질은 $A\beta_{25-35}$ 인 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 sAPPβ (soluble N-terminal fragment) 및 C99 (12-kDa C-terminal fragment)의 과발현에 의하여 유발되는 퇴행성 신경질환인 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 노인성 치매, 당뇨성 치매, 알코올성 치매 및 혈관성 치매로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 플라바논 유도체를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 플라바논 유도체를 유효성분으로 포함하는 신경세포 보호용 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 신경세포 보호는 아밀로이드 단백질의 β-시트(sheet) 구조에 의해 유발되는 독성으로부터 신경세포를 보호하는 것일 수 있고, 상기 아밀로이드 단백질은 $A\beta_{25-35}$ 인 것일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 시험관 내(in vitro) 또는 생체 외(ex-vivo)에서 플라바논 유도체를 시료에 처리하는 단계를 포함하는 AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 또는 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)의 발현 또는 활성을 저해하는 방법을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 플라바논 유도체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 아밀로이드 베타에 의해 유도된 신경독성으로부터 신경세포를 보호하는 방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 플라바논 유도체를 포함하는 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)에 대한 결합제를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 플라바논 유도체를 포함하는 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)에 대한 길항제를 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 플라바논 유도체는 AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 또는 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)의 과발현 또는 과활성에 의하여 유발되는 퇴행성 신

경질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 플라바논 유도체의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 2는 플라바논 유도체에 의한 AChE (A), BChE (B) 및 BACE1 (C)의 저해 활성을 나타낸 것이다 (베르베린, 갈란타민 및 케르세틴이 양성 대조군으로 사용됨).

도 3A 및 3B는 다른 농도의 기질 조건 (0.6 mM (●), 0.3 mM (○) 및 0.1 mM (▼))에서 디다이민 (A) 및 폰시린 (B)에 의한 AChE 저해의 Dixon plot을 나타낸 것이고, 도 3C는 다른 농도의 디다이민 (0 μM (Δ), 0.8 μM (▼), 4 μM (○) 및 20 μM (●))에 의한 AChE 저해의 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 것이며, 도 3D는 다른 농도의 폰시린 (0 μM (Δ), 4 μM (▼), 20 μM (○) 및 100 μM (●))에 의한 AChE 저해의 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 것이다.

도 4A 및 4B는 다른 농도의 기질 조건 (0.6 mM (●), 0.3 mM (○) 및 0.1 mM (▼))에서 디다이민 (A) 및 폰시린 (B)에 의한 BChE 저해의 Dixon plot을 나타낸 것이고, 도 4C는 다른 농도의 디다이민 (0 μM (Δ), 4 μM (▼), 20 μM (○) 및 100 μM (●))에 의한 BChE 저해의 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 것이며, 도 4D는 다른 농도의 폰시린 (0 μM (Δ), 4 μM (▼), 20 μM (○) 및 100 μM (●))에 의한 BChE 저해의 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 것이다.

도 5A 및 5B는 다른 농도의 기질 조건 (150 nM (●), 250 nM (○) 및 750 nM (▼))에서 디다이민 (A) 및 폰시린 (B)에 의한 BACE1 저해의 Dixon plot을 나타낸 것이고, 도 5C는 다른 농도의 디다이민 (0 μM (■), 0.5 μM (Δ), 2.5 μM (▼), 12.5 μM (○) 및 62.6 μM (●))에 의한 BACE1 저해의 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 것이며, 도 5D는 다른 농도의 폰시린 (0 μM (■), 0.5 μM (Δ), 2.5 μM (▼), 12.5 μM (○) 및 62.6 μM (●))에 의한 BACE1 저해의 Lineweaver-Burk plot을 나타낸 것이다.

도 6은 플라바논 유도체와 2WJO의 도킹된 위치에서의 상호작용을 나타낸 것으로서, 디다이민 (A), 폰시린 (B), 나린제닌 (C), QUD (D) 및 2WJO-QUD complex docking protocol (E)은 분홍색 막대기로 나타냈고, 2WJO와 형성된 수소결합은 녹색 막대기로 나타냈으며, 소수성 상호작용 (van der Waals interaction)과 관련된 2WJO의 잔기는 녹색선으로 나타낸 것이다.

도 7A 및 7B는 플라바논 유도체 (디다이민 (A), 폰시린 (B))와 AChE 사이의 분자 도킹을 나타낸 것이고, 도 7C 및 7D는 플라바논 유도체 (디다이민 (C), 폰시린 (D))와 BChE 사이의 분자 도킹을 나타낸 것이다.

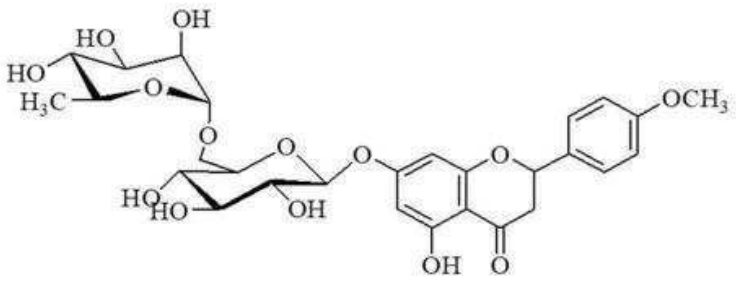
도 8은 PC12 세포에 플라바논 유도체를 24 시간 동안 전처리하고, 2 시간 동안 $A\beta_{25-35}$ (10 μM)을 처리한 후, MTT 어세이를 통해 세포생존률을 측정한 결과이다 (데이터는 3 회 실험에 대하여 평균 ± SEM 로 표시함; 및 $^{a-j}$ 문자는 평균에 대한 통계적 차이를 나타냄).

도 9A는 PC12 세포에서 디다이민을 전처리하고, $A\beta_{25-35}$ 을 처리한 후 세포생존률을 측정한 결과이고, 9B는 $A\beta_{25-35}$ 이 처리된 PC12 세포에 디다이민을 처리한 후, BACE1의 발현량을 측정한 결과이며, 9C는 APP, sAPPsβ 및 C99의 발현량을 웨스턴블럿을 통해 측정한 결과이다 (결과는 β-actin으로 표준화하였고, 세 번의 독립된 실험에서의 평균 ± SEM 로 표시함; 및 $^{a-f}$ 문자는 평균에 대한 통계적 차이를 나타냄).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명의 플라바논 유도체는 디다이민 (didymin), 폰시린 (poncirin) 및 나린제닌 (naringenin)으로서 각각 하기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물을 의미한다. 본 발명의 플라바논 유도체는 당업계에 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질을 사용할 수 있다.

