

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2015-0027703

(43) 공개일자

2015년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 271/10 (2006.01) A61K 31/4245 (2006.01)  
A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0113960

(22) 출원일자

2014년08월29일

심사청구일자

2014년08월29일

(30) 우선권주장

1020130103199 2013년08월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인

중앙대학교 산학협력단

서울 동작구 흑석동 221

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

민경훈

서울특별시 서초구 잠원로4길 34-11, 101동 1003호(잠원동, 녹원한신아파트)

장지호

서울 용산구 효창원로 17, 104동 1301호 (산천동, 리버힐삼성아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

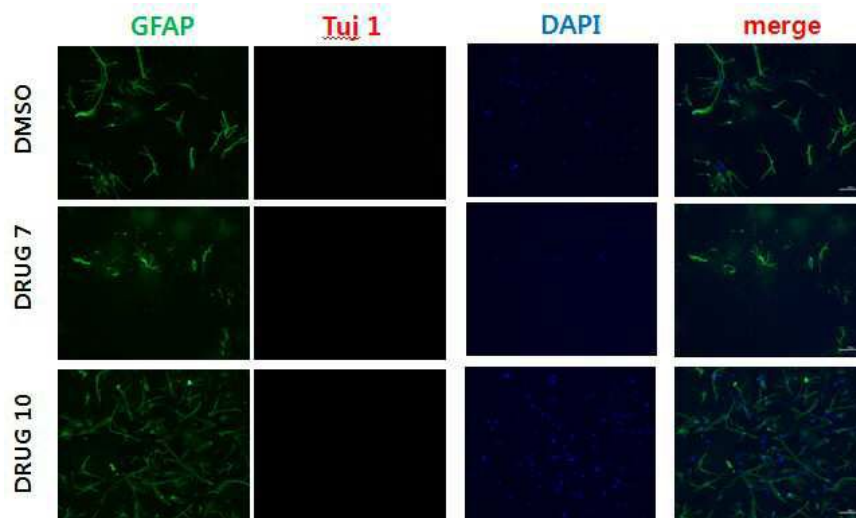
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **신경줄기세포 분화조절제용 광학활성 화합물 및 이의 의학적 용도**

### (57) 요약

본 발명은 신경줄기세포 분화조절제용 광학활성 화합물 및 이의 의학적 용도에 관한 것으로, 상기 광학활성 화합물을 이용하면 유사한 다른 화합물에 비해 탁월하게 신경줄기세포를 신경세포 특히 성상세포로 분화시킬 수 있으므로, 상기 유도체를 포함한 조성물은 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 또는 척수 손상 질환 등을 포함하는 신경세포손상 질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

**대표도** - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012050137

부처명 교육부

연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 줄기세포 기반 고효율 고속 약물 탐색기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 중앙대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C6049724

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오 의료 기술개발사업

연구과제명 역분화 줄기세포의 체계적인 분양시스템 및 기술 교육시스템 구축

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.10.01 ~ 2013.09.30

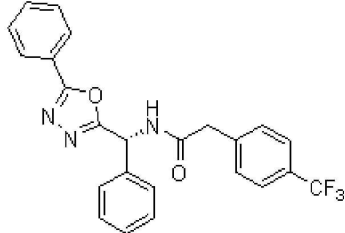
---

## 특허청구의 범위

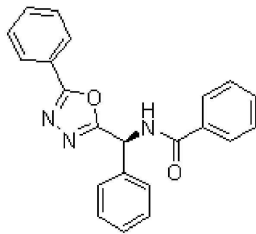
### 청구항 1

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염:

[화학식 1]



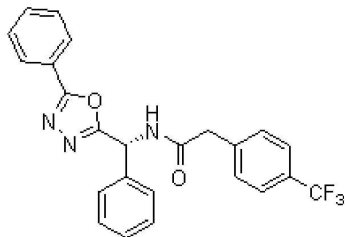
[화학식 2]



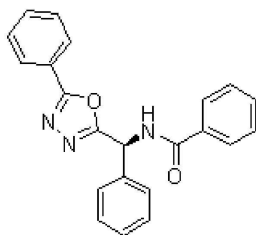
### 청구항 2

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 신경줄기세포의 신경세포로의 분화유도용 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



### 청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 광학활성 화합물 또는 그의 염을 1 내지 10  $\mu$ M의 양으로 포함하는, 신경줄기세포의

신경세포로의 분화유도용 조성물.

