



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년02월03일  
 (11) 등록번호 10-1357234  
 (24) 등록일자 2014년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C07D 405/12 (2006.01) C07D 241/36 (2006.01)  
 A61K 31/498 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0146860  
 (22) 출원일자 2011년12월30일  
 심사청구일자 2011년12월30일  
 (65) 공개번호 10-2013-0078095  
 (43) 공개일자 2013년07월10일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020110028932 A\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 한국화학연구원  
 대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)  
 (72) 발명자  
 안진희  
 대전 유성구 유성대로 1741, 109동 804호 (진민동, 세종아파트)  
 최상운  
 대전 유성구 어은로 57, 132동 104호 (어은동, 한빛아파트)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 양부현

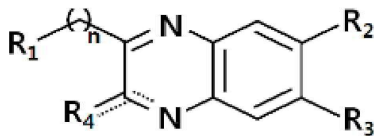
전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 나영민

(54) 발명의 명칭 **신규한 퀴녹살린 유도체 및 이를 이용한 신경전구세포 또는 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도용 조성물**

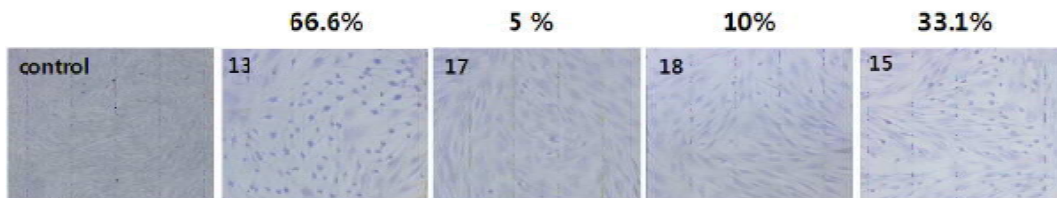
**(57) 요약**

본 발명은 다음 화학식으로 표시되는 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염에 관한 것이다:



본 발명에 따르면, 신규한 퀴녹살린 유도체 및 이를 포함하는 분화 유도용 조성물은 신경전구세포 또는 줄기세포를 신경세포로 분화시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 의하여 분화 유도된 신경전구세포는 특정세포(예컨대, 도파민 신경세포) 또는 올리고덴드로사이트등으로 고효율로 분화할 수 있고, 차후 난치성 신경계 질환(예컨대, 파킨슨 병이나 척수손상)과 같은 난치성 신경계질환 적용할 수 있으며 신약개발에 있어서 기초적인 자료를 제공한다.

**대표도** - 도1



(72) 발명자

**김광록**

대전 유성구 구즉로 16, 109동 906호 (송강동, 한  
마을아파트)

**강승규**

대전 서구 월평동로 45, 103동 1401호 (월평동, 진  
달래아파트)

**정희정**

대전 서구 청사로 254, 107동 1204호 (둔산동, 등  
지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1107-B5

부처명 산업기술연구회

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 MELK의 뇌종양 세포 증식 조절 연구 및 저분자 화합물 탐색(창의적연구)

기 여 율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

---

**특허청구의 범위**

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

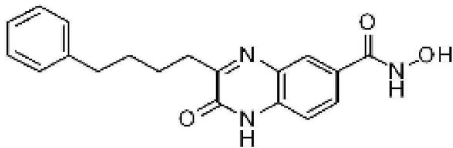
청구항 4

삭제

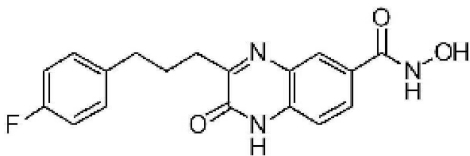
청구항 5

다음 화학식 13, 화학식 15, 화학식 16 또는 화학식 18로 표시되는 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염:

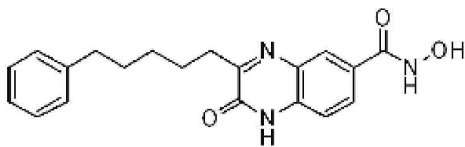
화학식 13



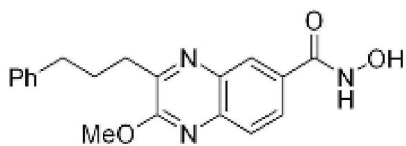
화학식 15



화학식 16



화학식 18

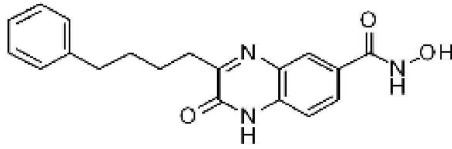


청구항 6

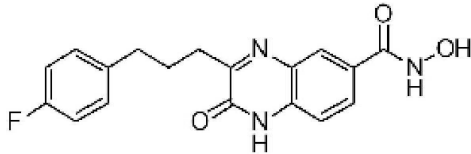
제 5 항에 있어서, 상기 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염은 다음 화학식 13, 화학식 15 및 화학식 18로 구성된 군

으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물:

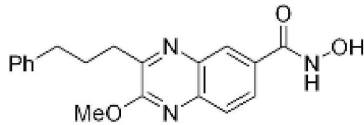
**화학식 13**



**화학식 15**



**화학식 18**



**청구항 7**

제 5 항 또는 제 6 항의 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 신경전구세포 또는 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도용 조성물.

**청구항 8**

제 7 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 배아생식세포, 배아중양세포, 성체줄기세포 및 유도만능줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 9**

제 7 항의 조성물을 신경전구세포 또는 줄기세포와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 신경전구세포 또는 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 퀴녹살린 유도체 및 이를 이용한 신경전구세포(neural precursor cell) 또는 줄기세포(stem cell)의 신경세포로의 분화유도용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 뇌졸중(stroke), 알츠하이머병, 파킨슨병, 탈수초질환(demyelinating disease), 척추 손상(spinal cord injury), 치매 등은 신경 세포 손상에 의해 신경기능에 이상이 생기는 질환이다. 상기 질환들로 인해 손상된 신경세포를 치료하는 방법은 약물요법 또는 외과적 수술이 일반적이지만, 이러한 치료는 정상적인 세포에도 손

상을 입혀 문제점으로 지적되고 있다.

- [0003] 이에 최근에는 질환에 의해 파괴되거나 손상된 세포를 외부로부터 공급해 주는 세포 치료제가 효과적인 것으로 제시되고 있다. 이러한 세포 치료제로는 줄기세포(stem cell)가 각광을 받고 있다.
- [0004] 줄기세포란 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하며, 특정 분화 자극(환경)에 의해 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 줄기세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 분화 자극이 가해지면 특정 세포로 분화되고 이러한 분화는 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다양한 세포로도 분화될 수 있는, 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다. 줄기세포는 세포학적 유래에 따라 배아줄기세포(embryonic stem cells), 체세포 복제 배아줄기세포(somatic cell nuclear transfer), 성체줄기세포(adult stem cells), 그리고 최근에 보고된 역분화줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)로 나눌 수 있다. 성체 줄기세포는 성체 내에 존재하는 각 기관, 예를 들면 골수, 뇌, 간, 췌장 등에서 유래하는 반면, 배아 줄기세포는 착상 전 수정란이나 발생 중인 태아 생식기 조직 등에서 유래한다. 이들은 인체를 구성하는 세포로 분화가 가능하여 난치병, 유전적 질병 등을 치료할 수 있는 도구로서 전 세계적으로 각광을 받고 있다.
- [0005] 뇌신경계 조직은 다른 조직과는 달리 면역거부반응이 거의 없기 때문에, 줄기세포를 이식하였을 때 이식된 세포의 장기간 생존을 기대할 수 있고, 따라서 신경세포 손상에 의해 유발되는 다양한 신경 질환(neuronal diseases)에 대한 세포 치료제로서도 많은 연구가 이루어지고 있다. 이에, 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 탈수초질환, 척추손상 등의 질환 치료에 줄기세포를 적용하려는 시도가 현재 진행 중이다(Isacon O, Deacon T, Trends. *Neurosci.*, 10:477-482(1997); Studer *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 1:290-295 (1998)). 그러나 세포 치료제로서의 줄기세포의 유용성을 높이기 위해서는 줄기세포를 효율적으로 특정세포로 분화시키는 기술이 필요하다. 이러한 목적으로 본 발명자들은 신규한 퀴녹살린 유도체 화합물을 합성하였으며, 본 발명의 화합물들을 신규한 줄기세포 분화 물질로 동정하였다.
- [0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**발명의 내용**

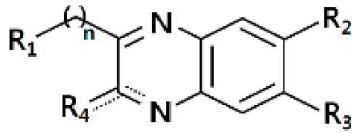
**해결하려는 과제**

- [0007] 본 발명자들은 신경전구세포(neural precursor cell) 또는 줄기세포(stem cell)의 신경세포로의 분화를 유도하는 물질을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 신경세포로의 분화를 유도하는 물질로 본 발명자들이 이미 규명한 퀴녹살린 유도체와 유사한 분자 골격을 가지는 물질을 합성하였고, 이 물질들이 줄기세포를 특정세포로 분화시키는 것을 밝혀 내었으며, 나아가 그 효율 또한 상당히 높은 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 신경전구세포(neural precursor cell) 또는 줄기세포(stem cell)의 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 신경전구세포 또는 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

**과제의 해결 수단**

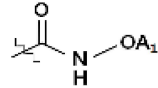
[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 화학식 1로 표시되는 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 제공한다:

[0014] 화학식 1



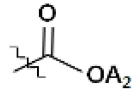
[0015]

[0016] 상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub>은 비치환되거나 C<sub>1-6</sub> 알콕시, C<sub>1-6</sub> 알킬 또는 할로로 치환된 C<sub>6-10</sub> 아릴; R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은



각각 독립적으로 수소,

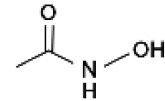
(A<sub>1</sub>은 수소 또는 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>4-5</sub> 헤



테로사이클로알킬) 또는

(A<sub>2</sub>는 수소 또는 C<sub>1-6</sub> 알킬)이며; R<sub>4</sub>는 인접한 고리탄소와 이중결합을 형

성하는 경우는 산소이고, 단일결합을 형성하는 경우는 C<sub>1-6</sub> 알콕시이고; n은 0-10의 정수이며; 는 단일



결합 또는 이중결합을 나타내며; R<sub>1</sub>이 비치환된 페닐기인 경우, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 각각 , H 및 산소가 아니다.

[0017] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 화학식 1로 표시된 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 신경전구세포(neural precursor cell) 또는 줄기세포(stem cell)의 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명자들은 신경전구세포(neural precursor cell) 또는 줄기세포(stem cell)의 신경세포로의 분화를 유도하는 물질을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 신경세포로의 분화를 유도하는 물질로 본 발명자들이 이미 규명한 퀴녹살린 유도체와 유사한 분자 골격을 가지는 물질을 합성하였고, 이 물질들이 줄기세포를 특정세포로 분화시키는 것을 밝혀 내었으며, 나아가 그 효율 또한 상당히 높은 것을 확인하였다.

[0019] 화학식 1로 표시되는 본 발명의 화합물은 줄기세포를 특정세포로 분화시키는 것으로 본 발명자들이 이미 규명한 퀴녹살린 유도체의 구조를 미미킹 하여 화학적으로 합성된다.

[0020] 본 명세서에서, 화학식 1의 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 정의하기 위하여 사용되는 용어 “할로”는 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도를 포함한다.

[0021] 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 비치환 또는 치환된 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 트리데실, 펜타데실 및 헵타데실 등을 포함한다. C<sub>1-6</sub> 알킬은 탄소수 1 내지 6의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C<sub>1-6</sub> 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다. 화학식 1에서, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub> 위치의 C<sub>1-6</sub> 알킬은 바람직하게는 C<sub>1-3</sub> 알킬이다.

[0022] 용어 “헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 헤테로사이클로알킬”은 탄소와 수소 그리고 최소 하나의 헤테로원자(산소, 황 또는 질소)를 포함하는 비-방향족성 사이클릭 탄화수소기를 의미한다. 상기 헤테로원자는 바람직하게는 산소 또는 황이고, 가장 바람직하게는 산소이다. 헤테로원자의 개수는 바람직하게는 1-4개, 보다 바람직하게는 1-3개, 보다 더 바람직하게는 1-2개, 가장 바람직하게는 1개이다. C<sub>4-5</sub> 헤테로사이

클로알킬은 링 구조를 형성하는 탄소의 개수가 4-5인 헤테로사이클로알킬을 의미한다.

[0023] 용어 “알콕시”는 -O알킬기를 의미하며, 예를들어, 에톡시, 메톡시 등을 포함하고, C<sub>1-6</sub> 알콕시가 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0024] 용어 “아릴”은 전체적으로 또는 부분적으로 불포화된 치환 또는 비치환된 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄소 고리를 의미한다. C<sub>6-10</sub> 아릴은 탄소수 6 내지 10의 탄소 고리 원자를 가지는 아릴기를 의미하며, C<sub>6-10</sub> 아릴이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다. 바람직하게는 아릴은 모노아릴 또는 비아릴이다. 모노아릴은 탄소수 5-6을 갖는 것이 바람직하며, 비아릴은 탄소수 9-10을 갖는 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는 상기 아릴은 치환 또는 비치환된 페닐이다. 모노아릴, 예컨대, 페닐이 치환되는 경우에는, 다양한 위치에서 다양한 치환체에 의해 치환이 이루어질 수 있으며, 예컨대, 할로, 히드록시, 니트로, 시아노, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 치환 또는 비치환된 직쇄 또는 가지쇄 알킬 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 직쇄 또는 가지쇄 알콕시에 의해 치환될 수 있다.