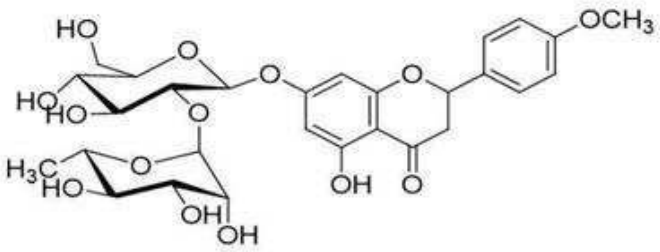
[0032] [화학식 1]



Didymin

[0033]

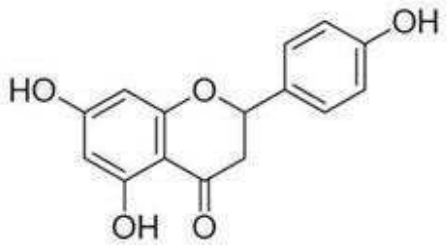
[0035] [화학식 2]



Poncirin

[0036]

[0038] [화학식 3]



Naringenin

[0039]

[0041] 본 발명에서 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 노인성 치매, 당뇨성 치매, 알코올성 치매 및 혈관성 치매을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 따른 퇴해성 신경질환은 AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)로 이루어진 군 중 하나 이상의 효소의 과발현 또는 과활성에 의하여 유발되는 퇴행성 뇌질환일 수 있고, 특히, 본 발명의 플라바논 유도체는 상기 세 가지 효소를 삼중으로 억제할 수 있고, 더 나아가 sAPPβ (soluble N-terminal fragment) 및 C99 (12-kDa C-terminal fragment)의 과발현에 의하여 유발되는 퇴행성 신경질환일 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에 따른 퇴행성 신경질환은 아밀로이드 단백질의 β-시트(sheet) 구조에 의해 유발되는 퇴행성 신경질환일 수 있고, 상기 아밀로이드 단백질은 $A\beta_{25-35}$ 일 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 플로바논 유도체는 신경세포 보호 용도로 이용할 수 있고, 상기 신경세포 보호

는 아밀로이드 단백질의 β-시트(sheet) 구조에 의해 유발되는 독성일 수 있다.

[0046] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 나아가, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태의 피부 외용제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0048] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 싸이코트리아 루브라 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0050] 상기 용어, "개체"란 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0051] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0053] 본 발명의 식품 조성물은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있으며, 기능성 식품, 건강기능식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다.

[0054] 본 발명의 용어, "기능성 식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0055] 본 발명의 용어, "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된

식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.

[0056] 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 조성물은 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물 및 이의 분획물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명에 적용될 수 있는 식품에는 예컨대, 특수영양식품(예: 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예: 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예: 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예:스낵류), 유가공품(예: 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예: 과실, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등) 등 모든 식품을 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료의 형태로 사용될 경우에는 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제, 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0060] 본 발명에서 사용되는 용어, "길항제(antagonist)"는 임의의 메커니즘에 의하여, 수용체 또는 세포 내 매개체와 같은 다른 분자의 영향을 부분적으로 또는 완전히 저해하는 분자를 의미하며, 본 발명에서 길항제는 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)에 자신이 결합함으로서 효현제(agonist)가 수용체에 결합하는 것을 막고, 자신은 수용체를 통한 생리작용을 나타내지는 않는 물질을 의미한다. 따라서, 본 발명의 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)의 길항제는 상기 효소에 강한 결합력을 가지므로 마이크로 분자 수준에서 부분적으로 상기 효소 관련 시그널링을 저해하되 완전히 폐지하지 않는 작용을 할 수 있다.

[0061] 본 발명에서 사용되는 용어, "AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) 길항제"는 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)의 생물학적 활성을 직간접적으로, 또는 실질적으로 방해, 감소 또는 저해할 수 있는 물질을 말한다.

[0062] 본 발명에서 사용되는 용어, "억제"는 결핍, 부조화, 그 밖의 많은 원인에 의하여 생물 활동이나 활성이 저하되는 현상을 말하며, 효소의 활성/발현을 부분적으로 또는 완전히 블로킹하거나, 감소시키거나, 예방하거나, 활성화를 지연시키거나, 불활성화시키거나 또는 하향 조절하는 것일 수 있다

[0063] 일 측면에서, 본 발명은 플라바논 유도체를 포함하는 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) 결합제에 관한 것이다.

[0064] 상기, 각 플라바논 유도체들의 AChE(acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase) 및 BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)에 결합하는 위치는 하기 실시예에서 상세히 설명한다.

[0065] 본 발명에서 사용하는 용어, "시료"는 생물학적 시료를 포함할 수 있으며, 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함할 수 있다.

[0067] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0069] **실시예 1. 실험재료 및 방법**

[0070] **1.1. 실험재료**

[0071] 전기뱀장어 유래 AChE (acetylcholinesterase, EC3.1.1.7), 말 혈청(horse serum) 유래 BChE (butyrylcholinesterase, EC 3.1.1.8), ACh (acetylthiocholine iodide), BCh (butyrylthiocholine chloride), DTNB (5,5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)), 디다이민 (didymin, >98% purity), 폰시린 (poncirin, >95% purity), 나린제닌 (naringenin), 케르세틴 (quercetin, >95% purity), 갈란타민 (galanthamine) 및 베르베린 (berberine)은 다른 언급이 없는 한 Merck, Fluka 또는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. BACE1 FRET (fluorescence resonance energy transfer) assay kits (β-secretase, human recombinant)은 Pan Vera Co. (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), DMSO (N, N-dimethyl sulfoxide)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 아밀로이드 베타 (Amyloid beta, Aβ 25-35)는 Bachem California Inc. (Torrance, CA, USA)에서 구입하였다. RPMI 1640, FBS (fetal bovine serum), penicillin, streptomycin 및 말 혈청 (horse serum) Gibco (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Anti-BACE1 (ab2077; Abcam), anti-C99 (M066-3; MBL), human anti-sAPPβ Swedish (sAPPβ-sw), APP, monoclonal β-actin 은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 플라바논 유도체 (flavanone derivatives)의 화학구조식은 도 1과 같다.

[0073] **1.2. *In vitro* ChE (Cholinesterase) 효소 어세이**

[0074] ChE에 대한 플라보노이드의 저해 활성은 Ellman et al. (Biochem. Pharmacol. 7 (1961) 88-95)에 의해 개발된 분광광도법 (spectrophotometric method)을 사용하여 측정되었다. ACh (acetylcholine) 및 BCh (butyrylcholine)은 각각 AChE (acetylcholinesterase) 및 BChE (butyrylcholinesterase)에 대한 저해 활성을 측정하는 기질로서 사용된다. 반응물은 140 μL의 인산나트륨 버퍼 (pH 8.0); 20 μL의 플라보이노이드 샘플 (최종 농도 100 μM); 및 20 μL의 AChE 또는 BChE 용액 (0.36 U/mL)를 첨가하여 혼합하고 상온에서 10 분 동안 반응시켰다. 모든 샘플 및 양성 대조군 (베르베린, 갈란타민)은 10% DMSO 에 녹여 사용하였다. 반응은 각각 10 μL DTNB; 및 10 μL의 ACh 또는 BCh 을 첨가하여 시작되었다. ACh 또는 BCh의 가수분해는 412 nm 에서 5 분 동안 ACh 또는 BCh의 효소적 가수분해에 의해 방출된 티오콜린 (thiocholine)과 DTNB의 반응으로부터 기인된 노란색의 5-티오-2-니트로벤조에이트 음이온의 형성을 추적함으로써 관찰되었다. 모든 반응은 spectrophotometer (VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 96-well microplate에서 세 번 수행되고 기록되었다. 퍼센트 (%) 저해는 다음의 수식으로 계산되었다: % 저해 = (1 - S / E) × 100 (S는 샘플을 처리한 경우의 효소 활성이고, E는 샘플을 처리하지 않은 경우 효소 활성임). 각 샘플의 ChE 저해 활성은 로그(log)-투여량(dose) 저해 곡선으로부터 계산된 IC_{50} 값 (기질인 ACh 또는 BCh의 가수분해를 50% 까지 저해하는데 필요한 농도, μM)으로 나타내었다.

[0076] **1.3. *In vitro* BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) 효소 어세이**

[0077] BACE1 효소 어세이는 BACE1 FRET (fluorescence resonance energy transfer) assay kits (β-secretase, human recombinant, PanVera Co., Madison, WI, USA)을 사용하였다. 어세이는 제공된 매뉴얼을 약간 변경하여 수행되었다 (Asian. Pac. J. Trop. Med. 9 (2016) 103-111). 양성 대조군은 케르세틴이 사용되었다.

