



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년02월24일  
(11) 등록번호 10-1117129  
(24) 등록일자 2012년02월09일

(51) Int. Cl.

C07D 241/36 (2006.01) C07D 241/44 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0086575

(22) 출원일자 2009년09월14일

심사청구일자 2009년09월14일

(65) 공개번호 10-2011-0028932

(43) 공개일자 2011년03월22일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020010023535 A

US5563140 A

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

최상운

대전광역시 유성구 가정로 43, 106동 101호 (신성동, 한울아파트)

안진희

대전광역시 유성구 유성대로 1741, - 109동 804호 (전민동, 세종아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

제일특허법인, 김선장, 장성구

전체 청구항 수 : 총 6 항

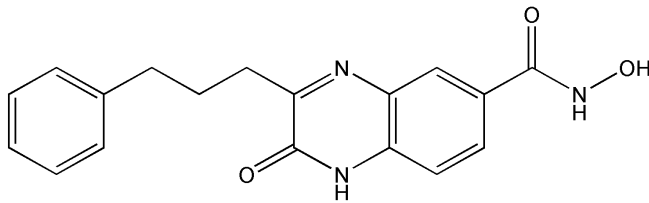
심사관 : 김은영

(54) 신규한 퀴놀살린 유도체 및 이를 포함하는 줄기세포의 신경세포로의 분화유도용 조성물

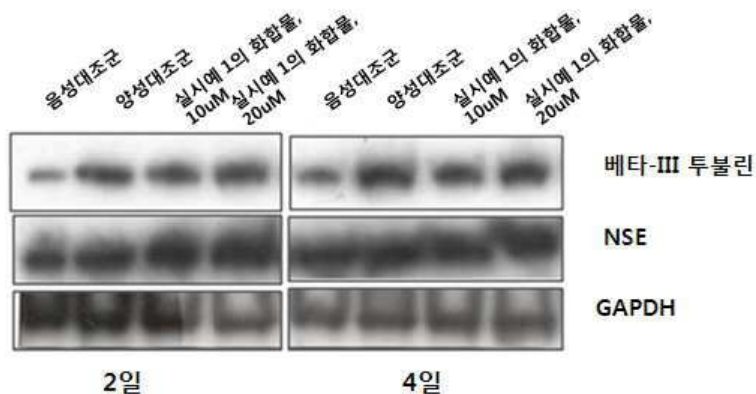
(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 1의 신규한 퀴놀살린 유도체 및 이를 포함하는 줄기세포의 신경세포로의 분화유도용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 퀴놀살린 유도체는 신경 손상 질환의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다:

<화학식 1>



대표도 - 도1



(72) 발명자

**김광록**

대전광역시 유성구 구죽로 16, 115동 206호 (송강동, 한마을아파트)

**정희정**

대전광역시 서구 청사로 254, 107동 1204호 (둔산동, 등지아파트)

**강승규**

대전광역시 서구 월평동로 45, 103동 1401호 (월평동, 진달래아파트)

**김성수**

서울특별시 강남구 삼성로 212, 1동 803호 (대치동, 은마아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-0907-B6

부처명 산업기술연구회

연구관리전문기관

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 고효율 특정세포분화화합물 발굴에 따른 신약개발응용(창의적연구)

기여율

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2009년 01월 01일~2009년 12월 31일

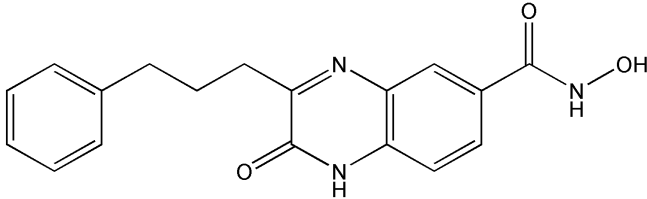
---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기 화학식 1로 표시되는 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염:

<화학식 1>



**청구항 2**

제 1 항에 따른 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 시험관 내에서(*in vitro*) 줄기세포를 신경세포로 분화 유도하기 위한 조성물.

**청구항 3**

제 2 항에 있어서,

상기 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 0.1 내지 100  $\mu$ M의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 4**

제 2 항에 있어서,

상기 줄기세포가 배아 줄기세포, 성체 줄기세포, 배아생식 줄기세포 및 배아중양 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 5**

제 2 항에 따른 조성물을 줄기세포와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법.