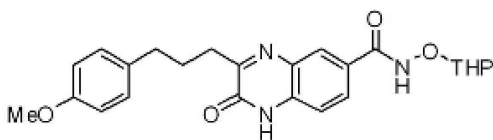
[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 화학식 1의 R<sub>1</sub>은 C<sub>1-3</sub> 알콕시 또는 플루오로이고, 보다 바람직하게는 메톡시 또는 플루오로이다.

[0026] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 화학식 1의 R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>에서 A<sub>1</sub>은 수소, 테트라하이드로퓨란 또는 테트라하이드로피란이고, A<sub>2</sub>는 수소 또는 C<sub>1-3</sub> 알킬이다. 보다 바람직하게는 A<sub>1</sub>은 수소 또는 테트라하이드로피란이고, A<sub>2</sub>는 수소 또는 메틸이다.

[0027] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 화학식 1의 R<sub>4</sub>는 인접한 고리탄소와 이중결합을 형성하는 경우는 산소이고, 단일결합을 형성하는 경우는 C<sub>1-3</sub> 알콕시이다. 보다 바람직하게는 R<sub>4</sub>는 인접한 고리탄소와 이중결합을 형성하는 경우는 산소이고, 단일결합을 형성하는 경우는 메톡시이다.

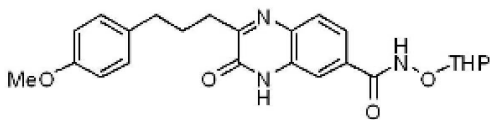
[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 퀴놀살린 유도체 또는 그의 염은 다음 화학식 2 내지 화학식 18로 구성된 군으로 표시된다:

[0029] **화학식 2**



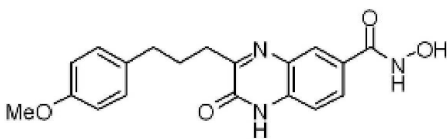
[0030]

[0031] **화학식 3**



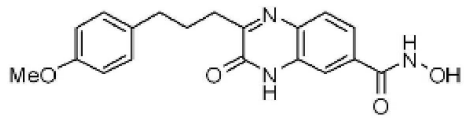
[0032]

[0033] **화학식 4**



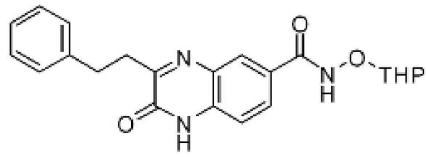
[0034]

[0035] **화학식 5**



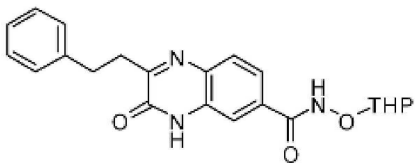
[0036]

[0037] 화학식 6



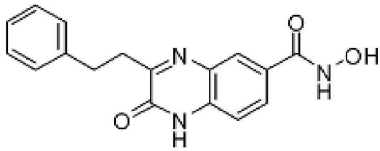
[0038]

[0039] 화학식 7



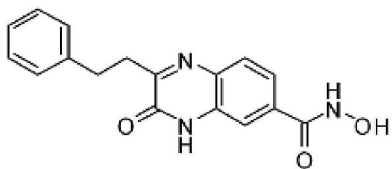
[0040]

[0041] 화학식 8



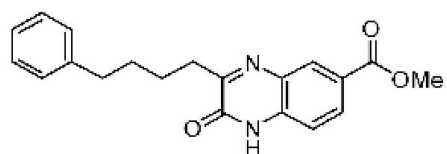
[0042]

[0043] 화학식 9



[0044]

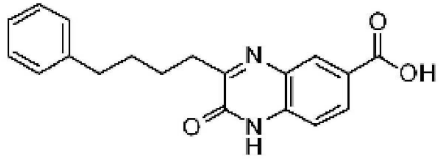
[0045] 화학식 10



[0046]

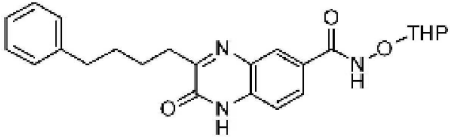
[0047] 화학식 11





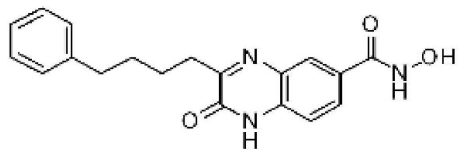
[0048]

[0049] 화학식 12



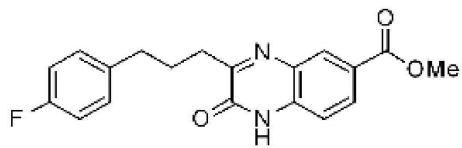
[0050]

[0051] 화학식 13



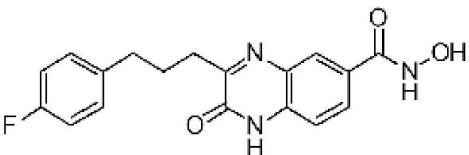
[0052]

[0053] 화학식 14



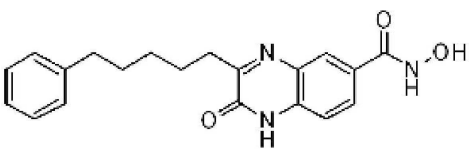
[0054]

[0055] 화학식 15



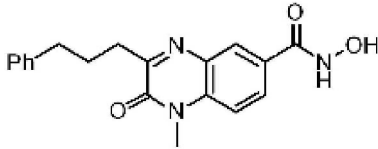
[0056]

[0057] 화학식 16



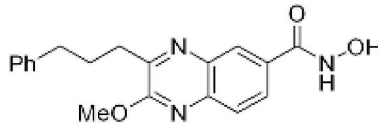
[0058]

[0059] 화학식 17



[0060]

[0061] 화학식 18



[0062]

[0063] 본 발명의 화합물들은 하나 또는 그 이상의 키랄 센터 및/또는 기하 이성질 센터를 가질 수 있으며, 이에 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 모든 입체이성질체, 즉, 광학이성질체, 부분입체이성질체 및 기하 이성질체를 포함한다.

[0064] 본 발명의 화학식 1의 퀴놀살린 유도체는 신경전구세포 또는 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 능력이 탁월하다. 따라서, 본 발명은 상기 화학식 1의 퀴놀살린 유도체 또는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는, 신경전구세포 또는 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0065] 본 발명에서 사용된 용어 "신경세포(neural cell)"는 중추신경계 또는 말초신경계의 뉴론(neuron) 및/또는 글리아, 예를 들면 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 및/또는 슈반세포(Schwann cell)를 의미한다.

[0066] 또한, 용어 "신경전구세포(neural precursor cell)"는 뉴우론, 성상세포 및 올리고덴드로사이트로 분화할 수 있는 신경세포의 분화 초기단계의 세포이다. 한편, 신경줄기세포는 증식을 계속하는 능력 즉 자기복제능력을 가지고 있으며, 중추신경계를 구성하는 신경세포, 성상세포(astrocyte), 퓌지세포(oligodendrocyte) 등의 세 가지 구성세포로 분화하는 다분화능력을 가진 미분화세포라 정의 할 수 있는데, 신경 줄기세포는 특정한 신경계 세포를 만들어내는 신경전구세포나 글리아전구세포의 단계를 거쳐서 신경세포/뉴론이나 글리아세포로 분화한다.

[0067] 본 명세서에서, 용어 "줄기세포의 신경세포로의 분화 유도"는 줄기세포에서 신경세포로 완전히 분화가 유도된 경우뿐만 아니라 줄기세포에서 신경세포로의 완전 분화되기 전 중간 단계에서 형성되는 배아유사구조체(embryonic body)의 형성도 포함하는 것이다. 즉, 본 발명의 줄기세포 분화 유도 조성물은 줄기세포가 특정세포로 완전 분화되는 것을 효과적으로 달성되도록 할 뿐만 아니라 줄기세포에서 배아유사구조체를 형성시키는 데에도 매우 큰 효율성을 나타낸다.

[0068] 본 발명이 적용되는 줄기세포는 제한이 없으며, 줄기세포의 특성, 즉 미분화, 무한정 증식 및 특정세포로의 분화능을 갖는 세포는 본 발명이 적용될 수 있는 세포이다. 본 발명이 적용되는 줄기세포는 크게 두 종류로 구별된다: 배아줄기세포(ES) 및 배아생식세포(EG)를 포함하는 전능성 줄기세포(pluripotent stem cell)와 다능성 줄기세포(multipotent stem cell). 배아줄기세포는 배반포의 내부세포괴(ICM)로부터 유래되고, 배아생식세포는 5-10 주령의 생식용기(gonadal ridge)의 원시생식세포로부터 유래된다. 한편, 다능성 줄기세포는 배아 조직, 태아조직 및 성체 조직에서 발견되며, 이는 성체줄기세포를 포함한다. 전능성 줄기세포는 인 비트로에서 무한정 증식되며, 3종류의 모든 배아층(외배엽, 중배엽과 내배엽)으로부터 유래되는 다양한 세포로 분화될 수 있는 능력을 갖는다.

[0069] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 성체줄기세포, 유도만능줄기세포, 배아생식세포 및 배아중양세포를 포함하며, 바람직하게는 배아줄기세포 및 유도만능줄기세포이다. 용어 '유도만능 줄기세포'는 비-전분화능 세포(예를 들면, 체세포)로부터 특정 유전자를 삽입하여 인공적으로 유래된 전분화능 줄기세포의 하나이다. 유도만능줄기세포는 줄기세포 유전자 및 단백질 발현, 염색체 메틸화, 배가시간(doubling time), 배아체 형성, 테라토마 형성, 생존성 키메라 형성, 교잡성 및 분화성을 가지는 면에서 전분화

능 줄기세포(예를 들면, 배아줄기세포)와 동일하다고 여겨진다.

- [0070] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 신경전구세포 또는 줄기세포와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 신경전구세포 또는 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [0071] 상기 배양 단계에서 이용하는 배지는 종래 기술에서 신경전구세포 또는 줄기세포 배양에 이용하는 보편적인 배지이다. 예를 들면, 상기 배지는 Eagle's MEM [Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. *Science* 130:142(1959)],  $\alpha$ -MEM[Stanner, C.P. et al., *NAT. New Biol.* 230:52(1971)], Iscove's MEM[Iscove, N. et al., *J. Exp. Med.* 147:923(1978)], 199 medium [Morgan et al., *Proc. Soc. Exp. Biomed.*, 73:1(1950)], CMRL 1066, RPMI 1640 [Moore et al., *J. Amer. Med. Assoc.* 199:519(1967)], F12[Ham, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 53:288(1965)], F10 [Ham, R.G. *Exp. Cell Res.* 29:515(1963)], DMEM [Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., *virology* 8:396(1959)], DMEM 및 F12의 믹스처 (mixture) [Barnes, D. et al., *Anal. Biochem.* 102:225(1980)], Waymouth's MB752/1[Waymouth, C. *J. Natl. Cancer Inst.* 22:1003(1959)], McCoy's 5A [McCoy, T. A., et al, *Pro. soc. Exp. Bio. Med.* 100:115(1959)], MCDB의 시리즈 [Ham, R.G et al., *In Vitro* 14:11(1978)], 및 이의 변형배지를 포함한다. 배지의 상세한 기술은 R. Ian Freshney, *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Inc., New York에서 알 수 있으며, 상기 기술은 본 명세서에 참조로 포함된다. 배양배지에는 피루브산 나트륨(sodium pyruvate), 글루타민(glutamine) 등이 추가로 첨가될 수 있다.
- [0072] 줄기세포가 여러 종류의 세포로 분화할 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. 예를 들면, 상기 신경전구세포 또는 줄기세포는 세포 분화를 위한 조건하에서 조혈 세포, 신경 세포, 베타 세포 (beta cell), 근육 세포, 간세포, 연골 세포, 상피 세포, 요로 세포 및 유사 세포로 분화하도록 유도된다. 줄기세포가 분화하기 위한 배지 조건 및 방법은 Palacios, et al., *PNAS. USA*, 92:7530-7537(1995), Pedersen, *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 6:543-552(1994), 및 Bain et al., *Dev. Biol*, 168:342-357(1995)에 개시되어 있다.
- [0073] 상기 신경전구세포 또는 줄기세포는 '분화 자극'에 의해 신경세포로 분화하게 되며, 이는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 무혈청 배지(Tropepe V et al., *Direct neural fate specification from embryonic stem cells: A primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. Neuron.* 30:6578(2001)), FGFs(fibroblast growth factors), Wnt 및 RA(retinoic acid)와 같은 모र्फोज엔(morphogens)의 처리(Ying QL et al. *Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. Nat Biotechnol.* 21:183186(2003))에 의해 분화할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분화자극 또는 세포 분화를 위한 조건하에서 상기 신경전구세포 또는 줄기세포는 조혈 세포, 신경 세포, 베타 세포 (beta cell), 근육 세포, 간세포, 연골 세포, 상피 세포, 요로 세포 및 유사 세포로 분화하도록 유도된다. 줄기세포가 분화하기 위한 배지 조건 및 방법은 Palacios, et al., *PNAS. USA*, 92:7530-7537(1995), Pedersen, *J. Reprod. Fertil. Dev.*, 6:543-552(1994), 및 Bain et al., *Dev. Biol*, 168:342-357(1995)에 개시되어 있다.
- [0074] 본 발명의 귀속살린 유도체 또는 그의 염은 그의 억제학적 유효량; 및 억제학적으로 허용되는 염을 포함하는 신경 손상 질환 예방 또는 치료용 억제학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0075] 본 발명에서 사용된 용어 "신경 손상 질환"은 운동 및 감각에 관여하는 신경이 손상되어 운동 및 감각을 포함하는 행동기능에 이상이 있는 질환을 의미하며, 이러한 질환은 뇌졸중(stroke), 알츠하이머병, 파킨슨병, 척추 손상 질환(spinal cord injury disease), 치매, 탈수초질환, 헌팅톤병 및 근위축성 척추측색경화증을 포함한다.
- [0076] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "치료"는 1) 아직 신경 손상 질환을 보유하고 있다고 진단되지 않았으나, 이러한 경향이 있는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서 질병 또는 장애가 발생하는 것의 예방, 2) 신경 손상 질환의 억제, 즉 발전의 억제, 및 3) 신경 손상 질환의 경감을 의미한다. 구체적으로, 상기 억제학적 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 신경세포 손상 질환의 치료가 필요한 대상(subject)의 손상부위에 투여할 경우, 주변 중추신경계 또는 말초신경계의 신경전구세포 또는 줄기세포를 신경세포로 분화시켜 손상된 신경 기능을 회복시키고 신경 손상 질환을 치료할 수 있다. 한편, 상기 투여 대상은 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 조성물이 억제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 억제학적 조성물은 억제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 억제학적 조성물에 포함되는 억제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로