[0079] **1.4. AChE, BChE 및 BACE1를 저해하는 플라바논 유도체의 키네틱 파라미터 (kinetic parameter)**

[0080] 본 발명자들은 플라바논 유도체가 AChE, BChE 및 BACE1 을 저해하는 메커니즘을 확인하기 위해 Lineweaver-Burk plot 및 Dixon plot의 두 가지 보완적인 키네틱 방법을 사용하였다 (J. Am. Chem. Soc. 56 (1934) 658-666; Biochem. J. 137 (1974) 143-144; 및 Biochem. J. 55 (1953) 170-171). AChE 및 BChE 저해의 메커니즘은 다른 농도의 기질 (플라바논 유도체에 대해 0.6 내지 0.1 mM)에 대한 효과를 관찰하여 확인하였다. AChE 및 BChE 저해 어세이는 다양한 기질의 농도로 수행되었다. 간단히, 10% DMSO 에 용해시킨 20 μL의 플라바논 유도체 샘플은 140 μL의 버퍼와 20 μL의 AChE 또는 BChE (0.36 U/mL)을 넣어 혼합하여 상온에서 10 분 동안 반응시켰다. 이후, 10 μL의 DTNB (0.5 mM)과 10 μL의 ACh 또는 BCh (0.6 mM)을 첨가하여 최종 혼합물은 상온에서 5 분 동안 반응시켰다. 혼합물의 흡광도는 microplate reader를 사용하여 412 nm에서 측정하였다. 플라바논 유도체에

의한 BACE1 저해에 대한 Dixon plot은 375, 250 및 150 nM 기질의 존재 하에 얻었다. 저해 키네틱 분석을 위한 각 플라바논 유도체의 실험 농도는 0 μM (■), 0.5 μM (Δ), 2.5 μM (▼), 12.5 μM (○) 및 62.6 μM (●)로 나타내었다. 저해상수 (K_i)는 Dixon plot의 분석에서 x-축 절편값을 K_i 로 하여 결정하였다.

[0082] 1.5. AChE 및 BChE의 분자 도킹 시뮬레이션

[0083] 도킹 연구는 advanced docking program AutoDock 4.2로 수행되었다 (J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785-2791). AChE (acetylcholinesterase) 및 BChE (butyrylcholinesterase)의 X-선 결정학적 구조는 Brookhaven protein data bank (http://www.rcsb.org/)에서 검색하였다. 템플릿 타겟 단백질 (PDB 코드: 4ey7 & 1p0i)의 준비를 위하여, 동족체 리간드 및 모든 결정학적 물 분자가 초기 수용체 구조로부터 생략되었고, 모든 도킹 시뮬레이션이 chain A에서 수행되었다. ADT 프로그램은 비극성 수소를 수용체의 관련 탄소 원자로 합치는데 사용하였고, Kollman 전하가 부여되었다. 도킹된 리간드에는 비극성 수소가 첨가되었고, ADT program에 의해 Gasteiger 전하가 부여되고, 비틀림 자유도가 할당되었다. Lamarckian 유전 알고리즘 (LGA, Lamarckian genetic algorithm)은 활성부위에서 상호작용/결합을 모델링하기 위해 적용되었다. 각 리간드에 대해 100 개의 바람직한 독립적인 유전 알고리즘가 고려되었다. Lamarckian 유전 알고리즘의 경우 27,000 maximum generation; 0.02의 유전자 돌연변이율 (gene mutation rate); 및 0.8 의 교차율이 사용되었다. 실제 도킹 과정에서 단백질을 특징짓는 그리드 맵 (grid map)은 AutoGrid 로 계산되었다. 그리드의 크기는 활성부위 뿐만 아니라 주변 표면의 상당 부분을 포함하는 방식으로 설정되었다. 이러한 목적을 위해, x, y 및 z 방향에서의 60 * 60 * 60 point의 그리드가 AChE 및 BChE의 촉매부위의 질량 중심에서 0.375 Å의 간격을 갖도록 설계되었다. 클러스터 분석은 도킹된 결과에서 3 Å의 RMSD tolerance를 사용하여 수행되었다.

[0085] 1.6. BACE1의 분자 도킹 시뮬레이션

[0086] BACE1 structure (PDB ID-2WJO)가 도킹 연구에 사용되었다. 누락된 잔기(residue) 162-171 은 SWISS-MODEL (Bioinformatics. 22 (2006)195-201) 웹-서버를 사용하여 모델링하였고, 생성된 모델의 질은 ANOLEA 및 QMEAN 분석을 사용하여 판단하였다. 이후, 선택된 모델은 도킹 연구에서 가동되었다. 비극성 전하가 합쳐지고 Gasteiger 전하가 모든 수용체 원자에 부여되었다. 모든 리간드는 Polak Ribiere 결합 경사도 알고리즘으로 0.003 kcal/Å mol^{-1} 의 에너지 수렴에 대해 Hyper Chem 8에서 시행된 MM4+를 사용하여 그려지고 최적화되었다. Gasteiger 전하는 각 리간드의 원자에 부여되고 비극성 수소가 합쳐졌다. Autodock 4 (J. Mol. Recogn. 9 (1996) 1-5)으로 시행된 사용된 Lamarckian 유전 알고리즘은 검색 방법으로서 사용되었다. 0.375 Å의 기본 그리드 간격이 유지되고, 그리드는 단백질의 활성부위 잔기를 수용하도록 선택되었다. 도킹을 위한 파라미터는 최종 기준으로서 2,500,000 의 최대 에너지 평가 및 최대 27,000 세대를 가진 150 개의 초기 집단이 포함되었다. 1의 Elitism 값과 0.02의 돌연변이 확률 및 0.8의 교차율이 사용되었다. 각 리간드에 대해 200 도킹 런이 수행되었다.

[0088] 1.7. 세포배양

[0089] 크롬친화세포종(pheochromocytoma) 세포인 PC12 세포는 기존에 기재된 바와 같이 배양되고 유지되었다 (Mol. Cells 13 (2002) 113-117). PC12 세포주는 이식가능한 래트의 크롬친화세포종 (ACCT, Manassas, VA, USA)에서 유래되었다. 세포는 신경세포 표현형의 유도에 의한 NGF (nerve growth factor)에 가역적으로 반응한다. 성장 배지는 RPMI 1640, 10% 열-불활성화된 말 혈청(horse serum), 5% FBS (fetal bovine serum), 50 units/mL 페니실린 (penicillin) 및 100 μg/mL 스트렙토마이신 (steptomycin)으로 이루어졌다. 배양은 5% CO_2 및 37 ℃ 의 인큐베이터에서 유지되었다. PC12 세포는 80-90 %의 컨플루언시가 된 경우 배양접시 (100 mm)의 표면에서 떼어내고, 배지를 세포에 직접 반복적으로 강하게 분주하여 단일세포로 분산시켜 계대배양하였다.

