



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월05일
(11) 등록번호 10-1846120
(24) 등록일자 2018년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0023932
(22) 출원일자 2017년02월23일
심사청구일자 2017년02월23일
(56) 선행기술조사문헌
W02005071096 A2
(뒷면에 계속) 기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
전북대학교 산학협력단
전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1
가)
(72) 발명자
최재수
부산광역시 남구 오륙도로 85, 101동 204호 (용호
동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)
정현아
전라북도 전주시 덕진구 송천3길 55, 101동 1105
호 (송천동1가, 벽산 e리버파크)
성수희
부산광역시 남구 전포대로 20번길 15, 109동 100
1호 (문현동, 문현동 삼성 아파트)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 6 항

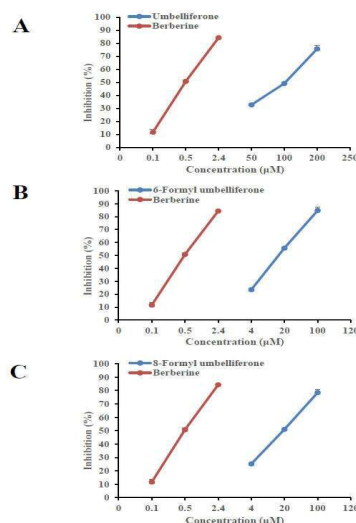
심사관 : 광희찬

(54) 발명의 명칭 6-포르밀 엄벨리페론을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 상기 6-포르밀 엄벨리페론은 BACE1 및 콜린에스테라제 효소의 활성을 현저하게 억제하여 아밀로이드 베타 펩티드의 생성을 억제함으로써 퇴행성 신경질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Journal of the Chemical Society (1936), pp. 1828-31
Planta Medica (20050131), 71(1), pp. 84-87
RSC Advances (2014), 4(106), pp. 61277-61280
약학회지 제 55 권 제 6 호 473~477 (2011)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A3051684

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 여성과학자지원사업

연구과제명 한국산 Angelica 속 식물의 항산화, 항염증 활성을 통한 알츠하이머 질환 개선 기능성 소재 개발 및 분자도킹모델을 이용한 치료 기전 시뮬레이션

기 여 율 1/1

주관기관 전북대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.07.30

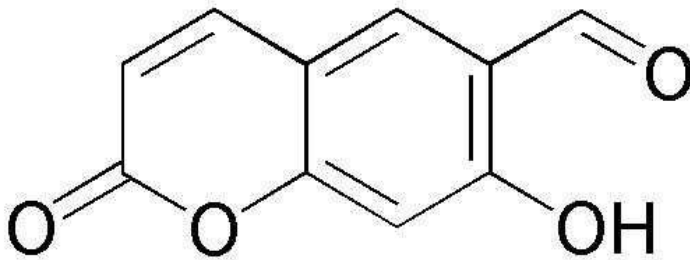
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 가지는 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 6-포르밀 엄벨리페론은 BACE1(beta-secretase 1) 및 콜린에스테라제의 활성을 억제하여 베타-아밀로이드 플라크의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

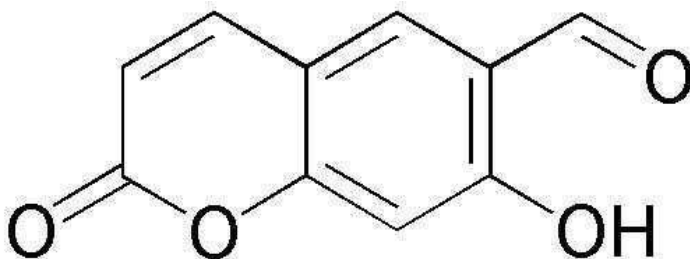
제 1 항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병 및 파킨슨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1의 구조를 가지는 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 6-포르밀 엄벨리페론은 BACE1(beta-secretase 1) 및 콜린에스테라제의 활성을 억제하여 베타-아밀로이드 플라크의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병 및 파킨슨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 6-포르밀 엠벨리페론을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계적으로 고령인구가 증가하고 있으며, 우리나라도 2000년 65세 이상 노인 인구가 전체인구의 7% 이상인 고령화 사회에 이미 진입하였으며, 2026년에는 노인 인구가 차지하는 비율이 전체의 20%를 넘어서는 초고령 사회로 진입할 것이라고 전망 (2015년 기획재정부 2060년 장기재정전망)되고 있는 상황에서 고령인구의 노인성 질병의 해결이 시급한 사회적 문제로 대두되고 있다.

[0003] 특히 노인성 치매질환의 약 절반을 차지하는 알츠하이머 질병은 현재로써는 유효한 치료방법과 예방방법이 없으며, 고령화 사회에 있어서 가장 시급히 해결해야 할 신경질환 중의 하나이기에 연구가 많이 요구되는 분야이다. 알츠하이머병의 병태생리학적 메커니즘은 아직 밝혀져 있지 않지만 콜린성 가설과 아밀로이드 가설이 관련되어 있다. 콜린성 가설은 뇌의 어떤 부위에 아세틸콜린의 농도가 현저히 낮아짐으로서 알츠하이머 질병이 일어난다는 것이다(Zarotsky 등, 2003; Tricco 등, 2012). 이에 따르면, 아세틸콜린 에스테라제 (acetylcholinesterase, AChE) 와 부티릴콜린 에스테라제 (butyrylcholinesterase, BChE)에 의해서 가수분해되는 신경전달물질인 아세틸콜린이 알츠하이머 질병의 중요한 원인일 수 있고(Hebert 등, 1995; Thies와 Bleiler, 2012; Zarotsky 등, 2003), 따라서, 아세틸콜린 에스테라제와 부티릴콜린 에스테라제 저해제는 알츠하이머 질병의 치료 약물로서 사용될 수 있다는 가설이다(Adams 등, 1984).

