



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0138756  
(43) 공개일자 2016년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/44 (2006.01) A61K 31/4409 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 31/44 (2013.01)  
A61K 31/4409 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-0073016  
(22) 출원일자 2015년05월26일  
심사청구일자 2015년05월26일

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
최강열  
서울특별시 양천구 목동서로 70, 216동 902호 (목동, 목동2단지아파트)  
김미연  
인천광역시 부평구 후정동로 12, 102동 1102호 (삼산동, 인천삼산벽산블루밍)  
김영문  
서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 첨단과학관 419호  
(74) 대리인  
특허법인충현

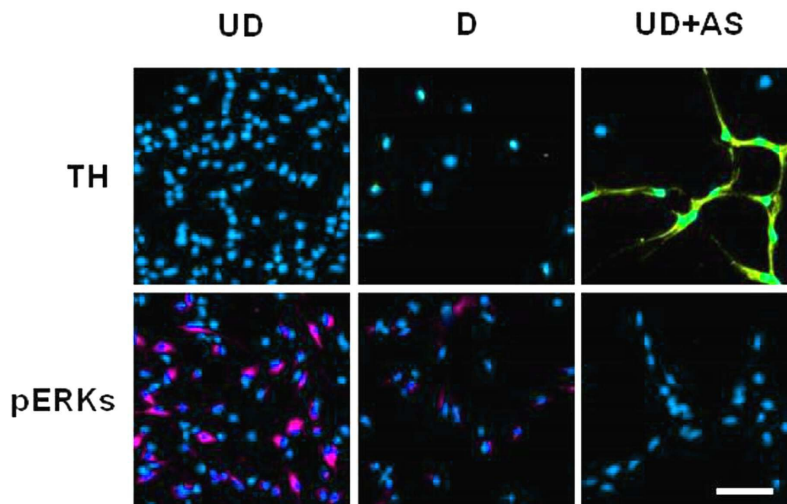
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화 유도용 조성물 및 이를 이용하여 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화시키는 방법

### (57) 요약

본 발명은 MEK1/2 저해제인 [화합식 1]로 표시되는 화합물('AS703026'라고도 한다.)을 포함하는 신경세포로부터 도파민 신경세포로의 분화유도용 조성물 및 이를 이용한 분화방법에 관한 것으로, 이를 통해 신경줄기세포로부터 분화된 도파민 신경세포는 파킨슨병 등의 신경퇴행성 질환 등을 치료하기 위한 세포 대체 요법과 유전자 치료 요법에 이용되거나 신약개발에 있어 약물효과 검증 또는 각종 연구를 위한 재료로 폭 넓게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12N 2500/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|          |  |
|----------|--|
| 과제고유번호   | 2010-0020235                               |
| 부처명      | 미래창조과학부                                    |
| 연구관리전문기관 | 한국연구재단                                     |
| 연구사업명    | 바이오 · 의료기술개발                               |
| 연구과제명    | Wnt와 Ras-ERK 신호전달계 조절을 통한 신경줄기세포 분화와 증식 제어 |
| 기 여 율    | 1/2  |
| 주관기관     | 연세대학교 산학협력단                                |
| 연구기간     | 2014.06.01 ~ 2015.06.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업  |
| 과제고유번호   | 2009-0083522                               |
| 부처명      | 미래창조과학부                                    |
| 연구관리전문기관 | 한국연구재단                                     |
| 연구사업명    | 선도연구센터지원사업                                 |
| 연구과제명    | ERC/단백질기능제어이행연구센터                          |
| 기 여 율    | 1/2  |
| 주관기관     | 연세대학교 산학협력단                                |
| 연구기간     | 2015.03.01 ~ 2016.02.28                    |

---

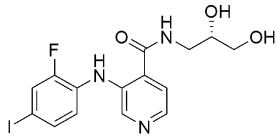
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화 유도용 조성물.

[화학식 1]



#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 0.1 내지 20  $\mu\text{M}$  농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 분화 유도용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 1 내지 10  $\mu\text{M}$  농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 분화 유도용 조성물.

#### 청구항 4

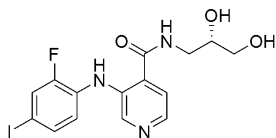
제1항에 있어서,

상기 분화 유도용 조성물은 신경줄기세포의 암세포적 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 분화 유도용 조성물.

#### 청구항 5

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 이용하여 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화시키는 방법.

[화학식 1]



#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 분화시키는 방법은 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물에 신경줄기세포를 접종한 후, 분화완료까지 1 일 내지 7 일 간 소모되는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화시키는 분화 유도 방법.

#### 청구항 7

제1항에 따른 분화 유도용 조성물 및 신경줄기세포를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

## 발명의 설명

## 기술분야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화를 유도하는 분화유도용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포의 사멸 없이 다른 뇌세포로 분화되는 것은 방지하면서, 도파민 신경세포로의 분화만을 유도할 수 있는 것을 특징으로 하는 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 분화 유도 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

[0002] 일반적으로, 신경퇴행성 질환들 중에서 특히 파킨슨병은 노인성 치매 다음으로 가장 흔한 퇴행성 질환으로, 주로 노인층이 많이 걸리는데, 사회의 노령화에 따라 그 환자수도 기하급수적으로 늘어나고 있다. 이에 병의 진행을 중단시키거나, 손상된 뇌조직을 회복시키기 위한 여러 치료법의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다.

[0003] 아직까지 파킨슨병에 대한 확실한 원인은 규명되지 못했으나, 뇌의 흑질(substantia nigra) 부분에 존재하는 도파민을 분비하는 도파민 뉴런 세포가 파괴되어 발생하는 병으로, 부족해진 도파민으로 인해 뇌의 운동회로가 망가지게 되어 파킨슨병의 다양한 증상을 야기하게 된다.

[0004] 이를 치료하기 위해 다양한 분야에서 연구가 이루어졌고, 현재 가능성이 제시된 치료방법은 몇 가지 유사 약물을 이용한 약물치료와 뇌심부자극술(deep-brain stimulation) 등과 같은 수술에 의한 인위적인 신경세포 자극 방법들이 있으나, 약물치료는 단기적이며 지속적인 투여에 의한 부작용으로 적용이 쉽지 않고 수술적 용법은 신체적, 경제적 부담이 많으며, 일시적으로 증상을 완화시키는 것 이상의 치료효과를 기대하기 어렵다는 문제점이 있어, 대체치료법이 절대적으로 필요하다.