[0091] 1.8. 아밀로이드 베타 ($A\beta_{25-35}$) 저장액의 준비

[0092] 아밀로이드 베타 (이하, "Aβ"으로 기재함)는 알츠하이머의 잠재적인 원인이고 (Nature 382 (1997) 685-691; 및

Cell 7 (1993)1039-1042), Aβ 올리고머는 단량체(monomer, 가용성) 또는 섬유소(fibril)보다 뉴런에 더 독성이 있다 (J. Biol. Chem. 281(2006) 28079-28089)고 보고되고 있다. 이에 본 발명에 사용된 $A\beta_{25-35}$ 은 사용 전에 미리 응집되도록 하였다. 간단히, $A\beta_{25-35}$ (1 mg)은 1 ml의 RPMI 1640 배지에 녹이고 응집을 유도하기 위해 3일 동안 37 ℃ 수조(water bath)에 두었다. 이후, 응집된 $A\beta_{25-35}$ 은 100 μg/ml (100 μM)로 희석하여 사용 전까지 -20 ℃에 저장하였다.

[0094] 1.9. 세포생존률 측정

[0095] 플라바논 유도체가 $A\beta_{25-35}$ 으로부터 PC12 세포를 보호하는 효과가 있는지 여부는 MTT에서 MTT formazan으로 감소시키는 세포의 능력, 즉, 세포생존률을 측정하여 결정되었다. 간단히, PC12 세포는 96-well plate에 4×10^4 cells/well로 분주되었고, 24 시간 동안 주어진 농도의 플라바논 유도체가 전처리되었다. 이후, 세포는 추가적으로 2 시간 동안 $A\beta_{25-35}$ (10 μM)가 처리되었다. 이후, MTT 용액 (20 μl/well, 1 mg/ml stock solution in PBS)을 넣고 37 ℃에서 3 시간 동안 처리되었다. 이후, 세포는 100 μl의 lysis buffer (10%, w/v of SDS in 0.01N HCl)를 넣고 37 ℃에서 오버나잇으로 용해되었다. 이후, O.D. (optical density)은 microplate reader (Molecular Devices, MN, USA)를 사용하여 570 nm에서 측정되었다.

[0097] 1.10. 웨스턴블럿 분석

[0098] 세표는 24 시간 형질감염 후 추출되었다. 전체 단백질은 RIPA lysis buffer로 추출되었고, 농도는 bicinchoninic acid assay (Pierce, USA)으로 정량되었다. 이후, 20 μg의 단백질에 5X SDS (sodium dodecyl sulfate) 로딩 버퍼를 넣고 95 ℃에서 5 분 동안 변성시켰다. 이후, 10% SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전체 단백질을 분리하고 0.45μm NC (nitrocellulose) 멤브레인 (Beyotime)으로 이동시켰다. 이후, 5% 탈지우유로 멤브레인을 블러킹하고 BACE1, APP, C99 및 sAPPβ antibodies (1:1,000)와 β-actin antibody (1:1,000) (both from Cell Signaling Technology, USA)을 넣고 4 ℃에서 오버나잇으로 반응시켰다. 세척 후, 특이적인 2차 항체로 1 시간 동안 반응시킨 후, PBST 로 다시 3 번 세척하였다. 단백질 밴드는 odyssey scanning system (LI-COR, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 검출하였다. 실험은 3 회로 세 번에 걸쳐 수행하였고, 대표 도면을 나타내었다. 데이터의 농도 분석은 cooled CCD camera system EZ-Capture II 및 CS analyzer version 3.00 software (ATTO Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 수행되었다.

[0100] 1.11. 통계 분석

[0101] 모든 실험은 3 회 실험에 대해 평균 ± SEM 으로 나타내었다. 통계적으로 유의한 값은 ANOVA (analysis of variance) 및 Duncan's test (Systat Inc., Evanston, IL, USA)를 사용하여 분석되었고, P 값이 < 0.05 이면 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0103] 실시예 2. AChE, BChE 및 BACE1에 대한 플라바논 유도체의 저해 효과

[0104] 본 발명자들은 플라바논 유도체에 의한 알츠하이머의 치료 효과를 확인하기 위하여 플라바논 유도체의 AChE, BChE 및 BACE1에 대한 저해 효과를 조사하였다. 그 결과, AChE, BChE 및 BACE1은 플라바논 유도체에 의해 농도-의존적으로 저해되었다 (표 1 및 도 2). 모든 실험된 플라바논 유도체는 현저한 AChE의 저해 활성을 나타냈으며, 특히, 디다이민의 IC_{50} 값은 2.13 ± 0.16 μM 로서, 폰시린 (IC_{50}: 12.96 ± 0.69 μM)과 나린제닌 (IC_{50}: 36.20 ± 0.10 μM)에 비해 강력한 AChE의 저해 효과를 나타냈다 (도 2A).

[0105] AChE 저해 어세이의 결과와 유사하게, 디다이민 및 폰시린은 양성 대조군 (베르베린의 IC_{50}: 1.69 ± 0.14 μM; 및 갈란타민의 IC_{50}: 1.23 ± 0.11 μM)과 비교하여 IC_{50} 값이 각각 8.12 ± 0.42 및 6.29 ± 0.52 μM 로서 BChE의 저해 활성을 나타냈다 (도 2B).

[0106] 또한, BACE1의 경우 디다이민, 폰시린 및 나린제닌은 양성 대조군인 케르세틴 (21.71 ± 1.42 μM)과 비교하여

IC_{50} 값이 각각 2.34 ± 0.07, 3.96 ± 0.09 및 38.06 ± 3.23 μM 으로 나타남으로써 BACE1의 저해 활성이 있음을 확인하였다 (도 2C).

표 1

[0108]

Flavonoids	AChE[a]	BChE[b]		BACE1[c]
	Mean ± SEM	Mean ± SEM	SI[d]	Mean ± SEM
Didymin	2.13 ± 0.16	8.12 ± 0.42	3.81	2.34 ± 0.07
Poncirin	12.96 ± 0.69	6.29 ± 0.52	0.48	3.96 ± 0.09
Naringenin	36.20 ± 0.10	163.99 ± 0.46	4.53	38.06 ± 3.23
Berberine[e]	0.44 ± 0.03	1.69 ± 0.14	3.84	–
Galanthamine[f]	0.38 ± 0.02	1.23 ± 0.11	3.23	–
Quercetin[g]	–	–	–	21.71 ± 1.42

[0110] [a,b,c]50% 저해 농도 (IC_{50}, μM)는 3회 실험에 대한 평균 ± S.E.M로 나타냄;

[0111] [d]SI: 선택지수 (BChE/AChE); 및

[0112] [e]Berberine, [f]Galanthamine 및 [g]Quercetin은 각각 ChE and BACE1 어세이에 대한 양성 대조군으로 사용됨.

[0114] **실시예 3. AChE, BChE 및 BACE1에 대한 플라바논 유도체의 저해 반응 키네틱 분석**

[0115] 본 발명자들은 플라바논 유도체에 의해 유도된 BACE1, AChE 및 BChE의 저해 메커니즘을 결정하기 위하여, 다른 기질과 저해제 농도에서의 Lineweaver-Burk plot 및 Dixon plot을 사용하여 저해 키네틱을 조사하였다. 저해 상수 (K_i)는 Dixon plot의 분석에서 x-축 절편값을 K_i 로 하여 결정하였다.

[0116] 그 결과, 폰시린에 의한 AChE 저해는 Ki 값이 20.43 μM 로서 비경쟁적 저해제로 확인되었고, 디다이민은 Ki 값이 6.86 μM 로서 혼합된 타입의 AChE 저해제인 것으로 확인되었다 (도 3 및 표 2). BChE의 저해에 있어, 디다이민은 Ki 값이 9.11 μM 로서 혼합된 타입의 저해제로 나타났고, 폰시린은 Ki 값이 10.33 μM 로서 경쟁적 저해제로 확인되었다 (도 4 및 표 2). 또한, BACE1의 저해에 있어, 디다이민 및 폰시린은 Ki 값이 각각 4.99 및 7.61 μM 로서 혼합된 타입의 저해제로 확인되었다 (도 5 및 표 2).