이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 운환제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0078] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0079] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.001-1000 mg/kg이다. 그러나, 유효 성분의 실제 투여량은 분화 및 증식하고자 하는 신경세포의 양, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등 여러 관련 인자를 고려하여 결정할 수 있으며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 형태로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0080] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

**발명의 효과**

[0081] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0082] (i) 본 발명은 신규한 퀴녹살린 유도체 및 이를 포함하는 신경전구세포 또는 줄기세포로부터 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0083] (ii) 본 발명에 따른 퀴녹살린 유도체를 이용하여 신경전구세포 또는 줄기세포를 신경세포로 분화시킬 수 있다.

[0084] (iii) 또한, 본 발명에 의하여 분화 유도된 신경전구세포는 특정세포(예컨대, 도파민 신경세포) 또는 올리고덴드로사이트등으로 고효율로 분화할 수 있고, 차후 난치성 신경계 질환(예컨대, 파킨슨 병이나 척수손상)과 같은 난치성 신경계질환 적용할 수 있으며 신약개발에 있어서 기초적인 자료를 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

[0085] 도 1은 본 발명의 화합물을 이용한 간엽줄기세포의 신경분화 유도를 니슬염색(Nissle staining)법을 이용하여 관찰한 결과이다. 각각의 화합물은 10 μM을 사용하였으며 대조군은 DMSO를 사용하였다.

도 2는 도 1에 대한 유도체의 신경분화 정도를 수치화하여 나타낸 것이다. 화합물 13이 10 μM에서 간엽줄기세포에서 신경분화를 잘 유도하였으며 화합물 15 또한 우수한 신경분화를 유도하였다.

도 3은 본 발명의 화합물 유도체에 의한 간엽 줄기세포의 신경분화마커의 발현정도를 웨스턴블롯팅(western blotting)으로 확인한 결과이다.

도 4는 간엽줄기세포에서 분화된 신경세포의 전기생화학적 결과를 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

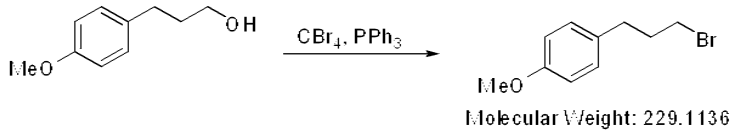
[0086] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0087] 합성예

[0088] 합성예 1: 화합물 2, 화합물 3, 화합물 4 및 화합물 5의 합성

[0089] <1-1> 1-(3-브로모프로필)-4-메톡시벤젠의 합성

[0090] 반응식 1

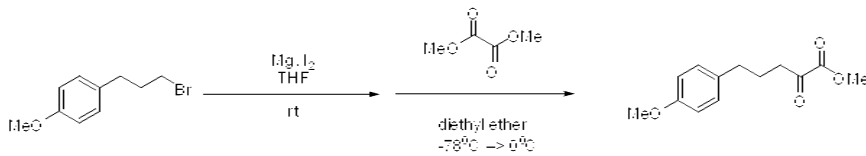


[0091]

[0092] 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM)(Junsei Chemical Co.) 15 ml에 3-(4-메톡시페닐)프로판-1-올 1 g (6 mmol, 1 eq)(Aldrich)을 넣어 녹이고 질소 치환한 후, CBr<sub>4</sub> 2 g (18 mmol, 3 eq)(Aldrich)을 넣는다. 상기 혼합물을 0℃에서 PPh<sub>3</sub> 4.8g (18 mmol, 3 eq)(Aldrich)을 첨가한다. 상온에서 1시간 교반한 후, 3-(4-메톡시페닐)프로판-1-올 이 모두 사라졌음을 확인한 후, NaHCO<sub>3</sub> 수용액을 첨가하여 유기층을 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 농축하여 컬럼크로마토그래피로 분리하였으며, 목적 화합물을 무색 오일 형태로 460 mg (수율 35%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (CdCl<sub>2</sub>, 300MHz) δ 7.11 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.80 (d, J=8.7 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.51 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.72(t, J=7.4Hz, 2H), 2.71-2.00 (m, 2H).

[0093] <1-2> 메틸 5-(4-메톡시페닐)-2-옥소펜타노에이트의 합성

[0094] 반응식 2



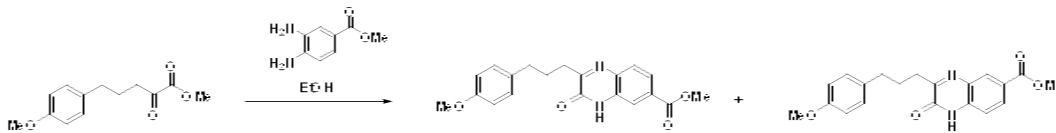
[0095]

[0096] 건조된 테트라하이드로퓨란(Tetrahydrofuran, THF)(Junsei Chemical Co.) 10 ml에 Mg 47 mg (1.96 mmol, 1.2 eq)(Aldrich)과 I<sub>2</sub> 10 mg(Aldrich)을 넣고 1-(3-브로모프로필)-4-메톡시벤젠 450 mg (1.96 mmol, 1.2 eq)을 첨가한 후, 상온에서 30분간 교반하여 그리니어드 시약을 제조하였다. 한편, 다른 플라스크에 디메틸옥살레이트 200 mg(1.63 mmol, 1 eq)(Aldrich)를 건조된 디에틸에테르(Junsei Chemical Co.) 5 ml에 녹인 후 -78℃로 냉각하였다. 상기 플라스크에 상기 그리니어드 시약을 천천히 첨가한 후, 온도를 상온으로 서서히 올려주었다. 0℃에서 3시간 교반 후 출발물질이 모두 사라졌음을 확인하고, 1 N HCl 용액 2 ml을 첨가하였다. 이 후, 유기층을 에테르로 3회 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 컬럼크로마토그래피로 분리하여, 목적화합물을 무색 오일 형태로 210 mg(수율 45%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (CdCl<sub>2</sub>, 300MHz) δ 7.08 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.82 (d, J=8.7 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 2.83 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.60(t, J=7.3Hz, 2H), 1.99-1.91 (m, 2H).

[0097] <1-3> 이성질체가 포함된 메틸 2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-3,4-디하이드로퀴놀릭살린-6-카르복실레이트의 합성

[0098] 반응식 3

[0099]



[0100]

에탄올(Junsei Chemical Co.) 7 ml에 메틸 3,4-디아미노벤조에이트 150 mg(0.89 mmol, 1 eq)(Aldrich)과 메틸 5-(4-메톡시페닐)-2-옥소펜타노에이트 210 mg(0.89 mmol, 1 eq)를 넣고 가열하여 완전히 녹인 후 상온에서 12시간 교반하였다. 반응하여 생긴 흰색 고체를 필터하여 목적화합물을 250 mg(수율 80%, 이성질체 포함) 수득하였다.

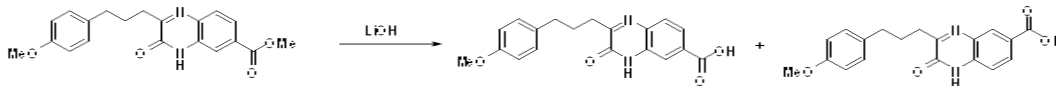
[0101]

<1-4> 이성질체가 포함된 2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산의 합성

[0102]

반응식 4

[0103]



[0104]

테트라하이드로피란 5 ml에 메틸 2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실레이트(이성질체 포함) 200 mg을 완전히 녹인 후, 물 5 ml에 완전히 용해시킨 LiOH·H<sub>2</sub>O (190 mg, 8 eq)(aldrich)을 첨가하였다. 이후 메탄올 5 ml을 넣어 모두 녹인후, 상기 혼합물을 50℃에서 12시간 교반한 후, 출발물질이 모두 사라졌음을 확인하였다. 반응이 완결된 후, 반응물을 농축하여 용매를 제거하고 물로 희석하였다. 1 N HCl 용액으로 pH를 3-4로 맞춰준 후, 유기층을 에틸아세테이트로 3회 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시켜 흰색 고상의 목적화합물을 190 mg(이성질체 포함, 수율 99%) 수득하였다.

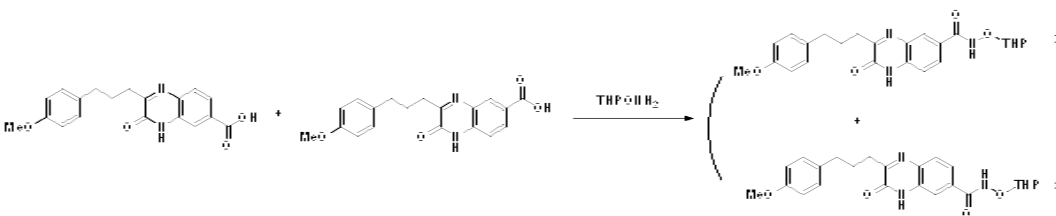
[0105]

<1-5> 3-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-2-옥소-N-((테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 2) 및 2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-N-((테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 3)의 합성

[0106]

반응식 5

[0107]



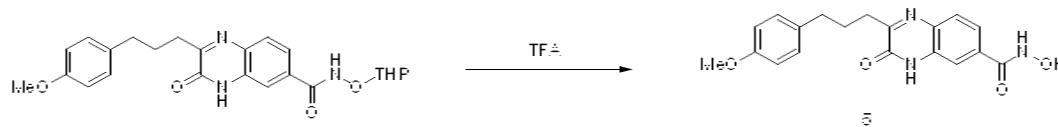
[0108]

이성질체가 포함된 2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산 200 mg(0.59 mmol, 1 eq)을 디메틸포름아마이드(Dimethylformamide, DMF)(Junsei Chemical Co.) 2 ml에 녹이고, NH<sub>2</sub>O-THP (Tetrahydropyran-2-yloxyamine) 138 mg (1.18 mmol, 2 eq)(aldrich), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDCI)(aldrich) 136 mg (0.71 mmol, 1.2 eq) 및 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole, HOBT)(aldrich) 80 mg (0.59 mmol, 1 eq)을 첨가하여 녹였다. 이후 상기 혼합물을 아이스배스(ice bath)에 올려 놓은 상태로 냉각시키고, 디이소프로필에틸아민(Diisopropylethylamine, DIPEA)(aldrich) 0.41 ml(2.36 mmol, 4 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 상온에서 3시간 교반한 후, 에틸아세테이트(Junsei Chemical Co.)로 희석하고 NH<sub>4</sub>Cl 수용액으로 세척하였다. 이후 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 농축하여 컬럼크로마토그래피로 분리하였다. 상기 유기층으로부터 이성질체인 3-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-2-옥소-N-((테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 2) 및 2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-N-((테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 3)를 분리하여 각

각 96 mg(흰색고체, 수율 38%) 및 20 mg(흰색고체, 수율 8%)의 목적화합물을 수득하였다: 1) 화합물 2:  $^1\text{H}$  NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz)  $\delta$  8.15 (d,  $J=1.7$  Hz, 1H), 7.86 (dd,  $J= 8.4, 1.7$  Hz, 1H), 7.26 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 7.06 (d,  $J=8.5$  H, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.17-4.10 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.65-3.61 (m, 1H), 2.84 (t,  $J= 7.5$  Hz, 2H), 2.64 (t,  $J= 7.5$  Hz, 2H), 2.09-1.99 (m, 2H) 1.93-1.61 (m, 6H). 2) 화합물 3:  $^1\text{H}$  NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz)  $\delta$  7.83 (d,  $J=8.3$  Hz, 1H), 7.74 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J= 8.3, 1.8$  Hz, 1H), 7.10 (d,  $J=8.6$  H, 2H), 6.79 (d,  $J=8.6$  H, 2H), 5.10 (s, 1H), 4.22-4.10 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.67-3.64 (m, 1H), 2.92 (t,  $J= 7.5$  Hz, 2H), 2.74 (t,  $J= 7.5$  Hz, 2H), 2.13-2.08 (m, 2H) 1.92-1.64 (m, 6H).