[0005] 이러한 신경퇴행성 질환에서 소실된 신경세포를 대체할 수 있는 치료방법은 유전자 요법 또는 세포이식이 있지만, 뇌신경조직은 손상시 스스로의 재건이 상당히 제한되어 있으므로, 현재까지 이들 질환에 대한 효과적인 치료법은 없는 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0519227호

## 발명의 내용

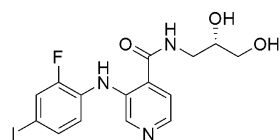
### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 신경줄기세포로부터 특이적으로 도파민 신경세포로의 분화만을 유도할 수 있는 분화 유도용 조성물 및 이를 이용하여 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화시키는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 대표적인 일 측면에 따르면, 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화 유도용 조성물에 관한 것이다.

[0009] [화학식 1]



[0010]

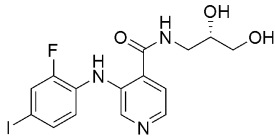
[0011] 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 0.1 내지 20  $\mu$ M 농도로 포함될 수 있다.

[0012] 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 1 내지 10  $\mu$ M 농도로 포함될 수 있다.

[0013] 상기 조성물은 신경줄기세포의 암세포적 성장 억제를 수반하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 다른 대표적인 일 측면에 따르면, 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 이용하여 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

[0015] [화학식 1]



[0016]

[0017] 상기 분화시키는 방법은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물에 신경줄기세포를 접종한 후, 분화완료까지 1 일 내지 7 일 간 소모될 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 대표적인 일 측면에 따르면, 상기 분화 유도용 조성물 및 신경줄기세포를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 발명의 효과

[0019] 본 발명의 MEK1/2 저해제로 사용되던 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화 유도용 조성물 및 이를 이용한 분화 유도 방법을 통해 신경줄기세포로부터 분화된 도파민 신경세포는 파킨슨병 등의 신경퇴행성 질환 등을 치료하기 위한 세포 대체 요법과 유전자 치료 요법에 이용되거나 신약개발에 있어 약물효과 검증 또는 각종 연구를 위한 재료로 폭 넓게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화됨;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D) 및 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)의 신경세포 분화 유도능을 확인하기 위한, 신경세포 분화인자에 대한 발현여부를 확인한 RT-PCR 분석 결과 및 신경세포 마커의 면역조직화학분석 결과를 나타낸 것이다.

도 2 및 도 3은 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화됨;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D) 및 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)의 세포주기를 확인하기 위하여 유세포 분석결과를 나타낸 것이다. 도 2는 PI로 염색한 후 분석하여 히스토그램으로 나타낸 것이고, 도 3은 annexin-V/PI로 염색한 후 분석하여 점도표로 나타낸 것이다.

도 4 및 도 5는 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화되었는지 여부를 확인하기 위하여 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화됨;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D) 및 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)의 면역블롯 분석결과(도4) 및 면역세포화학 분석결과(도5)를 나타낸 것이다.

도 6은 AS703026을 포함하는 분화 유도용 조성물의 도파민 신경세포 치료효과를 관찰하기 위하여, 배아 10.5일 임신한 모델 쥐의 복강에 4 일간 AS703026을 포함하는 분화 유도용 조성물을 투여한 후와 배아 10.5일 임신한 모델 쥐의 복강에 4 일간 아무것도 투여하지 않은 후(대조군)의 희생된 배아에서 도파민 신경세포가 가장 많이 분포하고 있는 중뇌의 복면(ventral midbrain) 부분을 채취하여, 표시인자 발현 정도를 신경세포 마커의 면역조직화학으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 AS703026을 포함하는 분화 유도용 조성물의 도파민 신경세포 치료효과를 관찰하기 위하여, 배아 10.5일 임신한 모델 쥐의 복강에 4 일간 AS703026을 포함하는 분화 유도용 조성물을 투여한 후와 배아 10.5일 임신한 모델 쥐의 복강에 4 일간 아무것도 투여하지 않은 후(대조군)의 희생된 배아에서 도파민 신경세포가 가장 많이 분포하고 있는 중뇌의 복면(ventral midbrain) 부분을 채취하여, 표시인자 발현 정도를 분석한 RT-PCR 결과를 나타낸 것이다.

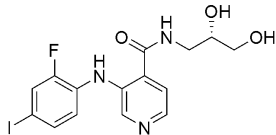
### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.

[0022] 본 발명에서 용어, "분화(differentiation)"란 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상을 의미한다.

[0023] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 [화학적 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 신경줄기세포로부터 도파민 신경 세포로의 분화 유도용 조성물이 개시된다.

### 화학적 1



[0024]

[0025] 본 발명에서 제안하고 있는 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물의 MEK1/2 저해제를 제외한, 다른 MEK1/2 저해제의 경우 도파민 신경세포로의 분화를 유도할 수 없거나, 세포독성을 일으켜 도파민 신경세포로 분화되기 전에 세포가 사멸하는 것을 확인하였다. 구체적으로 대표적인 MEK1/2 저해제인 PD98059는 MEK1 저해제로, MEK2는 저해하지 못하기 때문에 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화가 거의 이뤄지지 않는 문제가 있고, MEK1 및 MEK2의 저해제인 U0126은 세포독성을 유발하여 신경줄기세포가 도파민 신경세포로 분화되기 전에 세포가 사멸하는 문제가 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물은 MEK1/2 저해제인 AS703026로, 상기 용어 "MEK1/2 억제제"는 MEK/ERK(mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase) 신호전달과정을 중 ERK1/2의 상위 단계(upstream) 분자인 MEK1/2를 표적으로 하는 물질들(예를 들어, PD98059(MEK1 저해제), U0126)을 의미한다.

[0027] 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물은 N-[(2S)-2,3-다하이드록시프로필]-3-[(2-플루오르-4-요도페닐)아미노]이소니코틴아마이드 하이드로클로라이드(N-[(2S)-2,3-dihydroxypropyl]-3-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]isonicotinamide hydrochloride)의 저분자 화합물이다.

