



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0137822

(43) 공개일자 2015년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/445 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0066371

(22) 출원일자 2014년05월30일

심사청구일자 2014년05월30일

(71) 출원인

건국대학교 산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

신찬영

서울특별시 양천구 목동동로 350 목동5단지아파트 511-604

반건호

서울특별시 동대문구 경희대로 24 경희대학교

김지운

인천광역시 남동구 석산로 35 풍림아이원아파트 104-503

(74) 대리인

한양특허법인

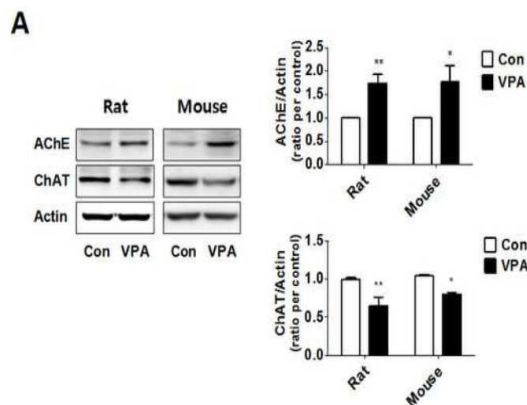
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 도네페질을 유효성분으로 포함하는 발프로산으로 유도된 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 도네페질을 유효성분으로 포함하는 발프로산 증후군의 증상으로서의 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 태아기에 발프로산에 노출된 것을 특징으로 하는 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0021(A120029)

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 (2차)[2세부]자폐증 모델 시스템을 이용한 발병기전연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.04.01 ~ 2014.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

도네페질을 유효성분으로 포함하는 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애는 자폐 범주성 장애 환자가 태아기에 발프로산에 노출되어 유발된 것을 특징으로 하는 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 아세틸콜린 에스테라제를 저해하는 것을 특징으로 하는 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 약학 조성물은 히스톤 디아세틸라제를 활성화하는 것을 특징으로 하는 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 히스톤은 아세틸콜린 에스테라제 프로모터 영역에 결합하는 히스톤 H3인 것을 특징으로 하는 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 자폐 범주성 장애는 사회성 결핍 증상을 나타내는 것을 특징으로 하는 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

도네페질을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하여 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애를 예방 또는 치료방법.

청구항 8

도네페질을 유효성분으로 포함하는 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애 완화 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 도네페질을 유효성분으로 포함하는 발프로산으로 유도된 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 도네페질(Donepezil) 또는 그의 염은 그 화학명이 2-[(1-벤질-4-피페리디닐)메틸]-5,6-디메톡시인단-1-온이며, 치매 등의 신경장애 치료를 위한 약물로 사용되는 아세틸콜린에스테라제 저해제이다.

[0003] 자폐 범주성 장애(Autism spectrum disorder, ASD)는 사회성 결핍, 언어 장애, 그리고 제한된 또는 반복적 행동 등을 포함하는 3가지의 핵심 행동 장애가 특징이다. 비록 자폐 범주성 장애의 정확한 발생 기전과 병인학이 알려져 있지 않지만 자폐 범주성 장애를 유발하는 무수한 유전적, 환경적 위험 요인이 지난 수십년 간 연구되고

있다.

[0004] 자폐 범주성 장애 치료에 대한 약물 후보군의 임상적 시도는 주로 신경전달물질의 조절과 이들의 수용체와의 관계에 대해 초점을 맞추고 있다. 그러나, 콜린 시스템을 조절하는 약물은 아직 자폐 범주성 장애의 치료에 대한 후보군 약물의 첫 번째 리스트에 올라 있지는 않다. 그럼에도 불구하고, 아세틸콜린(ACh)은 특히 중추신경계의 다양한 신경학적 과정, 예를 들어 가소성, 인지능력, 기억, 다른 신경전달물질의 분비 등에 연관되어 있다. 이러한 관련성은 자폐 범주성 장애의 치료에 있어서 아세틸콜린의 가능한 역할에 대해 연구할 충분한 동기가 되고 있다. 아세틸콜린은 아세틸 코엔자임 A와 콜린으로부터 콜린 아세틸 트랜스퍼라제(ChAT)의 작용에 의해 합성되며, 아세틸콜린에스테라제에 의해 분해된다. 이러한 효소들과 콜린성 수용체(무스카린성 및 니코틴성 아세틸콜린 수용체)의 조절 장애는 알츠하이머 병, 파킨슨병, 정신분열증부터 자폐 범주성 장애까지 다양한 신경학적 장애를 유발한다.

[0005] 자폐 범주성 장애 환자의 뇌에서 콜린 시스템의 조절 장애는 흔하게 관찰된다. 최근에 CHRNA7($\alpha 7$ -니코틴성 아세틸콜린 수용체 서브유닛을 코딩한다) 및 CHRM3(M3 무스카린성 수용체를 코딩한다)의 유전적 돌연변이가 자폐 증 환자에서 발견되었다. 자폐 범주성 장애 환자의 뇌를 사후(死後) 검사한 결과 M1 무스카린성 수용체와 수 개의 니코틴성 수용체 서브유닛($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$)은 감소되었으나 니코틴성 수용체의 $\alpha 7$ 서브유닛은 상향 조절되었음이 밝혀졌다. 이러한 결과는 양성자 자기공명장치로 검사에 의해 아세틸콜린 전구체로서 콜린의 감소된 수준은 많은 회백질과 측두엽에서도 관찰되었다. 이러한 모든 결과는 자폐 범주성 장애 환자에 있어서 뇌에서 콜린 시스템의 조절 장애가 관련됨을 시사한다.

[0006] 아세틸콜린 에스테라제 저해제인 도네페질, 리바스티그민, 갈란타민 등을 자폐 범주성 장애 환자에 적용했을 때 언어 능력, 의사소통 능력, 과행동에 있어서 다양한 정도의 효과를 보이며, 따라서 이러한 결과는 이러한 아세틸콜린 에스테라제 저해제들을 자폐 범주성 장애에 대한 또 다른 병인학적, 치료학적 타겟이 될 수 있음을 시사한다.

[0007] 전 세계적으로 자폐 범주성 장애 환자가 증가하고 있지만 자폐 범주성 장애의 병인학적 요인과 치료 타겟을 찾으려는 노력에도 불구하고 최근까지 승인된 약물들(리스페달, 아빌리파이)은 자폐 범주성 장애의 3가지 큰 증상 중 특히 사회성 결핍 측면에 대해서는 제한된 약효를 나타내고 있을 뿐이다. 이러한 핵심 증상을 개선하기 위한 치료제에 대한 충족되지 않은 필요성은 전례없이 높은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. PCT출원 국제공개공보 제 WO 2001/066114호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 도네페질을 유효성분으로 포함하는 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애는 자폐 범주성 장애 환자가 태아기에 발프로산에 노출되어 유발된 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0012] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 아세틸콜린 에스테라제를 저해하는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다.