#### 청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 신경줄기세포가 배아 신경줄기세포, 성체 신경줄기세포, 배아생식 신경줄기세포 및 배아종양 신경줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경줄기세포의 신경세포로의 분화유도용 조성물.

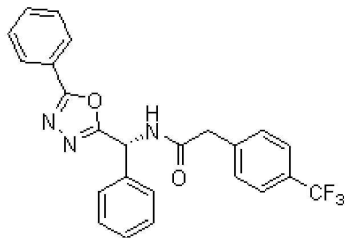
#### 청구항 5

청구항 2에 있어서, 상기 신경세포는 뉴런(neuron), 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 또는 소교세포(microglia cell)인 것을 특징으로 하는, 신경줄기세포의 신경세포로의 분화유도용 조성물.

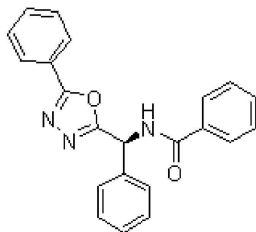
#### 청구항 6

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 신경세포손상 질환 치료 또는 예방용 약학조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



#### 청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 신경세포손상 질환은 파킨슨씨병, 알츠하이머, 피크병(Pick's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 허혈성 뇌질환(stroke), 탈수초질환(demyelinating disease) 및 척추 손상(spinal cord injury)으로 이루어진 군에서 선택되는 신경세포손상 질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001]

본 발명은 신경줄기세포 분화조절제용 광학활성 화합물 및 이의 의학적 용도에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002]

뇌졸중(stroke), 알츠하이머병, 파킨슨병, 탈수초질환(demyelinating disease), 척추 손상(spinal cord injury) 등은 신경 세포 손상에 의해 신경기능에 이상이 생기는 질환으로, 상기 질환들로 인해 손상된 신경세포는 재생되지 않아 치료가 어렵고 대증요법으로 약물 또는 외과적 수술이 이루어지나 이러한 치료법은 일시적이

거나 정상적인 세포에도 손상을 입혀 문제점으로 지적되고 있다.

- [0003] 이에 최근에는 질환에 의해 파괴되거나 손상된 세포를 외부로부터 공급해 주는 세포 치료제가 효과적인 것으로 제시되고 있다. 이러한 세포 치료제로는 신경줄기세포(Neural stem cells: NSCs)가 각광을 받고 있다.
- [0004] 신경줄기세포는 신경계에 존재하는 전구세포(progenitor cell)의 서브타입으로, 성상세포(astrocytes), 희돌기교세포(oligodendrocytes), 뉴런(neurons)으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 중추신경계(CNS)와 말초신경계(PNS)에서 분리하여 다세포성 뉴로스피어(Multicellular neurospheres)를 만들 수 있고 이 세포가 각각의 조건에서 글리아(glia) 계통과 신경 계통으로 분화하게 된다(Sally Temple *et al.* 2001).
- [0005] 뇌신경계 조직을 다른 조직과는 달리 면역거부반응이 거의 없기 때문에, 신경줄기세포를 이식하였을 때 이식된 세포의 장기간 생존을 기대할 수 있고, 따라서 신경세포 손상에 의해 유발되는 다양한 신경 질환에 대한 세포 치료제로서도 많은 연구가 이루어지고 있다.
- [0006] 그러나, 세포 치료제로서의 신경줄기세포의 유용성을 높이기 위해서는 신경줄기세포를 효율적으로 특정 세포로 분화시키는 기술이 필요하다.
- [0007] 한편, 한국공개특허 제2010-0047901호에서는 헤지호그(Hedgehog) 경로를 억제하는 옥사디아졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 이의 용도를 개시하고 있지만, 상기 옥사디아졸 유도체는 본 발명과 상이한 화합물일 뿐 아니라, 신경줄기세포 분화조절제로서의 용도를 개시하지 않는다.

