



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0028066  
(43) 공개일자 2020년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 31/37* (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)

*A61P 25/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 31/37* (2013.01)

*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0106040

(22) 출원일자 2018년09월05일

심사청구일자 2018년09월05일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

이금화

광주광역시 남구 용대로74번길 8, 102동 502호(봉선동, 모아엘가아파트)

황서진

광주광역시 북구 우치로

(74) 대리인

리엔목특허법인

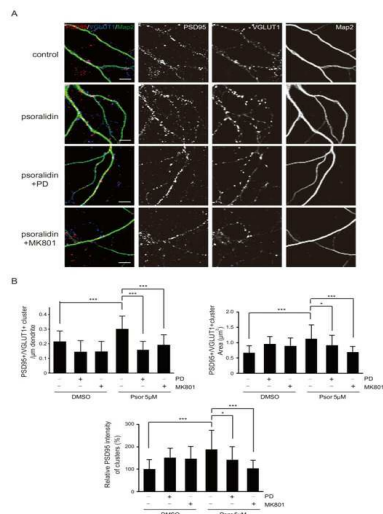
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 프소칼리딘을 포함하는 조성물 및 이의 용도

### (57) 요약

프소칼리딘을 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따른 프소칼리딘은 우수한 시냅스 가소성 조절 효과를 나타내므로 뇌발달 질환 또는 퇴행성 뇌질환을 포함한 인지장애의 치료제 또는 개선제 등의 개발에 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

**A61P 25/28** (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345281945

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구(1년~5년)

연구과제명 시냅스가소성을 조절하는 신규물질의 발굴과 흥분성, 억제성신경세포에서의 분자적 기전  
연구

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교

연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

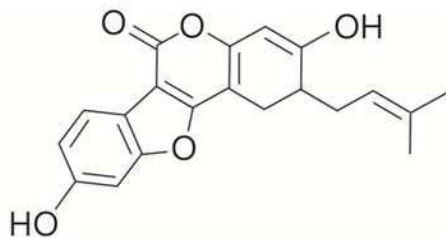
#### 청구항 1

프소랄리딘(psoralidin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 인지장애를 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 프소랄리딘은 하기 화학식 1로 표시되는 것인 약학적 조성물.

<화학식 1>



#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 인지장애는 뇌발달 질환 또는 퇴행성 뇌질환인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 뇌발달 질환 또는 퇴행성 뇌질환은 자폐증, 조현병, 우울증, 조울증, 주의력 결핍-과잉행동 장애, 건망증, 경도인지장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 피크병, 니만픽병, 고셔병, 파브리병, 테이색스병, 샌드호프병, 소뇌실조증, 치매, 뇌졸중, 크로이츠펔트-야콥병, 알코올성 뇌신경질환, 다발성경화증, 루게릭병, 근위축성 측삭 경화증, 외상성 두부손상, 간질, 뇌 허혈증, 중풍, 기억상실증, 뇌 기능 혼수, 외상 후 스트레스 장애, 척수 손상, 척수염, 저산소증, 뇌경색, 뇌염, 뇌 순환대사장애, 및 베르니케-코르사코프 증후군으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 프소랄리딘은 N-메틸-D-아스파르테이트 (N-methyl-D-aspartate; NMDA) 수용체 조절제인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 프소랄리딘은 세포외 신호-조절된 키나아제 (extracellular signal-regulated kinase; Erk)를 활성화시키는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 프소랄리딘은 즉각조기발현유전자(Immediate early genes; IEGs)의 발현을 유도하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 프소랄리딘은 시냅스 가소성을 조절하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 10

프소랄리딘을 유효성분으로 포함하는 학습능력 또는 기억능력을 향상하는데 사용하기 위한 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 프소랄리딘은 N-메틸-D-아스파르테이트 수용체인 것인 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 프소랄리딘은 세포의 신호-조절된 키나아제를 활성화시키는 것인 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 프소랄리딘은 즉각조기발현유전자(Immediate early genes; IEGs)의 발현을 유도하는 것인 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 14

청구항 10에 있어서, 상기 프소랄리딘은 시냅스 가소성을 조절하는 것인 건강기능식품 조성물.

#### 청구항 15

프소랄리딘을 유효성분으로 포함하는 인지장애를 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

프소랄리딘을 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

## 배경 기술

- [0002] 인지 장애는 학습과 기억, 지각, 문제해결력 등의 인지 능력이 연령에 비하여 저하된 상태로, 뇌발달 질환, 퇴행성 뇌질환을 비롯한 뇌신경 질환에 의해 나타난다. 이러한 인지 능력의 저하는 상기 질환의 진행뿐만 아니라, 일상 생활 능력 감소, 삶의 질 저하, 나아가 사회적인 고립을 야기하므로 인간의 생존에 문제가 된다. 그럼에도 불구하고, 현재 이를 치료하거나 개선시키는 중추신경계 약물이 부족하여 이를 위한 신규 물질의 개발이 크게 요구되고 있다.
- [0003] 이러한 인지장애는 신경 활성화와 시냅스 기능 조절의 결함으로 야기되는 것으로 알려져 있으며, 즉각조기발현유전자(Immediate early genes)는 학습과 관련된 자극이 있는 경우 신속하게 전사 되어 시냅스의 가소성 조절을 통해 기억을 형성하므로, 학습 및 기억 메카니즘 연구와 인지 장애의 치료 표적 개발에 있어서 매우 중요하다.
- [0004] 한편, 프소랄리딘(psoralidin)은 Psoralea corylifolia의 씨앗으로부터 단리된 천연 화합물로서, 항산화, 항염증, 항골다공증, 및 항종양과 같은 생물학적인 활성이 규명되어 이를 이용한 연구들은 다수 있으나 (한국공개특허 10-2015-0019578), 중추신경계(central nervous system; CNS) 기능 조절에 있어서의 프소랄리딘의 역할에 대한 연구는 미미한 실정이다.

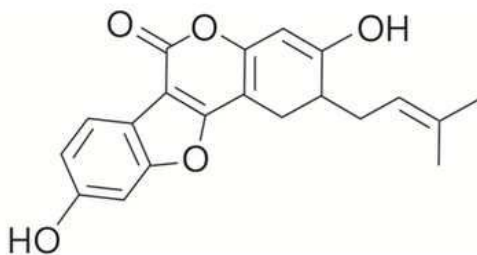
## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0005] 일 양상은 프소랄리딘(psoralidin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 인지장애를 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 다른 양상은 프소랄리딘을 유효성분으로 포함하는 학습능력 또는 기억능력을 향상하는데 사용하기 위한 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 또 다른 양상은 프소랄리딘을 유효성분으로 포함하는 인지장애를 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0008] 일 양상은 프소랄리딘(psoralidin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 인지장애를 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [0009] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프소랄리딘(psoralidin)"은 Psoralea corylifolia의 씨앗으로부터 단리된 천연 화합물로 coumestan 유사체이며, 하기 화학식 1과 같은 구조를 갖는다.
- [0010] [화학식 1]



- [0011]
- [0012] 상기 "약학적으로 허용가능한"은 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점 또는 합병증 없이 이득/위험 비가 합리적이어서 대상체(예: 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며 건전한 의학적 판단의 범주에 내인 화합물 또는 조성물을 의미할 수 있다.
- [0013] 상기 "염"은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용할 수 있다. 상기 유리산은 무기산 또는 유기산일 수 있으며, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등일 수 있고, 상기 유기산은 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르

산, 갈록투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등일 수 있다. 또한, 상기 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 산부가염은 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 퓨마레이트, 글루캡테이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프틸레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등을 포함할 수 있다.

[0014] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인지장애"는 연령에 비해 인지기능, 특히 기억력이 저하된 상태를 의미할 수 있다. 상기 "인지기능"이란, 자극을 받아들이고, 저장하고, 인출하는 일련의 정신 과정을 의미는 것으로 지각, 학습과 기억, 사고, 판단 등을 포함하는 과정일 수 있다. 상기 인지장애는 노화에 따른 신경퇴화, 유전적 요인, 환경적 요인, 뇌손상 등으로 인해 유발될 수 있고, 뇌발달 질환 또는 퇴행성 뇌질환을 포함한 뇌신경 질환에서 나타나는 증상일 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예방 또는 치료"는 상기 조성물을 약학적 유효량으로 투여하여 인지장애의 증상을 개선시키는 것을 포괄적으로 의미할 수 있고, 인지장애로 인한 한가지 증상 또는 대부분의 증상을 개선시키는 것일 수 있다. 상기 "약학적 유효량"은 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여 횟수, 치료 기간, 배합, 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 상기 "유효량"은 개체에게 투여하였을 때, NMDA 수용체를 활성화시키거나, MAPK 신호전달 경로를 활성화시키거나, erk1/2를 활성화시키거나, 즉각조기발현 유전자의 발현을 유도하거나, 시냅스에 구조적인 변화를 유도할 수 있는 양을 의미할 수 있다. 상기 "개체"는 동물, 예를 들어, 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다.