**청구항 6**

제 1 항에 따른 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 척추 손상 질환, 치매 및 탈수초질환으로 이루어진 군에서 선택되는 신경 손상 질환 치료용 약학 조성물.

**청구항 7**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 퀴녹살린(quinoxaline) 유도체 및 이를 포함하는 줄기세포(stem cell)의 신경세포로의 분화유도용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 뇌졸중(stroke), 알츠하이머병, 파킨슨병, 탈수초질환(demyelinating disease), 척추 손상(spinal cord injury) 등은 신경세포 손상에 의해 신경기능에 이상이 생기는 질환이다. 상기 질환들로 인해 손상된 신경세포를 치료하는 방법으로 약물요법 또는 외과적 수술이 일반적으로 이용되고 있지만, 이들 치료 방법들은 정상적인

세포에도 손상을 입힌다는 문제점이 있다.

[0003] 최근에는 질환에 의해 파괴되거나 손상된 세포를 외부로부터 공급해 주는 세포 치료제가 효과적인 것으로 제시되고 있으며, 이러한 세포 치료제로는 줄기세포(stem cell)가 각광을 받고 있다.

[0004] 줄기세포란, 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation) 되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하며, 이들 세포들은 특정 분화 자극(환경)에 의해 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 줄기세포는 세포 분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 또한 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.

[0005] 뇌신경계 조직은 다른 조직과는 달리 면역거부반응이 거의 없기 때문에, 줄기세포를 이식하였을 때 이식된 세포의 장기간 생존을 기대할 수 있다. 따라서 신경세포 손상에 의해 유발되는 다양한 신경 질환(neuronal diseases)에 대한 세포 치료제로서도 많은 연구가 이루어지고 있다. 구체적으로, 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.

[0006] 본 발명자들은 줄기세포를 특정세포로 분화시키는 물질을 개발하고자 연구를 수행한 결과, 귀녹살린 유도체가 줄기세포를 특정세포로 효율적으로 분화시킬 수 있는 것을 밝혀내었으며, 나아가 그 효율 또한 대단히 높음을 확인함으로써 발명을 완성하였다.

### 발명의 내용

#### 해결 하고자하는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 줄기세포를 특정세포로 효율적으로 분화시킬 수 있는 귀녹살린 유도체 또는 그의 염을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 귀녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

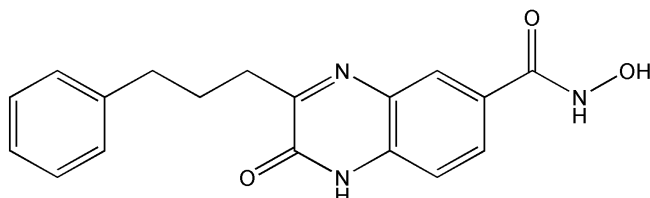
[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 귀녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 신경 손상 질환 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

#### 과제 해결수단

[0011] 상기 목적에 따라, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시된 귀녹살린 유도체 또는 그의 염을 제공한다:

#### 화학식 1



[0012]

[0013] 상기 다른 목적에 따라, 상기 화학식 1로 표시된 귀녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 조성물을 줄기세포와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[0015] 상기 또 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 신경 손상 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

**효 과**

[0016] 본 발명에 따른 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염은 줄기세포를 신경세포로 효율적으로 분화시킬 수 있으며, 또한 이를 포함하는 약학 조성물은 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 척추 손상 질환 등을 포함하는 신경 손상 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0017] 본원 명세서에서 사용되는 용어, 기술 등은 특별한 한정 없이, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에 언급된 문헌들은 모두 본 발명을 설명하기 위한 문헌으로 본 명세서에 포함된다.

[0018] 본원 명세서에서 사용되는 용어 "신경 손상 질환"은 운동 및 감각에 관여하는 신경이 손상되어 운동 및 감각을 포함하는 행동기능에 이상이 있는 질환을 의미하며, 이러한 질환으로는 뇌졸중(stroke), 알츠하이머병, 파킨슨병, 척추 손상 질환(spinal cord injury disease), 치매, 탈수초질환 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

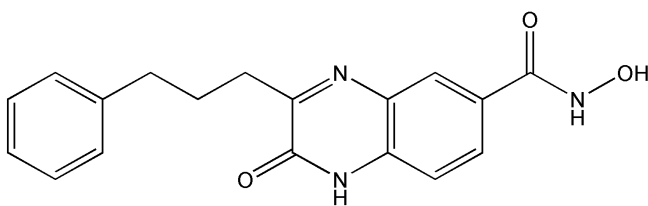
[0019] 또한, 본원 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 1) 신경 손상 질환을 보유하고 있다고 진단되지 않았으나, 이러한 경향이 있는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서 질병 또는 장애가 발생하는 것의 예방, 2) 신경 손상 질환의 억제, 즉 발전의 억제, 및 3) 신경 손상 질환의 경감을 의미한다.