[0004] 또한, 아밀로이드 가설에서는 뇌에 아밀로이드 (amyloid beta: A β) 베타 펩티드가 축적하여 알츠하이머 질병이 일어난다는 것이다(Querfurth와 Laferla, 2010). 아밀로이드 베타 펩티드는 알츠하이머 질병의 중요한 원인으로 알려져 있을 뿐만 아니라 파킨슨, 당뇨병과 같은 다양한 질병들의 원인으로도 알려져 있다 (Zhao 등, 2004; Eichner 등, 2011). 이러한 질환들에서 나타나는 현상으로는 정상적으로는 수용성이어야 하는 아밀로이드 단백질이 플라크 (plaque) 형태로 응집되면 뇌의 신경세포에서 정상적인 뉴런기능을 간섭함으로 인해 알츠하이머 질병을 유발하는 것으로 보고되고 있다 (Lambert 등, 1998; Kirkitadze 등, 2002; Kim 등, 2003; Kounnas 등, 2010).

[0005] 아밀로이드 베타 펩티드는 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein, APP)이 아스파르테이트 단백질 효소 (aspartate protease)인 감마 세크레타제 (γ -secretase)와 베타 세크레타제 (β -secretase, BACE1)의 작용을 받아 생성된다. 아밀로이드 가설에서는 산발적인 알츠하이머 질병을 가진 뇌에서는 베타 세크레타제 (BACE1)활성이 증가된다는 것이다(Yang 등, 2003; Holsinger 등, 2002). BACE1 녹아웃 마우스는 아밀로이드 베타 펩티드를 생성할 수 없다는 결과로부터, BACE1 만이 APP를 절단하고 아밀로이드 베타 펩티드를 생성한다는 것으로 보고되었다(McConlogue 등, 2007). BACE1에 의해서 아밀로이드 베타 펩티드가 과잉 생성되면 신경세포의 퇴행화를 가져오는 독성을 지닌 미세 섬유화 (fibril)가 된다는 보고도 있다.

[0006] 알츠하이머 질병을 치료하기 위한 약물로서, 아세틸콜린 에스테라제의 저해제로 알려진 타크린(THA, 흑색) 및 도네페질(donepezil, 적색)과, ACE1의 저해제로 알려진 QUD 및 TMF가 있으나, 이들 약물은 효과가 뛰어나지 않거나, 구역질, 구토, 설사가 유발되는 부작용이 존재한다는 문제가 있어, 효과가 뛰어나면서 부작용이 적은 약물의 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1. M.Y. Ali, H.A. Jung, J.S. Choi, Anti-diabetic and anti-Alzheimer's disease

activities of Angelica decursiva, Arch. Pharm. Res. 38 (2015) 2216-2227.

(비특허문헌 0002) 2. M.Y. Ali, S. Jannat, H.A. Jung, R.J. Choi, A. Roy, J.S. Choi, Anti-Alzheimer potential of coumarins from Angelica decursiva and Artemisia capillaris and structure-activity analysis, Asian Pac. J. Trop. Med. 9 (2016) 103-111.

(비특허문헌 0003) 3. S. Caffieri, F. Di Lisa, F. Bolesani, M. Facco, G. Semenzato, F. Dall'Acqua, M. Canton, The mitochondrial effects of novel apoptogenic molecules generated by psoralen photolysis as a crucial mechanism in PUVA therapy, Blood 109 (2007) 4988-4894.

발명의 내용

해결하려는 과제

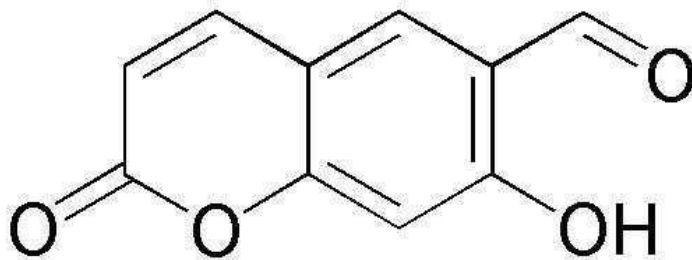
[0009] 본 발명의 목적은 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] [화학식 1]



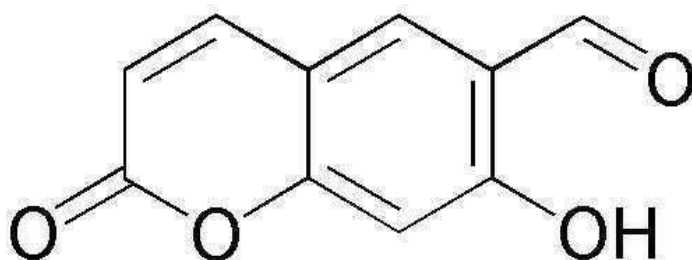
[0014]

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 6-포르밀 엄벨리페론은 BACE1(beta-secretase 1) 및 콜린에스테라제의 활성을 억제하여 베타-아밀로이드 플라크의 생성을 억제하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병 및 파킨슨병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0020] [화학식 1]



[0021]

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)은 BACE1 및 콜린에스테라제 효소의 활성을 현저하게 억제하여 퇴행성 신경질환의 중요 인자로 알려진 아밀로이드 베타 펩티드의 생성을 억제함으로써 퇴행성 신경질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 엄벨리페론(A), 6-포르밀 엄벨리페론(B) 및 8-포르밀 엄벨리페론(C)의 아세틸 콜린에스테라제의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 2는 엄벨리페론(A), 6-포르밀 엄벨리페론(B) 및 8-포르밀 엄벨리페론(C)의 부티릴콜린 에스테라제의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 3은 엄벨리페론(A), 6-포르밀 엄벨리페론(B) 및 8-포르밀 엄벨리페론(C)의 BACE1의 억제 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 6-포르밀 엄벨리페론의 BACE1의 활성 억제 효과를 Lineweaver-Burk와 Dixon 플롯으로 나타낸 것이다.

도 5는 8-포르밀 엄벨리페론의 BACE1의 활성 억제 효과를 Lineweaver-Burk와 Dixon 플롯으로 나타낸 것이다.