표 2

[0118]

Flavonoids	AChE		BChE		BACE1	
	Inhibition type[a]	K_i (μM)[b]	Inhibition type[a]	K_i (μM)[b]	Inhibition type[a]	K_i (μM)[b]
Didymin	Mixed-type	6.86	Mixed-type	9.11	Mixed-type	4.99
Poncirin	Noncompetitive	20.43	Competitive	10.33	Mixed-type	7.61

[0120] [a]Dixon plot으로 결정됨; 및 [b]Dixon and Lineweaver plot으로 결정됨.

[0122] **실시예 4. BACE1에 대한 플라바논 유도체의 분자 도킹 분석**

[0123] 플라바논 유도체 및 QUD (2-amino-3-{(1R)-1-cyclohexyl-2-[(cyclohexylcarbonyl) amino] ethyl}-6-phenoxyquinazolin-3-Ium)의 분자 도킹 모델은 도 6에 나타내었다. Protein Data Bank에 따르면, QUD는 최근까지 보고된 것 중 가장 강력한 BACE1 저해제이다. 도킹 연구는 단백질 구조 2WJO로 수행되었다. 결과에서 2WJO 잔기는 보통 BACE1과 비교하여 다르게 번호가 매겨진다. 예를 들어, BACE1에서는 촉매 쌍이 Asp32 및 Asp228을 포함하나, 2WJO 구조에서는 Asp36 및 Asp232으로 대응된다. Autodock 4.2에 의해 생성된 리간드-효소 복합체에서 플라바논 유도체와 QUD는 안정적으로 BACE1의 동일 포켓 내에 위치한 것으로 나타났다.

[0124] BACE1의 활성부위에서 디다이민의 해당 리간드 상호작용은 디다이민의 당 부분과 BACE1의 Asp36 및 Lys111 잔기 사이의 수소결합을 통해 이루어졌다 (도 6A 및 표 3). 또한, Phe112, Gly78, Lys79, Tyr75, Trp80, Val73, Arg132, Ile130 및 Tyr202은 소수성 상호작용(Van der Waals interaction)을 나타냄으로써, BACE1과 디다이민 사이의 상호작용을 강화시켰다.

[0125] 폰시린은 BACE1와 2 개의 수소결합을 형성하였고, -8.2 kcal/mol의 결합 친화력을 나타냈다 (도 6B 및 표 3). BACE1의 Ile130 및 Asp232 잔기가 폰시린의 당 부분과 2 개의 수소결합을 형성하였다. 폰시린과 BACE1의 Phe112, Tyr75, Trp119, Gln16, Leu34, Thr236, Gly234, Gly38 및 Tyr202 잔기 사이에서는 강한 소수성 상호작용이 형성되었다.

[0126] 나린제닌은 BACE1과 수소결합을 형성하였고, -6.98 kcal/mol의 결합 친화력을 나타냈다 (도 6C 및 표 3). BACE1의 Ile130은 나린제닌과 하나의 수소결합을 형성하였다. 나린제닌과 BACE1의 Arg132, Asn41, Ser39, Ile122, Phe112, Gln77, Trp80, Val73 및 Lys79 잔기 사이에서는 강한 수소성 상호작용이 형성되었다.

[0127] 대조적으로, BACE1의 Gly234, Asp232 및 Asp36 잔기는 QUD와 수소결합을 형성하였고, Leu34, Phe112, Lys79, Gly78, Tyr75, Tyr202 및 Arg239 잔기와 소수성 상호작용을 형성하였다 (도 6D). 또한, 2WJO-QUD 복합체의 도킹 프로토콜을 평가하였다 (도 6E).

표 3

Enzyme	Ligands	Docking score (Kcal/mol)	H-bonds interacting residues	Hydrophobic interacting residues
AChE	Didymin	−11.7	Arg296, Asp74, Tyr341, Asn87, Gln71	Leu289, Trp286, Leu76, Val73, Phe338, Thr75, Tyr337
	Poncirin	−10.1	Asp74, Arg296, Ser293	Gln291, Glu292, Val294, Phe295, Phe297, Tyr124, Tyr337, Trp286, Tyr 341, Phe338, Leu289
	Donepezil	−11.6	Phe295	Tyr72, Trp286, Tyr 337, Trp 86, His447, Gly448, Glu202, Ser203, Gly121, Gly120, Phe338, Tyr124, Phe297, Tyr341, Val294, Ser293
BChE	Didymin	−7.8	Gln517, Gln518, Asp391, Glu422, Lys513	Thr512, Met511, Tyr500, Tyr420, Thr502, Arg515, Ala516
	Poncirin	−5.9	Ala516, Asp375, Glu422, Met511, Gln518	Tyr373, Thr374, Val377, Lys513, Arg515, Gln517, Leu514, Tyr500, Tyr420, Thr502, His372
	Donepezil	−7.38	Asp74, Arg296, Ser293	Gln291, Glu292, Val294, Phe295, Phe297, Tyr124, Tyr337, Trp286, Tyr341, Phe338, Leu289
BACE1	Didymin	−9.22	Asp36, Lys111	Phe112, Gly78, Lys79, Tyr75, Trp80, Val73, Arg132, Ile130, Tyr202
	Poncirin	−8.22	Ile130, Asp232	Phe112, Tyr75, Trp119, Gln16, Leu34, Thr236, Gly234, Gly38, Tyr202
	Naringenin	−6.98	Ile130	Arg132, Asn41, Ser39, Ile122, Phe112, Gln77, Trp80, Val73, Lys79
	QUD	−11.99	Gly234, Asp232, Asp36	Leu34, Phe112, Lys79, Gly78, Tyr75, Tyr202, Arg239

[0129]

[0131] **실시예 5. AChE 및 BChE에 대한 플라바논 유도체의 분자 도킹 분석**

[0132] 본 발명자들은 플라바논 유도체가 AChE 및 BChE 에 결합하는지 확인하기 위하여 분자 도킹 연구를 수행하였다. Autodock 4.2 시뮬레이션의 결과에 따르면, 디다이민 및 폰시린은 AChE와 각각 -11.7 및 -10.1 kcal/mol의 결합 에너지를 가진 것으로 나타났다 (도 7 및 표 3).

[0133] 디다이민은 AChE의 활성부위에 존재하는 Arg296, Asp74, Tyr341, Asn87 및 Gln71 잔기와 5 개의 수소결합을 형성하였다 (도 7A 및 표 3). Asn87 및 Gln71의 두 잔기는 디다이민의 메톡시 그룹과 수소결합을 형성하였고, Arg296, Asp74 및 Tyr341의 잔기는 디다이민의 당 부분과 3 개의 수소결합을 형성하였다. AChE의 Leu289, Trp286, Leu76, Val73, Phe338, Thr75 및 Tyr337 잔기는 디다이민과 소수성 상호작용을 형성하였다.

[0134] 폰시린은 AChE와 3 개의 수소결합을 형성하였고, -10.1 kcal/mol 결합 에너지를 나타냈다 (도 7B 및 표 3). AChE의 Asp74 잔기는 폰시린의 하이드록실 그룹과 수소결합을 형성하였고, Arg296 잔기는 폰시린의 산소 원자와

수소결합을 형성하였으며, Ser293 잔기는 폰시린의 당 부분과 수소결합을 형성하였다. 또한, AChE의 Gln291, Glu292, Val294, Phe295, Phe297, Tyr124, Tyr337, Trp286, Tyr341, Phe338 및 Leu289 잔기는 폰시린과 소수성 상호작용을 형성하였다.