[0013] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 있어서, 상기 약학 조성물은 히스톤 디아세틸라제를 활성화하는 것이 바람직하고, 상기 히스톤은 아세틸콜린 에스테라제 프로모터 영역에 결합하는 히스톤 H3인 것을 특징으로 하는 것이 더

바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 자폐 범주성 장애는 사회성 결핍 증상을 나타내는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0015] 또한 본 발명은 상기의 약학 조성물을 이용하여 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 도네페질을 유효성분으로 포함하는 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애 완화 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 도네페질은 발프로산에 의해 유발된 자폐 범주성 장애 완화 또는 개선 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있으며, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등에 첨가될 수 있다.
- [0018] "자폐 범주성 장애"는 자폐증, 아스퍼거 증후군, 전반적 발달장애(PDD), 레트 장애 및 소아 붕괴성 장애를 포함하는 자폐증-관련 장애를 의미한다.
- [0019] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 약학 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합 뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 약학조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 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. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물 또는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로즈, 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0022] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약 제형은 자가-유화 약물 전달 시스템 (SEDDS)이다. 에멀전은 하나의 비혼화성 상과 다른 상의 분산물로서, 일반적으로는 액적의 형태를 가진다. 일반적으로, 에멀전은 격렬한 기계적 분산에 의해 생성된다. 에멀전 또는 마이크로에멀전과는 대조적으로, SEDDS는 어떠한 외부의 기계적 분산이나 교반이 행해지지 않고도 과량의 물에 첨가될 때 자발적으로 에멀전을 형성한다. 단지 가볍게 혼합하기만 하면 생성되는 SEDDS의 장점은 용액 전체에 액적을 분포시킨다는 점이다. 부가적으로, 물이나 수성 상은 임의로 투여 직전에 첨가되는데, 이로써 불안정하거나 소수성인 활성 성분의 안정성이 보장된다. 그러므로, SEDDS는 소수성 활성 성분의 경구 전달 및 비경구 전달에 효과적인 전달 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, SEDDS는 소수성 활성 성분의 생체이용률을 개선한다. 자가-유화 투여형을 제조하는 방법에는, 예를 들어 미국 특허 제 5,858,401호, 제 6,667,048호 및 제 6,960,563호에 개시된 것들이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0024] 적합한 비강내 제형에는, 예를 들어 미국 특허 제 4,476,116호, 제 5,116,817호 및 제 6,391,452호에 개시된 것들이 포함된다. 비강 투여형은 일반적으로 활성 성분 이외에 다량의 물을 함유한다. 다른 성분, 예컨대 pH 조정제, 유화제 또는 분산제, 보존제, 계면활성제, 겔 형성제 또는 완충제, 및 다른 안정화제 및 가용화제가 임의로 소량 존재한다.
- [0025] 흡입을 통한 투여에 있어서, 본 발명의 화합물은 임의로 에어로졸, 미스트 또는 분말의 형태이다. 본원에 기재된 제약 조성물은 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하는, 가압 팩 또는 분무기로부터 제공되는 에어로졸

스프레이의 형태로 편리하게 전달된다. 가압 에어로졸의 경우에, 투여 단위는 계량된 양만큼 전달하는 밸브를 제공함으로써 결정된다. 적합한 분말 베이스, 예컨대 락토스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하는 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위하여, 예를 들어 젤라틴과 같은 캡슐 및 카트리지가 제형화된다.

[0026] 본 발명의 화합물에 대하여 적절한 1일 투여량은 체중 1 kg 당 약 0.01 내지 약 2.5 mg이다. 큰 몸체의 포유동물, 예를 들어 비제한적으로 인간에 있어서 지정된 1일 투여량은 약 0.5 mg 내지 약 1000 mg이며, 편리하게는 분할 투여되거나 (예를 들어, 비제한적으로 1일에 4회 이하) 또는 연장 방출형으로서 투여된다. 경구 투여용으로서 적합한 단위 투여형은 활성 성분 약 1 내지 약 500 mg, 활성 성분 약 1 내지 약 250 mg, 또는 활성 성분 약 1 내지 약 100 mg을 포함한다. 개체 치료 방식과 관련하여 변수가 여러 가지이고, 이러한 권장 수치로부터 크게 벗어나는 일은 흔치 않으므로, 상기 범위는 단지 제안하기 위한 것이다. 임의로, 이러한 투여량은 사용된 도네페질의 활성, 치료될 질환 또는 상태, 투여 모드, 개체의 필요조건, 치료될 질환 또는 상태의 증증도 및 전문의의 판단으로 제한되지 않는 다수의 변수에 따라 변경된다.

[0027] 이하 본 발명을 설명한다.

[0028] 본 발명의 발명자들은 발프로산으로 유도된 자폐증 실험동물모델(VPA 실험동물모델)을 사용하여 도네페질의 치료적 효과를 조사하였다. 본 발명자들은 출생 전에 발프로산(VPA)에 노출된 랫트와 그의 자손 마우스들에서 콜린 신경 발달의 조절 장애와 가장 눈에 띄게 전두엽 피질에서 아세틸콜린에스터라제(AchE)의 상향 조절을 유발한다는 것을 밝혔다. 유사하게, 발프로산로 처리된 배양 피질 신경 전구 세포의 분화는 시험관 내에서도 아세틸콜린에스터라제의 증가된 발현을 보였다. 염색질 면역침전 실험은 아세틸콜린 에스터라제 프로모터 영역에 결합하는 히스톤 H3의 아세틸화는 발프로산에 의해 증가된다는 것을 밝혔다. 추가적으로, 트리코스타틴 A(trichostatin A)와 낙산 나트륨염(SB) 같은 다른 히스톤 디아세틸라제 저해제(HDACIs) 또한 분화하는 신경 전구 세포에서 아세틸콜린 에스터라제의 발현을 증가시켰으며, 이는 아세틸콜린 에스터라제 발현의 조절에서 히스톤 디아세틸라제 저해제의 필수적 역할을 시사한다. 행동 분석을 위해 우리는 배아기 10일(E10)에 발프로산에 노출된 자손 마우스에게 도네페질(0.3mg/kg)을 출생 후 14일부터 실험기간 내내 하루에 한 번 피하주사하였다. 도네페질 처리는 아세틸콜린 에스터라제의 하향조절에 따라 발프로산 처리된 자손 마우스의 사회성접근지수를 향상시켰으며 반복 행동과 과행동, 또는 비정상적 불안행동을 막았다. 즉 본 발명에 의한 이러한 결과는 아세틸콜린 에스터라제의 상향 조절에 의해 대표되는 아세틸콜린 시스템의 조절 장애는 자폐 범주성 장애의 발프로산 동물 모델의 자폐 행동에 대하여 효과적인 약물학적 치료 타겟이 될 수 있는 증거를 제공한다는 것을 시사한다.