도 6은 엄벨리페론(황색), 6-포르밀 엄벨리페론(청색), 8-포르밀 엄벨리페론(녹색), 아세틸콜린 에스테라제의 저해제로 알려진 타크린(THA, 흑색) 및 도네페질(donepezil, 적색)에 대하여 아세틸콜린 에스테라제의 활성부위와의 분자 도킹 모델을 나타낸 것이다.

도 7은 엄벨리페론(A), 6-포르밀 엄벨리페론(B), 8-포르밀 엄벨리페론(C), 아세틸콜린 에스테라제의 저해제인 타크린(THA, D) 및 도네페질(donepezil, E)과 아세틸콜린 에스테라제와의 리간드 상호작용에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

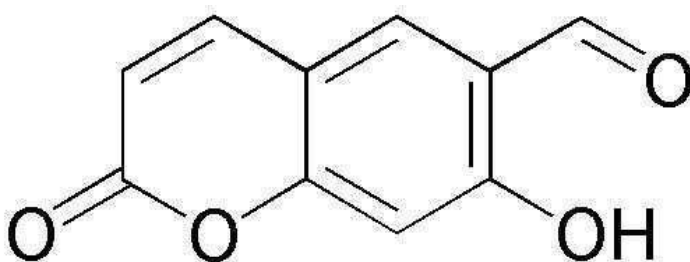
도 8은 엄벨리페론(황색), 6-포르밀 엄벨리페론(청색), 8-포르밀 엄벨리페론(녹색), BACE1의 저해제로 알려진 QUD(적색) 및 TMF(흑색)에 대하여 BACE1의 활성부위와의 분자 상호작용을 나타낸 것이다.

도 9는 엄벨리페론(A), 6-포르밀 엄벨리페론(B), 8-포르밀 엄벨리페론(C), BACE1의 저해제인 타크린(THA, D) 및 도네페질(donepezil, E)과 BACE1과의 리간드 상호작용에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 6-포르밀 엄벨리페론(6-formyl umbelliferone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0027] [화학식 1]



[0028]

[0030] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 6-포르밀 엄벨리페론을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 임상투여 시에 다양한 하기의 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및

감미제를 포함할 수 있다.

- [0033] 본 발명의 6-포르밀 엄벨리페론을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 6-포르밀 엄벨리페론을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 포함할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 60 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이며, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [0036] 본 발명의 6-포르밀 엄벨리페론이 상기와 같은 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선을 위해 이용되기 위해서는, 식품학 또는 약제학적 분야에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며 그 자체 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 경구로 섭취할 수 있는 어떤 식품 형태로도 제조될 수 있다. 바람직하게는 음료, 환, 과립, 정제 또는 캡슐 형태이다.
- [0037] 본 발명의 건강 기능 식품은, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되고 식품학적으로 허용되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예컨대, 음료수로 제조되는 경우에는 본 발명의 6-포르밀 엄벨리페론 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등에서 하나 이상의 성분을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 건강기능식품의 유효성분으로 포함될 수 있는 양은 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선을 원하는 사람의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 g 내지 10.0 g 정도로 포함되는 것이 좋으며, 이러한 함량을 갖는 건강 기능 식품을 섭취함으로써 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선 효과를 얻을 수 있다.
- [0040] 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.
- [0042] **실시예 1. 재료 및 방법**
- [0043] **1.1. 자화전호로부터 6-포르밀 엄벨리페론의 분리**
- [0044] 분말의 자화전호 전초 (2.7 kg)를 메탄올로 3시간씩 3회 환류 냉각하에서 추출하고 감압 진공하에서 40℃ 이하에서 농축하여 메탄올 추출물 (864.32 g)을 얻었다. 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후, 디클로로메탄 (CH₂Cl₂), 에틸아세테이트(EtOAc)과 n-부탄올(n-BuOH)로 순차적으로 분획하여 CH₂Cl₂(212.47 g), EtOAc(19.06 g)과 n-BuOH(151.07 g) 분획물 및 최종 물 분획물 (434.32 g)을 얻었다. EtOAc 분획물 (19 g)을 CH₂Cl₂-MeOH (10:1)을 용매로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 행하여 F-1에서 F-20까지 20개의 subfraction을 얻은 후 F-6 (500 mg)을 다시 CH₂Cl₂-MeOH (15:1)을 용매로 하여 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 행하여 미백색 분말 6-포르밀 엄벨리페론 (30 mg)을 최종 분리하였다. 화합물의 구조는 수소 및 탄소 핵자기 공명스펙트럼을 분석하고 문헌 (Caffieri 등, 2007)과 비교하여 결정하였다.
- [0045] 6-포르밀 엄벨리페론 (6-formyl umbelliferone)의 정상-미백색 분말; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 11.7 (1H, brs, -OH), 10.24 (1H, s, -CHO), 8.03 (1H, s, H-5), 8.04 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-4), 6.84 (1H, s, H-8), 6.32 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-3); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 189.2 (-CHO), 163.4 (C-7), 159.5 (C-2), 158.7 (C-9), 144.4 (C-4), 130.0 (C-5), 120.4 (C-6), 113.1 (C-3), 111.96 (C-10), 103.4 (C-8)
- [0047] **1.2. 8-포르밀 엄벨리페론의 합성**
- [0048] 빙냉하에서 엄벨리페론을 트리플루오로 초산 용액 (2.0 g, 9.8 m mole)에 녹이고 우로트로핀(urotropine, 2.06 g, 14.69 m mole)을 천천히 첨가한 후 환류 냉각상태에서 12 시간 동안 가열한다. 반응 후 용매를 증발시킨 후 증류수 30 mL를 첨가하여 빙냉 조건에서 방치하면 미황색 침전물이 생성된다. 여과, 건조하여 헥산:에틸 아세테이트 (10:1) 용매로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피하여 미황색 8-포르밀 엄벨리페론 (0.30 g, 수율 15%). 8-포