[0109] <1-6> N-하이드록시-2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 5)

[0110] 반응식 6

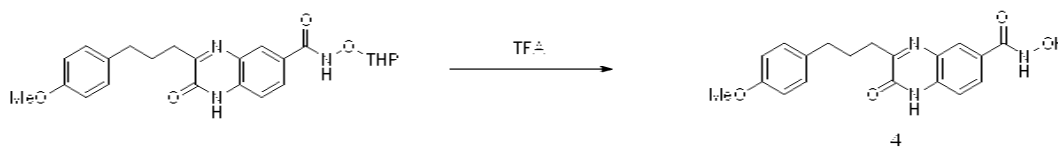


[0111]

[0112] 메탄올 5 ml과 디클로로메탄 5 ml에 2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드 96 mg(0.22 mmol, 1 eq)을 넣어 완전히 녹인 후, 상온에서 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid, TFA)(aldrich) 0.32 ml(4.4 mmol, 20 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 35°C에서 10시간 교반한 후 농축하여 고상의 화합물을 수득하고 이를 에틸아세테이트로 세척하여 목적화합물을 40 mg(흰색고체, 수율 51%) 수득하였다:  $^1\text{H}$  NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300MHz)  $\delta$  12.43 (brs, 1H), 11.25 (brs, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.86 (d,  $J= 8.6$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J=8.2$  Hz, 2H), 6.81 (d, 8.2 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 2.76 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.61 (t, 7.5 Hz, 2H), 1.94-1.9 (m, 2H).

[0113] <1-7> N-하이드록시-3-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 4)

[0114] 반응식 7



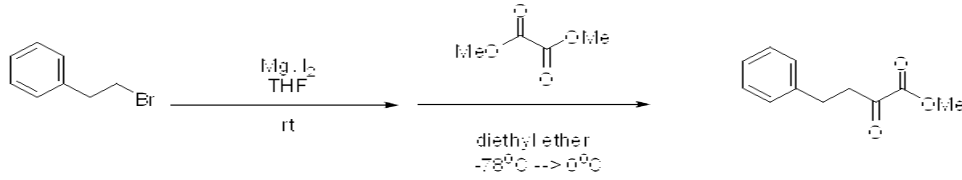
[0115]

[0116] 화합물 4는 “N-하이드록시-2-(3-(4-메톡시페닐)프로필)-3-옥소-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 5)” 에 기재된 방법에 따라 합성되었다:  $^1\text{H}$  NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz)  $\delta$  7.82 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H), 7.69 (d,  $J=1.7$  Hz, 1H), 7.63 (dd,  $J= 8.5, 1.7$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J=8.5$  H, 2H), 6.78 (d,  $J=8.5$  H, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.92 (t,  $J= 7.5$  Hz, 2H), 2.79 (t,  $J= 7.5$  Hz, 2H), 2.13-2.06 (m, 2H).

[0117] 합성예 2: 화합물 6, 화합물 7, 화합물 8 및 화합물 9의 합성

[0118] <2-1> 메틸 2-옥소-4-페닐부타노에이트의 합성

[0119] 반응식 8

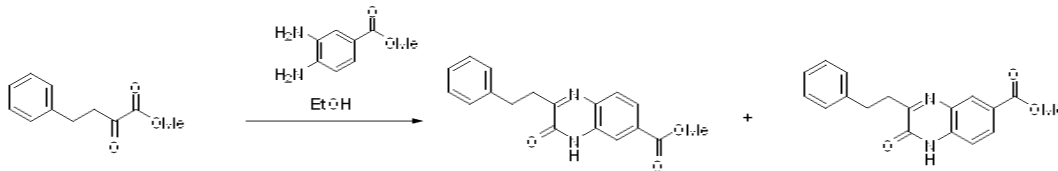


[0120]

[0121] 건조된 테트라하이드로퓨란 10 ml, Mg 350 mg(1.2 eq) 및 I<sub>2</sub> 50 mg의 혼합물에 (2-브로모에틸)벤젠(aldrich) 2.13 ml(1.2 eq)을 첨가한 후, 상온에서 30분 간 교반하여 그리니아드 시약을 제조하였다. 한편, 다른 플라스크에 디메틸 옥살레이트 1.7 g(1 eq)를 디에틸에테르 10 ml에 첨가하여 녹인 후 -78°C로 온도를 낮추었다. 상기 플라스크에 상기 그리니아드 시약을 천천히 첨가한 후, 온도를 상온으로 서서히 올려주었다. 이후 상기 혼합물을 0 °C에서 3시간 교반하여 출발물질이 모두 사라 졌음을 확인하고, 1 N HCl 용액 5 ml을 첨가하였다. 유기층을 에테르로 3회 추출하였다. 상기 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 컬럼크로마토그래피로 분리하였으며, 최종적으로 목적화합물을 무색 오일 형태로 760 mg(수율 30%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (CdCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 7.32-7.18 (m, 5H), 3.85 (s, 3H), 3.19 (t, J=7.4 Hz, 2H), 2.91 (t, J=7.4Hz, 2H).

[0122] <2-2> 이성질체가 포함된 메틸 3-옥소-2-페넬-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실레이트의 합성

[0123] 반응식 9

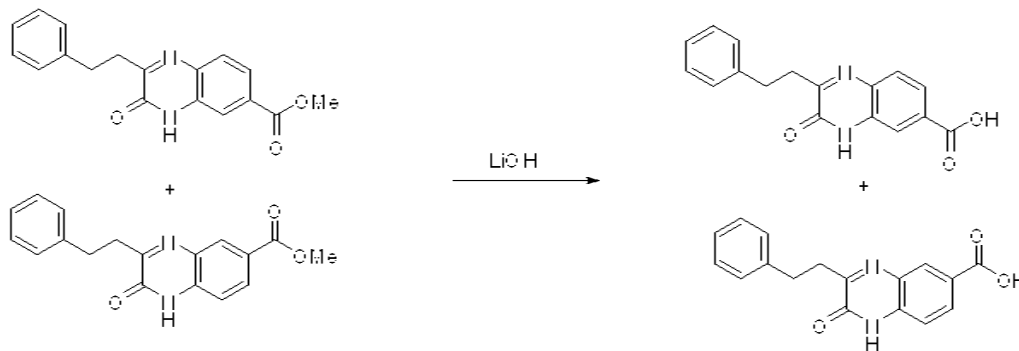


[0124]

[0125] 에탄올 30 ml에 메틸 3,4-디아미노벤조에이트 657 mg(3.95 mmol, 1 eq)과 메틸 2-옥소-4-페닐부타노에이트 760 mg(3.95 mmol, 1 eq)을 첨가하고 가열하여 완전히 녹인 후 상온에서 12시간 교반하였다. 상기 반응물을 필터 하여 목적화합물을 1100 mg(수율 90%, 이성질체 포함) 수득하였다.

[0126] <2-3> 이성질체가 포함된 3-옥소-2-페넬-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산의 합성

[0127] 반응식 10



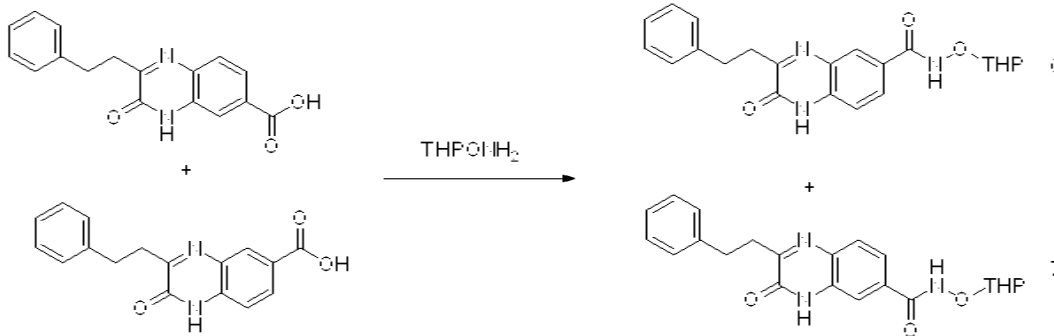
[0128]

[0129] 테트라하이드로퓨란 5 ml에 메틸 3-옥소-2-페넬-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실레이트(이성질체 포함) 175 mg(0.57 mmol, 1 eq)을 첨가하여 완전히 녹인 후, 물 5 ml에 완전히 용해시킨 LiOH.H<sub>2</sub>O (190 mg, 8 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물에 메탄올 5 ml을 첨가하고 50 °C에서 12시간 교반하여 출발물질이 모두 사라짐을 확인하였다. 반응이 완결된 후, 상기 반응물을 농축하여 용매를 제거하고 물로 희석하였다. 희석한 용액에 1 N HCl 용액을 첨가하여 pH를 3-4로 맞춘 후, 유기층을 에틸아세테이트로 3회 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시켜 흰색 고상의 목적화합물을 160 mg(이성질체 포함, 수율 95%) 수득하였다.



[0130] <2-4> 3-옥소-2-페네틸-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 7) 및 2-옥소-3-페네틸-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 6)의 합성

[0131] 반응식 11

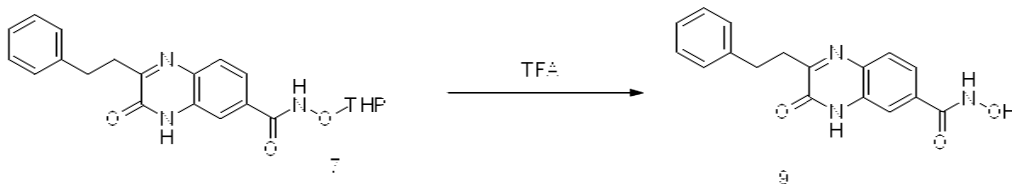


[0132]

[0133] 이성질체가 포함된 3-옥소-2-페네틸-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산 173 mg(0.59 mmol, 1 eq)를 디메틸포름아마이드 2 ml에 녹이고, NH<sub>2</sub>OTHP 138 mg(1.18 mmol, 2 eq), EDCI 136 mg(0.71 mmol, 1.2 eq) 및 HOBt 80 mg(0.59 mmol, 1 eq)을 첨가하여 녹인 후, 아이스배스로 옮겨 냉각시켰다. 상기 냉각된 혼합물에 디이소프로필에틸아민 0.41 ml(2.36 mmol, 4 eq)을 첨가하여 상온에서 3시간 교반한 후, 에틸아세이트로 희석하였다. 상기 희석용액을 NH<sub>4</sub>Cl 수용액으로 세척하고, 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 농축하여 컬럼 크로마토그래피로 분리하였다. 상기 유기층으로부터 이성질체인 3-옥소-2-페네틸-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 7) 및 2-옥소-3-페네틸-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 6)를 분리하여 각각 63 mg (흰색고체, 수율 27%) 및 20 mg(흰색고체, 수율 8%)의 화합물을 수득하였다: 1) 화합물 7: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.10 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.80 (dd, J= 8.5, 1.8 Hz, 1H), 7.24 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.17-7.15 (m, 4H), 7.07-7.02 (m, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.09-4.01 (m, 1H), 3.57 -3.52 (m, 1H), 3.12-2.97 (m, 4H), 1.84-1.53 (m, 6H). 2) 화합물 6: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 7.74 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.61 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.56 (dd, J= 8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.18-7.14 (m, 4H), 7.08-7.05 (m, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.09-4.00 (m, 1H), 3.57-3.45 (m, 1H), 3.14-2.97 (m, 4H) 1.81-1.46 (m, 6H).

[0134] <2-5> N-하이드록시-3-옥소-2-페네틸-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 9)의 합성

[0135] 반응식 12

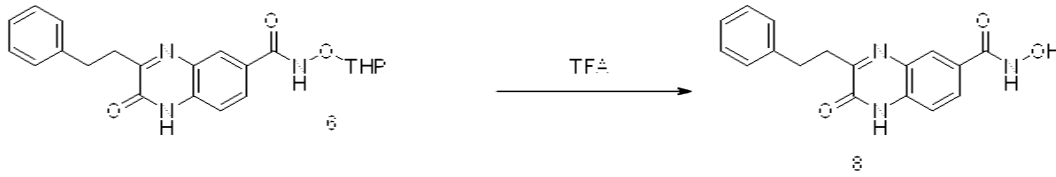


[0136]

[0137] 메탄올 4 ml과 디클로로메탄 4 ml에 3-옥소-2-페네틸-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드 63 g(0.16mmol, 1 eq)을 첨가하여 완전히 녹인 후, 상온에서 테트라하이드로푸란 0.24 ml(3.2 mmol, 20 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 35℃에서 10시간 교반한 후, 농축하여 고상의 화합물을 수득하고 이를 에틸아세이트로 세척하여 목적화합물을 25 mg(흰색고체, 수율 51%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300MHz) δ 12.42 (brs, 1H), 11.29 (brs, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.87 (dd, J= 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26-7.28 (m, 4H), 7.15 - 7.17 (m, 1H), 3.04 - 3.06 (m, 4H).

[0138] <2-6> N-하이드록시-2-옥소-3-페네틸-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(화합물 8)의 합성

[0139] 반응식 13



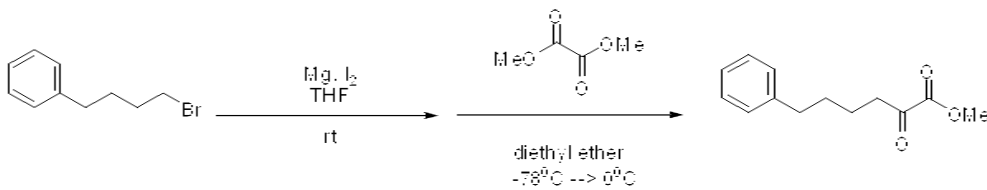
[0140]

[0141] 화합물 8은 의 합성은 “N-하이드록시-3-옥소-2-페네틸-3,4-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 9)” 에 기재된 방법에 따라 합성되었다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 7.84 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.28-7.26 (m, 4H), 7.19-7.16 (m, 1H), 3.24-3.09 (m, 4H).