[0029] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0030] 발프로산의 태아기(Prenatal) 노출은 설치류 후손의 전두엽 피질(prefrontal cortex)에서 아세틸콜린에스터라제의 상향 조절을 유도

[0031] 전두엽 부위는 사회적 인식과 행동에 중요한 부위로 알려져 있는데, 본 발명자들은 4주에 랫트와 마우스 후손의 전두엽 피질 부위에서 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 각각 아세틸콜린의 1차 대사 효소 및 합성에 대한 율속 효소인 콜린 아세틸 트랜스퍼라제 및 아세틸콜린에스터라제의 발현 레벨을 조사하였다 (도 1a).

[0032] 랫트 전두엽 피질에서, 발프로산 처리군에서 아세틸콜린에스터라제 레벨은 대조군보다 현저하게 높았다(1.74 ± 0.19 배 vs. 대조군, $p < 0.01$). 반면, 콜린 아세틸 트랜스퍼라제 레벨은 발프로산 처리된 군에서 다소 감소하였다(0.73 ± 0.12 배 vs 대조군, $p < 0.05$). 유사한 결과들이 마우스 후손의 전두엽 피질에서 관찰되었다(도 1a). 증가된 아세틸콜린에스터라제 발현을 면역조직화학을 사용하여 확인하였다(도 1b).

[0033] 히스톤 디아세틸라제 저해제는 배양된 랫트 피질 신경 전구 세포에서 아세틸콜린에스터라제의 업-레귤레이션을 유도함

[0034] 증가된 아세틸콜린에스터라제 발현에 관여하는 기전을 밝히기 위하여, 본 발명자들은 발프로산 (주지된 히스톤 디아세틸라제 저해제) 및 다른 히스톤 디아세틸라제 저해제, 트리코스타틴 A 및 낙산 나트륨염을 SD 랫트 배아로부터 피질 신경 전구세포(NPC)에 처리하였다(배아기 14일).

[0035] 약물 처리 후, 신경 전구세포를 분화 조건(성장 인자 제외)에서 24시간 동안 배양하고 아세틸콜린 에스터라제의 발현 수준을 반정량 RT-PCR (도 2a) 및 웨스턴 블랏 분석하였다(도 2b). 아세틸콜린 에스터라제 유전자 발현 수준(도 3a)은 HDACI 처리로 증가하였다(배수 증가 vs 대조군, 발프로산 군 = 1.81 ± 0.12 배, $p < 0.0001$, 트리코스타틴(TSA) = 1.91 ± 0.09 배, $p < 0.0001$, SB = 1.35 ± 0.08 배, $p < 0.05$). 아세틸콜린 에스터라제의 단백질 수준도 히스톤 디아세틸라제 저해제에 의하여 증가하였다 (배수 증가 vs 대조군, 발프로산 = 1.94 ± 0.53 ,

$p < 0.05$, 트리코스타틴(TSA) = 1.90 ± 0.27 , $p < 0.05$, 낙산 나트륨염(sb) = 2.07 ± 0.67 , $p < 0.05$).

[0036] 히스톤 H3의 증가된 아세틸화는 발프로산 자폐 동물 모델에서 아세틸콜린에스터라제 유전자 프로모터 부위에 결합

[0037] 본 발명자들은 증가된 아세틸콜린에스터라제 수준이 아세틸콜린에스터라제 프로모터 부위에서 과아세틸화된 히스톤 H3에 의하여 매개될 것이라고 가정하였다. 이것을 증명하기 위하여 본 발명자들은 히스톤 H3 및 아세틸콜린에스터라제 유전자의 프로모터 부위 사이의 상호작용을 발프로산 처리된 랫트 신경전구세포(도 3b)만 아니라 발프로산 랫트(도 3a)로부터 얻어진 전두엽 피질을 사용하여 염색질 면역침전분석을 사용하여 조사하였다. 글리세랄데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제 DNA를 양 실험에서 음성 대조군으로 사용하였다. 본 발명자들은 아세틸콜린에스터라제 유전자 프로모터에 아세틸 히스톤 H3 결합이 발프로산으로 처리된 피질 신경전구세포 및 발프로산 동물 모델의 전두엽 피질에서 더 확연하였다는 것을 확인하였다. 이 결과들은 발프로산의 태아기 노출이 히스톤 H3에서 과아세틸화를 야기하고 그것은 후성적(epigenetic) 기작에 의하여 아세틸콜린에스터라제 유전자 발현을 활성화하였다는 것을 시사한다.

[0038] 도네페질의 아만성(Subchronic) 처리는 발프로산 동물 모델 마우스에서 사회적 행동 장애를 개선

[0039] 증가된 아세틸콜린에스터라제 수준은 뇌에서 아세틸콜린의 수준에 반비례적으로 영향을 주기 때문에, 본 발명자들은 그것의 저해제인 도네페질을 사용한 아세틸콜린에스터라제의 저해는 발프로산 유도된 자폐 동물 모델에서 자폐 증상을 개선할 수 있을 것으로 가정하였다. 본 발명자들은 발프로산 마우스에서 출생 후 14일로부터 1일에 한번 도네페질을 아만성적으로 처리하였다. 약 1주일 후(P23, 출생 후 23일) 사회적 행동 이상을 조사하였다. 사회적 장애를 체크하기 위하여 두 타입의 사회적 행동 테스트를 3개의 방 사회적 상호작용 시험(Three chamber social interaction test)을 사용하여 수행하였다(도 4a). 첫번째 섹션에서, 본 발명자들은 작은 선행 케이지 또는 빈 선행 케이지에 위치한 낯선 마우스의 그 공간에 머무르는 시간을 측정하여 사회성접근지수를 평가하였다. 두번째 섹션에서, 새 마우스를 기존 빈 공간에 추가하고 익숙한 마우스와 새로운 마우스들 사이에 사회적 선호도지수를 익숙한 마우스 및 낯선 마우스들 사이에 머무르는 시간을 측정하여 평가하였다. 데이터에 기반하여, 본 발명자들은 기존에 기재된 것과 같은 사회성접근 지수 및 사회적 선호도지수를 계산하였다[Kim KC et al, Toxicol Lett, 201, pp137-142,2011;]. 첫 번째 섹션에서, 발프로산 마우스군은 다른 군들의 마우스보다 빈 공간에 더 오래 머물렀고 동종의 마우스와 공간에 같이 머무르는 시간은 대조군보다 더 낮았고 이것은 사회성 결핍을 시사한다. 도네페질로 처리된 발프로산 군은 동료 마우스와 공간에서 더 오랜 시간 머물렀다. 이 결과들은 사회적 지수로 계산되었고, 그것은 발프로산 군에서 도네페질 처리로 개선된 사회적 상호작용을 나타내었다($F(1,36)=4.80$, $p < 0.05$). 사회적 선호도지수 테스트에서, 발프로산 군은 대조군보다 익숙한 마우스들과 더 오래 머무르고, 낯선 마우스들과는 더 적은 시간 머물렀다. 도네페질로 처리된 발프로산 군은 대조군과 비교하여 그들 공간들에서 유사한 잔류 시간을 나타내었다. 사회적 선호도 접근지수는 도네페질로 처리된 발프로산 군에서 사회적 선호도지수의 개선을 나타내었다.