르밀 엄벨리페론 (8-formyl umbelliferone)의 성장-미황색 분말; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 12.22 (1H, brs, -OH), 10.61 (1H, s, -CHO), 7.66 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.60 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.89 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-8), 6.33 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 192.94 (-CHO), 165.51 (C-7), 159.12 (C-2), 156.74 (C-9), 143.36 (C-4), 135.98 (C-5), 114.7 (C-6), 113.41 (C-8), 110.85 (C-3), 108.68 (C-6)

[0050] **1.3. 콜린에스테라제 (cholinesterase) 억제활성**

[0051] 콜린에스테라제 억제 활성은 아세틸티오콜린 (ACh)과 부티릴티오콜린 (BCh)을 기질로 이용하는 AChE(acetylcholinesterase)와 BChE(butrylcholinesterase)의 억제활성을 측정한다. 100 mM Sodium phosphate buffer (pH 8.0) 140 μl , 시료 20 μl 와 AChE (0.36 U) 혹은 BChE (0.36 U) 20 μl 를 각각 96 well microplate에 넣고 실온에서 15분간 배양한 후에 10 μl 의 DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]와 기질인 ACh 혹은 BCh 10 μl 를 넣어 최종적으로 반응액이 200 μl 이 되도록 96 well plate에 넣는다. 이때, DTNB와 기질인 ACh 혹은 BCh을 넣어야 효소반응이 시작되고, ACh 혹은 BCh이 효소적 가수분해에 의해 생성되는 thiocholine과 DTNB가 반응하여 생성되는 노란색의 5-thio-2-nitrobenzoate anion을 microplate reader VERSA max (Molecular Devices, CA, USA)로 412 nm에서 15분 후 측정한다. 각각의 측정시료의 cholinesterase 억제활성을 IC_{50} 값으로 나타내며 이는 기질인 ACh과 BCh의 가수분해를 50 % 억제하는 농도를 $\mu\text{g/ml}$ 혹은 μM 로 나타낸 값으로 나타낸다. 양성대조군으로 베르베린(berberine)을 사용하였다. 콜린에스테라제 억제 %는 하기 방정식으로 구하였다.

[0053] $\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{sam}}/A_{\text{con}})/A_{\text{std}}] \times 100$

[0054] A_{sam} : 측정시료를 넣었을 때의 흡광도

[0055] A_{con} : 측정시료를 넣고 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도

[0056] A_{std} : 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도

[0058] **1.4. BACE1 (β -secretase) 활성 저해 실험**

[0059] 알츠하이머성 치매질환과 관련된 효소인 베타-세크레타아제 (β -secretase)에 대한 저해활성은 키트 시약 방법 (BACE1 FRET assay kit, PanVera Co.)에 따라 수행하였다. 10 % DMSO에 용해시킨 시료, assay buffer (50 mM sodium acetate, pH 4.5), BACE1 효소 (1.0 U/mL), 제공 기질 (750 nM Rh-EVNLDAEFK-Quencher in 50 mM, ammonium bicarbonate)을 반응하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 암실에서 반응시킨다. 2종의 fluorophores (Rh-EVNLDAEFK-Quencher)가 BACE1에 의해 분해되면 fluorescent donor (Rh-EVNL)가 생성되고 이 반응생성물은 흡광광도 545 nm (excitation)와 585 nm (emission)에서 microplate spectrofluorometer (Gemini EM, Molecular Devices, and Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. BACE1 억제 %는 하기 방정식으로 구하였다. 각 시료의 BACE1 효소 억제는 IC_{50} 값 (μM)으로 표시하였다.

[0061] $\text{Inhibition (\%)} = [1 - (S_{60} - S_0)/(C_{60} - C_0)] \times 100$

[0062] C_{60} : 60분 반응 후 대조군의 형광광도 (효소, buffer, 기질)

[0063] C_0 : 혼합 직후 (0분) 대조군의 형광광도 (효소, buffer, 기질)

[0064] S_{60} : 60분 반응 후 실험군의 형광광도 (시료, 효소, buffer, 기질)

[0065] S_0 : 혼합 직후 (0분) 실험군의 형광광도 (시료, 효소, buffer, 기질)

[0067] **1.5. 베타 세크레타아제 (BACE1) kinetic 연구**

[0068] BACE1의 저해활성에 대한 상관관계를 결정하기 위하여 여러가지 화합물 농도와 기질인 Rh-EVNLDAEFK-Quencher를 750 nM, 375 nM, 250 nM의 농도로 준비하였다. 여러 가지 농도의 화합물 (6-포르밀 엄벨리페론: 10 μM , 2 μM , 0.4 μM ; 8-포르밀 엄벨리페론 : 100 μM , 50 μM , 25 μM)과 기질을 BACE1 활성 저해 실험과 동일한 방법으로 545 nm (excitation)와 585 nm (emission)에서 microplate spectrofluorometer (Gemini EM, Molecular

Devices, and Sunnyvale, CA, USA)으로 측정하였다. 저해 유형은 딕선 플롯(Dixon plot)과 라인위버-버크 플롯(Lineweaver-Burk plot)으로 결정하였으며, 저해제의 저해 상수 (inhibition constant, K_i)는 딕선 플롯(Dixon plot)으로 구하였다.