## 발명의 내용

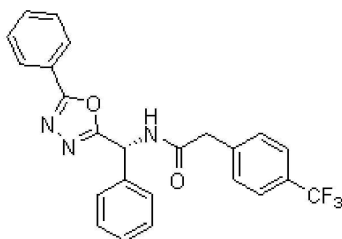
### 해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 신규한 광학활성 화합물이 신경줄기세포를 특정세포 즉, 성상세포로 분화시키는 신경줄기세포 분화조절제인 것을 밝혀냄으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 이에, 본 발명의 목적은 신경줄기세포 분화조절 활성을 갖는 광학활성 화합물을 제공하는 데에 있다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 광학활성 화합물을 포함하는 신경줄기세포의 신경세포로의 분화유도용 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0011] 또한, 본 발명의 또다른 목적은 상기 조성물을 신경줄기세포와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 신경줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0012] 또한, 본 발명의 또다른 목적은 상기 광학활성 화합물을 포함하는 신경세포손상 질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

### 과제의 해결 수단

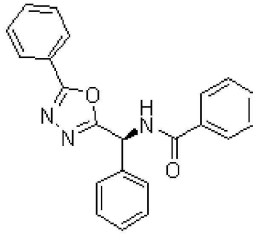
- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염을 제공한다:

- [0014] [화학식 1]



- [0015]

- [0016] [화학식 2]



[0017]

[0018]

또한, 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염을 포함하는 신경줄기세포의 신경세포로의 분화유도용 조성물을 제공한다.

[0019]

또한, 본 발명은 상기 조성물을 신경줄기세포와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 신경줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[0020]

또한, 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염을 포함하는 신경세포손상 질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0021]

본 발명에 따른 광학활성 화합물을 이용하여 신경줄기세포를 신경세포 특히 성상세포로 분화시킬 수 있으므로, 상기 광학활성 화합물을 포함한 조성물은 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병 또는 척수 손상 질환 등을 포함하는 신경세포손상 질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0022]

도 1은 본 발명에 따른 광학활성 화합물에 의한 랫 태아 유래 신경줄기세포의 성상세포로의 유도를 관찰한 것으로, GFAP의 면역형광 이미지를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 광학활성 화합물에 의한 인간 유도만능 줄기세포 (iPSC) 유래 신경줄기세포의 성상세포로의 유도를 관찰한 것으로, GFAP의 면역형광 이미지를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023]

본 발명에 기재된 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.

[0024]

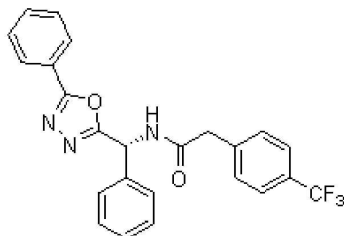
이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0025]

본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염을 제공한다:

[0026]

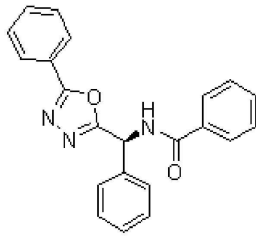
[화학식 1]



[0027]

[0028]

[화학식 2]



[0029]

[0030]

본 발명에 따른 광학활성 화합물은 공지의 방법에 의해 상응하는 염으로 제조할 수 있다. 이러한 염은 독성이 없는 수용성의 것이 바람직하다. 바람직한 염으로는 칼륨, 나트륨 등 등과 같은 알칼리 금속의 염; 칼슘, 마그네슘 등과 같은 알칼리토류 금속의 염; 그리고 테트라메틸 암모늄, 트리에틸아민, 메틸아민, 디메틸아민, 시클로헥틸아민, 벤질아민, 페네틸아민, 피페리딘, 모노에탄올아민, 디에탄올아민, 트리스(히드록시메틸)아민, 라이신, 아르기닌, N-메틸-D-글루카민 등과 같은 약학적으로 허용 가능한 아민의 염을 들 수 있다.

[0031]

본 발명에 사용되는 광학활성 화합물은 공지의 방법에 의해 상응하는 산 부가염으로 제조할 수 있다. 이러한 산 부가염은 독성이 없는 수용성인 것이 바람직하다. 바람직한 산 부가염으로는 염산염, 브롬화수소산염, 요오드화수소산염, 황산염, 인산염 및 질산염과 같은 무기산염, 또는 아세트산염, 젖산염, 주석산염, 옥살산염, 푸마르산염, 말레인산염, 구연산염, 벤조산염, 메탄술폰산염, 에탄술폰산염, 벤젠술폰산염, 톨루엔술폰산염, 이세티온산염, 글루쿠론산염 및 글루콘산염과 같은 유기산염을 들 수 있다.