[0028] 본 발명에서 발명자들은 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물은 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화를 유도하기 위한 용도로 전혀 사용된 적이 없는 물질로, 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물은 상술한 바와 같이, MEK1/2 저해제로 알려져 있을 뿐, 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물이 신경줄기세포의 분화에 구체적으로 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

[0029] 그러나 본 발명에서 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물이 ATP-non competitive binding을 통하여 MEK1과 MEK2 모두에 대한 활성을 저해하고 있으므로, 세포독성 및 세포 사멸 없이 신경줄기세포를 도파민 신경세포에 대해서만 특이적으로 분화되도록 유도하는 것을 확인하였다.

[0030] 특히, 마우스 배아(E10.5)에서 분리된 신경줄기세포를 도파민 신경세포로의 분화를 유도하면서, 다른 세포로의 분화는 저해하고, 암세포적 성장은 억제한다는 것을 확인하였다.

[0031] 본 발명의 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화유도용 조성물에 있어서, 상기 신경줄기세포는 신경세포로 분화될 수 있는 미분화세포로, 뉴런, 성상세포 및 희소돌기 아교세포로 분화할 수 있는 신경세포의 분화 초기단계의 세포로, 동물로부터 유래된 것일 수 있다.

[0032] 이때, 동물이란 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개, 쥐, 랫트 및 고양이 등의 가축을 포함하며, 바람직하게는 인간이다.

[0033] 상기 분화 유도용 조성물은 상기 [화학적 1]로 표시되는 화합물외에 당업자에게 공지된 배지 조성 성분을 추가적으로 함유할 수 있다. 구체적으로 본 발명의 분화 유도용 조성물은 무혈청 배지 조성 성분이면 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 Dulbecco's Modified Eagles's Medium/Nutrient Mixture F12(DMEM/F12)(1:1)를 사용할 수 있다.

[0034] 또한, 상기 분화 유도용 조성물은 90-110  $\mu$ M 푸트레신(putrescine), 20-40 nM 셀레나이트(selenite), 10-30 nM 프로그스테론(progesterone), 1.0-2.0 mg/ml 글루코오스(d-+)-glucose), 20-30  $\mu$ g/ml 인슐린(insulin), 0.05-0.2  $\mu$ g/ml 아포-트랜스페린(apo-transferrin), 0.3-0.6 mM 알라닐글루타민(alanyl glutamine), 50-150 IU/ml 페니실린(penicillin) 및 50-150  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)로 이루어진 군으로부터 선택된 어

는 하나 이상의 배지 조성 성분을 더 함유할 수 있다.

[0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서 발명자들은 동물의 신경줄기세포를 이용하여, 이를 도파민 신경세포로 분화시키기 위한 최적화된 상기 분화 유도용 조성물을 확립하고자 한 바, 본 발명에 따른 상기 분화 유도용 조성물은 성장한 마우스 배아에서 분리한 신경줄기세포를 특이적으로 도파민 신경세포로 분화되도록 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0036] 아울러 본 발명에 따른 분화 유도용 조성물을 이용하지 않고, 종래 신경줄기세포를 분화시킨 경우, 도파민 신경세포의 표지인자인 TH와 TuJ1의 발현정도가 약 10배 이상 낮은 것을 확인하였으며, 다른 뇌 세포의 표지인자의 발현정도가 더 높아, 도파민 신경세포 외에 다른 세포로 더 많이 분화되었음을 확인하였다.

[0037] 또한, 본 발명의 분화 유도용 조성물에서 상기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물은 신경줄기세포에서 MEK1/2를 모두 억제하여 세포 독성 없이 도파민 신경세포로의 분화만을 촉진하며, 다른 종류의 세포로는 분화를 유도하지 않기 때문에, 저 농도의 상기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물로도 다량의 도파민 신경세포를 생산할 수 있다는 점에서, 상기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물은 파킨슨병 등의 치료제 개발 및 생산에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

[0038] 즉, 본 발명의 분화 유도용 조성물에서 상기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물은 MEK1/2 저해제(inhibitor)로써 아직까지 암 환자를 대상으로 한 임상 2상 시험까지 사용된 바 있는 약물로, 신경계에서는 전혀 사용된 바가 없다.

[0039] 따라서 본 발명에서는 이를 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화 유도용 조성물에 포함시킴으로써, 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포만을 특이적으로 분화 유도하는 효과를 갖는 본 발명을 완성하였다.

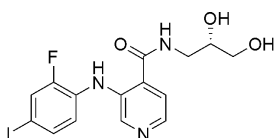
[0040] 상기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물은 신경줄기세포 내의 MEK/ERK 신호전달계를 억제하고, 특이적으로 도파민 신경세포로의 분화를 유도한다. 특히 이 조성물이 신경줄기세포의 도파민 신경세포로의 분화 과정에 있어, 세포의 사멸 없이 다른 뇌 세포인 성상세포(astrocyte)나 희소돌기 아교세포(oligodendrocyte)로의 분화는 유도하지 않고 있기 때문에, 이를 치료에 이용할 경우, 종래 신경줄기세포의 배양액을 활용한 치료에서 발생하던 부작용들을 줄일 수 있다.

[0041] 즉, 본 발명의 분화 유도용 조성물은 EGFR→Ras→Raf-1→MEK→ERK 경로에 관여하여 증식의 저해에 의해 도파민 신경세포로의 분화를 유도하기 때문에, 암세포적인 성장을 야기하지 않으면서도 원하는 도파민 신경세포만으로 분화되도록 유도할 수 있다. 따라서 치료용 도파민 신경세포의 생산에 매우 유용하다.

[0042] 또한 본 발명의 구체적인 실시예에서 본 발명자들은 상기 분화 유도용 조성물을 실제 in vivo(인 비보) 실험에서 도파민 신경세포의 분화를 유도할 수 있는지 확인하고자, 임신한 모델 쥐의 복강에 본 발명의 분화 유도용 조성물을 투여한 결과 도파민 신경세포의 농도가 증가하며, 투여하지 않은 임신한 모델 쥐의 배아의 뇌 부분에서는 도파민 신경세포가 2 배 이상 낮은 것을 확인하였다(도 6, 7 참조)

[0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면 본 발명은 하기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 이용하여 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화시키는 방법을 개시한다.