[0016] 상기 "약학적 조성물"은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러가지 제제로 투여될 수 있으며, 인간 투여를 위해, 상기 제제는 생물학 표준의 FDA국에 의해 요구되는 멸균성, 발열원성, 일반적인 안정성 및 순도 표준에 부합하는 것일 수 있다.

[0017] 상기 "경구투여를 위한 제제"는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등을 포함하는 고형 제제일 수 있다. 상기 고형 제제는 본 발명의 유효성분에 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제되거나, 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제를 포함할 수 있다. 상기 경구투여를 위한 제제는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등을 포함하는 액상 제제일 수 있다. 상기 액상 제제는 통상적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0018] 상기 "비경구 투여를 위한 제제"는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등을 포함할 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁용제는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등일 수 있다. 상기 좌제의 기제는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등일 수 있다.

[0019] 일 구체예에 있어서, 상기 인지장애는 뇌발달 질환 또는 퇴행성 뇌질환인 것일 수 있다.

[0020] 상기 "뇌발달 질환"은 유전적 요인, 환경적 요인, 또는 발육과정 중 생긴 뇌 손상 등으로 인해 지능, 언어 능력, 운동 능력, 학습능력 등이 연령에 맞게 발달하지 않은 상태를 의미할 수 있다. 예를 들어, 자폐증, 조현병 등이 포함될 수 있다.

[0021] 상기 "퇴행성 뇌질환"은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 발생하는 모든 뇌질환을 포함하는 광의의 개념을 의미할 수 있다. 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌신경세포의 사멸, 뇌 신경세포간의 시냅스 형성 또는 기능상의 문제, 또는 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증가나 감소 등으로 인해 유발될 수 있다. 예를 들어, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 다발성경화증, 및 루게릭병 등이 포함될 수 있다.

- [0022] 일 구체예에 있어서, 상기 뇌발달 질환 또는 퇴행성 뇌질환은 자폐증, 조현병, 우울증, 조울증, 주의력 결핍-과잉행동 장애, 건망증, 경도인지장애, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 니만픽병, 고셔병, 파브리병, 테이색스병, 샌드호프병, 소뇌실조증, 치매, 뇌졸중, 크로이츠펔트-야콥병, 알코올성 뇌신경질환, 다발성경화증, 루게릭병, 근위축성 측삭 경화증, 외상성 두부손상, 간질, 뇌 허혈증, 중풍, 기억상실증, 뇌 기능 혼수, 외상 후 스트레스 장애, 척수 손상, 척수염, 저산소증, 뇌경색, 뇌염, 뇌 순환대사장애, 및 베르니케-코르사코프 증후군으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0023] 상기 경도 인지장애는 인지기능이 저하되었으나 아직은 치매가 아닌 상태로, 알츠하이머병으로 이행될 수 있는 상태를 의미하는 것일 수 있다.
- [0024] 일 구체예에 있어서, 상기 프소탈리딘은 N-메틸-D-아스파르테이트 (N-methyl-D-aspartate; NMDA) 수용체 조절제일 수 있다.
- [0025] 상기 "N-메틸-D-아스파르테이트(N-methyl-D-aspartate; NMDA) 수용체"는 신경세포에 있는 글루타메이트 수용체의 일종으로 세포의 사멸과 정상 세포 간의 신호전달을 조절하는 것일 수 있다. 상기 NMDA 수용체는 뉴런들이 서로를 강하게 또는 약하게 연결되도록 돕는 역할을 하는바, 학습과 기억의 신경전달과정의 근간이 되는 시냅스 가소성에서 매우 중요한 역할을 하는 것일 수 있다. 상기 수용체의 활성화는 세포 내 신호 전달의 조절을 통해 장기 증강(long-term potentiation; LTP)를 유지하고 장기기억을 형성하는데 필요한 즉각조기발현유전자를 조절하는 것을 의미할 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "NMDA 수용체 조절제"는 상기 NMDA 수용체에 작용하여 상기 수용체를 활성화시킴으로써 세포내 신호전달 캐스케이드(cascade)를 통해 시냅스 가소성을 조절하는 물질을 의미할 수 있다.
- [0027] 일 구체예에 있어서, 상기 프소탈리딘은 세포외 신호-조절된 키나아제 (extracellular signal-regulated kinase; Erk)를 활성화시키는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 "Erk (extracellular signal-regulated kinase; Erk)"는 세포 내에 존재하여 세포 외의 자극을 세포내로 전달하는 인산화효소로, MAPK(Mitogen-activated protein kinase; MAPK) 신호 전달 경로에 관여하는 단백질을 의미할 수 있다. 상기 Erk는 NMDA 수용체의 활성화를 통한 세포 외 칼슘의 유입을 시작으로 다양한 매개 단백질을 통해 인산화 되어 활성화되는 것일 수 있다.
- [0029] 일 구체예에 있어서, 상기 프소탈리딘은 즉각조기발현유전자(Immediate early genes; IEGs)의 발현을 유도하는 것일 수 있다.
- [0030] 본 명세서에서 사용되는 용어 "즉각조기발현유전자(Immediate early genes; IEGs)는 학습과 같은 자극에 대응하여 신속하게 발현되어 시냅스 가소성 조절에 관여하는 유전자로서, 기억 형성에 핵심적인 역할을 하는 것을 의미할 수 있다. 상기 즉각조기발현유전자는 시냅스 가소성에 관련된 특정 유전자의 전사를 조절하는 전사 인자로 작용하거나, 또는 시냅스 가소성의 변화를 직접적으로 조절하는 작동자로 작용하는 것일 수 있다.
- [0031] 일 구체예에 있어서, 상기 프소탈리딘은 시냅스 가소성을 조절하는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 "시냅스"는 하나의 신경세포에서 다른 신경세포로 신호를 전달하는 특수한 접점 구조로서, 하나의 신경세포의 축삭돌기(전 시냅스)와 다른 신경세포의 수상돌기(후 시냅스)가 만나는 부위를 의미할 수 있다. 상기 신호 전달은 하나의 신경세포에서 발생한 전기 신호가 신경세포 말단에 빠르게 도달하여 신경전달물질을 분비하면 이러한 신경전달물질이 다른 신경세포에 존재하는 수용체에 결합하는 과정을 통해 이루어질 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시냅스 가소성 (synaptic plasticity)"은 학습에 의해 시냅스에 일정한 변화가 생기는 것을 의미할 수 있다. 상기 변화는 시냅스에서 신경전달물질이 더 많이 분비되거나, 신경전달물질과 결합하는 수용체의 수가 더 많아지거나, 또는 시냅스의 수가 더 많아지는 것을 통해 시냅스의 전달 효율 또는 시냅스의 결합 양상이 지속적으로 변화하는 것일 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시냅스 가소성 조절"은 시냅스에 구조적 또는 기능적인 변화를 유도하는 것으로 시냅스의 밀도, 면적, 강도 등을 변화시키는 것일 수 있다.
- [0035] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 상기 "담체 또는 부형제"는 생리학상 상용성인 어떠한 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스,

물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0037] 다른 양상은 프소랄리딘을 유효성분으로 포함하는 학습능력 또는 기억능력을 향상하는데 사용하기 위한 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 프소랄리딘, NMDA 수용체, Erk, 즉각조기발현유전자, 시냅스 가소성 등에 대해서는 상기한 바와 같다.

[0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 "학습능력 또는 기억능력 향상"은 시냅스의 가소성 조절을 통해 유도되는 것일 수 있다. 상기 "학습(learning)"은 생물이 처한 물리적, 생물학적 환경이 주는 특수한 정보와 지식을 얻는 과정을 의미할 수 있고, 상기 "기억(memory)"은 그러한 정보나 지식의 저장된 형태를 의미할 수 있다.

[0040] 상기 "건강기능식품"은 상기 건강식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합 양은 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올, 음료, 및 비타민 복합제 등에 한정되지 않고 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다.