[0135] 양성 대조군인 도네페질 (Donepezil)은 AChE와 -11.06 kcal/mol의 결합 에너지를 나타냈고, AChE의 Phe295 잔기와 수소결합을 형성하였다 (표 3). AChE의 Tyr72, Trp286, Tyr 337, Trp86, His447, Gly448, Glu202, Ser203, Gly121, Gly120, Phe338, Tyr124, Phe297, Tyr341, Val294 및 Ser293 잔기는 도네페질과 소수성 상호작용을 형성하였다.

[0136] 디다이민은 BChE와 -7.8 kcal/mol의 결합 친화력을 나타냈고, BChE의 활성부위에 존재하는 Gln517, Gln518, Asp391, Glu422 및 Lys513 잔기와 5 개의 수소결합을 형성하였다 (도 7C 및 표 3). Lys513, Gln517 및 Gln518 잔기는 각각 디다이민의 메톡시 그룹, 하이드록실 그룹 및 산소 원자와 수소결합을 형성하였다. 또한, Asp391 및 Glu422 잔기는 디다이민의 당 부분과 수소결합을 형성하였다. BChE의 Thr512, Met511, Tyr500, Tyr420, Thr502, Arg515 및 Ala516 잔기는 디다이민과 강한 소수성 상호작용을 형성하였다.

[0137] 폰시린은 BChE의 활성부위에서 Ala516, Asp375, Glu422, Met511, Gln518, Tyr373, Thr374, Val377, Lys513, Arg515, Gln517, Leu514, Tyr500, Tyr420, Thr502 및 His372 의 16 개 잔기와 상호작용을 형성하였다 (도 7D 및 표 3). BChE의 Asp375 및 Gln518 잔기는 폰시린의 당 부분과 2 개의 수소결합을 형성하였고, Glu422 and Met511은 폰시린의 메톡시 그룹과 2 개의 수소결합을 형성하였으며, Ala516 잔기는 폰시린의 산소 원자와 수소결합을 형성하였다.

[0138] 대조적으로, 양성 대조군인 도네페질은 BChE의 활성부위에서 Asp74, Arg296, Ser293, Gln291, Glu292, Val294, Phe295, Phe297, Tyr124, Tyr337, Trp286, Tyr341, Phe338 및 Leu289 의 14 잔기와 상호작용을 형성하였고, 이 중 3 개의 수소결합을 형성하였다 (표 3).

[0140] **실시예 6. $A\beta_{25-35}$-유도의 신경세포 사멸에 대한 플라바논 유도체의 보호 효과**

[0141] 본 발명자들은 플라바논 유도체가 $A\beta_{25-35}$-유도의 신경세포 사멸로부터 세포를 보호하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 다른 농도의 플라바논 유도체를 전처리하여 세포생존률을 측정하는 실험을 수행하였다. 그 결과, PC12 세포에 10 μM의 $A\beta_{25-35}$ 가 처리된 경우 세포생존률은 46% 까지 감소되었으나, PC12 세포에 플라바논 유도체를 전처리한 경우에는 현저하게 세포생존률이 증가되었음을 확인하였다 (도 8). 이는 플라바논 유도체가 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경세포 사멸로부터 세포보호 효과가 있음을 의미한다.

[0142] 특히, 10 및 20 μM의 디다이민이 전처리된 경우 PC12 세포의 세포생존률은 각각 82 ± 0.3% 및 94 ± 0.3% 으로 현저하게 증가되었다. 또한, 15 및 30 μM의 폰시린을 전처리한 경우 세포생존률은 각각 66 ± 0.7% 및 82 ± 0.5% 로 증가되었고, 50 및 100 μM의 나린제닌을 전처리한 경우 세포생존률은 각각 61 ± 0.6% 및 69 ± 1.5% 로 증가되었다. 양성 대조군인 커큐민 (curcumin)과 레스베라트롤 (resveratrol)은 25 μM의 농도에서 세포생존률이 각각 86 ± 0.9% 및 67 ± 1.2% 로 증가되었다.

[0143] 상기 결과로부터, 플라바논 유도체는 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경세포의 세포독성으로부터 현저한 세포보호 효과가 있음을 확인하였다.

[0145] **실시예 7. $A\beta_{25-35}$-유도의 신경 독성에 대한 디다이민의 효과**

[0146] 본 발명자들은 플라바논 유도체 중 디다이민이 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성으로부터 세포보호 효과가 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 그 결과, PC12 세포에 $A\beta_{25-35}$ 를 처리하면 세포생존률이 43% 까지 현저하게 감소되었으나, 5 내지 40 μM의 디다이민을 전처리한 경우에는 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 세포독성이 감소되고 현저하게 세포생존률이 회복되는 효과가 있음을 확인하였다 (도 9A).

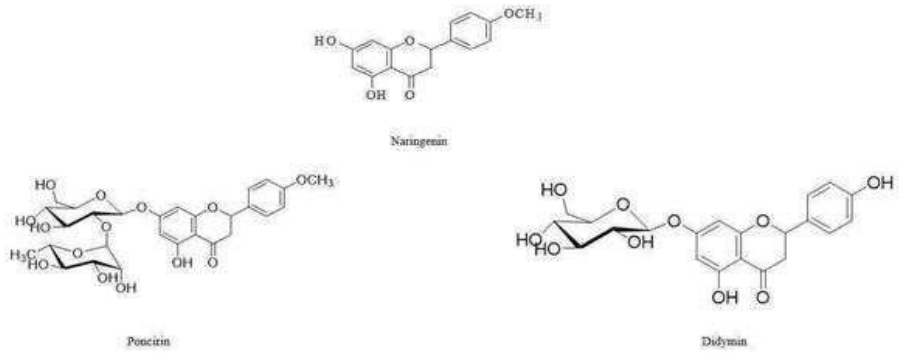
[0147] 또한, 본 발명자들은 디다이민이 BACE1, APP (amyloid precursor protein), sAPPβ (soluble N-terminal fragment) 및 C99 (12-kDa C-terminal fragment) 단백질의 발현에 영향을 주는지 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 디다이민을 처리한 세포에서는 대조군에 비해 농도-의존적으로 BACE1, sAPPβ 및 C99의 발현이 현저하

게 감소되었음을 확인하였다 (도 9B 및 9C). 다만, APP의 발현에는 현저한 변화가 나타나지 않았다.

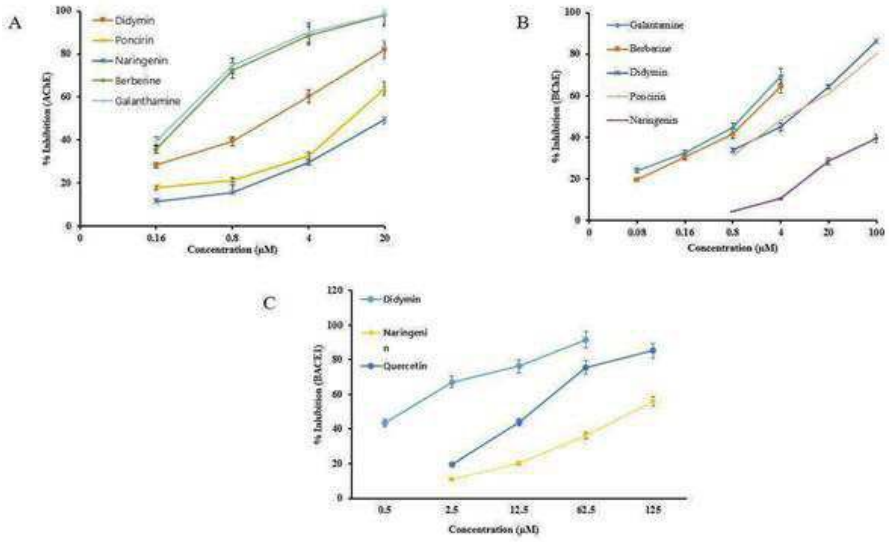
[0148] 상기 결과로부터, 디다이민은 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 세포독성으로부터 세포를 보호하고, BACE1, sAPPβ 및 C99의 발현을 현저하게 감소시켜 Aβ 응집을 차단함으로써 알츠하이머병의 예방 또는 치료 효과가 있음을 확인하였다.