[0142] 합성예 3: 화합물 10, 화합물 11, 화합물 12 및 화합물 13의 합성

[0143] <3-1> 메틸 2-옥소-6-페닐헥사노에이트의 합성

[0144] 반응식 14

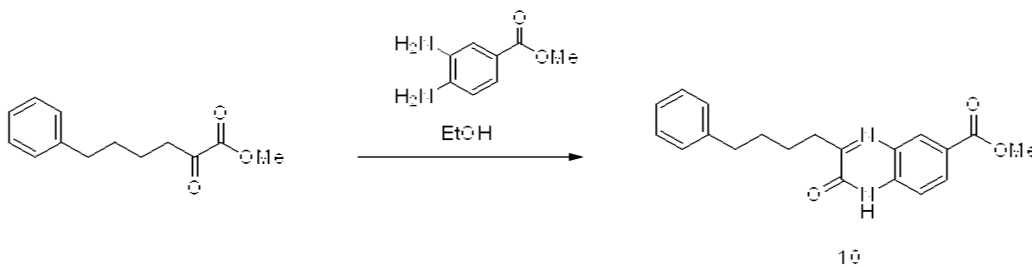


[0145]

[0146] 건조된 테트라하이드로퓨란 10 ml, Mg 350 mg(1.2 eq) 및 I<sub>2</sub> 50 mg의 혼합물에 (4-브로모부틸)벤젠 1.27 ml(1.2 eq)을 첨가한 후, 상온에서 30분간 교반하여 그리니어드 시약을 제조하였다. 한편, 다른 플라스크에 디메틸옥살레이트 1.7 g(1 eq)에 건조된 디에틸에테르 10 ml을 첨가하여 녹인 후 -78°C로 냉각시켰다. 상기 냉각된 혼합물에 상기 그리니어드 시약을 천천히 첨가한 후, 온도를 상온으로 서서히 올려주었다. 이후 0 °C에서 3시간 교반하여 출발 물질이 모두 사라 졌음을 확인하고, 1 N HCl 용액 5 ml을 첨가하였다. 유기층을 에테르로 3회 추출하였으며, 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 컬럼크로마토그래피로 분리하여 목적화합물을 무색 오일 형태로 1140 mg(수율 35%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (cdc13, 300MHz) δ 7.30-7.15 (m, 5H), 3.85 (s, 3H), 2.89-2.84 (m, 2H), 2.66-2.61 (m, 2H), 1.69-1.6 (m, 4H).

[0147] <3-2> 메틸 2-옥소-3-(4-페닐부틸)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실레이트의 합성(화합물 10)

[0148] 반응식 15



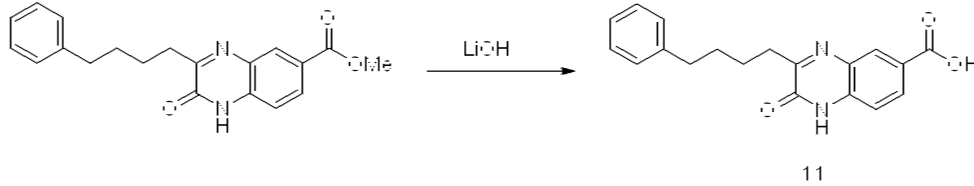
[0149]

[0150] 에탄올 30 ml에 메틸 3,4-디아미노벤조에이트 754 mg(4.54 mmol, 1 eq)과 메틸 2-옥소-6-페닐헥사노에이트 1000 mg(4.54 mmol, 1 eq)을 넣고 열선충으로 가열하여 완전히 녹인 후 상온에서 12시간 교반하였다. 반응하여 생긴 흰색 고체를 필터링하여 목적물을 760 mg(수율 50%, 이성질체 분리) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (dms0-d<sub>6</sub>, 300MHz) δ 12.58 (s, 1H), 8.20 (d, J=1.8 Hz, 1H), 8.01 (dd, J=8.5, 1.8 Hz, 1H), 7.34 (d, J=8.5 Hz,

1H), 7.29-7.13 (m, 5H), 3.87 (s, 3H), 2.83 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.63 (t, J=7.3 Hz, 2H), 1.76-1.64(m, 4H).

[0151] <3-3> 2-옥소-3-(4-페닐부틸)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복실산의 합성(화합물 11)

[0152] 반응식 16

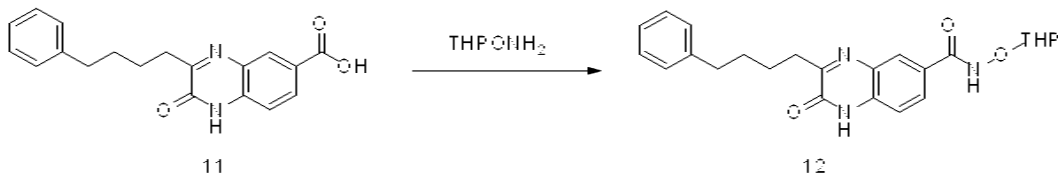


[0153]

[0154] 테트라하이드로퓨란 5 ml에 메틸 2-옥소-3-(4-페닐부틸)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복실레이트(이성질체 포함) 190 mg(0.57 mmol, 1 eq)를 넣어 완전히 녹인 후, 물 5 ml에 완전히 용해시킨 LiOH·H<sub>2</sub>O(190 mg, 8 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물에 메탄올 5 ml을 첨가하여 클리어페이스(clear phase)를 맞춰준 후, 50 °C에서 12시간 교반하여 출발 물질이 모두 사라짐을 확인하였다. 상기 반응이 완결된 후, 반응물을 농축하여 용매를 제거하고 물로 희석하였다. 상기 희석용액에 1 N HCl 용액을 첨가하여 pH를 3-4로 맞춰준 후 유기층을 에틸아세테이트로 3회 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시켜 흰색고상의 목적화합물을 150 mg(수율 80 %) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (dmsO-d<sub>6</sub>, 300MHz) δ 12.55 (s, 1H), 8.17 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.98 (d, J=8.5, 1.8 Hz, 1H), 7.25 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.16-7.12 (m, 5H), 2.80 (t, J=7.2 Hz, 2H), 2.61 (t, J=7.2 Hz, 2H), 1.65-1.67 (m, 4H).

[0155] <3-4> 2-옥소-3-(4-페닐부틸)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 12)

[0156] 반응식 17

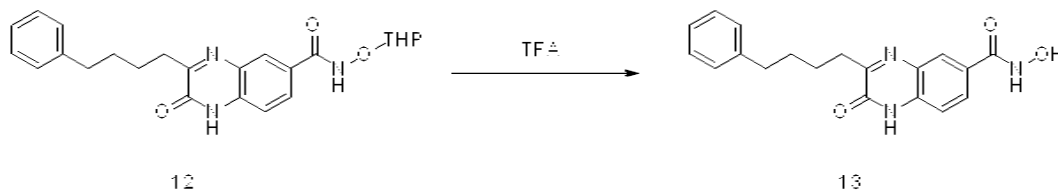


[0157]

[0158] 2-옥소-3-(4-페닐부틸)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복실산 40 mg(0.12 mmol, 1 eq)을 디메틸포름아마이드 1 ml에 녹이고, NH<sub>2</sub>THP 28 mg(0.24 mmol, 2 eq), EDCI 28 mg (0.14 mmol, 1.2 eq) 및 HOBt 17 mg (0.12 mmol, 1 eq)을 첨가하여 녹였다. 이후, 상기 혼합물을 아이스베스로 옮겨 온도를 낮추고, 디소프로필에틸아민 0.085 ml(0.48 mmol, 4 eq)을 첨가한 후, 상온에서 3시간 교반하였다. 상기 혼합물을 에틸아세테이트로 희석하고 NH<sub>4</sub>Cl 수용액으로 세척하였다. 이후 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 컬럼크로마토그래피로 분리하여 목적화합물을 30 mg(흰색고체, 수율 60%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.09 (d, J=1.7 Hz, 1H), 7.80 (dd, J= 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.23 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.15-7.02 (m, 5H), 4.98 (s, 1H), 4.07-4.03 (m, 1H), 3.55-3.52 (m, 1H), 2.82 (t J=7.4 Hz, 2H), 2.57 (t J=7.4 Hz, 2H), 1.83-1.49 (m, 10H).

[0159] <3-5> N-하이드록시-2-옥소-3-(4-페닐부틸)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 13)

[0160] 반응식 18



[0161]

[0162] 메탄올 4 mL과 디클로로메탄 4 mL에 2-옥소-3-(4-페닐부틸)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드 30 mg(0.07 mmol, 1 eq)을 첨가하여 완전히 녹이고, 상온에서 트리플루오로아세트산 0.11 mL(1.42 mmol, 20 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 35°C에서 10시간 교반한 후, 농축하여 고상의 화합물을 수득하고 이를 에틸아세테이트로 세척하여 목적화합물을 10 mg(흰색고체, 수율 42%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 300MHz) δ 12.43 (brs, 1H), 11.28 (brs, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.15 (d, J= 1.7 Hz, 1H), 7.87 (dd, J= 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.30 (d, J= 8.5, Hz, 1H), 7.29-7.16 (m, 5H), 2.82 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 2.64 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 1.73-1.67 (m, 4H).

[0163] 합성예 4: 화합물 14 및 화합물 15의 합성

[0164] <4-1> 3-(4-플루오로페닐)프로판-1-올의 합성

[0165] 반응식 19

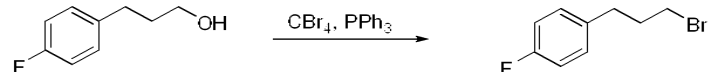


[0166]

[0167] 건조된 테트라하이드로푸란 20 mL에 리튬알루미늄하이드라이드(Lithium aluminium hydride, LAH)(aldrich) 720 mg(18 mmol, 3 eq)를 넣고, 아이스배스에 옮긴 후, 4-플루오로신남산 1 g (6 mmol, 1 eq)(aldrich)을 건조된 테트라하이드로푸란 20 mL에 녹여서 적가하고 4시간 동안 환류(reflux) 시켰다. 출발 물질이 모두 사라졌을 때, 메탄올 10 mL을 첨가하여 반응을 종결시키고 농축하였다. 1 N HCl로 중성화한 후, 에틸아세테이트로 3회 세척하였고, 농축한 후 컬럼 분리 하여 목적화합물을 470 mg (수율 50%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (CdCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 7.17-6.79 (m, 4H), 3.69 (t, J=7.4 Hz, 2H), 2.70 (t, J=7.4 Hz, 2H), 1.89-1.80 (m, 2H).

[0168] <4-2> 1-(3-브로모프로필)-4-플루오로벤젠의 합성

[0169] 반응식 20



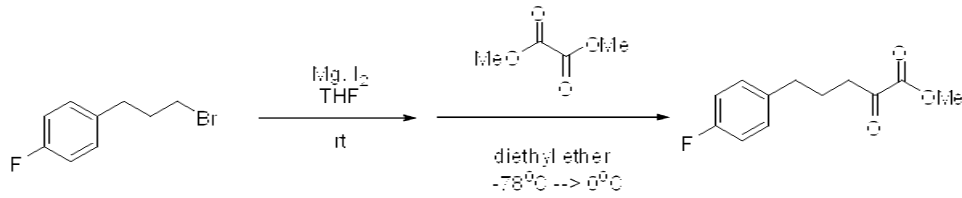
[0170]

[0171] 디클로로메탄 10 mL에 3-(4-플루오로페닐)프로판-1-올 470 mg (3.05 mmol, 1 eq)을 넣어 녹이고 질소 치환한 후, CBr<sub>4</sub> 3 g (9.15 mmol, 3 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 아이스배스에 올려 놓은 뒤, PPh<sub>3</sub> 2.4 g (9.15 mmol, 3 eq)을 첨가하고, 상온에서 1시간 교반하여 출발 물질이 모두 사라짐을 확인하였다. 이후, NaHCO<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 유기층을 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 농축하여 컬럼크로마토그래피로 분리하였고, 목적화합물을 무색 오일 형태로 540 mg (수율 81%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (CdCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ 7.17-7.00 (m, 4H), 3.41-3.37 (m, 2H), 2.78-2.75 (m, 2H), 2.75-2.20 (m, 2H).