[0020] 또한, 본원 명세서에서 사용되는 용어 "신경세포(neural cell)"는 중추신경계 또는 말초신경계의 뉴론(neuron) 및 글리아, 예를 들면 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 및 슈반세포(schwann cell)를 의미한다.

[0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 제공한다:

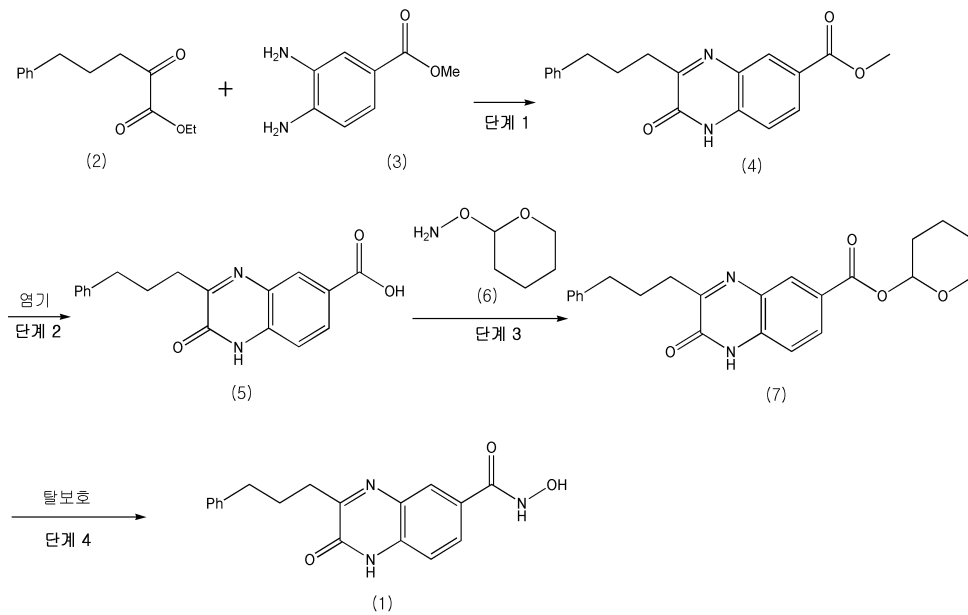
[0023] <화학식 1>



[0024]

[0025] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 퀴녹살린 유도체는 하기 반응식 1로 표시되는 합성경로에 따라 제조할 수 있다:

반응식 1



[0026]

[0027]

구체적으로, 에틸 2-옥소-5-페닐펜타노에이트(ethyl 2-oxo-5-phenylpentanoate) (2)와 3,4-디아미노 벤조산 알킬 에스터(예를 들어, 3,4-디아미노 벤조산 메틸 에스터 (3) 또는 3,4-디아미노 벤조산 에틸 에스터)를 에탄올 (EtOH) 용매 중에서 반응시킨 후, 레지오이성질체(regioisomer)를 재결정으로 분리하여 화학식 4의 화합물을 제조한다(단계 1).

[0028]

상기 단계 1에서 제조된 화학식 4의 화합물을 용매(예를 들어, 테트라히드로푸란(THF), 메탄올(MeOH), 또는 이들의 혼합용매 등)에 용해시킨 후, 염기(예를 들어, LiOH 등)를 물에 용해시켜 제조한 용액을 첨가하여 가수분해함으로써 카르복실산 화합물 (5)을 제조한다(단계 2).

[0029]

상기 단계 2에서 제조된 화학식 5의 화합물을 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 염산염(EDCI) 및 1-히드록시벤조트리아졸 하이드레이트(HOBT)의 존재하에 O-(테트라히드로-2H-피리딘-2-일)하이드록실아민 (NH<sub>2</sub>OHP)(6) 및 디이소프로필에틸아민(DiPEA)과 반응시켜 화학식 7의 화합물을 제조한다(단계 3).