[0044] [화학적식 1]



[0045]

[0046] 본 발명자들은 신경줄기세포 분화 시에 도파민 신경세포로 분화되도록 유도할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과 MEK1/2 저해제로 사용되는 상기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 상기 신경줄기세포에 처리하는 경우, 다른 뇌 세포로의 분화는 방지하면서 도파민 신경세포로의 분화는 유도하므로 특이적으로 도파민 신경세포만을 효과적으로 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0047] 상기 신경줄기세포는 공지된 방법에 따라 배아 줄기세포로부터 분리하여 사용할 수 있고, 시판되는 제품을 구입하여 사용하거나, 통상적인 배양방법에 따라 배양하여 사용할 수 있으며, 이는 특별히 한정되지 않는다. 다만



본 발명의 실시예에서는 상기 신경줄기세포로 마우스 배아 14.5의 전두엽에서 분리한 것을 사용하였다.

- [0048] 상기 신경줄기세포를 분화하기 이전에 배양 배지에 접종하고 35 내지 40 °C에서 배양할 수 있다. 상기 신경줄기세포를 배양하기 위한 배지로는 성장인자를 포함하는 무혈청 배지 조성 성분이면 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 성장인자를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagles's Medium/Nutrient Mixture F12(DMEM/F12)(1:1)를 사용할 수 있다.
- [0049] 또한, 상기 분화 유도용 조성물은 90-110 μM 푸트레신(putrescine), 20-40 nM 셀레나이트(selenite), 10-30 nM 프로게스테론(progesterone), 1.0-2.0 mg/ml 글루코오스(d-+)-glucose), 20-30 μg/ml 인슐린(insulin), 0.05-0.2 μg/ml 아포-트랜스페린(apo-transferrin), 0.3-0.6 mM 알라닐글루타민(alanyl glutamine), 50-150 IU/ml 페니실린(penicillin) 및 50-150 μg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 배지 조성 성분을 더 함유할 수 있다.
- [0050] 상기 성장인자는 10-30 ng/ml bFGF, 10-30 ng/ml EGF 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0051] 상기 신경줄기세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (1:1), 100 μM 푸트레신(putrescine), 30 nM 셀레나이트(selenite), 20 nM 프로게스테론(progesterone), 1.55 mg/ml 글루코오스(d-+)-glucose), 25 μg/ml 인슐린(insulin), 0.1 μg/ml 아포-트랜스페린(apo-transferrin), 0.5 mM 알라닐글루타민(alanyl glutamine), 100 IU/ml 페니실린(penicillin), 100 μg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 조성 성분으로 포함하는 배지에 배양함으로써, 미분화된 신경줄기세포를 얻을 수 있다.
- [0052] 상기 신경줄기세포는 신경세포로 분화될 수 있는 미분화세포로, 신경세포, 성상세포 및 희소돌기 아교세포(oligodendrocyte)로 분화할 수 있는 신경세포의 분화 초기단계의 세포로, 동물로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0053] 이때, 동물이란 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개, 쥐, 랫트 및 고양이 등의 가축을 포함하며, 바람직하게는 인간이다.
- [0054] 상기 배양된 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화하는 것은, 상기 신경줄기세포를 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물에 접종하고, 당업자에게 공지된 방법에 따라 분화시키는 것을 말한다. 특별히 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 상기 신경줄기세포를 본 발명의 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물에 직접 접종하거나 신경줄기세포가 배양된 배지에 본 발명의 분화 유도용 조성물을 첨가하여 35 내지 40 °C에서 분화를 유도할 수 있다.
- [0055] 상기 신경줄기세포는 상기의 다양한 배양조건(배지의 성분, 상기 성분들의 함량, 배양 기간 등)에 따른 분화과정을 거쳐 도파민 신경세포로 분화되는데, 상기 배양 조건은 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게 상기 배양 조건은 35 내지 40 °C에서 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화를 유도할 수 있다. 만약 상기 배양 조건이 35 °C 미만이거나 40 °C를 초과하게 되면 신경줄기세포가 도파민 신경세포로 분화되기 이전에 사멸하는 문제가 발생한다.
- [0056] 또한, 상기 신경줄기세포는 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 첨가하기 이전에 세포농도를 충분히 확보하거나, 세포의 이상여부를 검출하기 위하여 7 일 이하의 배양기간 내에, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 상술한 방법으로 처리하는 것이 바람직한데, 상기 신경줄기세포의 배양기간은 세포농도를 충분히 확보하기 위하여 최소 0.5 일 최대 7 일 이하의 배양기간인 것이 더욱 바람직하다.
- [0057] 일반적으로 상기 신경줄기세포는 배양기간 동안 쉽게 분화되려는 특성을 가지고 있으므로, 이를 본 발명의 분화 유도용 조성물을 첨가하기 이전까지 미분화상태로 유지시키고자, bFGF 또는 EGF를 인위적으로 처리하여 분화능을 억제한 상태이다.
- [0058] 따라서 상기 신경줄기세포의 배양기간이 7 일을 초과하여 본 발명의 분화 유도용 조성물을 첨가하는 경우에는, 완전히 분화능이 억제되지 않은 일부 신경줄기세포가 이미 다른 뇌세포로 분화되어 불순물로 존재하게 되므로, 상기 분화 유도용 조성물을 첨가하여도 높은 수율로 도파민 신경세포를 얻을 수 없다는 문제가 있다.
- [0059] 즉, 7 일 이하의 배양기간 내에, 상기 신경줄기세포에 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 상술한 방법으로 처리하는 것이 바람직하다.
- [0060] 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 신경줄기세포에서 세포의 증식과 생존에 관여하는 대표적인 경로인 RAS-



RAF-MEK-ERK 신호전달경로 중에서 MEK 경로에 작용하는 MEK1/2를 모두 억제함으로써, 세포에 작용하기 때문에, 도파민 신경세포로 분화되도록 유도할 수 있고, 암세포적인 성장을 야기하지 않으면서도 원하는 도파민 신경세포만으로 분화되도록 유도할 수 있다. 따라서 저 농도의 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물을 포함하여도 치료용 도파민 신경세포를 다량 생산할 수 있다.

[0061] 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물은 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 것으로, 이를 이용하여 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화시키기 위해서는, 상기 분화 유도용 조성물에서 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물이 0.1 내지 20  $\mu\text{M}$  농도로 포함되는 것을 특징으로 하는데, 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물이 0.1  $\mu\text{M}$  미만이면 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화유도 성능이 저하되어 다른 세포로의 분화가 유도되는 문제가 발생하고 20  $\mu\text{M}$  초과하면 세포 독성을 나타낸 문제가 발생한다.