[0040] 본 발명자들은 마우스가 있는 선행 케이지와 빈 선행 케이지에 접근하는 시간(스니핑 타임)을 측정하여 사회적 행동을 평가하였다. 발프로산 마우스는 낮은 사회적 접근 지수 및 사회적 선호도 접근 지수를 나타내었다. 도네페질 처리된 마우스는 사회성접근지수 테스트 및 사회적 선호도 접근지수 테스트 모두에서 낯선 마우스 근처로 더 많은 시간 접근하였다. 이러한 결과는 도네페질 처리된 처리된 발프로산 마우스는 사회적 행동에서 개선의 명백한 경향을 나타낸 것이다.

[0041] 발프로산 군에서 도네페질의 행동학적 효과를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 기존 보고에 따른 둥지 건설(building) 점수를 평가하였다[Silverman JL et al, Nat Rev Neurosci, 11, pp 490-502, 2010; Penagarikano O et al, Cell, 147, pp 235-246, 2011]. 본 발명자들은 정각 다섯시에 케이지의 중간에 네스트렛(nestlet)을 위치하고 다음 날 아침 정각 9시에 맹검 시험법을 사용하여 세운 둥지의 점수를 매겼다. 발프로산 군의 둥지 점수는 대조군 보다 더 낮았다(대조군 = 4.42 ± 0.66 , 발프로산 처리군 = 3.60 ± 0.51 , $p < 0.05$). 발프로산군에서 도네페질 처리는 현저하게 개선된 둥지 점수를 나타내었다(발프로산 = 3.60 ± 0.51 , 발프로산 + DNP = 4.71 ± 0.26 , $F(1,36)=7.71$, $p < 0.001$).

[0042] 도네페질의 아만성적 처리는 발프로산 동물 모델에서 과잉행동을 억제하고 반복되는 행동을 개선함

[0043] 본 발명자들은 구슬 매장 시험을 수행하였다(도 5a). 발프로산 처리 마우스는 대조군보다 더 많은 구슬을 묻었지만 도네페질 처리된 발프로산 군은 대조군과 동일한 수준의 구슬을 묻었다($F(1,48)=18.26$, $p < 0.001$).

[0044] 오픈 필드 테스트에서, 발프로산 마우스는 더 큰 운동력 활성을 나타내었지만, 그 증가된 운동력 활성은 도네페

질 처리로 현저하게 감소되었다 ($F(1,44)=16.20$, $p<0.01$). 또한, 발프로산 군에서 운동 속도는 대조군보다 더 높았고 이것은 도네페질 처리된 군에서 현저하게 감소하였다($F(1,44)=16.20$, $p<0.01$)(도 5b).

[0045]

실험 동물들의 불안 관련 행동을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 이피엠(Elevated plus maze) 테스트를 수행하였다. 흥미롭게도, 발프로산 처리 마우스는 덜 불안한 행동을 시사하는 대조군보다 열린 팔 부위에서 더 오래 머물렀지만, 도네페질 처리는 발프로산 군의 비정상적인 불안 정도를 정상으로 회복하였다(도 5c).

발명의 효과

[0046]

본 발명은 도네페질을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물이 아세틸콜린 에스터라제를 저해함으로써 발프로산 증후군의 증상을 예방 또는 치료함을 시사한다. 본 발명의 조성물은 태아성 발프로산 증후군을 포함하는 발프로산 증후군의 증상인 자폐 범주성 장애를 예방 또는 치료제로 개발될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1은 발프로산으로 유도된 자폐성 범주 장애 실험동물 모델의 전두엽 부위에서 관찰되는 콜린성 효소의 조절 장애를 나타낸다. 도 1a는 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 아세틸콜린에스터라제와 콜린 아세틸트랜스퍼라제의 발현 수준을 나타낸다. 도 1b는 면역조직화화학분석으로 생후 28일에 전두엽 부위의 아세틸콜린에스터라제를 측정하는 것이다.

도 2는 SD 랫트로부터 얻은 피질의 신경전구세포에서 히스톤 디아세틸라제 저해제가 아세틸콜린에스터라제의 발현을 증가시켰음을 나타낸다. 도 2a는 SD 랫트로부터 얻은 피질 신경전구세포에 히스톤 디아세틸라제 저해제 처리 24시간 후에 mRNA와 단백질 발현을 RT-PCR 분석을 사용하여 분석한 것이고, 도 2b는 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 분석한 것이다.

도 3은 아세틸콜린에스터라제의 프로모터 영역에 결합하는 히스톤 H3의 아세틸화가 발프로산 처리에 의해 증가함을 나타낸다. 도 3a는 태아기에 발프로산 또는 PBS에 노출된 랫트의 전두엽 피질을 사용한 염색질 면역침전분석의 결과를 나타낸다. 도 3b는 랫트의 피질 신경전구세포로부터 얻은 염색질 면역침전분석의 결과를 나타낸다. GAPDH는 음성 대조군으로 사용하였다.

도 4는 도네페질의 아만성 처리는 발프로산에 노출된 마우스에서 사회적 행동을 향상시킴을 나타낸다. 도 4a는 3개의 방 사회적 상호작용 시험(Three chamber social interaction test)에서 사회적접근지수를 측정하는 결과를, 도 4b는 사회적 선호도 접근지수를 측정한 결과를 나타낸다. 도 4c는 둥지 건설 시험(Nest Building Test)의 결과를 나타낸다.

도 5는 도네페질의 아만성 처리가 반복적 행동, 과행동 및 비정상적 우울증 유사 행동을 향상시킴을 나타낸다. 도 5a는 구슬 매장 시험(Marble burying test)의 결과를 나타낸다. 도 5b는 오픈 필드 테스트(Open field test)의 결과를 나타낸다. 도 5c는 이피엠 테스트(Elevated plus maze test)의 결과를 나타낸다.

도 6a는 발프로산에 노출된 마우스에서 약물 처리 및 행동 연구 계획을 나타내고, 도 6b는 발프로산에 노출된 마우스의 체중 변화도를 나타낸다.

도 7은 접근 시간에 기초한 비정상적 사회적 행동이 만성적 도네페질 투여에 따라 향상됨을 나타낸다. 도 7a는 사회적접근지수를, 도 7b는 사회적 선호도를 접근 시간에 기초하여 다른 마우스나 대상에 대하여 재-분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0049]

본 발명에서 사용한 물질은 다음과 같다. 돌베코 변형 이글 배지/F12(이하 DMEM/F12 배지라 한다.)는 킵코 BRL(Grand Island, NY)로부터 얻었으며, B-27 보충제는 Invitrogen(Carlsbad, CA)으로부터 구매하였다. 아세틸콜린에스터라제에 대한 항체(NB1-51274)는 Novus biological(CO, USA)을, 콜린 아세틸트랜스퍼라제(ChAT, MAB5350)은 Chemicon(CO, USA)을, 히스톤 H3(#9715)는 Cell signaling(MA, USA)을, 아세틸-히스톤 H3은 Millipore(MA, USA)를 출처로 한다.