[0041] 또 다른 양상은 프소랄리딘을 유효성분으로 포함하는 인지장애를 예방 또는 개선하기 위한 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0042] 상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 프소랄리딘, 인지장애, 뇌발달 질환, 퇴행성 뇌질환, 건강기능식품, NMDA 수용체, Erk, 즉각조기발현유전자, 시냅스 가소성 등에 대해서는 상기한 바와 같다.

### 발명의 효과

[0043] 일 양상에 따른 프소랄리딘은 우수한 시냅스 가소성 조절 효과를 나타내므로, 약학적 조성물 또는 건강기능식품에 유효성분으로 포함되어 뇌발달 질환 또는 퇴행성 뇌질환을 포함한 인지장애의 치료제 또는 개선제 등의 개발에 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 SH-SY5Y 세포주 및 초대대뇌신경세포에서의 Erk의 활성화와 즉각조기발현유전자의 발현을 유도하는 천연 화합물의 스크리닝 과정을 나타낸 것으로, (A) 천연화합물의 스크리닝 과정을 도식화한 것, (B) SH-SY5Y 세포에 436개의 천연화합물을 처리한 1차 스크리닝 결과, (C) 5-6 DIV(Days in vitro) 초대대뇌신경세포에 86 개의 천연화합물을 처리한 2차 스크리닝 결과, 및 (D) 7 DIV 초대대뇌신경세포에 41 개의 천연화합물을 처리한 최종 스크리닝 결과이다.

도 2는 프소랄리딘의 Erk1/2의 활성화 및 즉각조기발현유전자의 발현에 대한 영향 확인한 결과로, (A) 웨스턴 블랏을 수행하여 프소랄리딘의 Erk1/2의 활성화에 대한 농도별 영향을 확인한 결과, (B) 3 번 이상의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 일원분산분석(one-way ANOVA) 후 Dunnett's post-hoc tests(n = 4)를 이용하여 분석한 결과, (C) 웨스턴 블랏을 수행하여 프소랄리딘의 Erk1/2의 활성화에 대한 시간별 영향을 확인한 결과, (D) 3 번 이상의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 일원분산분석(one-way ANOVA) 후 Dunnett's post-hoc tests(n = 4)를 이용하여 분석한 결과, 및 (E) 정량적 RT-PCR을 수행하여 프소랄리딘의 즉각조기발현유전자의 발현에 대한 영향 확인한 결과이다. (오차 막대는 표준 편차(SD)를 나타낸다. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001, 및 # p < 0.05; ## p < 0.01; ### p < 0.001.)

도 3은 MAPK 신호 전달 경로, NMDA 수용체 활성화, 또는 칼슘 이온의 유입이 프소랄리딘에 의한 Erk1/2 활성화 또는 즉각조기발현유전자의 발현에 관여하는지를 확인하기 위한 결과로, (A) MAPK 또는 PI3K 신호 전달이 프소랄리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여하는지를 확인한 결과, (B) 4 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 Student's t-test (n = 4)를 이용하여 분석한 결과, (C) NMDA 수용체 활성화가 프소랄리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여하는지를 확인한 결과, (D) 4 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 Student's t-test (n = 4)를 이용하여 분석한 결과, (E) 칼슘 이온의 유입이 프소랄리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여하는

지를 확인한 결과, (F) 3 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 Student 's t-test ( $n = 3$ )를 이용하여 분석한 결과, (G) MAPK 신호 전달이 프소랄리딘에 의해 유도된 즉각조기발현유전자의 발현에 관여하는지를 확인한 결과, 및 (H) NMDA 수용체 활성화가 프소랄리딘에 의해 유도된 즉각조기발현유전자의 발현에 관여하는지를 확인한 결과이다. (오차 막대는 표준 편차(SD)를 나타낸다. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ , \$  $p < 0.05$ ; \$\$  $p < 0.01$ ; \$\$\$  $p < 0.001$ , 및 n.s.: 유의하지 않음.)

도 4는 프소랄리딘이 추가적인 시냅스 활성화에 효과가 있는지 여부 및 프소랄리딘이 글루타메이트 용량-반응 곡선에 영향을 주는지 여부를 확인한 결과로, (A) 프소랄리딘에 의해 유도된 신경세포의 변화에 대한 비-NMDA 형 글루타메이트 수용체 및 L형 전압 의존성 칼슘 채널의 영향을 확인한 결과, (B) 3 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 Student 's t-test ( $n = 5$ )를 이용하여 분석한 결과, 및 (C) 프소랄리딘의 글루타메이트 EC50에 대한 영향을 확인한 결과로 3 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 비선형 회귀(nonlinear regression)를 이용하여 분석한 결과이다. (오차 막대는 표준 편차(SD)를 나타낸다.)

도 5는 프소랄리딘에 의해 유도된 흥분성 시냅스의 발달을 확인한 결과이다. (A) 흥분성 시냅스를 면역형광 및 공초점 현미경을 사용하여 얻은 이미지, 및 (B) 시냅스 PSD95-양성 및 VLU1-양성 클러스터를 정량화한 결과로 일원분산분석 후 Dunnett's post-hoc test를 사용하여 분석한 결과이다. (오차 막대는 표준 편차(SD)를 나타낸다. \*\*\*  $p < 0.001$ . 스케일 막대 10mm.)

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### 참고예 1. 실험재료

##### 1.1. 시약 및 항체

사용된 1차 항체는 토끼 항-p-Erk1/2 (Cell Signaling, # 9101), 토끼 항-Erk1/2 (Cell Signaling, # 9102), 토끼 항-p-Akt (Cell Signaling, # 4060), 닭 항-Map2 (Abcam, ab5392), 마우스 항-PSD 95 (Santa Cruz Biotechnology, sc-32290), 토끼 항-VGLUT1 (Synaptic Systems, 135 302), 및 마우스 항- $\beta$ -액틴-HRP (Sigma, A3854)이다. 사용된 2 차 항체는 HRP-접합된 항-토끼 및 항-마우스(Invitrogen, G21040, G21234), AlexaFluor 488 염소 항-닭 (Invitrogen, A11039), AlexaFluor 555 염소 항-마우스 (Invitrogen, A21422), 및 AlexaFluor 647 염소 항-토끼 (Invitrogen, A21244)에 접합된 항체이다. Sigma-Aldrich로부터 MK-801 (M107), PD0325901 (PZ0162), LY294002 (L9908), Thiazolyl Blue Tetrazolium (M2128), 및 EGTA (E3889)를 구입하였다. BAPTA-AM (B1205)은 Invitrogen으로부터 구입하였다.

##### 1.2. 초대신경세포의 배양

대뇌 피질과 해마는 배아 (E) 15.5일 IRC 마우스의 뇌로부터 해리되었다. 해리된 대뇌 피질과 해마를 37 °C에서 20 분 동안 0.25 % 트립신(Gibco)/DNase I (Sigma)로 소화시켰다; 소 태아 혈청을 이용하여 트립신을 비활성화시켰다. 세포를 폴리-L-라이신(Sigma)으로 미리 코팅된 플레이트에 놓고 2 % B27 보충제, Glutamax, 및 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen)이 보충된 신경기본배지(Neurobasal medium)에서 배양하였다. 신경 세포는 95 % 공기와 5 % CO2를 함유한 포화 대기에서 37 °C로 유지시켰고, 단리시킨지 하루 후 배지를 새로운 배지로 교체하고 매 3-4 일마다 배지의 반을 교체하였다.

#### 참고예 2. 실험과정

##### 2.1. RNA 단리 및 RT-PCR 분석

총 RNA는 GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 추출하였다. cDNA를 생성하기 위해 iScript™ cDNA Synthesis Kit (bio-rad)를 사용하여 총 RNA (0.5-1 g)를 역전사시켰다. mRNA의 정량은 StepOne 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)을 SYBR Green PCR Master Mix를 사용하여 제조사의 지침 (Applied Biosystems)에 따라 수행하였다. 정량적 RT-PCR에 사용된 전사-특이적 프라이머는 다음과 같다: Arc, F: 5'-AAGTGCCGAGCTGAGATGC-3', R: 5'-CGACCTGTGCAACCCTTTC-3', Egr-1, F: 5'-TCGGCTCCTTCTCACTCA-3', R: 5'-CTCATAGGGTTGTCGCTCGG-3', c-Fos, F: 5'-CGGGTTTCAACGCCGACTA-3', R: 5'-TTGGCACTAGAGACGGACAGA-3', GAPDH, F: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3', R: 5'-TGTAAGCATGTAGTTGAGGTCA-3'. 글리세르알데히드-3-인산염 탈수소 효소 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH)는 표준화를 위한

기준 유전자로 사용되었다. mRNA의 상대적 정량은 Pfaffl 방법을 사용하여 계산되었다 (Pfaffl, 2001).