[0062] 더욱 바람직하게는 하기 실시예에서 후술하겠지만, 상기 분화 유도용 조성물에서 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물이 1 내지 10  $\mu\text{M}$  농도로 포함되는 것일 수 있는데, 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물이 1  $\mu\text{M}$  농도 미만이면 다른 세포로의 분화는 유도되지 않으나, 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화되는데 소모되는 시간이 길어져 비경제적인 문제가 있고, 10  $\mu\text{M}$ 을 초과하게 되면 유효성분인 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물이 과량으로 첨가되기 때문에, 추후 생체 내에 투여될 시 세포 내 여러 신호전달경로에 영향을 미치는 MEK1/2 저해효과가 커지게 되어 원하지 않는 반응이 유도될 수 있으며, MEK1/2 저해효과로 인해 암세포의 형성을 억제하는 특성이 일반 세포에도 적용되는 문제가 발생할 수 있다.

[0063] 상기 신경줄기세포 배양액에 MEK1/2 저해제인 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화 유도용 조성물을 첨가한 후, 분화완료까지 1 일 내지 7 일 간 소모되는 것을 특징으로 하는데, 바람직하게는 약 3 내지 5 일이 소모되므로 임상 치료에 효율적으로 이용될 수 있다.

[0064] 아울러 본 발명의 방법에 따라 분화를 유도한 마우스 신경줄기세포 중 75% 이상이 도파민 신경세포로 분화되었고, 이는 본 발명의 분화 유도용 조성물을 첨가하지 않은 마우스 신경줄기세포의 분화상태에 비해서 약 45~50% 이상 더 많이 도파민 신경세포로 분화된 것으로, 본 발명의 방법에 따라 분화를 유도할 경우, 도파민 신경세포에 대해 특이적이고 현저히 우수한 분화유도 특성을 나타내고 있음을 알 수 있다.

[0065] 또한, 배아 10.5일 임신한 모델 쥐의 복강에 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 분화 유도용 조성물을 투여한 결과가 투여하지 않은 결과보다 희생된 배아의 뇌 부분에서 약 2배 이상 증가된 도파민 신경세포가 형성되어 있다는 것을 확인하였고, 이로부터 본 발명의 분화 방법에 의해 신경줄기세포가 도파민 신경세포로 완벽히 분화된다는 것을 알 수 있다.

[0066] 또한 본 발명의 분화 유도용 조성물은 EGFR→Ras→Raf-1→MEK→ERK 경로에 관여하여 증식의 저해에 의해 도파민 신경세포로의 분화를 유도하기 때문에, 암세포적인 성장을 야기하지 않으면서도 원하는 도파민 신경세포만으로 분화되도록 유도할 수 있다. 따라서 치료용 도파민 신경세포의 생산에 매우 유용하다.

[0067] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 분화 유도용 조성물 및 신경줄기세포를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방용 약학적 조성물을 개시한다.

[0068] 상기 도파민 신경세포와 관련된 질환은 선천적 또는 후천적으로 도파민 신경세포의 손상 또는 소실에 의해 발생한 질환이면 특별히 이에 제한되지 않고 포함될 수 있고, 바람직하게는 파킨슨병일 수 있다.

[0069] 본 발명에서 상기 예방 또는 치료용 조성물은 상기 분화 유도용 조성물과 신경줄기세포를 유효성분으로 포함하는 것으로, 이를 상기 질환을 갖는 환자에 투여하면, 체외에서 도파민 신경세포의 분화가 유도되어 도파민 신경세포가 대량 증식 및 분화되어 투여 즉, 분화가 완료된 도파민 신경세포뿐만 아니라, 분화 중인 도파민 신경세포 전구체 또는 신경줄기세포가 환자의 인체 내에 투여되고, 이후, 인체 내의 인자들의 영향을 받아 분화가 완료되면서 신경세포가 손상 및 손실된 부위에 적용되므로 치료의 효과를 나타낼 수 있다.

[0070] 본 발명의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 암세포적 성장을 억제하는 상기 [화합식 1]로 표시되는 화합물을 포함하고 있기 때문에, 신경줄기세포와 혼합하여 분화를 위한 배양을 하지 않아도 바로 환자의 인체 내에 투여할 수 있다.

[0071] 아울러 본 발명의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 도파민 신경세포만을 특이적으로 분화하기 때문에, 분화 유도용 조성물 및 신경줄기세포를 집중하고 분화한 후, 별도의 정제공정이 요구되지 않으므로, 신경줄기세포와

혼합하여 분화를 위한 배양을 하지 않아도 바로 환자의 인체 내에 투여할 수 있다.

- [0072] 본 발명의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 이식시 면역 거부 반응이 일어나지 않도록 면역반응 억제제를 추가할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 당업계에 일반적인 제형 예컨대 주사제의 형태로 제조될 수 있으며, 외과수술적으로 뇌의 중뇌부위에 직접 이식할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 치료용 조성물의 투여량은 환자의 중합 정도, 투여 경로, 투여 방법, 투여 횟수, 치료기간 환자의 나이 및 성, 및 질병의 정도에 따라 변할 수 있으며, 이는 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0075] 상기 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 바람직한 투여용량으로는 0.5 내지 20 mg/day로 투여될 수 있다.
- [0076] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.
- [0077] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

## [0078] 실시예 1

### [0079] 1) 마우스 신경줄기세포 배양

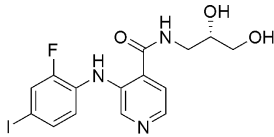
- [0080] 마우스 배아 14.5일의 뇌에서 신경줄기세포를 분리하여 N2 배양 배지(medium)에 10 ng/ml 염기성 섬유아세포 성장인자(human basic fibroblast growth factor, bFGF)(Peprotech, Princeton, NJ)와 20 ng/ml 인간 표피 성장인자(human epidermal growth factor, EGF)(Peprotech)를 처리하고 25 cm<sup>2</sup> 플라스크(Nunc, Pittsburgh, PA)에서 4 일간 현탁액(suspension)상태로 배양하였다.
- [0081] 뉴로스피어(Neurosphere)가 형성되면 TrypLE를 처리하여 단일 세포(single cell)로 분리한 후, 15 µg/ml 폴리-L-오르니틴(poly-L-ornithine)과 10 µg/ml 파이브로넥틴(fibronectin)이 코팅되어 있는 배양접시에 골고루 세포를 잘 살포(seeding)하여 배양하여, 이 형태를 관찰하였다.
- [0082] 이때, 상기 N2 배양 배지의 성분은 다음과 같다.
- [0083] Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (1:1), 100 µM 푸트레신(putrescine), 30 nM 셀레나이트(selenite), 20 nM 프로그스테론(progesterone), 1.55 mg/ml 글루코오스(d-+)-glucose, 25 µg/ml 인슐린(insulin), 0.1 µg/ml 아포-트랜스페린(apo-transferrin), 0.5 mM 알라닐글루타민(alanyl glutamine), 100 IU/ml 페니실린(penicillin), 100 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)