[0070] **1.6. BACE1의 분자적 도킹 시뮬레이션 연구**

[0071] 도킹 연구는 BACE1에 대한 시료의 최적의 결합위치를 알아보기 위하여 수행되었다. Human BACE1 저해제인 QUD(2-amino-((1*R*)-1-cyclohexyl-2-[(cyclohexylcarbonyl)amino]ethyl)-6-phenoxyquinazolin-3-ium) (PDB ID: 2WJO)의 각각 2.5 Å의 해상도를 가진 결정 구조는 RCSB Protein Data Bank에서 제공받았다. 도킹 시뮬레이션을 위해서 QUD는 제거하고 단백질은 리간드가 없는 상태로 여겼으며, 물 분자는 Accelrys Discovery Studio 16.1 (DS, <http://www.accelrys.com>; Accelrys, Inc. San Diego, CA, USA)을 이용하여 제거하였다. Autodock 4.2.6 automated docking tool을 이용하여 단백질에 극성의 수소 원자를 붙였으며, QUD가 단백질에 결합하는 부위들을 가장 적합한 리간드 결합 부위로 하였다. 엠벨리페론, 6-포르밀 엠벨리페론 그리고 8-포르밀 엠벨리페론의 3차원적 구조는 Chemdraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA)을 이용하여 그렸으며 pdb 포맷형식으로 저장하였다. 자동화된 도킹 시뮬레이션은 Autodock tools (ADT)를 이용하여 수행되었다. Grid map은 단백질 결합부위를 완전히 포함할 수 있도록 grid box size는 $126 \times 126 \times 126$ point로 하고, default spacing은 0.375 Å로 설정하여 생성되었다. BACE1 잔기들의 결합 양상과 이에 상응하는 결합 에너지들 중 가장 낮은 에너지 값을 가진 모델을 가장 좋은 분자적 상호작용으로 간주하였다. 알려진 알로스테릭 저해제인 TMF(5,7,4'-trimethoxyflavone)가 결합 잔기와 양상을 비교하기 위해서 이용되었다. 결과는 UCSF Chimera와 LigPlot (v.1.4.5)을 이용하여 분석되었고, 모든 도킹 시뮬레이션은 Intel® Core™ i5-6300HQ CPU @ 2.30 GHz (Windows 10 and 64-bit operating system)을 이용하여 수행되었다.

[0073] **실시에 2. 엠벨리페론, 6-포르밀 엠벨리페론 및 8-포르밀 엠벨리페론의 BACE1 및 콜린에스테라제 효소에 대한 억제활성 효과**

[0074] 본 발명자들은 엠벨리페론, 6-포르밀 엠벨리페론 및 8-포르밀 엠벨리페론의 BACE1 및 콜린 에스테라제 효소에 대한 억제활성을 살펴보기 위한 실험을 진행하였다. 베르베린을 대조화합물로 하여, 시험관 조건하에서 엠벨리페론, 6-포르밀 엠벨리페론 및 8-포르밀 엠벨리페론에 대하여 항-콜린에스테라제 활성을 확인하였다.

[0075] 그 결과, 뱀장어로부터 얻은 아세틸콜린에스테라제에 대한 억제활성(표 1)에서 엠벨리페론은 50% 억제 농도(IC_{50})가 $105.48 \pm 0.57 \mu M$ 로 약한 억제활성을 나타내었지만, 6-포르밀 엠벨리페론과 8-포르밀 엠벨리페론은 16.70 ± 1.62 및 $19.13 \pm 0.57 \mu M$ 로서 높은 억제활성을 나타내었다. 대조화합물인 베르베린은 $0.74 \pm 0.007 \mu M$ 이었다. 이들 화합물들은 모두 아세틸콜린에스테라제에 대하여 농도 의존적으로 억제활성을 나타내었다 (도 1).

[0076] 또한, 부티릴콜린에스테라제에 대한 억제활성(표 1)을 확인하였으며, 엠벨리페론과 8-포르밀 엠벨리페론은 50% 억제 농도(IC_{50})가 각각 90.14 ± 0.02 과 $87.67 \pm 0.48 \mu M$ 로서 약한 억제활성을 나타내었지만 6-포르밀 엠벨리페론은 $27.90 \pm 3.43 \mu M$ 로서 다소 높은 억제활성을 나타내었다 (도 2). 대조화합물인 베르베린은 $9.81 \pm 0.35 \mu M$ 이었다.

[0077] 베타-세크레타제 (BACE1)에 대한 억제활성(표 1)의 경우, 엠벨리페론은 아주 약한 억제효과를 나타내었으며 반면, 6-포르밀과 8-포르밀로 치환된 경우에는 각각 50% 억제 농도(IC_{50})가 1.31 ± 0.01 과 $39.82 \pm 0.31 \mu M$ 로서 높게 나타났다 (도 3). 특히, 6-포르밀 엠벨리페론은 대조군인 퀘르세틴보다 훨씬 높은 활성을 나타내었다. 6-포르밀 엠벨리페론의 BACE1 효소에 대한 저해양식은 딕선(Dixon plot)과 라인위버-버크 플롯(Lineweaver-Burk plot)으로부터 비경쟁적 저해 상수 (K_i)값은 2.27인 것으로 확인되었다(표 1, 도 4 및 도 5).

[0079] [표 1]

Compounds	AChE	BChE	BACE1	K_i value ^b	Inhibition type ^c
	IC ₅₀ (μM) ^a				
Umbelliferone	105.48 ± 0.57	90.14 ± 0.02	168.54 ± 2.17		
6-Formyl umbelliferone	16.70 ± 1.62	27.90 ± 3.43	1.31 ± 0.01	2.27	Noncompetitive
8-Formyl umbelliferone	19.13 ± 0.57	87.67 ± 0.48	39.82 ± 0.31	22.2	Noncompetitive
Berberine ^d	0.14 ± 0.08	9.81 ± 0.35		-	-
Quercetin ^e			22.08 ± 0.57	-	-

[0080]

[0081] ^a IC₅₀ 값(μM)은 로그 곡선으로 계산되었고, 세 번 반복실험으로부터 평균 ± S.E.M으로 표현하였음.

[0082] ^b 딕슨 플롯(Dixon plot)으로 결정됨.

[0083] ^c 딕슨 플롯(Dixon plot) 및 라인위버-버크 플롯(Lineweaver-Burk plot)으로 결정됨.