## 2.2. 웨스턴 블랏 분석

대뇌신경세포는 방사면역침전 분석 완충액(radioimmunoprecipitation assay buffer; RIPA)으로 용해시켰다. 단백질을 8 % SDS-PAGE 겔을 사용하여 분리하고 0.22- $\mu$ m 나이트로셀룰로오스(nitrocellulose; NC) 막으로 옮겼다. 막은 5 % 탈지 우유 블로킹 완충액에서 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션한 다음 4°C에서 1차 항체와 함께 밤새 인큐베이션하였다. Tris-완충 식염수 및 Tween 20(Tris-buffered saline and Tween 20; TBST)으로 세척한 후, 2차 항체를 실온에서 1 시간 동안 막에 첨가하였다. 막은 웨스턴 블랏 ECL 용액(Supex)으로 전개되었다.  $\beta$ -액틴은 면역블로팅 대조군으로 사용되었다. 단백질 수준의 변화를 확인하기 위하여 상이한 용해물을 사용하여 3번 이상의 개별 실험을 수행하였다.

## 2.3. 면역 형광법

해리된 해마신경세포는 폴리-L-라이신으로 코팅된 유리 커버 슬립상에서 성장하였다. 신경 세포를 4 % 파라포름알데히드 (paraformaldehyde; PFA)/인산염 완충 식염수 (phosphate buffered saline; PBS)에서 15 분간 고정시킨 후 0.1 % Triton X-100/PBS로 10 분간 투과시켰다. 신경 세포를 실온에서 1 시간 동안 10 % 정상 염소 혈청 (normal goat serum; NGS) 블로킹 완충액과 함께 인큐베이션하였다. 신경 세포를 마우스 항-PSD95, 토끼 항-VGLUT1, 및 닭 항-MAP2 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. PBS로 세척한 후, 신경 세포를 실온에서 1 시간 동안 AlexaFluor 488, AlexaFluor 647, 또는 AlexaFluor 555 (Invitrogen)에 접합된 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 신경 세포를 PBS로 5 분간 3 회 세척한 후, 장착 매체(Thermo Scientific, 9990402)와 함께 양전하를 띤 유리 슬라이드 상에 장착시켰다. 신경 세포는 Nikon A1 공초점 레이저 현미경 시스템을 사용하여 이미징하였다.

## 2.4. PSD 95 / VGLUT1-양성 클러스터의 정량

VGLUT1-양성 PSD 95 클러스터의 밀도, 면적, 및 강도를 ImageJ 프로그램 및 NeuronJ 플러그인을 사용하여 흥분성 해마 신경 세포의 2차 수상돌기의 이미지로부터 측정하였다. 각 채널의 배경 강도를 뺀 다음 ImageJ의 Adjust / Threshold 기능을 클러스터 크기를 정량화하기 위해 동일한 조건으로 각 이미지에 적용했다. 각 실험에서 무작위로 선택된 피라미드 신경 세포로부터 50개에서 100개의 수지상 영역을 분석하였다. 밀도는 수지상 길이 100  $\mu$ m<sup>2</sup> 당 클러스터 수로서 계산되었다 (평균  $\pm$  s.d.). 모든 분석은 처리와 관련하여 맹검된 실험자에 의해 수행되었다.

## 2.5. 통계적 분석

결과는 평균(표준 편차(standard deviation; SD))으로 제시되고, 실험에 따라 ANOVA의 Student's t-테스트 다음에 Dunnett's post-hoc 테스트 또는 Newman-Keuls' post-hoc 테스트를 사용하여 분석하였다. 결과는 도면의 범례에 표시된 것처럼 3 번의 상이한 배양에 걸쳐 여러 개의 웰로 구성된 다수의 실험 (n)에서 평균을 냈다. 결과는 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

### 실시예1. 즉각조기발현유전자의 발현을 유도하는 천연화합물 후보물질 스크리닝

시냅스 변형에 관여하는 새로운 화합물을 찾기 위하여, 웨스턴 블랏 및 정량적 RT-PCR을 수행하여 MAPK 신호 전달 경로 활성화 및 즉각조기발현유전자의 발현을 유도하는 천연 화합물 라이브러리를 스크리닝하였다.

도 1A는 천연화합물의 스크리닝 과정을 도식화한 것이다. 먼저 인간 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y에서 Erk1/2 인산화를 통한 MAPK 신호 전달 경로의 활성을 분석함으로써 436 개의 천연 화합물을 스크리닝하였다.

도 1B는 SH-SY5Y 세포에 436개의 천연화합물을 처리한 1차 스크리닝 결과이다. SH-SY5Y 세포에 천연화합물을 5  $\mu$ M로 30 분간 각각 처리하고 RIPA 완충액으로 시료를 용해시킨 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 p-Erk1/2의 상대적인 양을 측정하였다. 그 결과, 도 1B에 나타난 바와 같이, 총 86 개의 천연화합물이 SH-SY5Y 세포에서 p-Erk1/2의 양을 대조군보다 3 배 이상 증가시킨 것을 확인하였다.

도 1C는 5-6 DIV(Days in vitro) 초대대뇌신경세포에 86 개의 천연화합물을 처리한 2차 스크리닝 결과이다. 5-6 DIV(Days in vitro) 초대대뇌신경세포에 86 개의 천연화합물을 5  $\mu$ M로 30 분간 각각 처리한 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 p-Erk1/2의 상대적인 양을 측정하였다. 그 결과, 도 1C에 나타난 바와 같이, 총 41개의 천연화합물이 초대대뇌신경세포에서 Erk1/2을 활성화시킴을 확인하였다.

도 1D는 7 DIV 초대대뇌신경세포에 41 개의 천연화합물을 처리한 최종 스크리닝 결과이다. 7 DIV 초대대뇌신경

세포에 41 개의 천연화합물을 5  $\mu$ M로 1 시간동안 처리한 후, 정량적 RT-PCR을 수행하여 Arc 및 Egr-1을 포함하는 즉각조기발현유전자의 mRNA의 상대적인 양을 측정하였다. 그 결과, 도 1D에 나타난 바와 같이, 최종적으로 19 개의 천연화합물이 MAPK 신호 전달 경로를 활성화시키고 초대대뇌신경세포에서 즉각조기발현유전자의 발현을 유도함을 확인하였다.

**[0068] 실시예 2. 프소칼리딘에 의한 Erk1/2의 활성화 및 즉각조기발현유전자의 발현 증가 확인**

**[0069]** 프소칼리딘의 Erk1/2의 활성화 및 즉각조기발현유전자의 발현에 대한 영향을 확인하기 위하여, 각각 웨스턴 블랏 및 정량적 RT-PCR을 수행하였다.

**[0070]** 도 2A는 프소칼리딘의 Erk1/2의 활성화에 대한 농도별 영향을 확인한 결과이다. 5-6 DIV(Days in vitro) 초대대뇌신경세포에 프소칼리딘을 농도별(1, 5, 10, 및 20  $\mu$ M)로 30 분간 처리하고 RIPA 완충액으로 시료를 용해시킨 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 상대적인 단백질 양을 측정하였다. 도 2B는 3 번 이상의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 일원분산분석(one-way ANOVA) 후 Dunnett's post-hoc tests(n = 4)를 이용하여 분석한 결과이다. 그 결과, 도 2A 및 도 2B에 나타난 바와 같이, 초대대뇌신경세포에서 p-Erk1/2의 양은 프소칼리딘에 농도-의존적으로 유의하게 증가하였고, 특히, 5  $\mu$ M에서 p-Erk1/2이 대략 1.7-2 배 증가함을 확인하였다. 그러나, Serine473에서 p-Akt의 양은 프소칼리딘에 의해 증가하지 않았고, 10  $\mu$ M 또는 20  $\mu$ M에서 약간 감소됨을 확인하였다 (10  $\mu$ M: 87.6 (6.5) %; 20  $\mu$ M: 82.3 (1.5) %).