## [0084] 실시예 2. 도파민 신경세포로의 분화

- [0085] 실시예 1의 방법으로 배양된 마우스 신경줄기세포에 10 µM의 하기 [화합식 1]로 표시되는 화합물(이하, 'AS703026'이라고도 한다.)을 첨가하여 4 일 동안 배양하였다.
- [0086] 뉴로스피어(Neurosphere)가 형성되면 TrypLE를 처리하여 단일 세포(single cell)로 분리한 후, 15 µg/ml 폴리-L-오르니틴(poly-L-ornithine)과 10 µg/ml 파이브로넥틴(fibronectin)이 코팅되어 있는 배양접시에 골고루 세포를 잘 살포(seeding)하여 배양하여, 이 형태를 관찰하였다.

[0087] [화학식 1]

[0088]



[0089] **비교예 1**

[0090] 신경전구세포의 배양액에 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물(이하, 'AS703026'이라고도 한다.)을 포함하는 분화 유도용 조성물을 첨가하지 않고 분화시킨 점을 제외하고는 상기 실시예 2와 모두 동일하게 배양하였다.

[0091] **실험예 1**

[0092] 신경줄기세포가 도파민 신경세포로 분화가 유도되었는지를 확인하고자 하였다.

[0093] 이를 위하여, 신경계 세포 특이적 마커들에 대하여 real-time(RT-PCR) 분석을 수행하였다. in vitro 분화 후 4 일째, mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었고 그래프 상의 숫자는 3 회 real-time PCR 분석으로부터 각 대조군에 상대적인 mRNA 발현의 평균값을 의미한다.

[0094] 도 1은 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화된;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D) 및 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)의 신경세포 분화 유도능을 확인하기 위한, 신경세포 분화인자에 대한 발현여부를 확인한 RT-PCR 분석 결과 및 신경세포 마커의 면역조직화학분석 결과를 나타낸 것이다.

[0095] 도 1a에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화된;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D)보다 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)에서 신경세포 분화인자인 Tuj1의 발현이 최대 10 배 이상 높게 확인되었다.

[0096] 또한, AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)는 다른 뇌 세포인 성상세포(astrocyte) 분화인자인 GFAP와 희소돌기 아교세포(oligodendrocyte) 분화인자인 MBP에 대한 발현은 감소하고 있음을 알 수 있다.

[0097] 도 1b에 나타난 바와 같이, 신경세포 마커(Tuj1)의 면역조직화학분석 결과도 AS703026으로 처리한 실시예 2(UD+AS)에서 도파민 신경세포의 현저한 증가를 확인하였으며, 세포의 형태 역시 AS703026으로 처리한 실시예 2(UD+AS)에서 신경돌기(neurite)가 뻗어 나가는 도파민 신경세포 군집들의 증가를 확인할 수 있었다.

[0098] 아울러, AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)는 다른 뇌 세포인 성상세포(astrocyte) 분화인자인 GFAP와 희소돌기 아교세포(oligodendrocyte) 분화인자인 MBP에 대해서는 면역반응성이 관찰되지 않았다.

[0099] 상기 결과를 종합하면 AS703026이 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 특이적인 분화를 하도록 유도하고 있다는 것을 알 수 있고, 이는 본 발명에 따른 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화 유도하는 조성물 및 분화 방법을 통해 인간의 뇌신경계 질환 특히 파킨슨 환자치료에 이용될 수 있음을 시사한다.

[0100] **실험예 2**

[0101] 신경줄기세포 특성상 AS703026과 같은 화합물의 처리에 의해 세포독성이 유발될 수 있으므로, 이를 확인하기 위하여, 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화된;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D) 및 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)들의 세포 주기를 분석하고 이를 비교하였다.

[0102] 분석 방법은 구체적으로, 세포 주기 분석을 위하여 배양된 각 세포(실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1)들을 차가운 PBS로 2회 세척한 다음, 차가운 70% 에탄올로 30 분 동안 고정하였다. 에탄올을 원심분리에 의해 제거하고, 세포를 현탁시키고, 세포 수를 ml 당 10<sup>6</sup> 세포로 조절한 다음, 상기 세포를 PBS로 2회 세척하고, RNase 존재 하

에서 상온에서 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 요오드화프로피디움(propidium iodide; PI) 을 처리한 후 30 분 동안 배양하였다.

[0103] 최종적으로, 상기 세포를 FACS칼리버 유세포 분석기(FACS Calibur flow cytometry)(BD Biosciences, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포사멸분석을 위하여 차가운 PBS로 2회 세척한 다음, 상온에서 요오드화프로피디움(propidium iodide; PI) 및 Annexin V FITC을 처리한 후 15분 동안 배양하고 FACS 유세포 분석기로 결과를 측정하였다. 데이터는 Cell-quest FACS 분석 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다. 이의 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다. 유세포분석기에서는 PI 및 FITC 형광이 측정된다.

[0104] 도 2 및 도 3은 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화됨;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D) 및 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)의 세포주기를 확인하기 위하여 유세포 분석결과를 나타낸 것이다. 도 2는 PI로 염색한 후 분석하여 히스토그램으로 나타낸 것이고, 도 3은 annexin-V/PI로 염색한 후 분석하여 점도표로 나타낸 것이다.

[0105] 신경줄기세포의 분화는 세포주기 억류(cell cycle arrest)가 일어나면서 분화가 같이 유도되는 특성과, 저분자 화합물의 처리에 의해 세포독성이 유발되는 특성이 있으므로, 이를 확인하기 위해 신경줄기세포의 세포주기를 측정하였다.