[0084] ^{d,e} 양성 대조군

[0085] (-) no test

[0087] 실시예 3. BACE1 저해 활성에 대한 분자적 도킹 연구

[0088] 본 발명자들은 화합물과 기준에 알려진 저해제들 (QUD와 TMF)에 대한 분자적 도킹을 연구하였다. Protein data bank (PDB)에 따르면 QUD는 가장 강력한 비펩타이드성 경쟁적 BACE1 저해제이고, TMF는 비경쟁적 저해제이다.

[0089] 표 3 및 도 7A에서와 같이, 활성 자리에서의 가장 높은 결합 에너지 (-5.4 kcal/mol)를 가진 결합 위치는 엄벨리페론의 수산기가 효소의 촉매 잔기인 Asp32와 수소결합을 하는 것으로 나타났다. 또한, 엄벨리페론과 효소의 Lys75, Trp76, Val69, Phe108 및 Ile118 잔기 간에는 소수성 결합(Van der Waals interacting)이 관찰되었다.

[0090] 엄벨리페론과는 반대로, 6-, 8-포르밀 엄벨리페론은 BACE1의 촉매 자리에 도킹되지 않았으며 이것은 *in vitro* 효소반응속도 연구와 일치되는 결과이다. 도 9B에서와 같이, BACE1의 Gly13 잔기는 6-포르밀 엄벨리페론의 수산기와 포르밀기와 각각 수소결합을 형성하였으며 -7.2 kcal/mol의 결합 에너지를 가졌다. 더욱이, 6-포르밀 엄벨리페론과 BACE1의 Ser10, Gly11, Tyr14, Val170, Thr232, Arg307, Pro308, Ala335 및 Glu339 잔기 간의 소수성 결합 또한 알로스테릭 위치에 결합하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 8-포르밀 엄벨리페론의 분자적 도킹 모델은 도 9C에 나타내었다. 8-포르밀 엄벨리페론-BACE1 복합체에서, 효소의 Ser10, Gly11, Gly13, Tyr14, Val170, Thr232, Arg307, Ala335, Val336 및 Glu339 잔기가 8-포르밀 엄벨리페론과 소수성 상호작용을 하는 것이 나타났으며 수소 결합은 관찰되지 않았다. QUD는 Gly230과 촉매 잔기인 Asp228과 Asp32와 4개의 수소결합을 형성함으로써 BACE1과 상호작용 하였다. 효소의 Lys107, Lys75, Gly74, Leu30, Thr231, Val69, Tyr198, Ile226, Thr329, Gly34, Arg235, Ser35, Tyr71 및 Ile118 잔기 역시 BACE1과 QUD 간의 소수성 상호작용에 연관되어 있음이 나타났다. 보고된 알로스테릭 저해제인 TMF와 BACE1 복합체에서, 효소의 Gly11 잔기가 TMF의 산소 원자와 하나의 수소 결합을 형성하였다(도 9E). 게다가, TMF와 효소의 Ser10, Tyr14, Thr232, Trp277, Glu303, Gln304, Leu306, Arg307, Pro308, Tyr320, Ala335, Val336 및 Glu339 잔기 간에 소수성 상호작용이 예측되었다. 도 6에서와 같이, 본 발명자들의 도킹 결과는 6-, 8-포르밀 엄벨리페론의 BACE1에 대한 결합 위치가 TMF의 결합 위치와 유사함을 보여준 것이다.

[0092] [표 2]

Compounds	AutoDock 4.2 Score (Kcal/mol) ^a	No. of H- bond ^b	H-bonds interacting residues ^c	Van der Waals interacting residues ^d
Umbelliferone	-6.3	3	Tyr121, Phe288, Arg289	Trp279, Ile287, Phe290, Phe330, Tyr334
6-Formyl-umbelliferone	-8.3	3	Ser200, Tyr334, His440	Ser81, Trp84, Gly118, Glu199, Phe330, Trp432
8-Formyl-umbelliferone	-8.0	1	Glu199	Trp84, Gly117, Gly118, Phe330, His440, Gly441
THA (Catalytic inhibitor)	-9.8	1	His440	Tyr442, Phe330, Trp84, Gly118, Trp432, Gly441, Tyr334, Glu199
Donepezil (Allosteric inhibitor)	-10.6	0		Tyr70, Ile275, Asp276, Trp279, Ile287, Phe288, Arg289, Tyr334, Tyr121, Ser286, Phe290, Phe330, Phe331

[0093]

[0094] ^a 결합에너지(Binding energy) - AChE 효소의 활성 부위에 대한 결합 친화성 및 결합력을 가리킴.

[0095] ^{b, c, d} 효소-억제제 복합체로부터의 수소결합 및 모든 아미노산 잔기는 Autodockvina 프로그램으로 결정됨.

[0097] [표 3]

Compounds	AutoDock 4.2 Score (Kcal/mol) ^a	No. of H- bond ^b	H-bonds interacting residues ^c	Van der Waals interacting residues ^d
Umbelliferone	-5.4	1	Asp32	Lys75, Trp76, Val69, Phe108, Ile118
6-Formyl-umbelliferone	-7.2	2	Gly13	Ser10, Gly11, Tyr14, Val170, Thr232, Arg307, Pro308, Ala335, Glu339
8-Formyl-umbelliferone	-7.0	-	-	Ser10, Gly11, Gly13, Tyr14, Val170, Thr232, Arg307, Ala335, Val336, Glu339
QUD (Catalytic inhibitor)	-9.3	4	Asp228, Asp32, Gly230	Lys107, Lys75, Gly74, Leu30, Thr231, Val69, Tyr198, Ile226, Thr329, Gly34, Arg235, Ser35, Tyr71, Ile118
TMF ^c (Allosteric inhibitor)	-7.8	1	Gly11	Ser10, Tyr14, Thr232, Trp277, Glu303, Gln304, Leu306, Arg307, Pro308, Tyr320, Ala335, Val336, Glu339