**[0071]** 도 2C는 프소칼리딘의 Erk1/2의 활성화에 대한 시간별 영향을 확인한 결과이다. 5-6 DIV 초대대뇌신경세포에 프소칼리딘을 5  $\mu$ M로 시간별(0.5, 1, 3, 및 6 시간)로 처리하고 웨스턴 블랏을 수행하여 단백질의 양을 측정하였다. 도 2D는 3 번 이상의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 일원분산분석(one-way ANOVA) 후 Dunnett's post-hoc tests(n = 4)를 이용하여 분석한 결과이다. 그 결과, 도 2C 및 도 2D에 나타난 바와 같이, 5  $\mu$ M의 프소칼리딘에서 p-Erk1/2의 양은 프소칼리딘 처리 30 분 후에 최고점을 찍고 처리 후 12 시간 동안 기저 수준까지 감소하였으나, Serine-473에서 p-Akt의 양은 5  $\mu$ M의 프소칼리딘 처리 후 12 시간 동안 증가하지 않음을 확인하였다.

**[0072]** 도 2A 내지 2D의 결과는 프소칼리딘이 p-Erk1/2 및 p-Akt를 모두 증가시키는 BDNF 또는 Reelin과 같은 다른 신경 영양인자의 조절제로 작용하는 대신 Erk1/2 신호 전달 캐스케이드를 특이적으로 활성화시킨다는 것을 나타내며, 또한 프소칼리딘에 의해 활성화된 Erk1/2 신호 전달이 PI3K(Phosphatidylinositol 3-kinase)-Akt 신호 전달과 상호작용하지 않을 수 있음을 시사한다.

**[0073]** 도 2E는 프소칼리딘의 즉각조기발현유전자의 발현에 대한 영향 확인한 결과이다. 7 DIV 초대대뇌신경세포에 프소칼리딘을 농도별(1, 5, 및 10  $\mu$ M)로 1 시간 동안 처리하고, 정량적 RT-PCR을 수행하여 여러 즉각조기발현유전자의 mRNA의 상대적인 양을 측정하였다. 그 결과 도 2E에 나타난 바와 같이, 즉각조기발현유전자 중 Bdnf 및 Homer-1a의 전사체는 증가되지 않았으나, Arc, Egr-1, 및 c-fos의 전사체는 프소칼리딘에 농도-의존적으로 유의하게 증가함을 확인하였다. (대조군인 DMSO를 처리한 경우와 비교하여, 프소칼리딘을 농도별(1, 5, 및 10  $\mu$ M)로 처리하여 유도된 상대적인 유전자 발현 수준은 다음과 같다: Arc: 200 (79) %, 219 (104) %, 및 182 (74) %; Egr-1: 166 (77) %, 352 (80) %, 및 398 (151) %; c-fos: 342 (298) %, 550 (392) %, 및 754 (669) %.)

**[0074]** 종합적으로, 도 2의 결과는 프소칼리딘이 인산화를 통해 Akt가 아닌 Erk1/2의 활성을 증가시키고, 30분에서 최고치를 나타내며, 농도-의존적 방식으로 증가시킨다는 것을 나타낸다. 또한, 프소칼리딘이 Arc, c-fos, 및 Egr-1등의 즉각조기발현유전자의 발현을 유의하게 유도하였는바, 프소칼리딘이 시험관 내에서 Erk1/2의 활성화 후에 즉각조기발현유전자의 활성-의존적인 발현을 자극시킬 수 있음을 나타낸다.

**[0075] 실시예 3. MAPK 신호전달 경로, NMDA 수용체 활성화, 칼슘 유입과의 연관성 확인**

**[0076]** MAPK 신호전달 경로, NMDA 수용체 활성화, 또는 칼슘 이온의 유입이 프소칼리딘에 의한 Erk1/2 활성화 또는 즉각조기발현유전자의 발현에 관여하는지를 확인하기 위하여, 웨스턴 블랏 또는 정량적 RT-PCR을 수행하였다.

**[0077]** 도 3A는 MAPK 또는 PI3K 신호 전달이 프소칼리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여하는지를 확인한 결과이다. 5-6 DIV 초대대뇌신경세포에 MEK 억제제인 PD0325901을 10  $\mu$ M로 또는 PI3K 억제제인 LY294002을 10  $\mu$ M로 30 분간 전처리한 다음 프소칼리딘을 5  $\mu$ M로 30 분간 처리한 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 상대적인 단백질 양을 측정하였다. 도 3B는 4 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 Student's t-test (n = 4)를 이용하여 분석한 결과이다. 그 결과, 도 3A 및 도 3B에 나타난 바와 같이, 프소칼리딘에 의한 Erk1/2 인산화의 증가는 MEK 억제제인 PD0325901, 10  $\mu$ M 에 의해 유의하게 감소하나, PI3K억제제인 LY294002, 10  $\mu$ M 에 의해서는 감소하지 않음을 확인하였다. 이는 MAPK 신호 전달은 프소칼리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여하나, PI3K

신호 전달은 프소랄리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여하지 않음을 의미한다.

[0078] 도 3G는 MAPK 신호 전달이 프소랄리딘에 의해 유도된 즉각조기발현유전자의 발현에 관여하는지를 확인한 결과이다. 7 DIV 초대대뇌신경세포에 MEK 억제제인 PD0325901을 10  $\mu$ M로 30 분간 전처리한 다음 프소랄리딘을 5  $\mu$ M로 30 분간 처리한 후, 정량적 RT-PCR을 수행하여 Arc, c-fos, 및 Egr-1의 상대적인 mRNA 양을 측정하였다. 그 결과 도 3G에 나타난 바와 같이, 프소랄리딘에 의해 유도된 Arc, c-fos, 및 Egr-1과 같은 즉각조기발현유전자의 발현은 MEK 억제제인 PD0325901, 10  $\mu$ M에 의해 완전히 억제됨을 확인하였다. 이는 MAPK 신호 전달이 프소랄리딘에 의해 유도된 즉각조기발현유전자의 발현에 관여함을 의미한다.

[0079] 도 3C NMDA 수용체 활성화가 프소랄리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여하는지를 확인한 결과이다. 5-6 DIV 초대대뇌신경세포에 NMDA 수용체 길항제인 MK-801을 1  $\mu$ M로 30 분간 전처리한 다음 프소랄리딘을 5  $\mu$ M로 30 분간 처리한 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 상대적인 단백질 양을 측정하였다. 도 3D는 4 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 Student's t-test ( $n = 4$ )를 이용하여 분석한 결과이다. 그 결과, 도 3C 및 도 3D에 나타난 바와 같이, 프소랄리딘에 의한 Erk1/2 인산화의 증가는 NMDA 수용체 길항제인 MK-801, 1  $\mu$ M에 의해 유의하게 감소함을 확인하였다. 이는 NMDA 수용체 활성화가 프소랄리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여함을 의미한다.

[0080] 도 3H는 NMDA 수용체 활성화가 프소랄리딘에 의해 유도된 즉각조기발현유전자의 발현에 관여하는지를 확인한 결과이다. 7 DIV 초대대뇌신경세포에 NMDA 수용체 길항제인 MK-801을 1  $\mu$ M로 30 분간 전처리한 다음 프소랄리딘을 5  $\mu$ M로 30 분간 처리한 후, 정량적 RT-PCR을 수행하여 Arc, c-fos, 및 Egr-1의 상대적인 mRNA 양을 측정하였다. 그 결과 도 3H에 나타난 바와 같이, 프소랄리딘에 의해 유도된 즉각조기발현유전자의 발현은 NMDA 수용체 길항제인 MK-801, 1  $\mu$ M에 의해 완전히 억제됨을 확인하였다. 이는 NMDA 수용체 활성화가 프소랄리딘에 의해 유도된 즉각조기발현유전자의 발현에 관여함을 의미한다.

[0081] 도 3E는 NMDA 수용체의 활성화가 세포내 하류 신호 전달을 개시하기 위한 칼슘 이온의 유입을 유발하는바, 칼슘 이온의 유입이 프소랄리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여하는지를 확인한 결과이다. 5-6 DIV 초대대뇌신경세포에 세포의 칼슘 이온 또는 세포내 칼슘 이온을 킬레이트하는 EGTA 2 mM로 또는 BAPTA-AM 10  $\mu$ M로 전처리한 다음 프소랄리딘을 5  $\mu$ M로 30 분간 처리한 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 상대적인 단백질 양을 측정하였다. 도 3F는 3 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 Student's t-test ( $n = 3$ )를 이용하여 분석한 결과이다. 그 결과 도 3E 또는 도 3F에 나타난 바와 같이, 프소랄리딘에 의한 Erk1/2 인산화의 증가는 세포의 칼슘 이온을 킬레이트하는 EGTA, 2 mM에 의해 유의하게 감소함을 확인하였다. 그러나, 세포내 칼슘이온을 킬레이트하는 BAPTA-AM, 10  $\mu$ M에 의해서는 감소하지 않음을 확인하였다 (미도시). 이는 NMDA 수용체의 활성화로 인한 세포외 칼슘 이온의 유입이 프소랄리딘에 의해 유도된 Erk1/2 활성화에 관여함을 의미한다.