[0172] <4-3> 메틸 5-(4-플루오로페닐)-2-옥소펜타노에이트의 합성

[0173] 반응식 21

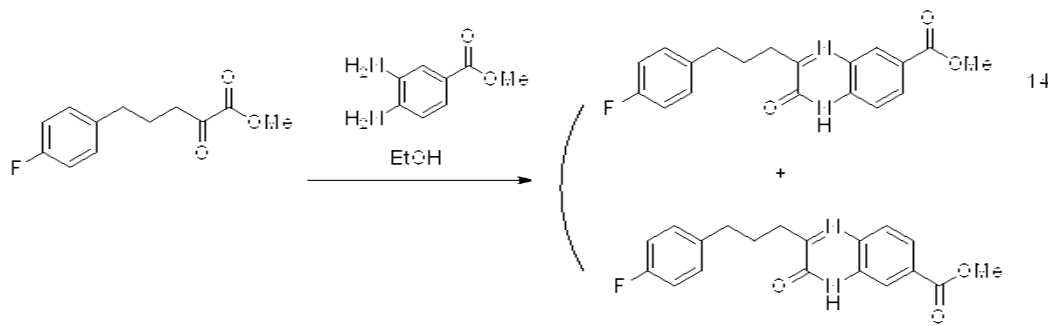
[0174]



[0175] 건조된 테트라하이드로퓨란 5 ml, Mg 60 mg (2.48 mmol, 1.2 eq) 및 I<sub>2</sub> 10 mg의 혼합물에 1-(3-브로모프로필)-4-플루오로벤젠 540 mg (2.48 mmol, 1.2 eq)을 첨가한 후 상온에서 30분간 교반하여 그리니아드 시약을 제조하였다. 한편, 다른 플라스크에 디메틸옥살레이트 244 mg (2.06 mmol, 1 eq)를 건조된 디에틸에테르 5 ml에 첨가하여 녹인 후 -78°C로 냉각시켰다. 상기 냉각된 혼합물에 상기 그리니아드 시약을 천천히 첨가한 후, 온도를 상온으로 서서히 올렸다. 이후 0 °C에서 3시간 교반하여 출발 물질이 모두 사라 졌음을 확인하고, 1 N HCl 용액 2 ml을 첨가하였다. 이후 유기층을 에테르로 3회 추출하였으며, 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 컬럼크로마토그래피로 분리하여 목적화합물을 무색 오일 형태로 40 mg (수율 7%)수득하였다.

[0176] <4-4> 메틸 3-(3-(4-플루오로페닐)프로필)-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-6-카르복실레이트의 합성(화합물 14)

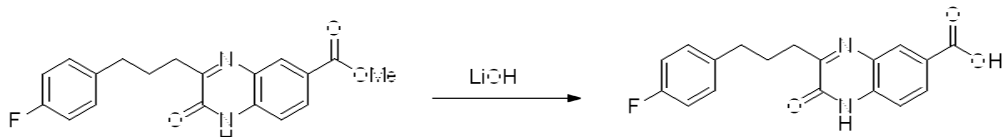
[0177] 반응식 22



[0178] 에탄올 2 ml에 메틸 3,4-디아미노벤조에이트 30 mg (0.18 mmol, 1 eq)과 메틸 5-(4-플루오로페닐)-2-옥소펜타노에이트 40 mg (0.18 mmol, 1 eq)를 넣고 열선총으로 가열하여 완전히 녹인 후, 상온에서 12시간 교반하였다. 반응 생성물인 흰색 고체를 필터링하여 목적화합물을 7 mg (수율 12%)을 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.37 (d, J=1.7 Hz, 1H), 8.07 (dd, J= 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.31 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.24-7.20 (m, 2H), 6.98-6.92 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 2.89 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.74 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.17-2.05 (m, 2H).

[0180] <4-5> 3-(3-(4-플루오로페닐)프로필)-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-6-카르복실산의 합성

[0181] 반응식 23

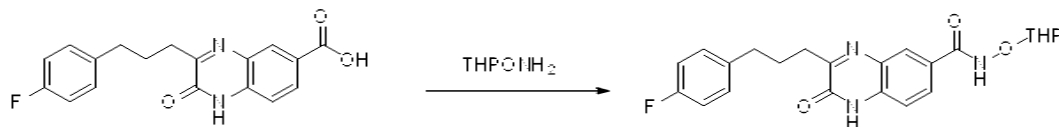


[0182] 테트라하이드로퓨란 0.5 ml에 메틸 3-(3-(4-플루오로페닐)프로필)-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-6-카르복실레이트 7 mg을 완전히 녹인 후, LiOH·H<sub>2</sub>O (6 mg, 8 eq)을 물 0.5 ml에 완전히 녹여 첨가하였다. 이후 메탄올 0.5 ml을 넣어서 클리어페이즈(clear phase)를 맞춰준 후, 상기 혼합물을 50 °C에서 12시간동안 교반하고, 출발 물질이 모두 사라짐을 확인하였다. 반응이 완결된 후, 상기 반응물을 농축하여 용매를 제거하고 물로 희석하였다. 1 N HCl 용액으로 pH를 3-4사이로 맞춰준 후 에틸아세테이트로 유기층을 3회 추출하였다. 상기 유기

층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시켜 흰색 고상의 목적화합물을 6 mg (수율 90%)수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.28 (d, J=1.7 Hz, 1H), 8.00 (dd, J= 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.20 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.14-7.10 (m, 2H), 6.88-6.82 (m, 2H), 2.78 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.64 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.03-1.98 (m, 2H).

[0184] <4-6> 3-(3-(4-플루오로페닐)프로필)-2-옥소-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성

[0185] 반응식 24

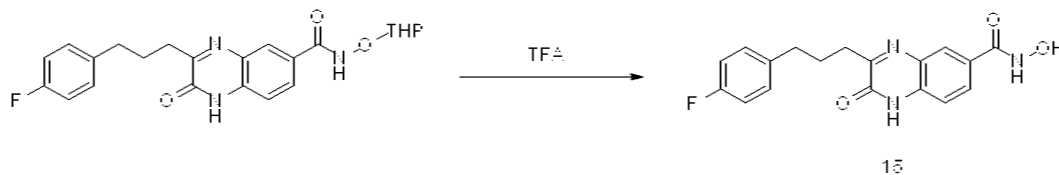


[0186]

[0187] 3-(3-(4-플루오로페닐)프로필)-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산 6 mg (0.022 mmol, 1 eq)를 디메틸포름아마이드 2 ml에 녹이고, NH<sub>2</sub>OTHF 5 mg (0.043 mmol, 2 eq), EDCI 5 mg (0.026 mmol, 1.2 eq), HOBT 3 mg (0.022 mmol, 1 eq)을 첨가하여 녹였다. 상기 혼합물을 아이스베스로 옮겨 냉각시키고, 디이소프로필에틸아민 0.014 ml (0.086 mmol, 4 eq)을 첨가하였다. 이후 상온에서 3시간동안 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하였고, NH<sub>4</sub>Cl 수용액으로 세척하였다. 이후 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 농축하고 컬럼크로마토그래피로 분리하였으며, 목적화합물을 7 mg (수율 77%)수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.19(d, J=1.8 Hz, 1H), 7.91 (dd, J= 8.6, 1.8 Hz, 1H), 7.31 (d, J=8.6 Hz, 1H), 7.24-7.19 (m, 2H), 6.98-6.92 (m, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.21-4.10 (m, 1H), 3.71-3.62 (m, 1H), 2.89 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.73 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.15-2.05 (m, 2H) 1.91-1.58 (m, 6H).

[0188] <4-7> 3-(3-(4-플루오로페닐)프로필)-N-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 15)

[0189] 반응식 25



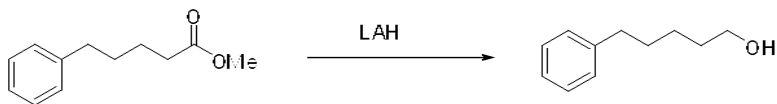
[0190]

[0191] 메탄올 0.5 ml과 디클로로메탄 0.5 ml에 3-(3-(4-플루오로페닐)프로필)-2-옥소-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드 7 mg (0.016 mmol, 1 eq)을 완전히 녹인 후, 상온에서 트리플루오로아세트산 0.024 ml (0.33 mmol, 20 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 35℃에서 10시간 동안 교반한 후, 농축하여 생긴 고체를 에틸아세테이트로 세척하여 목적화합물을 4 mg (흰색고체, 수율 71%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.18 (s, 1H), 7.91 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.34 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.26-7.21 (m, 2H), 7.00-6.94 (m, 2H), 2.92 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 2.76 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 2.15-2.10 (m, 2H).

[0192] 합성예 5: 화합물 16의 합성

[0193] <5-1> 5-페닐펜탄-1-올의 합성

[0194] 반응식 26

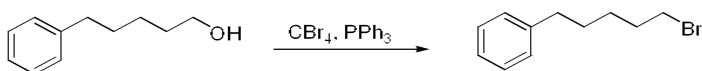


[0195]

[0196] 건조된 테트라하이드로퓨란 10 ml에 리튬알루미늄하이드라이드 197 mg (0.0052 mol, 2 eq)를 넣고 아이스배스로 옮긴 후, 메틸5-페닐펜타노에이트 500 mg (0.0026 mol, 1 eq)을 건조된 테트라하이드로퓨란 10 ml에 녹여서 첨가하였다. 이후 4시간동안 환류시켰다. 출발물질이 모두 사라졌을 때, 메탄올 10 ml을 첨가하여 반응을 종결시키고 농축하였다. 상기 농축된 반응물에 1 N HCl을 첨가하여 중성화한 후, 에틸아세이트로 3회 세척하였다. 이후 유기층을 농축하고 컬럼크로마토그래피로 분리하여 목적화합물을 330 mg (수율 78%) 수득하였다:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CdCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$  7.30-7.25 (m, 2H), 7.19-7.14 (m, 3H), 3.63 (t, J=6.7 Hz, 2H), 2.62 (t, J=7.5 Hz, 2H), 1.68-1.55 (m, 4H), 1.45-1.37 (m, 2H).

[0197] <5-2> (5-브로모펜틸)벤젠의 합성

[0198] 반응식 27

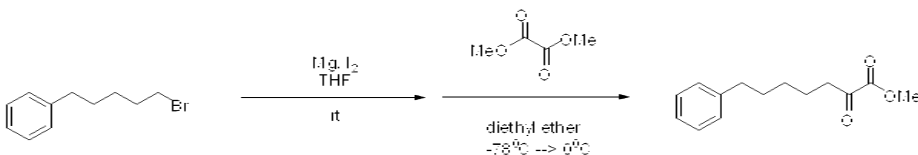


[0199]

[0200] 디클로로메탄 10 ml에 5-페닐펜탄-1-올 330 mg (2 mmol, 1eq)을 넣어 녹이고 질소 치환한 후, CBr<sub>4</sub> 2 g (6 mmol, 3 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 아이스배트로 옮긴 후, PPh<sub>3</sub> 1.6 g (2 mmol, 3 eq)을 첨가하고, 상온에서 1시간동안 교반하여 SM이 모두 사라짐을 확인하였다. 이후, NaHCO<sub>3</sub> 수용액을 가하여 유기층을 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 농축하여 컬럼크로마토그래피로 분리하였으며, 목적화합물을 무색 오일 형태로 450 mg(정량적) 수득하였다:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CdCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$  7.30-7.25 (m, 2H), 7.20-7.16 (m, 3H), 3.40 (t, J=6.6 Hz, 2H), 2.62 (t, J=7.5 Hz, 2H), 1.91-1.80 (m, 2H), 1.67-1.60 (m, 2H), 1.52-1.45 (m, 2H).

[0201] <5-3> 메틸 2-옥소-7-페닐헵타노에이트의 합성

[0202] 반응식 28

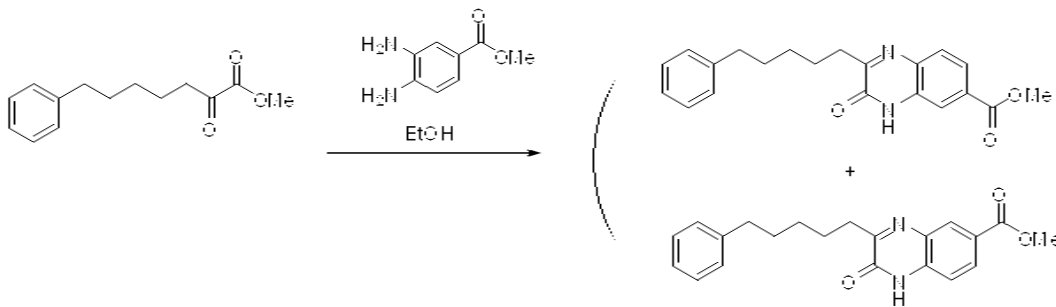


[0203]

[0204] 건조된 테트라하이드로퓨란 5 ml, Mg 47 mg (1.98 mmol, 1.2eq) 및 I<sub>2</sub> 5 mg의 혼합물에 (5-브로모펜틸)벤젠 450 mg (1.98 mmol, 1.2eq)을 첨가한 후, 상온에서 30분간 교반하여 그리니어드 시약을 제조하였다. 한편, 다른 플라스크에 디메틸옥살레이트 200 mg (1.65 mmol, 1eq)를 건조된 디에틸에테르 5 ml에 첨가하여 녹인 후 -78°C로 온도를 낮추었다. 상기 냉각된 혼합물에 상기 그리니어드 시약을 천천히 첨가한 후, 온도를 상온으로 서서히 올려주었다. 이후 0 °C에서 3시간 교반하여 출발 물질이 모두 사라졌음을 확인하고, 1 N HCl 용액 3 ml를 첨가하였으며, 유기층을 에테르로 3회 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 컬럼크로마토그래피로 분리하여, 목적화합물을 무색 오일 형태로 70 mg (수율 7%) 수득하였다:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CdCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$  7.30-7.24 (m, 2H), 7.20-7.14 (m, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.83 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.64-2.58 (m, 2H), 1.69-1.58 (m, 4H), 1.42-1.34 (m, 2H).