[0032]

본 발명의 사용되는 광학활성 화합물 또는 그의 염은 공지의 방법에 의해 수화물로 제조할 수 있다.

[0033]

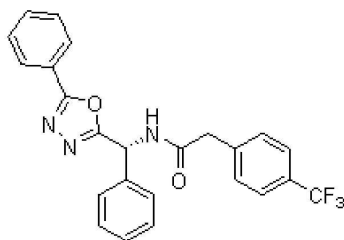
도 1 및 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 광학활성 화합물을 처리한 실험군은 어떠한 광학활성 화합물 처리도 하지 않은 대조군에 비해 유의성 있게 신경줄기세포를 정상세포로 분화 유도하며, 특히 유사한 화합물 11과 비교해서도 보다 탁월하게 신경줄기세포를 정상세포로 분화 유도하므로, 본 발명에 따른 광학활성 화합물 또는 그의 염은 신경줄기세포를 신경세포, 특히 정상세포로 분화를 촉진함으로써 신경세포들 간의 균형을 맞추어 신경세포손상 질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

[0034]

또한, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 신경줄기세포의 신경세포로의 분화유도용 조성물을 제공한다:

[0035]

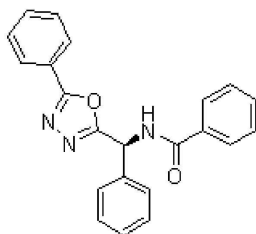
[화학식 1]



[0036]

[0037]

[화학식 2]



[0038]

[0039]

특히, 본 발명에 따른 조성물은 상기 광학활성 화합물 또는 그의 염을 1 내지 10  $\mu$ M의 양으로 포함하는 것이 바람직하다.

[0040]

본 발명에 의해 분화될 수 있는 신경줄기세포는 특정한 신경계 세포를 만들어내는 신경전구세포의 단계를 거쳐서 신경세포로 분화하게 된다. 따라서, 미분화 상태이면서, 무한정 증식 및 신경세포로의 분화기능을 갖는 세

포라면 특별히 제한되지는 않는다. 예를 들어, 배아 신경줄기세포, 성체 신경줄기세포, 배아생식 신경줄기세포 및 배아종양 신경줄기세포 등으로부터 선택될 수 있다.

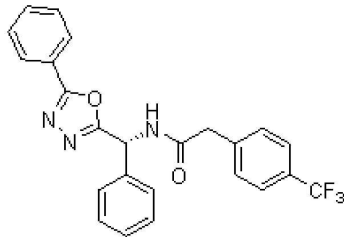
[0041] 상기 신경줄기세포로부터 분화된 신경세포는 뉴런(neuron), 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포(oligodendrocyte) 또는 소교세포(microglia cell)일 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 신경줄기세포와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 신경줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

[0043] 상기 배양은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Hyclone)/F12 배지와 같은 세포배양용 배지에서 수행될 수 있으며, 배양배지에는 B27, 섬유아세포성장인자(fibroblast-derived growth factor, FGF), 상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF) 등과 같은 성장인자 등이 추가로 첨가될 수 있다. 배양기간은 3 내지 10일이 바람직하다.

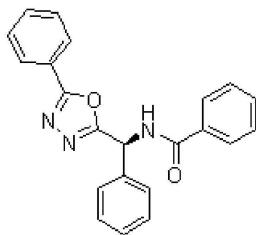
[0044] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 광학활성 화합물 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는, 신경세포손상 질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다:

[0045] [화학식 1]



[0046]

[0047] [화학식 2]



[0048]

[0049] 상기 신경세포손상 질환으로는 파킨슨씨병, 알츠하이머, 피크병(Pick's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 허혈성 뇌질환(stroke), 탈수초질환(demyelinating disease) 및 척추 손상(spinal cord injury)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0050] 보다 상세하게는, 상기 신경세포를 치료학적으로 유효한 양으로 신경세포손상 질환의 치료가 필요한 대상의 손상부위에 투여할 경우, 주변 중추신경계 또는 말초신경계의 신경전구세포 또는 신경줄기세포를 신경세포로 분화시켜 손상된 신경 기능을 회복시키고 신경 손상 질환을 치료할 수 있다. 이때 상기 대상은 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[0051] 본 발명의 약학조성물은 유효 성분 이외에 약학적으로 허용되는 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 약학 조성물은 약학 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사제 또는 구소 투여용 제제 등이 바람직하다. 이때, 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 함께 사용할 수 있다.