[0082] 종합적으로, 도 3은 프소랄리딘의 작용은 NMDA 수용체의 활성화로 인해 세포외 칼슘이 유입되고 세포내 MAPK 신호 전달 경로를 활성화시켜 Erk1/2의 활성화 및 즉각조기발현유전자의 발현 증가를 유도한다는 것을 의미한다. 이는 프소랄리딘이 초대대뇌신경세포에서 시냅스 활성화에 영향을 주기 위한 NMDA 수용체 활성화의 작용제 또는 조절제로서 작용할 수 있음을 시사한다.

#### [0083] 실시예 4. 프소랄리딘에 의한 글루타메이트 EC50의 변화 확인

[0084] 프소랄리딘이 추가적으로 시냅스 활성화에 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 비-NMDA 형 글루타메이트 수용체 및 L형 전압 의존성 칼슘 채널을 각각 차단하는 CNQX 및 nifedipine을 전처리하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 또한, 프소랄리딘이 글루타메이트 용량-반응 곡선에 영향을 주는지 여부를 확인하기 위하여, 글루타메이트 농도를 점진적으로 증가시키면서 처리하여 글루타메이트 용량-반응 곡선의 이동을 분석하였다.

[0085] 도 4A는 프소랄리딘에 의해 유도된 신경세포의 변화에 대한 비-NMDA 형 글루타메이트 수용체 및 L형 전압 의존성 칼슘 채널의 영향을 확인한 결과이다. 5-6 DIV의 대뇌신경세포에 비-NMDA 형 글루타메이트 수용체 및 L형 전압 의존성 칼슘 채널을 각각 차단하는 CNQX, 20  $\mu$ M 및 nifedipine, 10  $\mu$ M을 전처리한 다음 프소랄리딘을 5  $\mu$ M로 30 분간 처리한 후, 웨스턴 블랏을 수행하여 상대적인 단백질 양을 측정하였다. 도 4B는 3 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 Student's t-test ( $n = 5$ )를 이용하여 분석한 결과이다. 그 결과 도 4A 및 도 4B에 나타난 바와 같이, 프소랄리딘은 CNQX 및 nifedipine으로 전처리된 대뇌신경세포에서 p-Akt의 양에는 영향을 미치지 않았지만, p-Erk1/2의 양을 유의하게 증가시켰음을 확인하였다. 이는 프소랄리딘에 의해 유도된 신경 세포의 변화가 전적으로 AMPA 또는 카이네이트(kainate) 수용체, L형 전압 의존성 칼슘 채널에 의해 매개되지 않음을 나타낸다. 또한, 프소랄리딘에 의해 Akt 활성화에 변화가 없는 것은 기저 시냅스 활성화에 의한 차폐효과

(masking)때문이 아니라는 것을 의미한다.

[0086] 도 4C는 프소칼리딘의 글루타메이트 EC50에 대한 영향을 확인한 결과이다. 대뇌신경세포에 글루타메이트 농도를 점진적으로 증가시키면서 p-Erk1/2의 상대적인 양을 측정하여 글루타메이트 용량-반응 곡선을 분석하였다. 결과는 3 번의 개별 실험을 통해 평균값을 구하고 비선형 회귀(nonlinear regression)를 이용하여 분석한 결과이다. 그 결과 도 4C에 나타난 바와 같이, 글루타메이트 EC50 값은 프소칼리딘 5  $\mu$ M의 존재시 최대 p-Erk1/2 양을 변화시키지 않으면서 왼쪽 방향으로 이동함을 확인하였다. 구체적으로, 활성화된 Erk1/2 수준으로부터 도출된 EC50 값은 글루타메이트를 처리한 샘플에서 4.68  $\mu$ M, 글루타메이트와 소칼리딘을 동시에 처리한 샘플에서 2.00  $\mu$ M 이었다. 이는 프소칼리딘이 기저 메커니즘에 관계없이 글루타메이트 수용체 활성화 또는 비활성화의 동력학에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

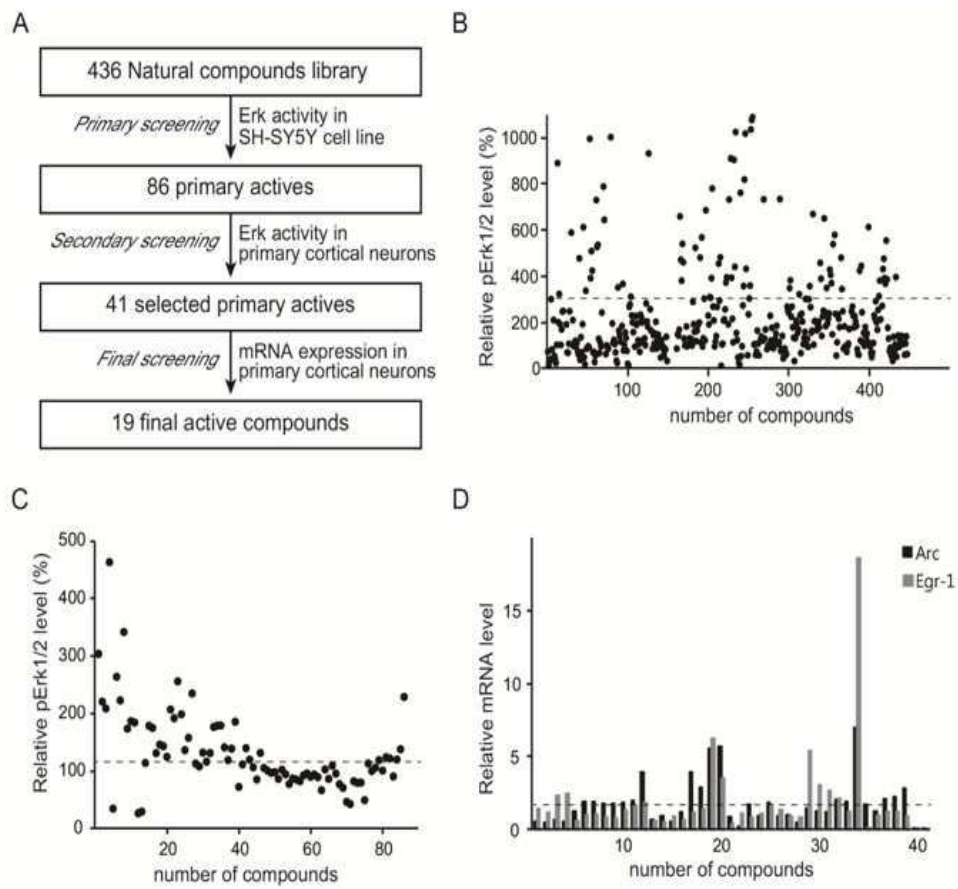
#### [0087] 실시예 5. 프소칼리딘의 시냅스 가소성 조절 효과 확인

[0088] 프소칼리딘의 흥분성 시냅스의 구조적 변화에 대한 효과를 확인하기 위하여, 흥분성 시냅스를 면역형광법 및 공초점현미경을 이용하여 이미징을 수행하고, PSD95-양성 및 VGLUT1-양성 클러스터를 정량화하였다.