[0205] <5-4> 메틸 2-옥소-3-(5-페닐헵틸)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실레이트의 합성

[0206] 반응식 29

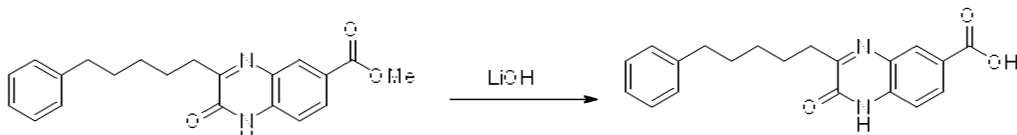


[0207]

[0208] 에탄올 3 ml에 메틸 3,4-디아미노벤조에이트 33 mg (0.2 mmol, 1 eq)과 메틸 2-옥소-7-페닐헵타노에이트 70 mg (0.2 mmol, 1 eq)를 넣고 가열하여 완전히 녹인 후 상온에서 12시간동안 교반하였다. 반응하여 생긴 흰색 고체를 필터링하여 목적화합물을 20 mg (수율 28%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.26 (d, J=1.7 Hz, 1H), 7.98 (dd, J= 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.22 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.13-6.97 (m, 5H), 3.84 (s, 3H), 2.77 (t, J= 7.7 Hz, 2H), 2.52 (t, J=7.7 Hz, 2H), 1.75-1.64 (m, 2H), 1.62-1.53 (m, 1.40-1.30 (m, 2H).

[0209] <5-5> 2-옥소-3-(5-페닐헵틸)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산의 합성

[0210] 반응식 30

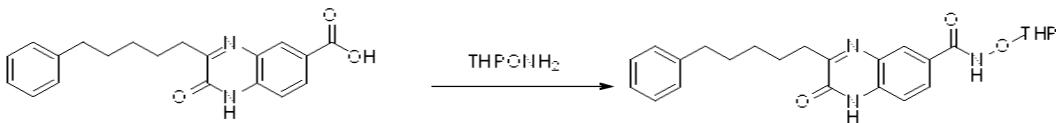


[0211]

[0212] 테트라하이드로퓨란 1 ml에 메틸 2-옥소-3-(5-페닐헵틸)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실레이트 20 mg을 완전히 녹인 후, LiOH.H<sub>2</sub>O (18 mg, 8 eq)를 물 1 ml에 완전히 녹여 첨가하였다. 이후 메탄올 1 ml을 넣어 클리어페이스(clear phase)를 맞춰주었다. 상기 혼합물을 50 °C에서 12시간동안 교반한 후, 출발 물질이 모두 사라짐을 확인하였다. 반응이 완결된 후, 상기 반응물을 농축하여 용매를 제거하고 물로 희석하였다. 이후 1 N HCl 용액으로 pH를 3-4사이로 맞춰준 후, 유기층을 에틸아세테이트로 3회 추출하였다. 상기 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시켜 흰색 고상의 목적화합물을 13 mg (수율 80%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.30 (d, J=1.7 Hz, 1H), 7.99 (dd, J= 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.21 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.13-6.97 (m, 5H), 2.77 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.52 (t, J=7.5 Hz, 2H), 1.77-1.68 (m, 2H), 1.64-1.54 (m, 2H), 1.40-1.33 (m, 2H).

[0213] <5-6> 2-옥소-3-(5-페닐헵틸)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성

[0214] 반응식 31



[0215]

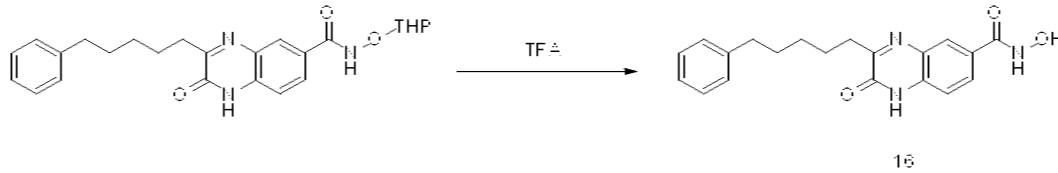
[0216] 2-옥소-3-(5-페닐헵틸)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산 13 mg (0.038 mmol, 1 eq)을 디메틸포름아미드 2 ml에 녹이고, NH<sub>2</sub>OTHP 9 mg (0.077 mmol, 2 eq), EDCI 8 mg (0.045 mmol, 1.2 eq) 및 HOBt 5 mg (0.038 mmol, 1 eq)을 첨가하여 녹였다. 이후 아이스배스로 옮겨 냉각시키고, 디이소프로필에틸아민 0.026 ml (0.152 mmol, 4 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 상온에서 3시간동안 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고 NH<sub>4</sub>Cl 수용액



으로 세척하였다. 이후 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 농축하였고, 이를 컬럼크로마토그래피로 분리하여 목적 화합물을 10 mg (수율 62%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.09(d, J=1.8 Hz, 1H), 7.80 (dd, J=8.5, 1.8 Hz, 1H), 7.23 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.13-6.99 (m, 5H), 4.98 (m, 1H), 4.12-4.10 (m, 1H), 3.57-3.52 (m, 1H), 2.75 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 2.52 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 1.18-1.16 (m, 2H) 1.61-1.13 (m, 10H).

[0217] <5-7> N-하이드록시-2-옥소-3-(5-페닐펜틸)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 16)

[0218] 반응식 32



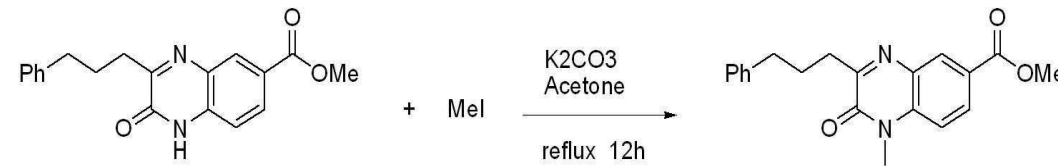
[0219]

[0220] 메탄올 1 ml과 디클로로메탄 1 ml에 2-옥소-3-(5-페닐펜틸)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복사마이드 10 mg (0.023 mmol, 1 eq)을 완전히 녹이고, 상온에서 테트라하이드로퓨란 0.034 ml (0.046 mmol, 20 eq)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 35°C에서 10시간동안 교반한 후, 농축하여 생긴 고체를 에틸아세테이트로 세척하여 목적화합물을 4 mg (흰색고체, 수율 50%) 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>, 300MHz) δ 8.15 (s, 1H), 7.87 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.32 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 7.23-7.09 (m, 5H), 2.87 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 2.62 (t, J= 7.4 Hz, 2H), 1.84-1.79 (m, 2H), 1.71-1.64 (m, 2H), 1.45-1.42 (m, 2H).

[0221] 합성예 6: 화합물 17 및 화합물 18의 합성

[0222] <6-1> 메틸 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복실레이트의 합성

[0223] 반응식 33

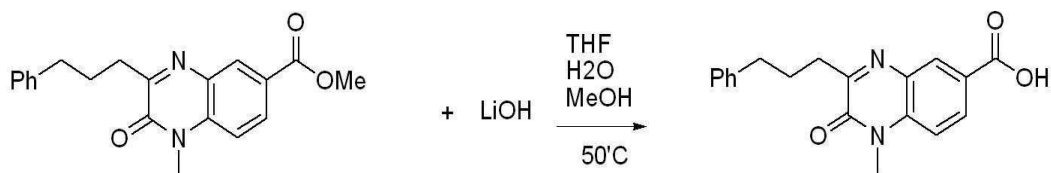


[0224]

[0225] 메틸 2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복실레이트(100 mg, 0.31 mmol)을 아세톤(10 ml)(Junsei Chemical Co.)에 녹인 다음, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (52 mg, 0.372 mmol)(Junsei Chemical Co.) 및 MeI(과량, excess)(aldrich)을 첨가한 후, 12시간 동안 환류 교반하여 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 에틸아세테이트/NaCl로 유기층을 추출하였다. 상기 유기층을 MgSO<sub>4</sub>로 건조시키고 농축하여 컬럼크로마토그래피(에틸아세테이트:헥세인=1:3)를 이용하여 메틸 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복실레이트(90 mg, 0.267 mmol, 수율 86%)를 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 8.51(d, J=2.1Hz, 1H), 8.17(dd, J=8.7Hz, 2.1Hz, 1H), 7.32(d, J=8.7Hz, 1H), 7.29~7.14(m, 5H), 3.96(s, 3H), 3.70(s, 3H), 3.03~2.98(m, 2H), 2.81~2.75(m, 2H), 2.21~2.11(m, 2H).

[0226] <6-2> 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀옥살린-6-카르복실산의 합성

[0227] 반응식 34



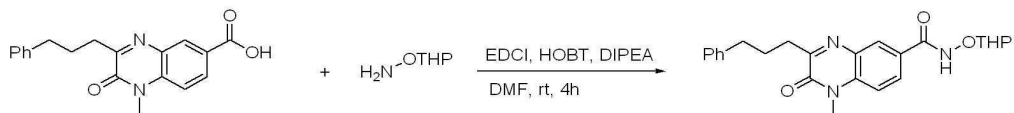
[0228]

[0229] 메틸 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실레이트(390 mg, 1.16 mmol)을 테트라하이드로퓨란(10 ml)과 메탄올(10 ml)에 녹인 후, 물(10 ml)에 LiOH (244 mg, 5.8 mmol)를 녹인 용액을 적가한 후 50°C에서 4시간 동안 교반하였다. 상기 반응 종료 후, 2 M HCl 수용액을 첨가하여 pH 2로 조정하였다.

이후 에틸아세테이트로 유기층을 추출하고 상기 유기층을 MgSO4로 건조시킨 후, 농축하여 메틸 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산(150 mg, 0.46 mmol, 수율 40%, 흰색고체)를 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 13.06(br, OH), 8.21(d, J=1.7Hz, 1H), 8.06(dd, J=8.8Hz, 1.7Hz, 1H), 7.59(d, J=8.8Hz, 1H), 7.28~7.12(m, 5H), 3.60(s, 3H), 2.84~2.79(m, 2H), 2.70~2.65(m, 2H), 2.06~1.96(m, 2H).

[0230] <6-3> 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성

[0231] 반응식 35

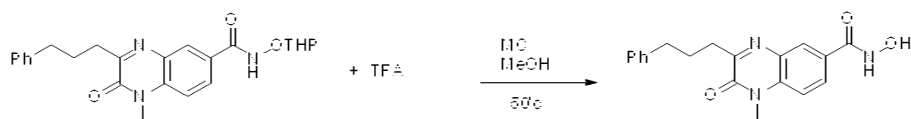


[0232]

[0233] 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실산(150 mg, 0.47 mmol)을 디클로로메탄(1 ml)에 녹인 다음, EDCI (109 mg, 0.57 mmol), 1-HOBT (64 mg, 0.47 mmol), NH<sub>2</sub>OHP (110 mg, 0.94 mmol) 및 디이소프로필에틸아민(243 mg, 1.88 mmol)을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반하였다. 반응이 완료된 후, 에틸아세테이트/NH<sub>4</sub>Cl로 유기층을 추출하였다. 상기 유기층을 MgSO4로 건조시킨 후, 농축하고 컬럼크로마토그래피(에틸아세테이트:헥세인=4:1)를 이용하여 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(100 mg, 0.237 mmol, 수율 50%)를 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 11.78(br, NH), 8.20(m, 1H), 7.97~7.94(m, 1H), 7.61~7.58(m, 1H), 7.29~7.13(m, 5H), 5.01(s, 1H), 4.09~4.01(m, 1H), 3.60(s, 3H), 3.54~3.50(m, 1H), 2.85~2.80(m, 2H), 2.71~2.66(m, 2H), 2.06~1.97(m, 2H), 1.71~1.54(m, 6H).

[0234] <6-4> N-하이드록시-1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 17)

[0235] 반응식 36



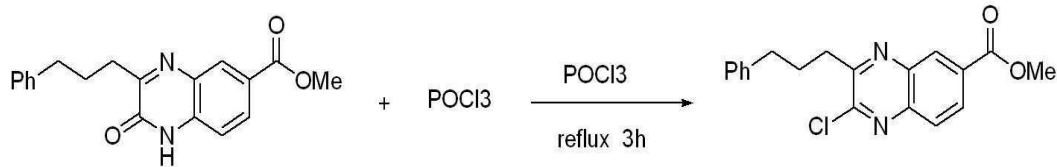
[0236]

[0237] 1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(100 mg, 0.237 mmol)를 메틸렌클로라이드(Methylene chloride, MC)(Junsei Chemical Co) 2 ml과 메탄올 2 ml에 녹인 다음, 트리플루오로아세트산(540 mg, 4.74 mmol)을 첨가하여 50°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 상

기 반응물을 농축하고, 에테르와 헥세인(Junsei Chemical Co) 하에서 고체의 화합물을 얻은 다음, 이를 필터하여 N-하이드록시-1-메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복사마이드(22 mg)를 수득하였다:  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  11.35(br, OH), 9.08(br, NH), 8.15(m, 1H), 7.96~7.94(m, 1H), 7.58~7.56(m, 1H), 7.23~7.14(m, 5H), 3.59(s, 3H), 2.82(s, 2H), 2.68(s, 2H), 2.01(s, 2H).