[0053] 그리고, 신경세포의 1회 투여량은  $1 \times 10^5$  세포/kg(체중), 바람직하게는 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 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.



[0054] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0055] <제조예 1> 2-(*티트*-부톡시카르보닐아미노)-2-페닐아세트산(1) 합성

[0056] 화합물 1은 문헌에서 알려진 방법(J. Labelled Comp. Radiopharm. 2004, 47, 599-608)에 따라 합성하였다.

[0057] <제조예 2> *티트*-부틸페닐(5-페닐-1,3,4-옥사디아졸-2-일)메틸카바메이트(3) 합성

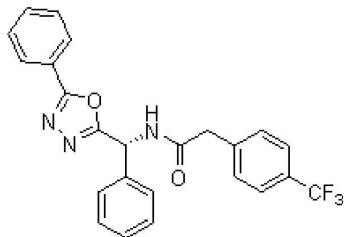
[0058] 화합물 3은 문헌에서 알려진 방법(Tetrahedron Lett. 2006, 47, 4827-4830)에 따라 합성하였다.

[0059] <제조예 3> 페닐(5-페닐-1,3,4-옥사디아졸-2-일)메탄아민(5) 합성

[0060] 아르곤 분위기 하 실온에서 건조  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7.0mL)에 용해시킨 화합물 3의 용액(533mg, 1.517mmol)에 TFA(0.93mL, 12.1mmol)를 첨가하였다. TLC로 4시간 동안 반응 완료를 모니터링 한 후, 반응혼합물을 물(7.0mL)로 퀀칭시켰고,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 추출하였으며, 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액 및 브라인으로 세정하였다. 유기층은  $\text{MgSO}_4$ 로 건조하고 여과하며 농축하였다. 비정제 잔류물은 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(EtOAc:*n*-헥산=1:1)를 통해 정제하여 화합물 5(348mg, 91%)를 제조하였다:

[0061]  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$  7.93(dd, 2H,  $J=7.7, 1.4\text{Hz}$ ), 7.33(m, 9H), 5.41(s, 1H).

[0062] <실시예 1> (R)-*N*-(페닐(5-페닐-1,3,4-옥사디아졸-2-일)메틸)-2-(4-(트리플루오로메틸)페닐)아세트아미드(7) 합성



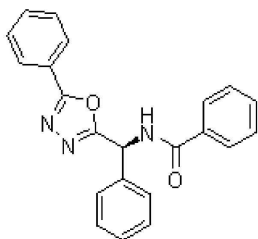
[0063]

[0064] 상기 화합물 7을 아래와 같은 방법으로 합성하였다.

[0065] 실온에서 건조  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.1M) 및 페닐아세트산(1.2 당량)에 용해시킨 광학활성 화합물 5 용액(1.0 당량)에 4-디메틸아미노피리딘(DMAP)(1.5 당량) 및 EDCI(1.2 당량)를 첨가하였다. TLC를 통한 모니터링에 의해 반응 완료를 확인할 때까지(2시간 내지 밤새도록) 상기 반응혼합물을 실온에서 교반한 후, 수용성 2N-HCl 용액으로 퀀칭시키고 EtOAc로 추출하였다. 얻어진 유기층을 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액 및 브라인으로 세정하였고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조하였으며 감압 하에서 여과하고 농축하였다. 비정제 잔류물은 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(EtOAc:*n*-헥산=1:4)를 통해 정제하여 화합물 7(18mg, 56%)을 제조하였다:

[0066]  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.71 (s, 2H), 6.50 (d,  $J = 7.95\text{Hz}$ , 1H), 6.95 (m, 1H), 7.30-7.61 (m, 12H), 7.92-8.01 (m, 2H).

[0067] <실시예 2> (S)-*N*-(페닐(5-페닐-1,3,4-옥사디아졸-2-일)메틸)벤즈아미드(10) 합성



[0068]

[0069]

[0070]

상기 화합물 10을 아래와 같은 방법으로 합성하였다.