[0030]

이어서 상기 단계 3에서 제조된 화학식 7의 화합물을 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올 등)과 염화 메틸렌의 혼합용매에 용해시킨 후, 산(예를 들면, 트리플루오로아세트산 등)의 존재하에 탈보호 반응시킴으로써 본 발명에 따른 화학식 1의 퀴놀살린 유도체를 제조할 수 있다(단계 4). 이때 반응은 실온 내지 60 °C의 온도범위에서 실시되는 것이 바람직하다.

[0031]

본 발명에서 화학식 1의 퀴놀살린 유도체의 염으로는 약제학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 의미한다. 구체적으로는 염산, 브롬산, 황산, 황산수소나트륨, 인산, 질산, 탄산 등과 같은 무기산과의 염; 또는 개미산, 초산, 프로피온산, 옥살산, 석신산, 벤조산, 시트르산, 말레인산, 말론산, 타르타르산, 글루콘산, 락트산, 게스티스산, 푸마르산, 락토비온산, 살리실릭산, 또는 아세틸살리실릭산(아스피린)과 같은 유기산과의 염 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0032]

또한 본 발명에 따른 화학식 1의 퀴놀살린 유도체의 염은 통상적인 방법들을 사용하여 화학식 1의 화합물로부터 제조하여 사용할 수 있다.

[0033]

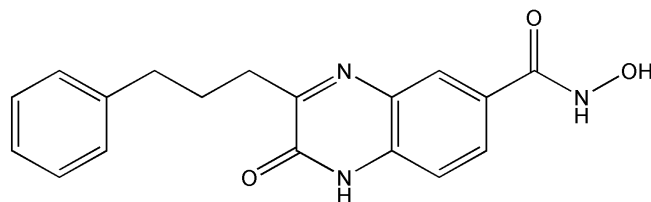
구체적으로는 화학식 1의 퀴놀살린 유도체를 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 용해시킨 후, 과량의 유기산을 가하거나 또는 무기산의 산 수용액을 가하여 침전 또는 결정화시킴으로써 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시킴으로써 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과하여 제조할 수 있다.

[0034]

상기와 같은 방법에 의해 제조된 본 발명에 따른 화학식 1의 퀴놀살린 유도체 또는 그의 염은, 줄기세포를 신경 세포로 분화시키는 능력이 탁월하다.

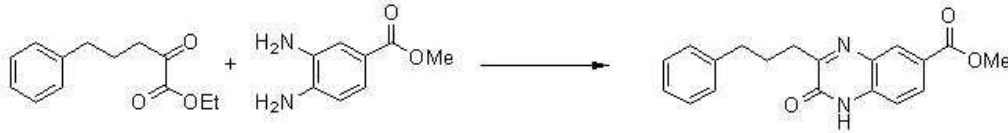
- [0035] 이에 따라, 본 발명은 상기 화학식 1의 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0036] 이때 상기 화학식 1의 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염은 0.1 내지 100  $\mu\text{M}$ , 바람직하게는 10 내지 20  $\mu\text{M}$ 의 농도로 포함될 수 있다.
- [0037] 본 발명은 또한 상기 조성물을 줄기세포와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명에 따른 분화 유도용 조성물과 함께 줄기세포를 배양하면, 줄기세포는 특정한 신경계 세포를 만들어내는 신경전구세포의 단계를 거쳐서 신경세포로 분화하게 된다. 따라서 상기 줄기세포로는 미분화 상태이면서, 무한정 증식 및 신경세포로의 분화기능을 갖는 세포라면 특별히 제한되지는 않는다. 구체적으로 줄기세포로는 배아 줄기세포, 성체 줄기세포, 배아생식 줄기세포, 배아중양 줄기세포 등을 들 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0039] 또한 상기 배양은 고농도 글루코스가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Hyclone)과 같은 세포 배양용 배지에서 수행될 수 있으며, 배양배지에는 피루브산 나트륨(sodium pyruvate), 글루타민(glutamine) 등이 추가로 첨가될 수 있다. 배양기간은 3 내지 10일이 바람직하다.
- [0040] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1의 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 신경 손상 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0041] 구체적으로, 상기 화학식 1의 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염을 치료학적으로 유효한 양으로 신경 손상 질환의 치료가 필요한 대상의 손상부위에 투여할 경우, 주변 중추신경계 또는 말초신경계의 신경줄기세포가 신경세포로 분화되어 손상된 신경 기능을 회복시킴으로써 신경 손상 질환을 치료할 수 있다. 이때 상기 치료 대상은 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약학 조성물은 약학 분야에서의 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 용액 또는 현탁액, 또는 주사시에 주사용 증류수로 제조하여 사용할 수 있는 즉시 사용형 주사용 건조분말 등의 주사용 제제; 또는 연고제 등의 국소 투여용 제제 등이 바람직하다. 이때, 일반적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 함께 사용할 수 있다.
- [0044] 상기 화학식 1의 퀴녹살린 유도체 또는 그의 염의 투여량은 1 내지 100 mpk이며, 바람직하게는 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 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.
- [0045] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 보다 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0046] 실시예 1: N-히드록시-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디히드로퀴녹살린-6-카복스아미드(N-hydroxy-2-oxo-3-(3-phenylpropyl)-1,2-dihydroquinoxaline-6-carboxamide)의 제조