[0050]

발프로산 나트륨염(P4543), 트리코스타틴 A(T8552), 낙산 나트륨염(Sodium butyrate, B5887), 그리고 도네페질 염산염 일수화물은 Sigma-Aldrich(St.Louis, MO)로부터 구입하여 발명에 사용하였다.

[0051]

실시예 1. 세포 배양

[0052]

랫트의 초기 신경전구세포는 배아기 14일(E14)의 SD 랫트의 대뇌 피질로부터 Berry-Kravis EM et al, Sciences translational medicine 4:152ra127, 2012;에서 설명한대로 분리하였다. 분화를 위해서, 신경전구세포는 폴리-엘-오르니틴(1mg/ml)로 계대배양시켰으며 DMEM/F12 배지를 포함하는 B27 보충액을 사용하여 성장 인자의 부존재 하에서 멀티-웰 플레이트(1×10^6)에 전-코팅하였다. 배양액은 습기 있는 환경(5% 이산화탄소)에 37℃를 유지하여 보관하였다. 히스톤 디아세틸라제 저해제는 계대배양 후 3시간 동안 처리되었다. 적절하게는, 세포 생존율은 MTT 분석에 의해 확인하였다. 세포 배양과 전구세포 분화 실험을 위해서, OrientBio(한국, 경기도)로부터 지정된 시간에 임신한 암컷 랫트를 얻었다. 마취, 안락사, 약물 투여 등은 실험동물보호규칙(1985년에 변경된 NIH publication No. 85-23)에 따라 수행하였으며, 이는 건국대학교 동물보호사용위원회에서 승인되었다.(KU13156)

[0053]

실시예 2. 웨스턴 블랏 분석

[0054]

세포는 PBS로 두 번 세척하고 2x SDS-PAGE 샘플 버퍼(120mM Tris-HCl(pH 6.8), 20% 글리세롤, 4% SDS, 28.8 mM 2-머캅토에탄올, 0.01% 브로모페놀블루)로 용해시켰다. 뇌 조직은 RIPA 완충용액(150mM 염화나트륨, 1% 트리톤-X 100, 0.5% 데옥시콜산 나트륨, 0.1% SDS, 50mM 트리스, pH 8.0)을 사용하여 균질화시키고 결과로 나온 용해물을 2X SDS-PAGE 샘플 완충용액에 의해 희석시켰다. BCA 단백질 분석에 의해 결정된 동량의 단백질($20 \mu\text{g}$)은 10% SDS-PAGE에 의해 분리되었으며 이는 니트로셀룰로오스 막으로 옮겨졌다. 막은 0.2% 트윈-20을 함유하는 1% 탈지우유로 1시간 동안 블락하였다. 막은 4℃에서 밤새 일차 항체와 함께 배양시켰으며, 실온에서 2시간동안 퍼옥시다아제로 컨주게이트 된 2차 항체(Santa Cruz, CA)와 함께 배양시켰다. 특정한 밴드는 ECL 시스템(Amersham, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 탐지하였으며 Bio-Rad 전기영동 이미지 분석기(Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK)에 노출시켰다. β -액틴은 로딩 대조군으로 사용하였으며 웨스턴 블랏 밴드 밀도는 β -액틴 면역활성에 의해 정상화시켰다.

[0055]

실시예 3. 반정량 RT-PCR

[0056]

본 발명에서는 반정량 RT-PCR을 수행하기 위해 총 RNA를 신경전구세포로부터 트리졸 시약에 의해 추출하였으며, $1 \mu\text{g}$ 의 total RNA를 RevertAid™ 역전사효소키트(K1622, Fermentas, Glen Burnie, Maryland, USA)를 사용하여 역전사시켰다. 그 후 $3 \mu\text{L}$ 의 cDNA를 PCR 증폭을 위해 사용하였으며, 이는 32번의 사이클로 구성되어 있다.(94℃, 1분; 60℃, 30초; 72℃, 35초, 그리고 마지막 확장 단계는 72℃에서 10분) 사용된 올리고 뉴클레오타이드 프라이머를 표 1에 나타내었다.(예제션 번호 : M17701)

표 1

[0057]

	포워드 프라이머	리버스 프라이머
AchE (아세틸콜린에스테라제)	5'-TTCTCCACACCTGTCTCATC-3'	5'-TTCATAGATACCAACACGGTTC-3'
Chat (콜린아세틸트랜스퍼라제)	5'-CAACCATCTTCTGGCACTGA-3'	5'-TAGCAGGCTCCATAGCCATT-3'
GAPDH (글리세르알데히드-3-포스페이트 탈하이드로제나제)	5'-AATGCATCCTGCACCACAA-3'	5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'

[0058]

증폭된 PCR 산물은 아가로스 겔을 포함한 브롬화 에티듐(Ethidium bromide)으로 분석하여 가시화시켰다.

[0059]

실시예 4. 염색질 면역침전법

[0060]

본 발명의 염색질 면역침전법(ChIP)은 이전에 보고된 Nelson JD et al, Nat Protoc 1, pp179-185, 2006;에 기재된 방법에 약간의 조작을 거쳐 수행하였다. 균질화된 뇌 또는 배양된 신경전구세포 시료는 포름알데히드로 고정시킨 후 1M 글라이신을 처리하였다. 차가운 PBS로 2번 세척한 후에 수집된 시료는 IP 완충용액(150mM 염화나트륨, 50mM 트리스-염산 pH 7.5, 5mM EDTA, 0.5% IGEPAL CA-630, 1.0% 트리톤 X-100)으로 얼음 위에서 용해시켰다. 펠렛은 IP 완충용액으로 피페팅하여 재현탁시켰으며 원심분리에 의해 세척하였다.(12,000g으로 4℃에서 1분) 염색질을 손질(shear)하기 위해, 1mL의 세척되고 재현탁된 펠렛을 얼음 위에서 초음파 처리하였다. 원심분리 후에(12,000g로 4℃에서 10분간) 상등액은 히스톤 또는 아세틸화된 히스톤($1 \mu\text{g}$)에 대응하는 일차 항체와 함께 면역침전법을 수행하는데 사용하였다. IgG는 대조군 항체로 사용하였다. 배양 후에, IP 완충용액 $20 \mu\text{L}$ 와 단백질 G 아가로스(Pierce) $20 \mu\text{L}$ 의 혼합물을 시료에 첨가하여 45분간 4℃에서 회전하는 플랫폼 위에서