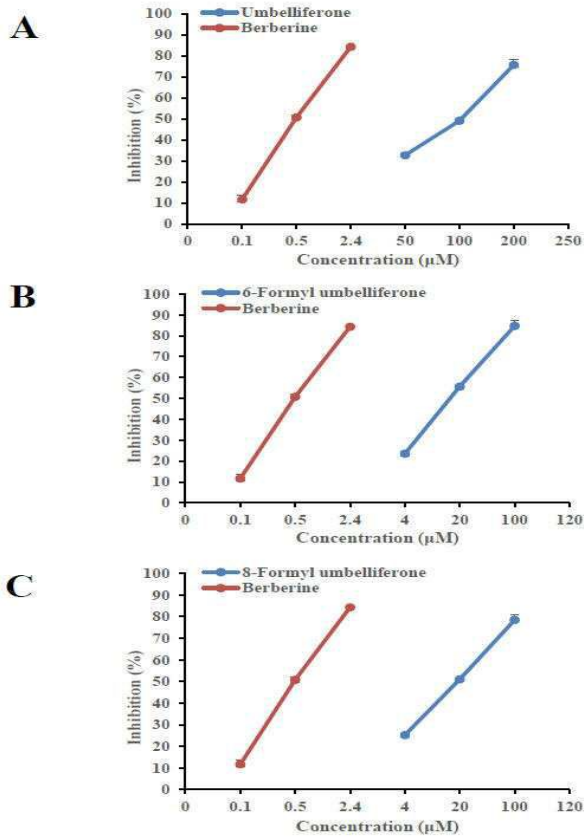
[0098]

[0099] ^a 결합에너지(Binding energy) - AChE 효소의 활성 부위에 대한 결합 친화성 및 결합력을 가리킴.

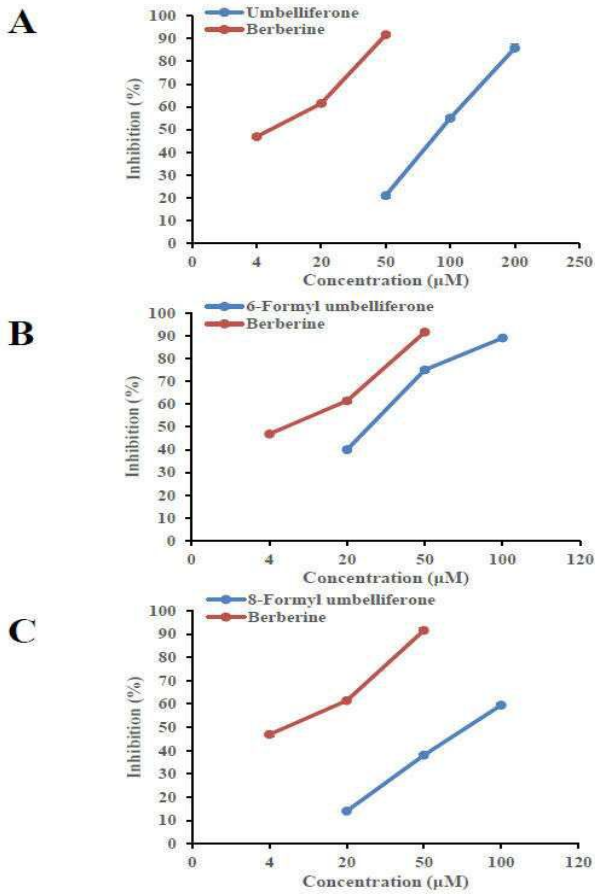
[0100] ^{b, c, d} 효소-억제제 복합체로부터의 수소결합 및 모든 아미노산 잔기는 Autodockvina 프로그램으로 결정됨.