[0047]

[0048] 단계 1 : 메틸 2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디히드로퀴녹살린-6-카복실레이트(methyl 2-oxo-3-(3-phenylpropyl)-1,2-dihydroquinoxaline-6-carboxylate)의 제조



[0049]

[0050] 에탄올(30 mL)에 3,4-디아미노 벤조산 메틸 에스터(649 mg, 3.9 mmol)를 가하여 용해시킨 후, 에틸 2-옥소-5-페닐펜타노에이트(860 mg, 3.9 mmol)를 가하여 처음에 약간 가열한 다음 실온에서 20 시간 교반하였다. 결과로 수득된 반응혼합물을 여과하여 생성된 백색 고체를 분리한 후, 소량의 용매(EtOH+n-헥산=1/1)로 세척하고 건조하여 목적 화합물을 수득하였다(880 mg, 수율: 70 %).

[0051]  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.57 (s, 1H), 8.23 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.02 (dd, J = 8.5, 1.9 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.32 - 7.15 (m, 5H), 3.87 (s, 3H), 2.81 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.71 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.08 - 1.98 (m, 2H)

[0052]  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  165.4, 162.7, 154.5, 141.8, 135.4, 130.8, 129.5, 129.3, 128.3, 128.2, 125.6, 124.0, 115.5, 52.1, 34.7, 32.0, 27.3

[0053] 단계 2: 2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디히드로퀴놀린-6-카복실산(2-Oxo-3-(3-phenylpropyl)-1,2-dihydroquinoline-6-carboxylic acid)의 제조



[0054]

[0055] 상기 단계 1에서 제조된 메틸 2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디히드로퀴놀린-6-카복실레이트(554 mg, 1.71 mmol)를 테트라히드로푸란(THF, 10 mL)과 메탄올(10 mL)의 혼합용매에 용해시킨 후, LiOH(366 mg, 8.6 mmol)를 H<sub>2</sub>O(10 mL)에 용해시켜 제조한 용액을 가하고, 50 °C에서 10시간 교반하면서 반응시켰다. 반응이 종결되면 감압 농축한 후 물에 용해시키고, 2N-HCl로 pH를 2로 조정하였다. 결과의 용액을 에틸 아세테이트로 추출한 후, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과 및 감압 농축하여 표제의 화합물을 수득하였다(백색 고체, 503 mg, 수율: 95 %).

[0056]  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.04 (brs, 1H), 12.59 (s, 1H), 8.27 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.06 (dd, J = 8.5, 1.9 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.36 - 7.20 (m, 5H), 2.87 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.13 - 2.03 (m, 2H)

[0057] 단계 3: 테트라히드로-2H-피란-2-일 2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디히드로퀴놀린-6-카복실레이트(tetrahydro-2H-pyran-2-yl 2-oxo-3-(3-phenylpropyl)-1,2-dihydroquinoline-6-carboxylate)의 제조



[0058]