배양시켰다. 세척 후에, DNA 분리를 위해 세척된 구슬에 10% Chelex 100 100 μ l를 첨가하고, 시료는 10분간 90℃에서 끓였다. DNA는 상등액으로부터 분리되었으며 이는 PCR 반응을 위해 사용하였다. 프로모터 영역에 직접적인 프라이머는 Integrated DNA Technologies 사의 PrimerQuest Design 툴을 사용하여 만들었다. Gapdh는 이 분석을 유효하게 하기 위한 대조군으로 사용하였다. 본 발명에서 사용된 프라이머 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	포워드 프라이머	리버스 프라이머
AchE (아세틸콜린에스터라제)	5'-CCTTCTGCGTTCCACTATGT-3'	5'-GGACACACTGACAGCTCTAATC-3'
GAPDH (글리세르알데히드-3-포스페이트 탈하이드로제나제)	5'-TCGTCCGTCCTCTCTACTTT-3'	5'-AGCTTTCTGGGCCTTCATAC-3'

실시예 5. 면역조직화학

본 발명에서는 실험동물에 얼음으로 차갑게 한 0.09% 정상 생리식염수(pH 7.4)를 20분간 끼얹은 후 4% 파라포름 알데히드로 처리하였다. 관상(coronal) 부분은 40 μ m 두께를 측정하여 전두엽 피질을 통과하여 절단 후 얼은 크리오스타트(저온유지장치)를 사용하여 연속된 부위로 준비하였다. 절단 부위는 각 웰에 1ml 조직 스톱 용액(0.2M 인산 완충용액에 든 글리세롤 및 에틸렌글라이콜)을 포함하는 24-웰 배양 플레이트(Falcon, Becton Dickinson Labware S.A., Le Pont-de-Claix, France)에서 수집되었다. 절단 부위는 1시간 동안 실온조건에서 블로킹 완충용액(PBS 내의 10% Horse 혈청 및 0.3% 트리톤 X-100)에 담그어졌다. 뇌 부위는 아세틸콜린에스터라제에 대한 1차 항체(Millipore, 1:500)와 함께 밤새 4℃에서 배양시켰으며 세척 완충용액(PBS 내의 1.5% Horse 혈청 및 0.1% 트리톤 X-100)으로 3번 세척하였다. Alexa 488과 컨주게이트 된 2차 항체는 블로킹 완충용액에서 희석되었으며 실온에서 2시간 배양시켰다. 3번 세척 완충용액으로 세척한 후에, 염색된 조직은 To-Pro3(1:1000)과 함께 핵 염색을 위해 배양시켰으며, 코팅된 슬라이드 글라스에 부착시키고 ProLong 용액(Invitrogen, USA)에 담그었다. 그 후 공초점(confocal) 현미경(ZEN2009, Carl Zeiss)을 사용하여 관찰하였다.

실시예 6. 인 비보(in vivo) 연구에서 동물 준비

임신한 Sprague-Dawley 랫트와 ICR 마우스는 OrientBio(대한민국, 경기도)에서 구입하였다. 동물은 표준 12시간 빛-암실 주기로, 주위 온도는 22±2℃로, 습도는 55±5%로, 음식물 펠렛과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 환경에서 유지시켰다. 태아기에 발프로산 또는 PBS에의 노출은 Kim KC et al, Toxicol Lett, 201, pp137-142, 2011;에 기재된 대로 수행하였다. 랫트와 마우스는 PBS 또는 발프로산을 피하주사하였는데, 배아기 12주 동물(E12)에는 400mg/kg의 용량을, 배아기 10주 동물(E10)에는 300mg/kg의 용량을 각각 주사하였다. 동물 실험은 한국대학교 동물보호사용위원회에 의해 승인되었다.(KU13156)

실시예 7. 약물의 처리

도네페릴 염산염 일수화물(0.3mg/체중 kg) 또는 생리식염수를 P14에서 P40까지 하루 한 번 복강 내 주사하였다. 체중은 1주일에 2번 또는 행동 시험 전에 측정하였다. 약물 용량은 문헌 및 예비 시험에 의해 선택하였다.(37, 38) 예비 시험에서, 3mg/kg 및 5mg/kg의 약물을 마우스에 주사하였는데(출생 후 14주, P14) 처리 후 곧 일부 마우스가 경련 및 타액 분비를 보였다.(데이터는 나타나지 않음) 이러한 부작용 때문에, 본 발명의 발명자들은 본 발명에서 0.3mg/kg을 선택하였다. 더욱이 임상적 세팅에 있어서 그의 식이 요법을 고려해 볼 때 만성 투여는 잘 고려해볼아야 한다. 약물은 신선하게 매 투여 스케줄마다 생리식염수(염화나트륨 0.9%)에 용해시켰으며 행동 시험 시작 30분 전에 투여하였다. 실험 도중에, 어떠한 비정상적 증상이나 독성 효과도 약물 및 생리식염수 처리군 둘 다에서 관찰되지 않았다.

5가지 다른 유형의 행동 분석이 실험 동물이 출생 후 40주에 다다를 때까지 연속적으로 수행되었다. 전 실험 기간 동안에, 실험군 사이에서 체중 변화가 나타나지 않았다.

실시예 8. 오픈필드 운동력 시험(Open field locomotor test)

오픈필드 박스(40x40x30cm)에서 새로운 환경에 대한 탐사 활동 분석이 수행되었다. 마우스들은 무대의 중심 영역에 놓여진 후 실제 행동 기록 전 5분간 습관화(habituation) 시간이 주어졌다. 전체 무대에서 움직인 총 거리와 속도가 20분간 움직임 추적 장비와 소프트웨어의 도움을 받는 CCD 카메라(EthoVision 3.1, Noldus

Information Technology, the Netherlands)로 측정하였다.

[0071] 실시예 9. 3개의 방 사회적 상호작용 시험(Three chamber social interaction test)

[0072] 사회적 상호작용 시험은 Kim KC et al, Toxicol Lett, 201, pp137-142, 2011;에 기재된 대로 수행하였다. 과제는 3개 세션으로 구성된다. 첫 번째 세션에서, 피실험동물은 중간 칸에 놓여졌으며 그 후 5분간의 습관화 시간을 주었다. 습관화 후에, 10분간의 사회성접근지수 시험을 위해 같은 종의 낯선 동물을(같은 연령 및 이전에 실험동물과 접촉한 적 없음) 왼쪽 또는 오른쪽 칸(낯선 영역 1)의 선형(wire) 케이지 안에 임의적으로 넣었으며, 동시에 다른 선형 케이지는 비워두었다(빈 영역). 낯선 영역 1 및 케이지 주변에서 보내는 시간을 빈 영역에서 지내는 시간에 대하여 그 시간을 측정하였다.