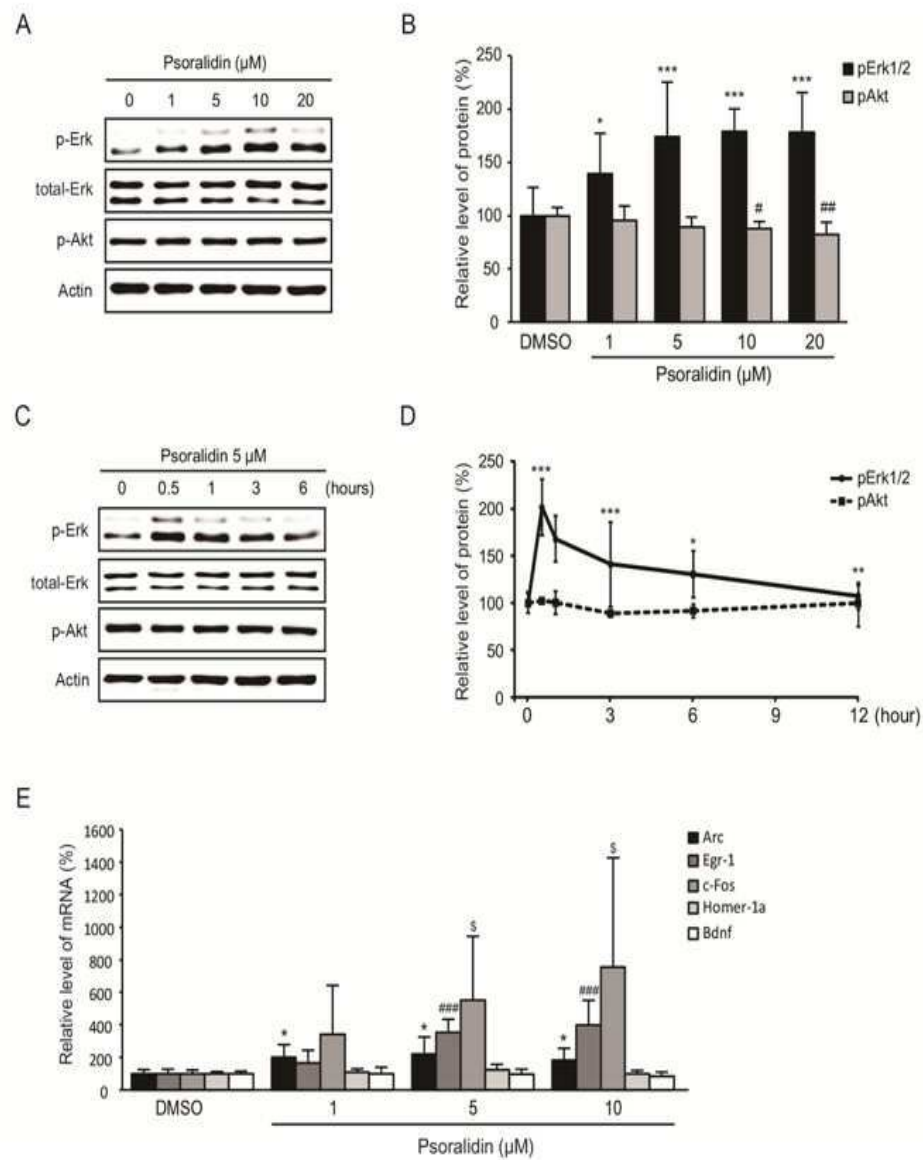
[0089] 도 5A는 면역형광법 및 공초점 현미경을 이용하여 흥분성 시냅스의 구조적인 변화를 가시화한 결과이다. 16-17 DIV 초대해마신경세포에 프소칼리딘을 5  $\mu$ M로 6시간 동안 처리하였다. 또한, NMDA 수용체와 MAPK 경로가 프소칼리딘에 의한 시냅스 변형에 관여하는지를 확인하기 위하여, MK-801 또는 PD0325901 1  $\mu$ M로 30 분 동안 전처리한 후, 프소칼리딘 5  $\mu$ M로 6 시간 동안 처리하였다. 시냅스 후 밀도 마커인 시냅스 후 밀도 단백질 95 (postsynaptic density protein 95; PSD95); 시냅스 전 마커인 소포성 글루타메이트 운반체 1 (vesicular glutamate transporter 1; VGLUT1); 및 수지상 마커인 MAP2의 항체를 사용하여 흥분성 시냅스를 가시화하였다. 도 5B는 시냅스 PSD95-양성 및 VGLUT1-양성 클러스터를 정량화한 결과이다. MAP2-양성인 신경세포의 수상 돌기에 PSD95-양성, VGLUT1-양성인 클러스터를 정량화하고 더 나아가 나아가 ImageJ에 프로그램을 사용하여 그들의 면적과 강도를 분석한 것으로, 일원분산분석 후 Dunnett's post-hoc test를 사용하여 분석한 결과이다. 그 결과 도 5A 및 도 5B에 나타난 바와 같이, 클러스터 밀도, 면적, 및 강도는 프소칼리딘을 처리하였을 때 유의하게 증가하였고, 흥분성 시냅스의 밀도는 처리 후 6 시간에서 최대화된 다음 24 시간에서 기저 수준으로 돌아옴을 확인하였다 (미도시). 또한, 이러한 흥분성 시냅스의 구조적인 변화는 MEK 억제제인 PD0325901 및 NMDA 글루타메이트 수용체 길항제인 MK801을 전처리한 경우 완전히 제거됨을 확인하였다. 이는 프소칼리딘이 NMDA 수용체와 MAPK 신호 전달의 활성화에 의해 매개되는 시냅스 밀도와 면적을 포함한 흥분성 시냅스의 구조적인 변화를 유도함을 시사한다.