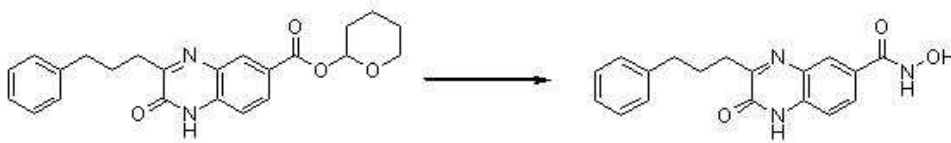
[0059] 상기 단계 2에서 제조한 2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디히드로퀴놀린-6-카복실산(154 mg, 0.5 mmol)을 디메틸포름아미드(DMF, 1 mL)에 용해시킨 후, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 염산염(EDCI, 115 mg, 0.6 mmol) 및 1-히드록시벤조트리아졸 하이드레이트(HOBT, 68 mg, 0.5 mmol)의 존재하에 O-(테트라히드로-



2H-피란-2-일)하이드록실아민(NH<sub>2</sub>OTHP, 117 mg, 1 mmol) 및 디이소프로필에틸아민(DiPEA, 258 mg, 2 mmol)과 실온에서 3 시간 교반하면서 반응시켰다. 반응이 종결되면 포화 NH<sub>4</sub>Cl을 넣고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 분리된 유기층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과, 감압 및 농축한 후, 잔여물을 관 크로마토그래피로 분리하여 표제의 화합물을 얻었다(백색 고체, 129 mg, 수율: 63 %).

[0060] <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.48 (brs, 1H), 11.71 (brs, 1H), 8.16 (d, J=1.4 Hz, 1H), 7.87 (dd, J=8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.31-7.13 (m, 6H), 4.99 (s, 1H), 4.11-3.96 (m, 1H), 3.56-3.46 (m, 1H), 2.76 (t, J=7.5 Hz, 2H), 2.68 (t, J=7.7 Hz, 2H), 2.06-1.95 (m, 2H), 1.73-1.48 (m, 6H).

[0061] 단계 4: N-히드록시-2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디히드로퀴녹살린-6-카복사미드 (N-hydroxy-2-oxo-3-(3-phenylpropyl)-1,2-dihydroquinoxaline-6-carboxamide)의 제조



[0062]

[0063] 상기 단계 3에서 제조한 테트라히드로-2H-피란-2-일 2-옥소-3-(3-페닐프로필)-1,2-디히드로퀴녹살린-6-카복실레이트(86 mg, 0.21 mmol)를 메탄올(MeOH, 5 mL) 및 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(5 mL)의 혼합용매에 용해시킨 후, 실온에서 트리플루오로아세트산(TFA, 490 mg, 4.3 mmol)을 가하고 35 °C에서 10 시간 교반시켰다. 반응이 종결되면 농축하고, 잔여물은 소량의 에틸 아세테이트를 가하여 30분간 교반한 후 여과하여 표제 화합물을 수득하였다(백색 고체, 56 mg, 수율: 83 %).

[0064] <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.48 (s, 1H), 11.30 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 8.13 (d, J=1.7 Hz, 1H), 7.88 (dd, J=8.5, 1.8 Hz, 1H), 7.32 - 7.14 (m, 6H), 2.80 (t, J=7.3 Hz, 2H), 2.70 (t, J=7.4 Hz, 2H), 2.07 - 1.97 (m, 2H).

[0065] <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 163.3, 162.4, 154.6, 141.8, 133.8, 130.8, 128.3, 128.2, 127.9, 127.2, 126.5, 125.6, 115.2, 34.7, 32.0, 27.5

[0066] 실험예 1: 쥐의 PC12 세포로부터 신경세포로의 분화 유도

[0067] 본 발명에 따른 퀴녹살린 유도체에 의한 PC12 세포로부터 신경세포로의 분화 능력을 확인하기 위해, 상기 실시예 1의 화합물을 PC12 세포에 처리한 후, 신경세포 분화마커인 뉴린 특이 에놀라제(neuron-specific enolase, NSE) 및 베타 III 투불린의 발현을 웨스턴 블롯팅을 통해 단백질 수준에서 관찰하였다.

[0068] 구체적으로 쥐의 PC12 세포(ATCC Cat. No. CRL-1721)에 실시예 1의 화합물을 10 μM 및 20 μM의 농도로 각각 처리한 다음, 2일 및 4일 뒤에 각각 세포 전체 단백질을 추출하였다. 추출한 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(입수처: abcam)를 각각 처리하여 4 °C에서 24 시간 동안 반응시켰다. 이때, 신경세포 분화마커 항체를 인식하는 형광 발생 효소를 가진 2차 항체(입수처: 산타크루즈(Santacruz))를 부착시켰다.