[0106] 도 2에 나타난 바와 같이, AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)는 G0/G1 기에 세포주기가 정지하였음을 확인하였다.

[0107] 세포주기 억류가 세포 독성과 연관 있는지를 확인하기 위하여, 분석한 결과 AS703026은 세포의 사멸을 유도하지 않고 있음을 알 수 있다.

[0108] 즉, 본 발명에서와 같이 AS703026을 포함하는 분화유도용 조성물 및 이의 분화방법은 세포의 독성 없이 세포주기 억류 및 도파민 신경세포로의 분화를 유도하고 있음을 확인할 수 있다.

### [0109] 실험예 3

[0110] 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화되었는지 여부를 확인하기 위하여 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화됨;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D) 및 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)의 면역블롯 분석(immunoblot analysis) 및 면역세포화학 분석(immunocytochemical analysis)하여 비교하였다. 이의 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0111] 면역블롯 분석은 상기 세포들을 아이스-콜드 인산-완충용액 식염수(PBS)로 세척하고 1x RIPA버퍼(10 mM HEPES, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 0.01 M DTT, protease inhibitors, pH 7.9)로 라이시스(lysis)하였다. 그 세포 파쇄액을 100 °C에서 10 분간 가열하고, 10-12 % SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 걸었다. 단백질을 전기영동적으로 나이트로셀룰로스 막으로 트랜스퍼하고, TBS-Tween 20 (0.1 %, v/v)내의 5 % 탈지분유로 1 시간 블럭하였다. 웨스턴 블롯을 항-Tuj1, 항-GFAP 또는 항-MBP 항체와 계속적으로 horseradish 퍼옥시데이즈-부착된 항-레빗 또는 항-마우스 IgG 이차 항체를 사용하여 수행하였다. 단백질 밴드들은 ECL (enhanced chemiluminescence; lab made)을 사용하여 시각화하였고 LAS-3000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan)로 검출하였다.

[0112] 면역세포화학 분석은 상기 세포들을 4 % 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 상온에서 10 분간 고정한 후 PBS로 세척하고, 0. 2% Triton X-100으로 15 분간 상온에서 인큐베이션하였다. 10 % BSA로 상온에서 1 시간 블럭(blocking)한 후, anti-Tuj1(Covance, Princeton, NJ), anti-GFAP(Biogenex, San Ramon, CA), anti-MBP(Abcam), anti-Ki67(Abcam), anti-p-ERK1/2 또는 anti-TH antibodies로 4 °C에서 밤새(overnight) 인큐베이션한 다음, 2차 항체로 Alexa Fluor 488- 또는 Alexa Fluor 555-conjugated IgG secondary antibodies(Molecular Probes, Eugene, OR)를 사용하여 상온에서 1 시간 배양하였다. 이어서 1  $\mu\text{g/ml}$  4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 5 분간 배양하고, 입구를 커버(coverlip)로 봉쇄하여, 공초점 현미경(confocal microscope)으로 세포를 관찰하였다.

[0113] 도 4 및 도 5는 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화되었는지 여부를 확인하기 위하여 실시예 1의 방법으로 배양된 신경전구세포(미분화됨;UD), 비교예 1의 방법으로 배양된 분화된 세포(D) 및 AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)의 면역블롯 분석결과(도4) 및 면역세포화학 분석결과(도5)를 나타낸

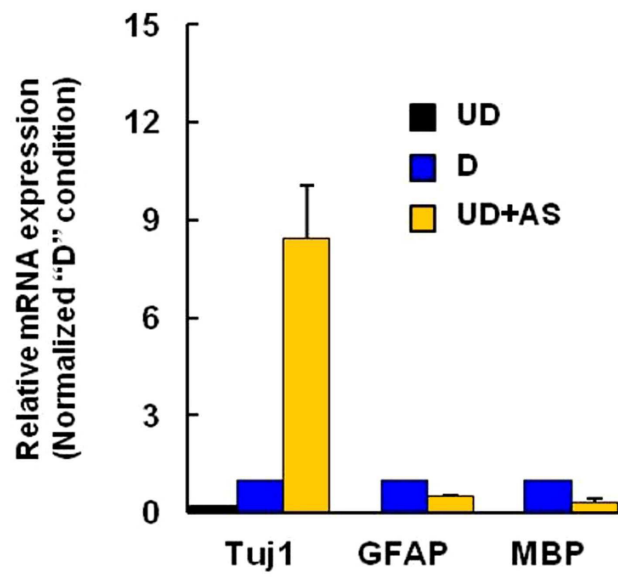
것이다.

- [0114] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)에서만 도파민 신경세포의 표지 인자인 TH(tyrosine hydroxylase)가 발현되고 있음을 확인할 수 있다.
- [0115] 즉, AS703026을 포함하는 분화유도용 조성물은 신경줄기세포의 배양액에 처리하면, 신경줄기세포로부터 다른 세포로의 분화는 방지하면서 도파민 신경세포로 효과적으로 분화를 유도할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0116] 아울러, AS703026으로 처리한 실시예 2의 방법으로 배양된 세포(UD+AS)에서 AS703026의 농도를 10  $\mu$ M 대신 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M로 처리하는 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 모두 동일하게 배양된 세포(UD+AS, 1)(UD+AS, 5)는 실시예 2의 방법으로 배양된 세포와 거의 유사한 도파민 신경세포의 표지인자(TH)의 발현이 관찰된다.
- [0117] 이를 통해 신경줄기세포로부터 도파민 신경세포의 분화유도용 조성물에서 AS703026의 농도가 신경줄기세포 배양액을 기준으로 0.5 내지 20  $\mu$ M 이면 신경줄기세포를 도파민 신경세포로 분화되도록 유도할 수 있다는 것을 알 수 있다. 보다 바람직하게는 1 내지 10  $\mu$ M일 수 있다.
- [0118] **실험예 4 in vivo 이식**
- [0119] AS703026을 포함하는 분화유도용 조성물의 도파민 신경세포 치료효과를 관찰하기 위하여, 배아 10.5일 임신한 모델 쥐의 복강에 4 일간 10 mpk(mg/kg)의 AS703026을 포함하는 분화유도용 조성물을 매일 투여한 후, 도파민 신경세포가 가장 많이 분포하고 있는 중뇌의 복면(ventral midbrain) 부분에서의 표지인자 발현 정도를 분석하였고, 이를 하기 도 6, 7에 나타내었다.
- [0120] 이때, 대조군으로 도 6, 7에 vehicle이라고 표시된 것은 배아 10.5일 임신한 모델 쥐의 복강에 4 일간 D.W(distilled water)를 동량으로 투여한 후, 도파민 신경세포가 가장 많이 분포하고 있는 중뇌의 복면(ventral midbrain) 부분에서의 표지인자 발현 정도를 분석하여 나타내었다.
- [0121] 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이 AS703026을 포함하는 분화유도용 조성물을 처리한 희생된 배아의 뇌 부분에서, 앞서 살핀 in vitro 결과에서처럼, 신경세포의 표지인자인 Tuj1과 도파민 신경세포의 표지인자인 TH의 발현이 대조군에 비해 현저히 높게 확인되었다.
- [0122] 아울러, 희생된 배아의 뇌 부분에서 분리한 단백질 및 mRNA를 RT-PCR 분석한 결과(도 7) AS703026을 포함하는 분화유도용 조성물을 처리한 희생된 배아에서 도파민 신경세포로의 분화가 증가되어 있음을 확인하였고, 다른 뇌 세포인 정상세포(astrocyte) 분화인자인 GFAP와 희소돌기 아교세포(oligodendrocyte) 분화인자인 MBP에 대해서는 면역반응성이 관찰되지 않아, 본 발명의 AS703026을 포함하는 분화유도용 조성물이 신경줄기세포로부터 다른 종류의 세포로의 분화를 유도하지 않는다는 것을 알 수 있다.