도면

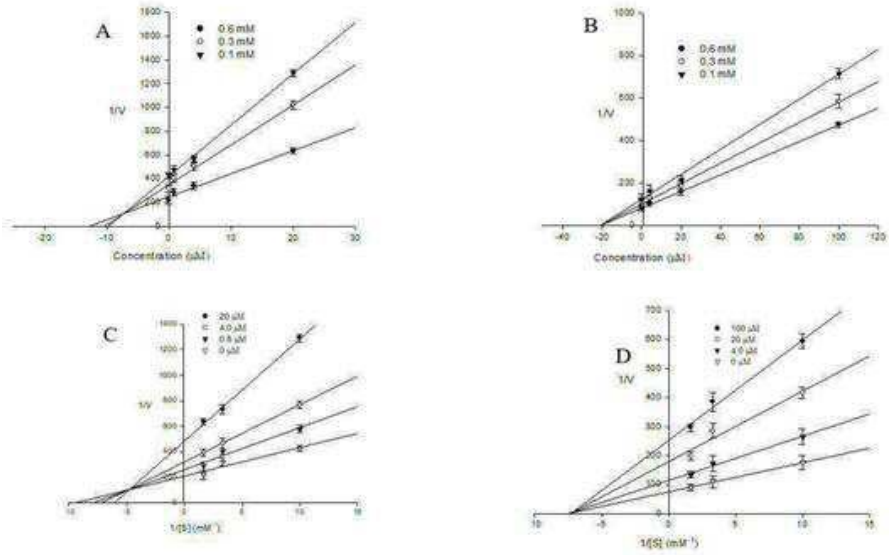
도면1



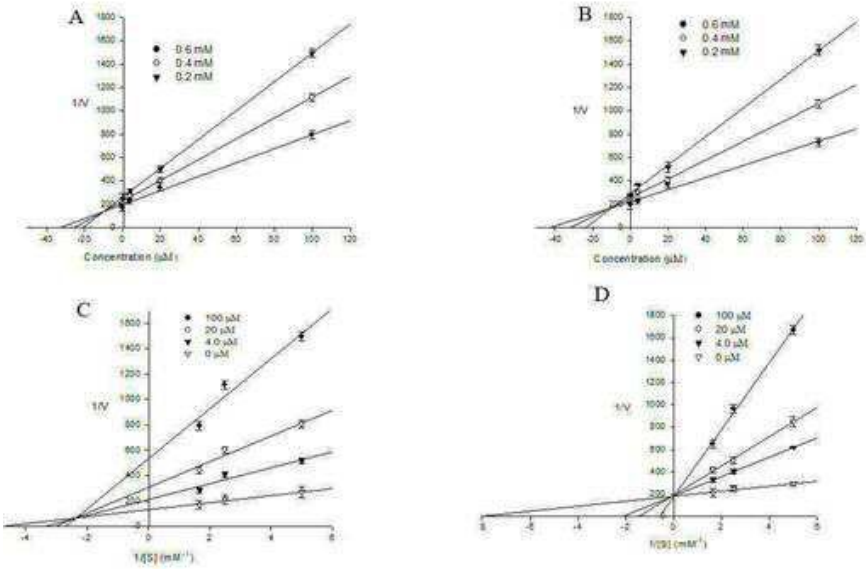
도면2



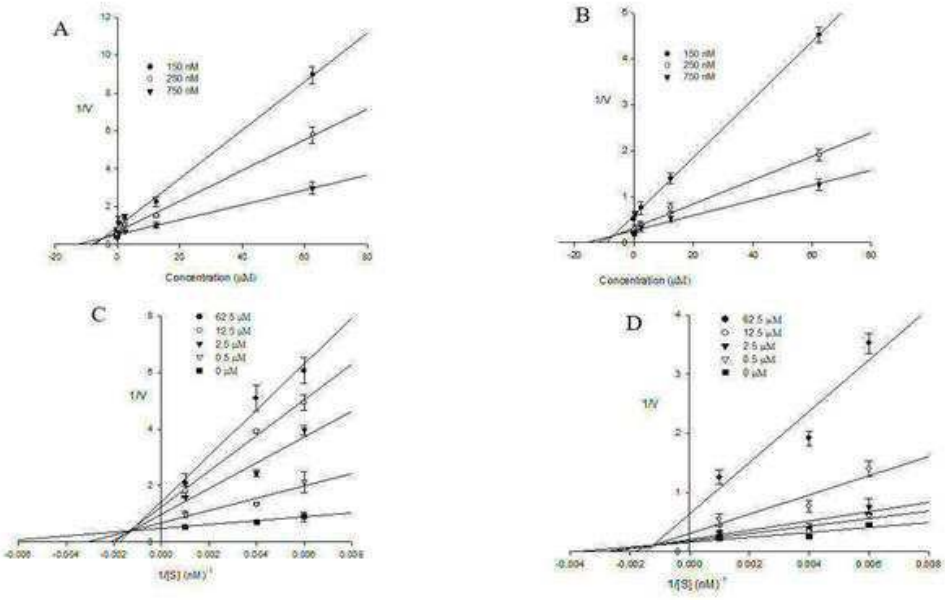
도면3


A
B
C
D
1/V
Concentration (μM)
1/[S] (mM⁻¹)

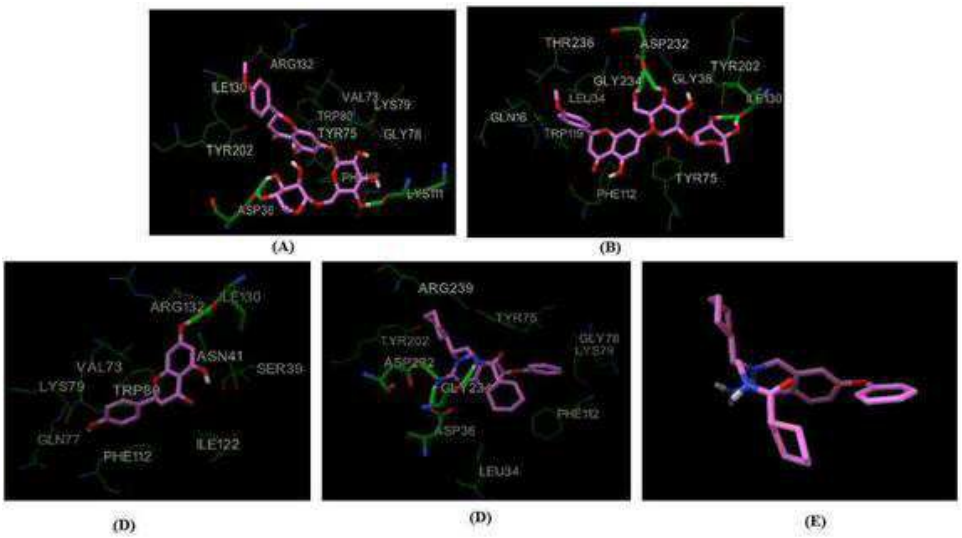
도면4


A
B
C
D
1/V
Concentration (μM)
1/[S] (mM⁻¹)