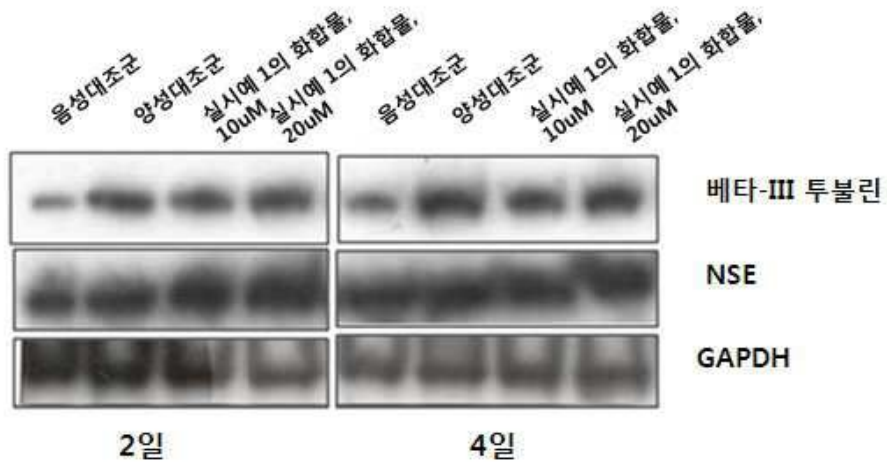
[0069] 형광 측정 장치(Image analyzer 3000, 후지(Fuji)사제)를 이용하여 신경세포 분화마커 단백질의 발현여부를 확인하고, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 이때, 0.01% DMSO를 처리한 세포를 음성 대조군으로, 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)를 50ng/ml의 농도로 처리한 세포를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0070] 도 1에 나타난 바와 같이, 신경세포 분화 마커인 NSE 및 베타 III 투불린이 발현되는 것으로부터, 본 발명에 따른 퀴녹살린 유도체가 신경세포 분화를 유도할 수 있음을 알 수 있다.