[0073] 사회적 선호도 접근지수 시험은 또 다른 10분간 직접 사회성접근지수 시험 종료 이후에 수행하였다. 또 다른 낯선 실험동물이 반대 칸(낯선 영역 2)의 선형 케이지에 놓여졌으며 피실험동물의 선형 케이지 내의 친숙한 동물에 대해 새로운 것에 대한 선호도를 확인하기 위한 동일한 파라미터를 이전 세션과 동일하게 측정하였다. 실험 중의 움직임 추적은 자동적으로 EthoVision 소프트웨어를 사용하여 기록되었다. 사회성접근지수(Sociability, SI)과 사회적 선호 요인(Social preference indices)가 다음의 공식에 따라 계산되었다.

[0074] 사회성접근지수(SI)=낯선 영역 1에서 보낸 시간 / 빈 영역에서 보낸 시간

[0075] 사회적 선호 요인(SPI)=낯선 영역 2에서 보낸 시간 / 낯선 영역 1에서 보낸 시간

[0076] 실시예 10. 둥지 건설 시험(Nest Building Test)

[0077] 대상 실험동물은 개별적으로 폴리카보네이트 케이지(20x26x13cm)에 실험 시작 전 3시간에 넣었다. 각 케이지에, 네스트렛(nestlet, 5x5cm, Ancare, NY, U.S.)이 5시 정각에 추가되었으며, 결과는 숙련된 실험자에 의해 다음날 아침에 맹검법에 의해 평가되었다. 점수를 매기는 단계는 Deacon R et al, J Vis Exp:e2607, 2012;에 기재된 대로 수행하였다.

[0078] 실시예 11. 이피엠(EPM, Elevated plus maze) 시험

[0079] 본 시험은 Holmes A et al, J Mol Neurosci, 18, pp151-165, 2002;에 기재된 과정에 따라 수행하였다. 미로는 2개의 열린 팔 부분(30x5cm)과 2개의 닫힌 팔 부분(30x5x15cm), 중심 영역(5x5cm)으로 구성되어 있다. 마우스는 중심 영역에 놓아진 후 미로 안에서 자유롭게 움직일 수 있도록 허락되었다. 팔 부분에서 마우스의 움직임과 소요 시간은 자동으로 Etho Vision 소프트웨어를 사용하여 기록되었다.

[0080] 실시예 12. 구슬 매장 시험(MBT, Marble burying test)

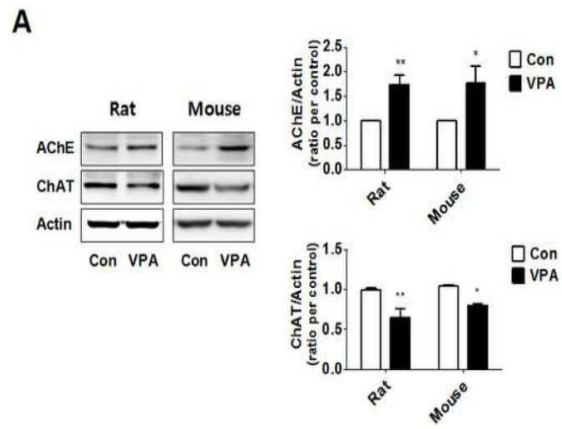
[0081] 본 시험은 Thomas A et al, Psychopharmacology(Berl), 204, pp361-373, 2009;에 기재된 것에 약간의 조작을 거쳐 수행하였다. 본 발명의 발명자들은 청결한 옥수수 숯대 침구(1/8 인치, Anderson lab bedding, U.S.)를 3cm 높이로 채웠으며 마우스는 각각 습관화를 위해 침구에 넣었다. 10분 후, 마우스는 제거되고 20개의 유리 구슬(지름 15mm)이 조심스럽게 4x5 개의 배열로 같은 거리를 유지하며 놓여졌다. 각 마우스는 지정된 케이지로 다시 돌려 보내 20분간 탐험하도록 허락되었다. 매장된 구슬(침구에 의해 50% 이상의 구슬이 덮여진 것)의 개수가 기록되었다.

[0082] 실시예 13. 통계학적 분석

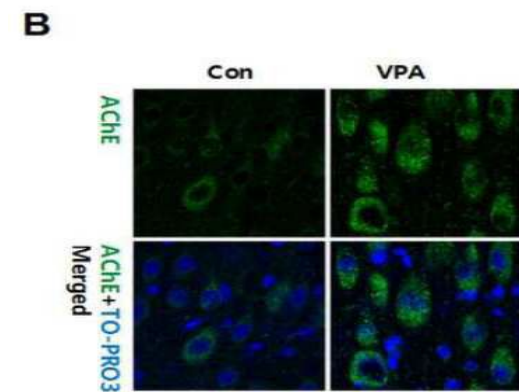
[0083] 본 발명에서 얻어진 데이터는 평균±표준 평균 오차(S.E.M.)로 표현되었으며 통계학적 유의미성은 일방향 다변수 분석(ANOVA)을 사용하여 분석하였으며 그 후 Newman-Keuls 시험을 사후 시험으로 수행하였다. 양방향 ANOVA는 발프로산 노출 또는 약물 치료의 효과 및 양 요소 간의 상호작용을 확인하기 위해 사용했다. 유의미한 효과가 어떤 요소 중 하나에서 발견된다면, 사후 비교가 Bonferroni의 사후 시험을 사용하여 수행되었다. p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의미하다고 할 수 있으며, 모든 통계학적 분석은 GraphPad Prism(버전 5) 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