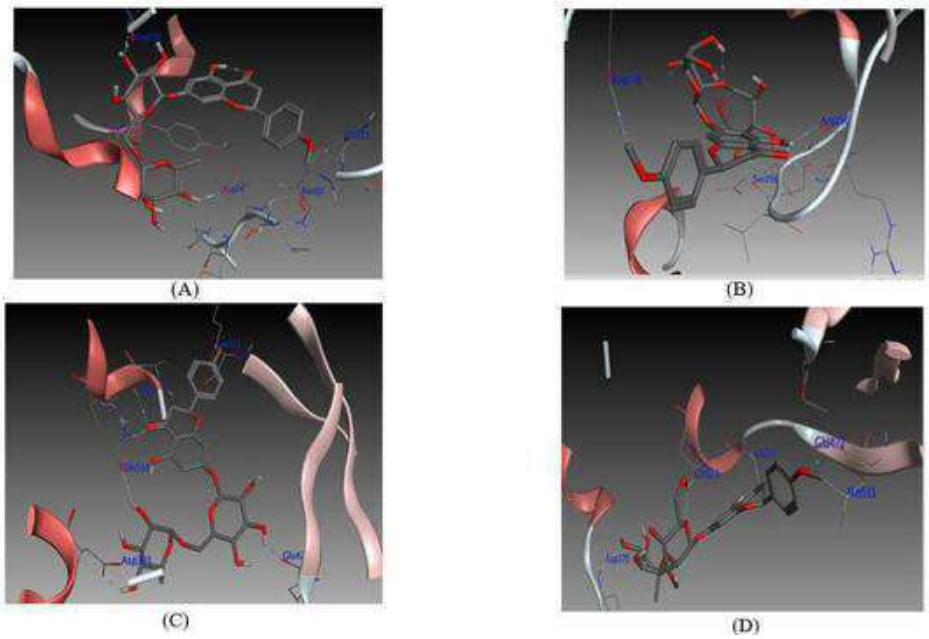
도면5


A
150 nM
250 nM
750 nM
1/V
Concentration (μM)
B
150 nM
250 nM
750 nM
1/V
Concentration (μM)
C
62.5 μM
12.5 μM
2.5 μM
0.5 μM
0 μM
1/V
1/[S] (nM)⁻¹
D
62.5 μM
12.5 μM
2.5 μM
0.5 μM
0 μM
1/V
1/[S] (nM)⁻¹

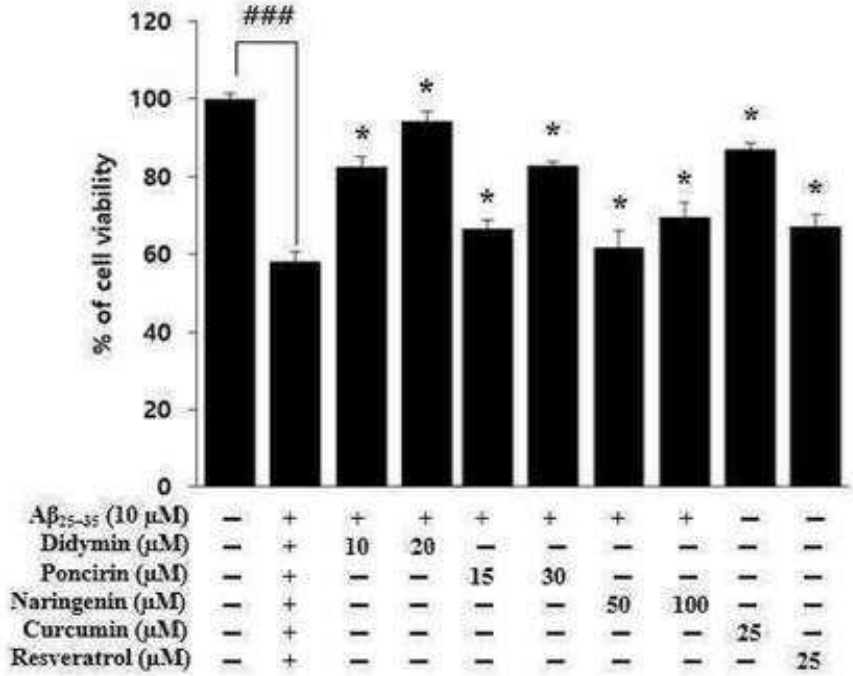
도면6


ARG132
ILE130
VAL73
LYS79
TRP80
TYR75
GLY78
TYR202
ASP38
LYS111
(A)
THR236
ASP232
TYR202
GLY234
GLY38
LEU34
ILE130
GLN76
TRP119
TYR75
PHE112
(B)
ARG132
ILE130
ASN41
SER39
VAL73
LYS79
TRP80
GLN77
PHE112
ILE122
(D)
ARG239
TYR75
TYR202
ASP232
GLY78
LYS79
GLY234
PHE112
ASP38
LEU34
(D)
(E)

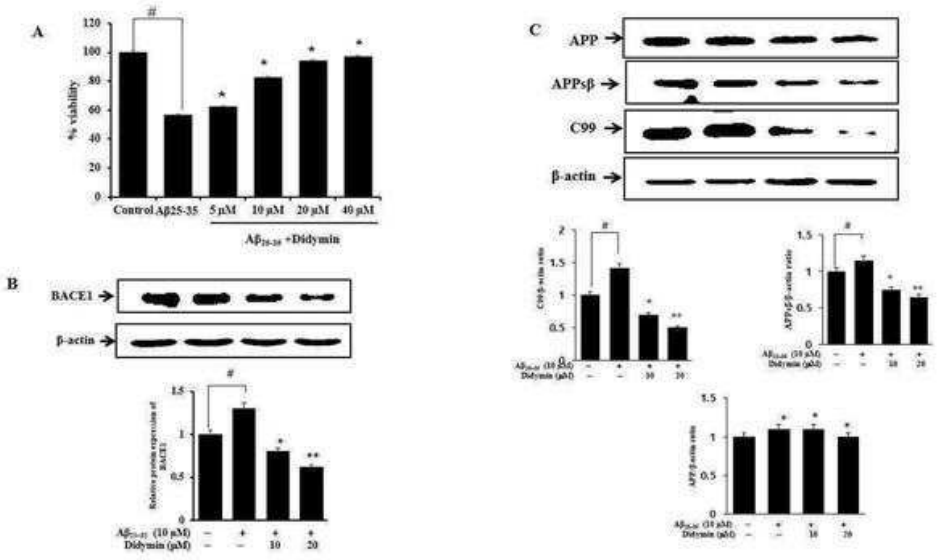
도면7


(A)
(B)
(C)
(D)

도면8


% of cell viability
120
100
80
60
40
20
0
###
Aβ25-35 (10 μM) – + + + + + + + – –
Didymin (μM) – + 10 20 – – – – – –
Poncirin (μM) – + – – 15 30 – – – –
Naringenin (μM) – + – – – – 50 100 – –
Curcumin (μM) – + – – – – – – 25 –
Resveratrol (μM) – + – – – – – – – 25

도면9


A
% viability
Control
Aβ25-35
5 μM
10 μM
20 μM
40 μM
Aβ25-35 +Didymin
B
BACE1
β-actin
C
APP
APPsβ
C99
β-actin