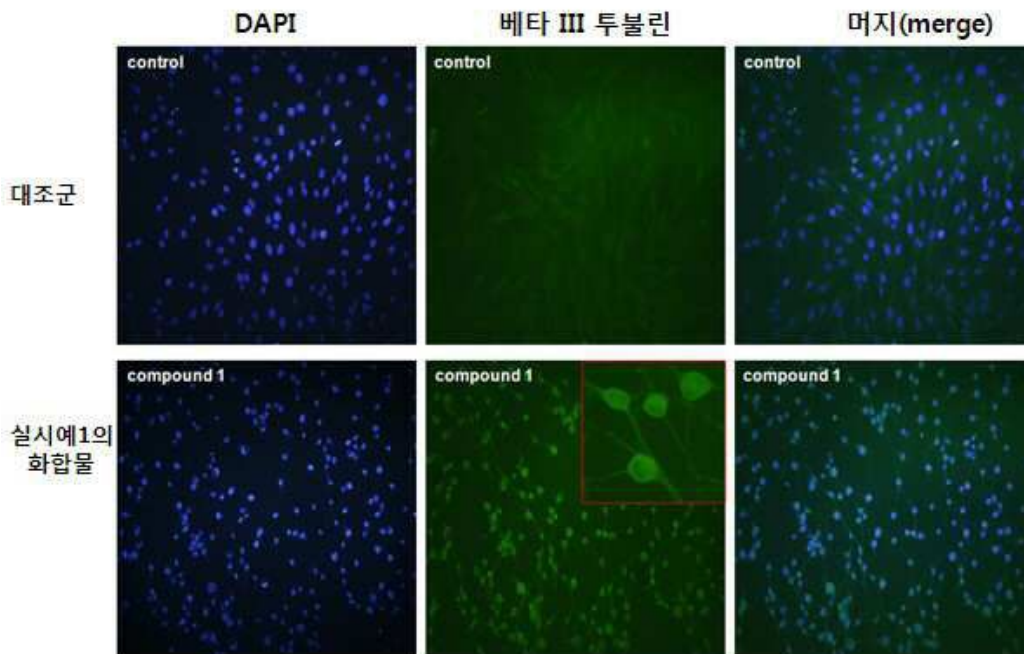
- [0071] **실험예 2: 쥐의 대퇴골에서 분리한 간엽줄기세포의 신경세포로의 분화 유도**
- [0072] 본 발명에 따른 귀족살린 유도체에 의한 줄기세포의 신경세포로의 분화 능력을 확인하기 위해 하기와 같은 방법으로 생체외(*in vitro*) 실험을 수행하였다.
- [0073] <2-1> 간엽줄기세포의 제조
- [0074] 먼저, 8 주령의 피셔(Fisher) 쥐(입수처: 중앙실험동물)의 대퇴골에서 골수 세포를 분리한 다음 DMEM 배양액에서 37 °C에서 배양하였다. 배양한 세포를  $1 \times 10^5$  개의 세포 농도로 T75 배양용기(Nunc)에 넣고, 10 일간 37 °C에서 3일에 한번씩 배지를 교환하는 조건으로 배양하였다. 이후 배양한 세포를 떼어내어  $1 \times 10^5$  개의 세포 농도로 동일 배양 배지를 함유한 배양용기에 넣은 다음, 37 °C에서 3일에 한번씩 배지를 교환하는 조건으로 10 일간 추가 배양하였다. 이러한 과정을 5회 반복하여 간엽줄기세포를 얻었다.
- [0075] <2-2> 신경세포의 분화형태 관찰
- [0076] 상기에서 얻어진 간엽줄기세포를  $1 \times 10^5$  개의 세포 농도로, DMEM 배지를 함유한 직경 30 mm의 배양 접시에 넣고, 상기 실시예 1의 화합물을 20  $\mu$ M의 농도로 1회 처리한 후, 2 일간 배양하였다.
- [0077] 배양된 세포를 베타-III-튜불린을 인지하는 항체 (abcam)를 처리하고 이어서 형광체가 표시된 2차 항체 (Santacruz)를 처리한 후 신경세포의 분화 형태를 형광현미경을 이용하여 면역세포화학검사(문헌[Klaus Scheller *et. al.*, *immunocytochemistry*, European journal of cell biology, 79: 299-307 (2000)] 참조)를 수행하고, 그 결과를 도 2a에 나타내었다. 도 2a에서 0.01% DMSO만 처리한 간엽줄기 세포군을 대조군으로 하였으며, DAPI는 핵 형광 염색약인 4',6-디아미디노-3-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 염색한 것이며, 머지(merge)는 베타-III-튜불린 항체로 염색된 사진과 병합된 사진이다.
- [0078] 도 2a에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물에 의해 간엽줄기세포가 형태학적으로 신경세포로 변화하였음을 알 수 있다.
- [0079] <2-3> 세포내 생화학적 변화 관찰
- [0080] 상기 <2-1> 에서 얻어진 간엽줄기세포에 실시예 1의 화합물을 10  $\mu$ M 및 20  $\mu$ M의 농도로 각각 처리하여 배양하면서 일정 시간 간격으로 세포를 채취하여 전체 단백질을 추출한 다음, 상기 실험예 1에서와 같이 항-베타 III 튜불린 및 항-NSE(입수처: abcam)를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시함으로써 신경세포의 생화학적 변화를 관찰하였다. 그 결과를 도 2b에 나타내었다. 이때, DMSO만 처리한 세포를 음성 대조군으로 사용하였다.
- [0081] 도 2b에 나타난 바와 같이, 간엽줄기세포에 실시예 1의 화합물을 처리하여 배양한 세포에서 신경세포 분화 마커인 베타 III 튜불린 및 NSE의 발현을 확인할 수 있다.
- [0082] 상기 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1의 화합물을 처리한 세포에서만 베타 III 튜불린이 발현하였으며, 이로부터 골수유래 간엽줄기세포가 신경세포로 분화하였음을 확인할 수 있다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0083] 도 1은 본 발명의 실시예 1의 화합물에 의한 PC12 세포에서의 신경 분화를 웨스턴 블롯팅을 통해 확인한 결과를 나타낸 사진이다.
- [0084] 도 2a는 본 발명의 실시예 1의 화합물에 의한 간엽줄기세포에서의 형태학적 신경 분화를 관찰한 결과를 나타낸 사진이다.
- [0085] 도 2b는 본 발명의 실시예 1의 화합물에 의한 간엽줄기세포에서의 신경 분화를 웨스턴 블롯팅을 통해 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도면

도면1



도면2a



도면2b