도면

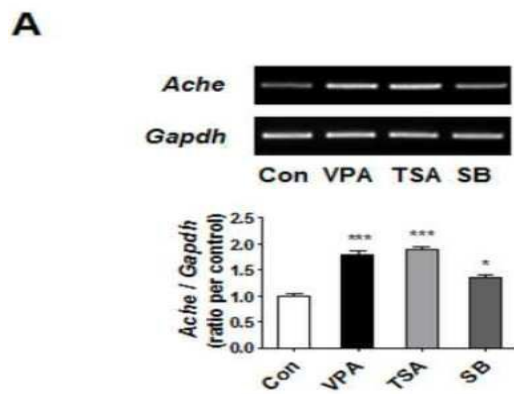
도면1a



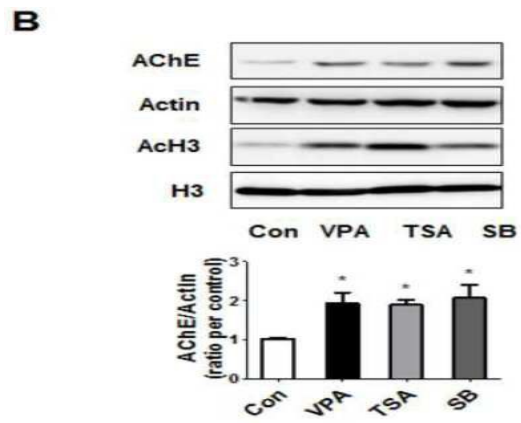
도면1b



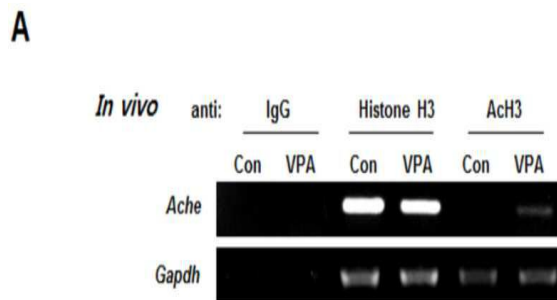
도면2a



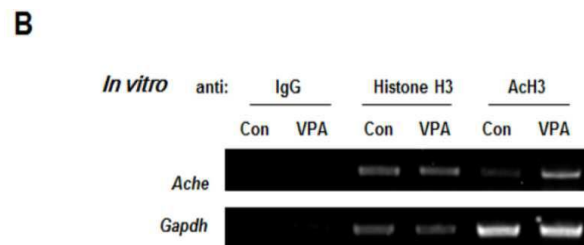
도면2b



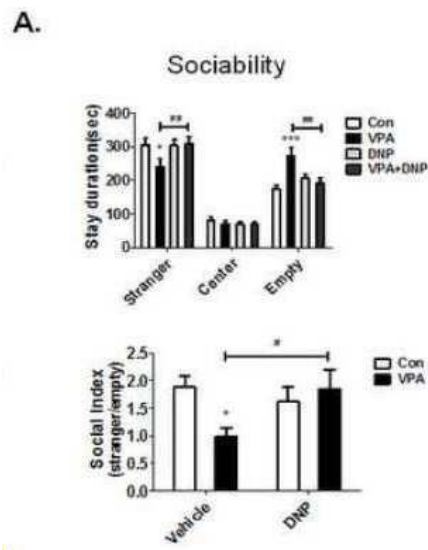
도면3a



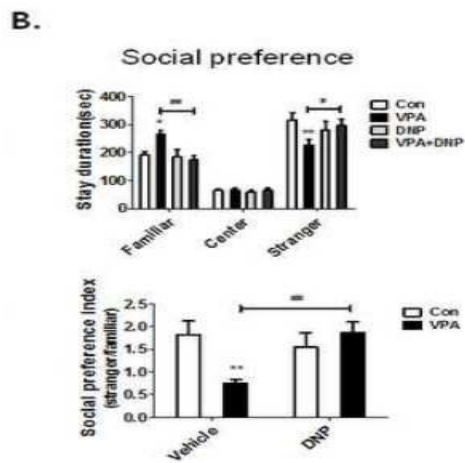
도면3b



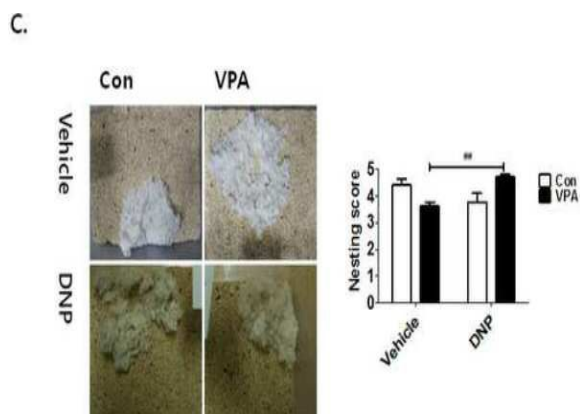
도면4a



도면4b

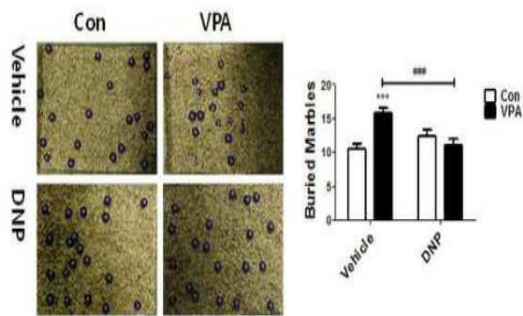


도면4c



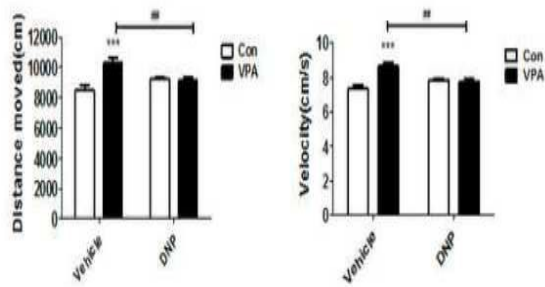
도면5a

A



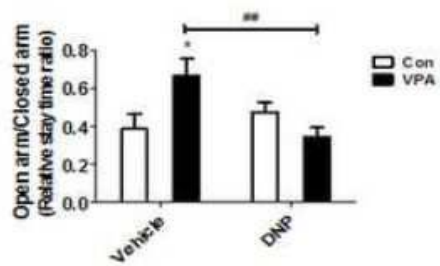
도면5b

B



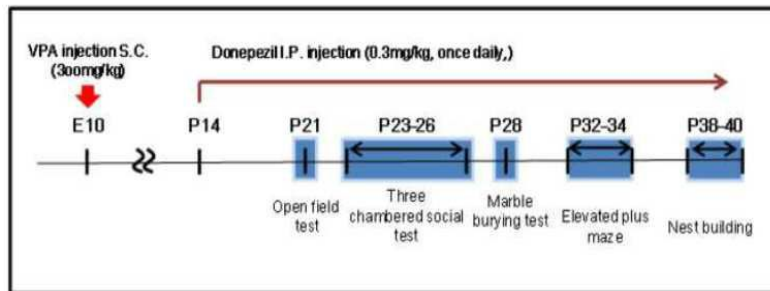
도면5c

C



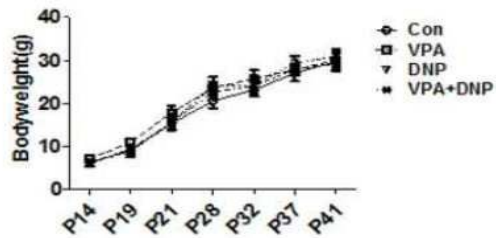
도면6a

A.

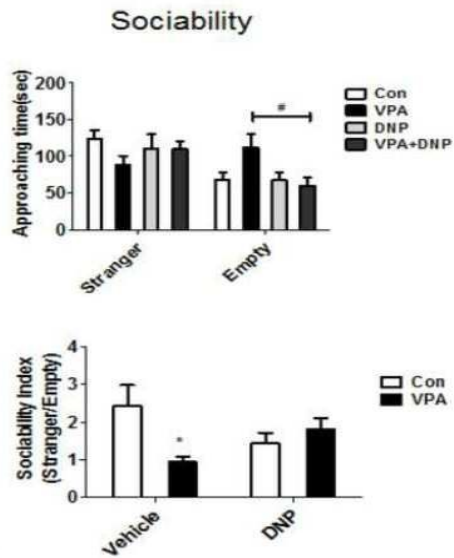


도면6b

B.



도면7a



도면7b