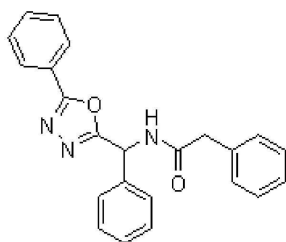
실온에서 건조  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.05M) 및 트리에틸아민 (1.7 당량)에 용해시킨 광학활성 화합물 5 용액 (1.0 당량)에  $0^\circ\text{C}$ 에서 건조  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.1M)에 용해시킨 페닐설폰일 클로라이드 (1.0 당량)를 첨가하였다. TLC를 통한 모니터링에 의해 반응 완료를 확인할 때까지 상기 반응혼합물을  $0^\circ\text{C}$ 에서 교반한 후, 수용성 2N-HCl 용액으로 반응을 종결시키고 EtOAc로 추출하였다. 얻어진 유기층을 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액 및 브라인으로 세정하였고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조하였으며 감압 하에서 여과하고 농축하였다. 비정제 잔류물은 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:n-헥산=1:3)를 통해 정제하여 연한 노란색의 화합물 10 (13mg, 29%)을 제조하였다:

[0071]

$^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.83 (d,  $J$  = 7.95Hz, 1H), 7.35-7.65 (m, 11H), 7.99-8.04 (m, 4H), 8.81 (d,  $J$  = 7.8Hz, 1H).

[0072]

<비교예 1> 2-페닐-N-(페닐(5-페닐-1,3,4-옥사디아졸-2-일)메틸)아세트아미드(11) 합성



[0073]

[0074]

실온에서 건조  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.1M) 및 페닐아세트산 (1.2 당량)에 용해시킨 화합물 5 용액 (1.0 당량)에 4-디메틸아미노 피리딘 (DMAP) (1.5 당량) 및 EDCI (1.2 당량)를 첨가하였다. TLC를 통한 모니터링에 의해 반응 완료를 확인할 때까지 (2시간 내지 밤새도록) 상기 반응혼합물을 실온에서 교반한 후, 수용성 2N-HCl 용액으로 원칭시키고 EtOAc로 추출하였다. 얻어진 유기층을 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액 및 브라인으로 세정하였고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조하였으며 감압 하에서 여과하고 농축하였다. 비정제 잔류물은 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 (EtOAc:n-헥산=1:4)를 통해 정제하여 화합물 11 (18mg, 56%)을 제조하였다:

[0075]

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz)  $\delta$  7.93(d, 2H,  $J$ =7.2Hz), 7.46(m, 3H), 7.31(m, 10H), 6.63(d, 1H,  $J$ =7.8Hz), 6.46(d, 1H,  $J$ =8.0Hz), 3.66(s, 2H).

[0076]

<실험예 1> 면역염색 분석

[0077]

1. 랫 태아 유래 신경줄기세포(NSC) 배양

[0078]

인비트로젠(invitrogen)에서 랫 태아 유래 신경줄기세포(NSC)를 구입하여 실시예에 따른 화합물들이 정상세포 분화를 유도하는지 여부를 확인하였다.

[0079]

이때, 상기 NSC (200,000/ml)는 2% B27 (Invitrogen), 20 ng/ml EGF (Chemicon, CA), 및 20 ng/ml FGF-2 (Chemicon, CA)로 보강된 DMEM/F12 배지 (Gibco, Carlsbad, CA)에서 7일 동안 뉴로스피어(neurosphere)로 성장시켰다. 이때, 상기 배지는 이틀에 한번 교체하였다. 분화를 위하여,  $37^\circ\text{C}$ 에서 10분 동안 뉴로스피어를 accutase를 포함한 단세포 현탁액에 분산시키고, 0.01% 폴리-L-라이신 및 10  $\mu\text{g/ml}$  라미닌 (Sigma-Aldrich,

MO) 상에 분주하였다. 이때, 분주 시 어떠한 성장인자도 포함되지 않지만, 2% B27로 보강되었다. DMSO로 처리된 세포는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양되었으며, 그 후 4일 동안 세포 분화를 판단하였다.