도면

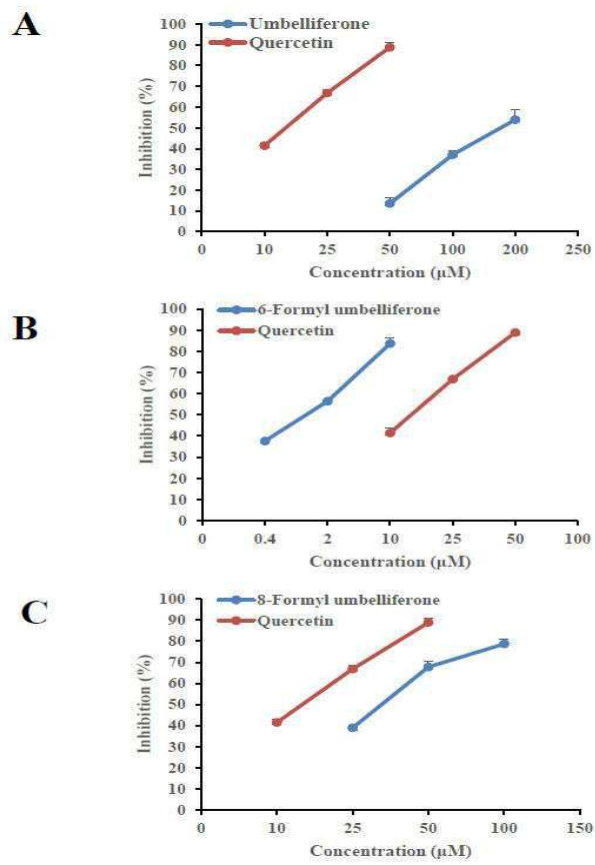
도면1



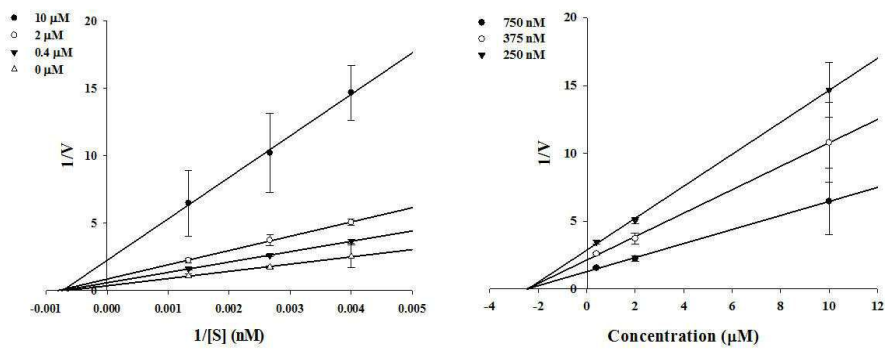
도면2



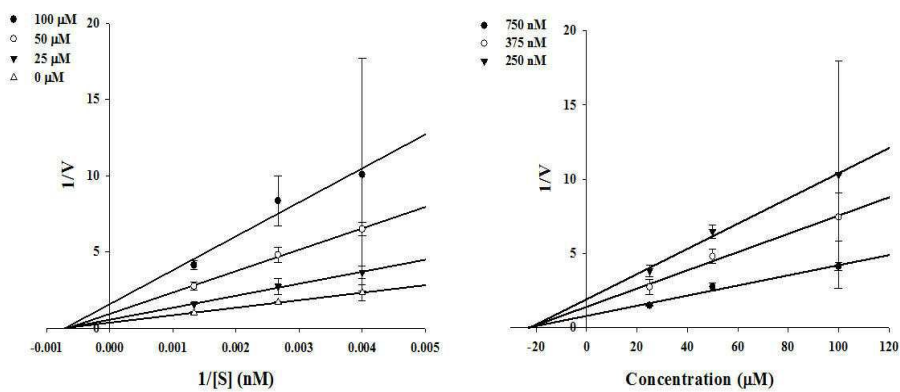
도면3



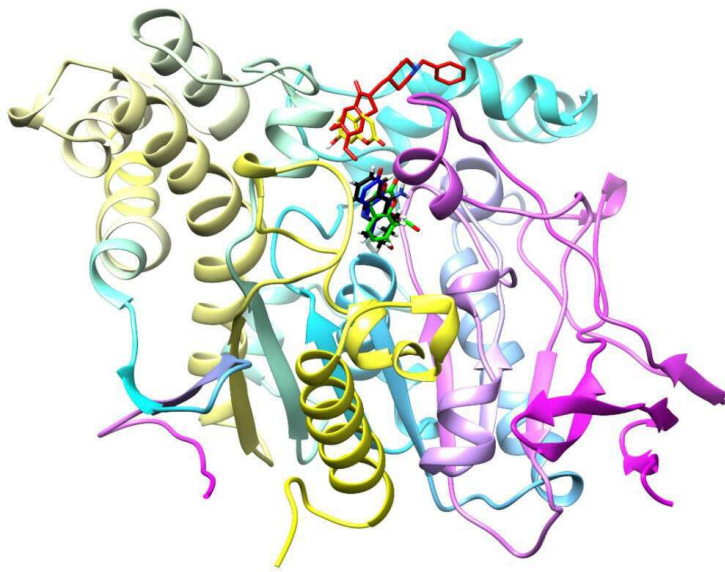
도면4



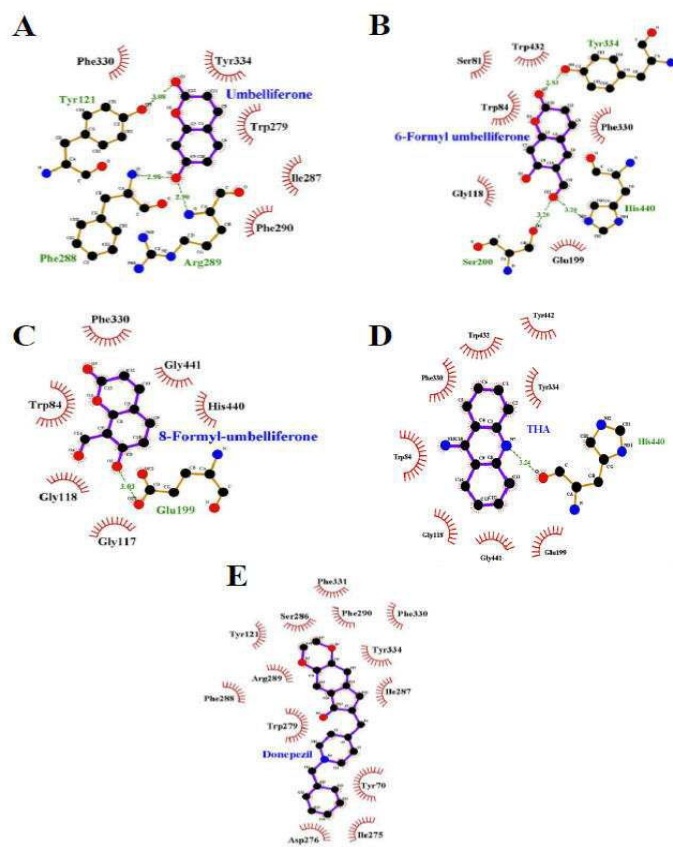
도면5



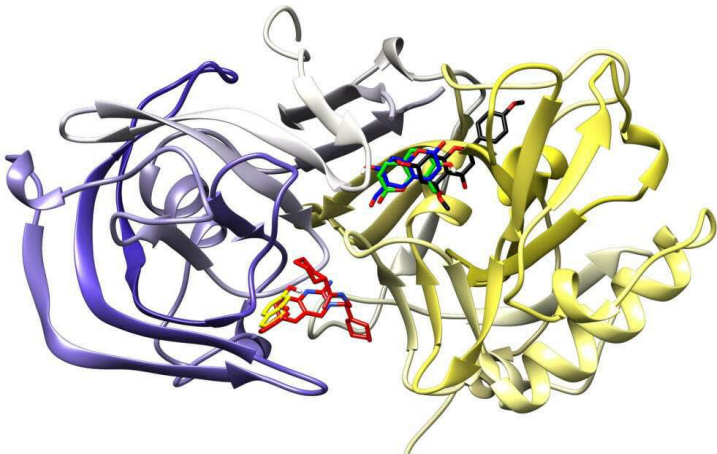
도면6



도면7



도면8



도면9