도면

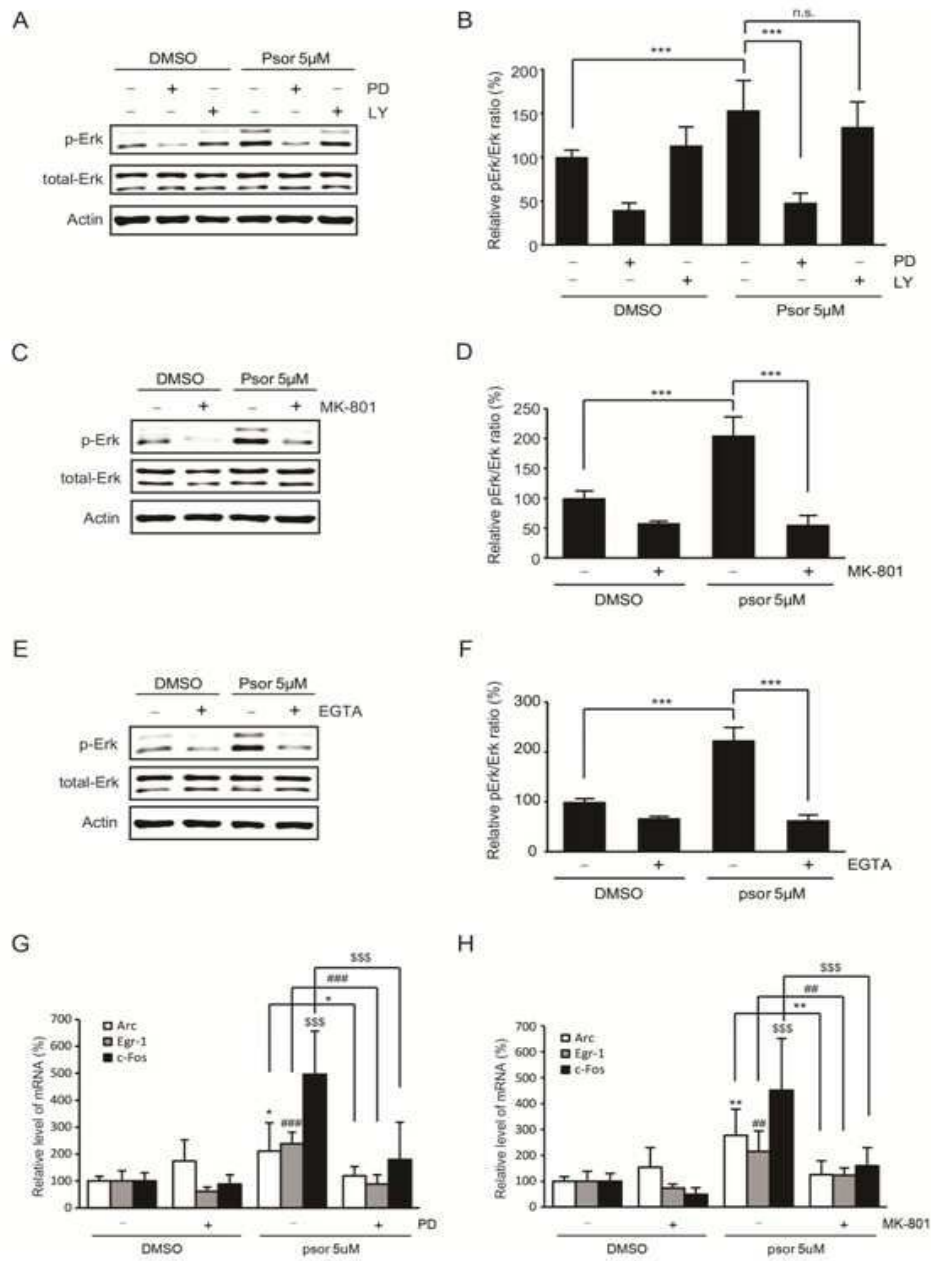
도면1



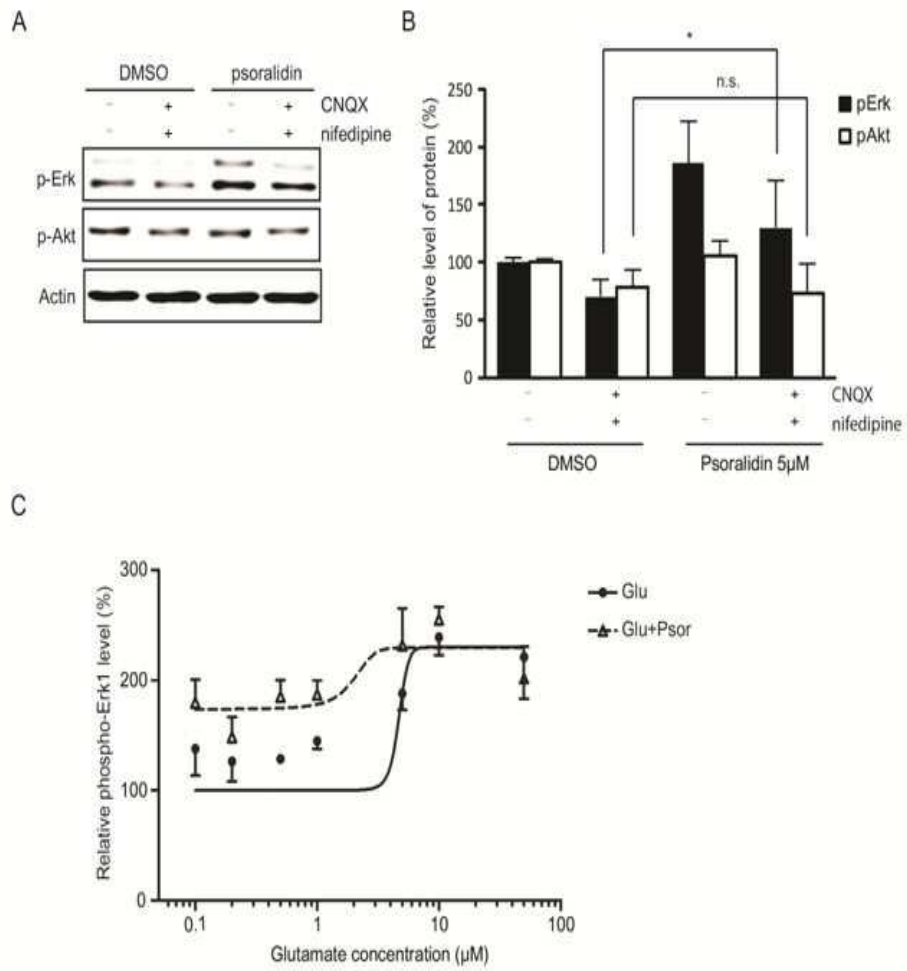
도면2



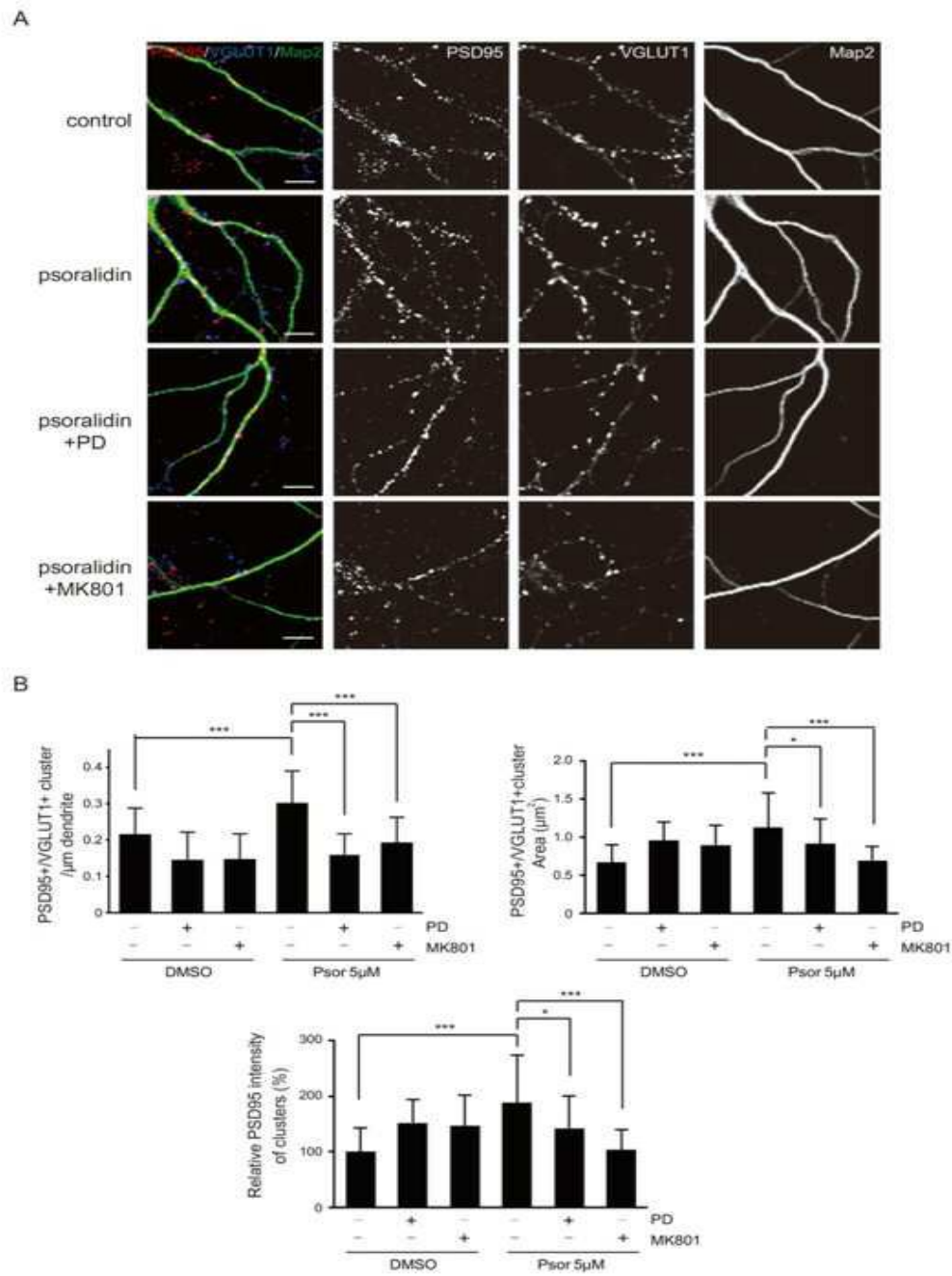
도면3



도면4



## 도면5



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> composition comprising psoralidin, and uses thereof
- <130> PN123249
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Arc forward primer  
 <400> 1  
 aagtgccgag ctgagatgc 19  
 <210> 2  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Arc reverse primer  
 <400> 2  
 cgacctgtgc aaccctttc 19  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Egr-1 forward primer  
 <400> 3  
 tcggctcctt tcctcactca 20  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Egr-1 reverse primer  
 <400> 4  
 ctcatagggt tgttcgctcg g 21  
 <210> 5  
 <211> 19  
 <212>  
 > DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> c-Fos forward primer  
 <400> 5

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| cggttttcaa cgccgacta            | 19 |
| <210> 6                         |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> Artificial Sequence       |    |
| <220><223> c-Fos reverse primer |    |
| <400> 6                         |    |
| ttggcactag agacggacag a         | 21 |
| <210> 7                         |    |
| <211> 21                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> Artificial Sequence       |    |
| <220><223> GAPDH forward primer |    |
| <400> 7                         |    |
| aggtcgggtgt gaacggatTT g        | 21 |
| <210> 8                         |    |
| <211> 23                        |    |
| <212> DNA                       |    |
| <213> Artificial Sequence       |    |
| <220><223> GAPDH reverse primer |    |
| <400> 8                         |    |
| tgttagaccat gtagttgagg tca      | 23 |