[0080] 2. 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 유래 신경줄기세포(NSC) 배양

[0081] 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 유래 신경줄기세포(NSC)를 이용하여 실시예에 따른 화합물들이 정상세포 분화를 유도하는지 여부를 확인하였다.

[0082] 이때, 상기 NSC(200,000/ml)는 2% B27(Invitrogen), 20 ng/ml EGF(Chemicon, CA), 및 20 ng/ml FGF-2(Chemicon, CA)로 보강된 DMEM/F12 배지(Gibco, Carlsbad, CA)에서 7일 동안 뉴로스피어(neurosphere)로 성장시켰다. 이때, 상기 배지는 이틀에 한번 교체하였다. 분화를 위하여, 37℃에서 10분 동안 뉴로스피어를 accutase를 포함한 단세포 현탁액에 분산시키고, 0.01% 폴리-L-라이신 및 10 µg/ml 라미닌(Sigma-Aldrich, MO) 상에 분주하였다. 이때, 분주 시 어떠한 성장인자도 포함되지 않지만, 2% B27로 보강되었다. DMSO로 처리된 세포는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양되었으며, 그 후 4일 동안 세포 분화를 판단하였다.

[0083] 3. 면역염색 분석

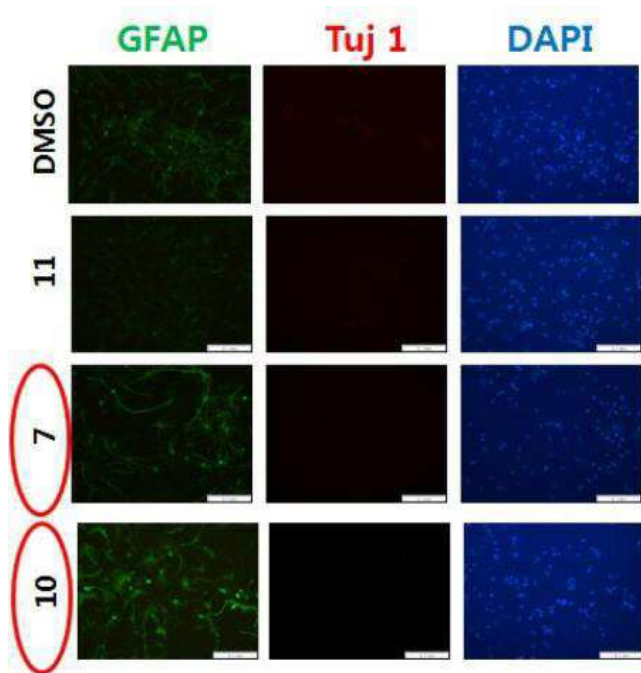
[0084] 면역염색 분석을 위하여, 앞서 얻어진 세포 배양물을 4% 파라포름알데히드에서 30분 동안 고정시키고 인산 완충액(PBS)으로 세정하였다. 고정된 세포를 5% 정상 염소 혈청 및 PBS에 용해된 0.2% 트리톤 X-100으로 브로킹하였으며, β-튜블린 III (TuJ1)(모노클로날; 1:1,000; Sigma-Aldrich, MO), 신경교섬유질산성단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP) (폴리클로날; 1:1,000; Dako, Carpinteria, CA)에 대한 제1항체와 배양하였다. PBS로 세정한 후, Cy3 (1:1000, Molecular Probes, CA)에 접합된 제2항체와 30분 동안 배양하였다. 핵염색으로 제2항체 배양 완료 후, 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI) (1:10,000 in PBS)을 5분 동안 첨가하였다. 역상 형광현미경(DMIL; Leica, Wetzlar)을 이용하여 이미지를 얻었다.

[0085] 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이 랫 태아 유래 신경줄기세포를 이용한 면역염색에서는 비교예에서 합성된 화합물 11보다 실시예와 같이 광학활성을 갖는 화합물 7과 화합물 10이 신경줄기세포로부터 정상세포로의 분화를 탁월하게 촉진시키는 것으로 확인되었다. 그리고, 도 2에 도시된 바와 같이 인간 유도만능 줄기세포(iPSC) 유래 신경줄기세포를 이용한 면역염색에서도 광학활성을 갖는 화합물 7과 화합물 10이 신경줄기세포로부터 정상세포로의 분화를 탁월하게 촉진시키는 것으로 확인되었다.

[0086] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2