[0238] <6-5> 메틸 2-클로로-3-(3-페닐프로필)퀴놀살린-6-카르복실레이트의 합성

[0239] 반응식 37

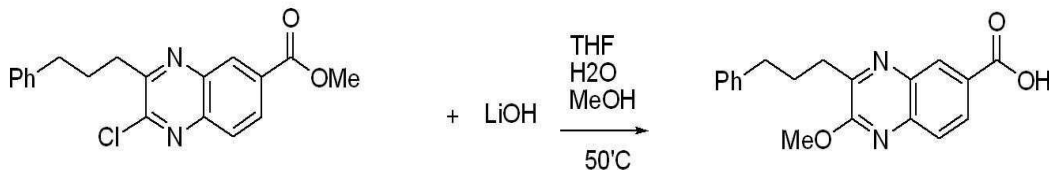


[0240]

[0241] 메틸-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디하이드로퀴놀살린-6-카르복실레이트(400 mg, 1.24 mmol)를 POCl<sub>3</sub> (5 ml)(aldrich)에 녹인 후, 3시간 동안 가열환류 교반하였다. 상기 반응이 완료된 후, NaHCO<sub>3</sub> (30 ml)가 첨가된 얼음물에 상기 반응용액을 넣어 고상의 물질을 생성하였다. 상기 고상의 물질을 관 크로마토그래피(에틸아세테이트:헥세인=1:3)를 이용하여 메틸 2-클로로-3-(3-페닐프로필)퀴놀살린-6-카르복실레이트(340 mg, 0.99 mmol, 수율 80%)를 수득하였다:  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  8.76(d, J=1.7Hz, 1H), 8.32(dd, J=8.7Hz, 1.7Hz, 1H), 8.01(d, J=8.7Hz, 1H), 7.32~7.19(m, 5H), 4.01(s, 3H), 3.21~2.16(m, 2H), 2.84~2.79(m, 2H), 2.30~2.22(m, 2H).

[0242] <6-6> 2-메톡시-3-(3-페닐프로필)퀴놀살린-6-카르복실산의 합성

[0243] 반응식 38



[0244]

[0245] 메틸 2-클로로-3-(3-페닐프로필)퀴놀살린-6-카르복실레이트(330 mg, 0.97 mmol)을 테트라하이드로퓨란(10 ml)과 메탄올(10 ml)에 녹인 후, 물(10 ml)에 LiOH (204 mg, 4.85 mmol)를 녹인 용액을 적가한 후 50°C에서 4시간 동안 교반하였다.

[0246] 반응 종료 후, 2 M HCl 수용액을 첨가하여 pH 2로 조정하였다. 에틸아세테이트를 이용하여 상기 반응물에서 유기층을 추출하였다. 상기 유기층을 MgSO<sub>4</sub>로 건조시킨 후, 농축하여 2-메톡시-3-(3-페닐프로필)퀴놀살린-6-카르복실산(300 mg, 0.92 mmol, 수율 94%, 흰색고체)을 수득하였다:  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  13.19(br, OH), 8.42(d, J=1.8Hz, 1H), 8.12(dd, J=8.6Hz, 1.8Hz, 1H), 7.83(d, J=8.6Hz, 1H), 7.29~7.12(m, 5H), 4.04(s, 3H), 2.93~2.88(m, 2H), 2.72~2.67(m, 2H), 2.12~2.02(m, 2H).

[0247] <6-7> 2-메톡시-3-(3-페닐프로필)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성

[0248] 반응식 39

[0249]

[0250]

[0251]

[0252]

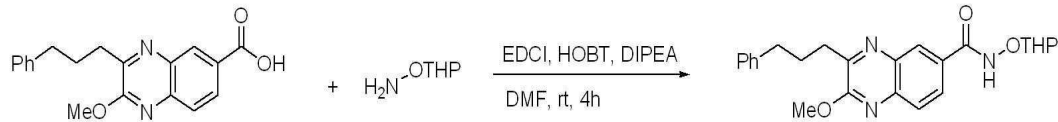
[0253]

[0254]

[0255]

[0256]

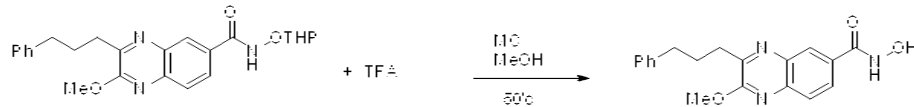
[0257]



2-메톡시-3-(3-페닐프로필)퀴놀살린-6-카르복실산(300 mg, 0.92 mmol)을 디메틸포름아미드(1 ml)에 녹인 다음, EDCI (212 mg, 1.1 mmol), 1-HOBT (125 mg, 0.92 mmol), NH<sub>2</sub>OTHP (216 mg, 1.84 mmol) 및 디이소프로필 에틸아민(476 mg, 3.68 mmol)을 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반하여 반응시켰다. 상기 반응이 완료된 후, 에틸아세테이트/NH<sub>4</sub>Cl로 상기 반응물에서 유기층을 추출하였다. 상기 유기층을 MgSO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 농축하고, 컬럼크로마토그래피(에틸아세테이트:헥세인=1:1)를 이용하여 2-메톡시-3-(3-페닐프로필)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)퀴놀살린-6-카르복사마이드(385 mg, 0.9 mmol, 수율 98%)를 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 11.86(br, NH), 8.36(m, 1H), 8.03~8.00(m, 1H), 7.86~7.83(m, 1H), 7.29~7.13(m, 5H), 5.03(s, 1H), 4.04(s, 3H+1H), 3.54~3.51(m, 1H), 2.94~2.89(m, 2H), 2.72~2.67(m, 2H), 2.14~2.04(m, 2H), 1.72~1.54(m, 6H).

<6-8> N-하이드로-2-메톡시-3-(3-페닐프로필)퀴놀살린-6-카르복사마이드의 합성(화합물 18)

반응식 40



18

2-메톡시-3-(3-페닐프로필)-N-(테트라하이드로-2H-피란-2-일옥시)퀴놀살린-6-카르복사마이드(100 mg, 0.235 mmol)을 메틸렌클로라이드(2 ml)와 메탄올(2 ml)에 녹인 다음, 트리플루오로아세트산(536 mg, 4.7 mmol)를 첨가하여, 50°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 상기 반응물을 농축하고, 에테르와 헥세인 하에서 고체의 화합물을 얻은 다음, 이를 필터하여 N-하이드록시-2-메톡시-3-(3-페닐프로필)퀴놀살린-6-카르복사마이드(25 mg)을 수득하였다: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 11.42(br, OH), 9.14(br, NH), 8.31(d, J=1.4Hz, 1H), 8.00(dd, J=8.6Hz, 1.4Hz, 1H), 7.82(d, J=8.6Hz, 1H), 7.29~7.13(m, 5H), 4.03(s, 3H), 2.93~2.88(m, 2H), 2.72~2.67(m, 2H), 2.12~2.02(m, 2H).

실험예

실험예 1: 마우스의 대퇴골에서 분리한 간엽줄기세포의 신경세포로의 분화 유도

본 발명에 따른 화합물에 의한 줄기세포의 신경세포로의 분화 능력을 확인하기 위해 하기와 같은 *인비트로* 실험을 수행하였다. 먼저, 8 주령의 피셔(Fisher) 마우스(중앙실험동물)의 대퇴골에서 골수 세포를 분리한 다음 DMEM 배양액에서 37°C에서 배양하였다. 배양한 세포를 1 x 10<sup>5</sup>개의 세포 농도로 T75 배양용기(Nunc)에 넣고 10 일간 37°C에서 3일간 한 번씩 배지를 교환하는 조건으로 배양하였다. 이후 세포를 떼어내어 1 x 10<sup>5</sup>개의 세포 농도로 동일 배양 배지를 함유한 배양용기에 넣은 다음, 37°C에서 3일간 한 번씩 배지를 교환하는 조건으로 10일간 추가 배양하였다. 이러한 과정을 5회 반복하여 간엽줄기세포를 수득하였다. 수득한 간엽줄기세포를 1 x 10<sup>5</sup> 개의 세포 농도로 DMEM 배지를 함유한 직경 100 mm의 배양 접시에 넣고, 상기 합성예의 화합물 10 μM을 1회 처리 후 2일간 배양하여 신경세포의 분화 형태를 니슬염색(Nissle staining)방법으로 관찰하고(도 1), 분화된 세포를 수지화하였다(도 2). 니슬염색방법을 간단히 설명하면, i) 분화된 세포에 4% 파라포름알데하이드를 처리하여 실온에서 20분간 반응을 시켜 세포를 고정하고, ii) PBS (phosphate buffer salin)용액으로 세 번 씻어 준 다음, 니슬용액(0.5% 크레실용액)을 처리하여 5분간 실온에서 반응시켜 남은 용액을 제거하고, iii)

PBS용액으로 세 번 씻어 준 다음 광학현미경으로 분화된 세포를 관찰한다. 이때, DMSO만 처리한 세포를 대조군으로 사용하였다.

[0258] 신경세포의 분화 형태를 니슬염색(Nissle staining)방법으로 관찰한 결과, 화합물 13, 화합물 17, 화합물 18 또는 화합물 15를 처리한 간엽줄기세포에서 전체 줄기세포 대비 분화된 세포의 비율은 각각 66.6%, 5%, 10% 및 33.1%를 나타내었다(도 1). 특히, 화합물 13를 처리한 간엽줄기세포에서 가장 우수한 신경세포분화가 관찰되었으며, 화합물 15 또한 우수한 분화능을 나타내었다.

[0259] **실험예2: 분화유도된 간엽줄기세포에서 신경분화마커의 단백질 변화 관찰**

[0260] 상기 실험예 1의 화합물에 대해, 신경세포 분화마커인 뉴런특이 에놀라제(neuron-specific enolase, NSE) 및 베타 III 투불린의 발현을 웨스턴 블롯팅을 통해 단백질 수준에서 관찰하였다.

[0261] 먼저, 세포에 상기화합물을 10 μM의 농도로 처리한 다음 세포 전체 단백질을 추출하였다. 단백질을 SDS(sodium dodesyl sulfate)가 들어있는 용액에서 열을 가하여 변성시킨 다음 SDS-PAGE에서 전기적으로 단백질을 크기별로 나열하였다. 크기별로 나열된 단백질을 나일론 필터(Bio-red)에 옮긴 다음 신경세포 분화마커 항체인 항-베타 III 투불린 및 항-NSE(abcam)를 처리하여 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 이때, 신경세포 분화마커 항체를 인식하는 형광 발생효소를 가진 2차 항체(Santacruz)를 부착시켰다. 형광 측정 장치(이미지 분석기 3000, Fuji)를 이용하여 신경세포 분화마커 단백질의 발현여부를 확인하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 신경세포 분화 마커인 NSE 및 베타 III 투불린이 발현되는 것으로 보아 본 발명의 화합물이 신경세포 분화를 유도할 수 있음을 알 수 있었다. 즉, 화합물 13, 화합물 17, 화합물 18 또는 화합물 15를 처리한 간엽줄기세포에서 신경세포 분화 마커인 베타 III 투불린 및 NSE가 과발현되었으며, 따라서 본 발명의 화합물을 처리한 세포만이 골수유래 간엽줄기세포가 신경세포로 분화하였음을 확인할 수 있었고, 특히 화합물 13의 경우 매우 우수한 신경분화 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

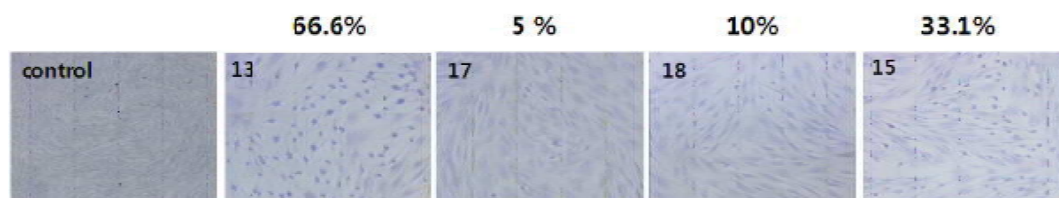
[0262] **실험예 3: 전기 생화학적 실험**

[0263] 전체세포에 대한 전기 생화학적 실험을 하기 위해 세포를 특수 배양액 (NaCl (150 mM), KCl (5 mM), MgCl<sub>2</sub> (1 mM), CaCl<sub>2</sub> (2.2 mM), Hepes (10 mM), pH 7.3)을 사용하고 삼투압 310 mOsm을 맞추기 위해 글루코스를 사용하였다. 전기적 측정을 하기 위한 피펫 내의 용액은 아스파라긴산 포타슘염(aspartic acid potassium salt, 120 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM), 에틸렌글리콜 테트라아세트산(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA, 0.5 mM), Hepes (10 mM), ATP (2 mM), GTP(0.3 mM)로 구성하였다. 전체세포 전기 분석은 Axopatch 200B (Molecular Devices Corporation)사의 기기로 분석하였다(도 4). 그 결과, 화합물 13을 처리한 간엽줄기세포가 우수한 생화학적 특성을 나타내었다.

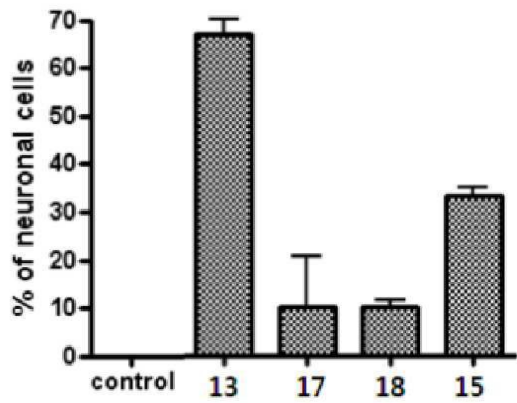
[0264] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**도면**

**도면1**



도면2



도면3



도면4