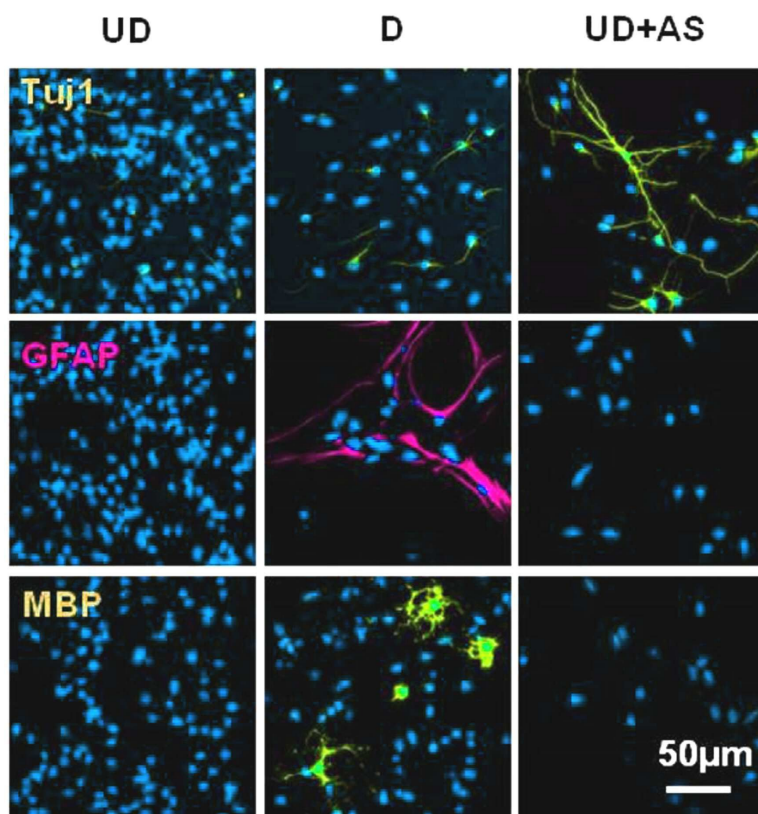


도면

도면1a

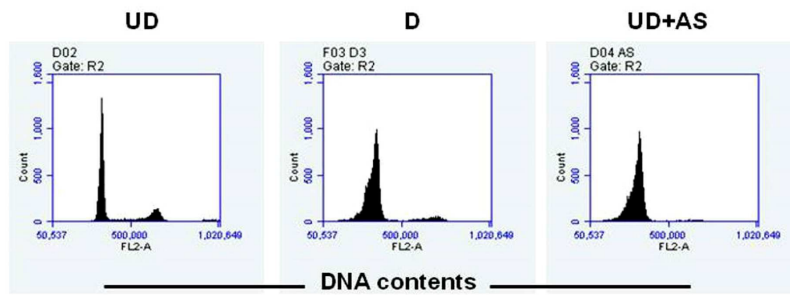


도면1b

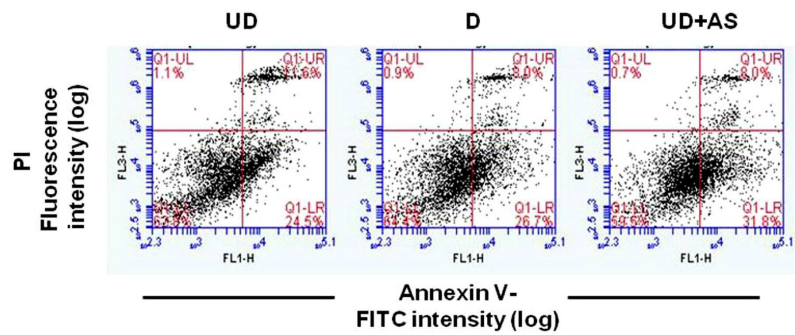




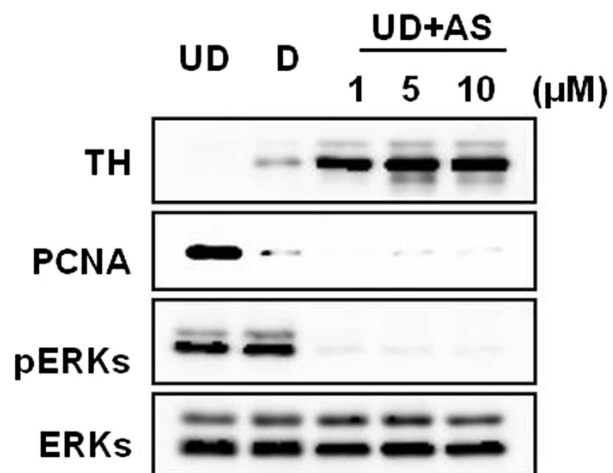
도면2



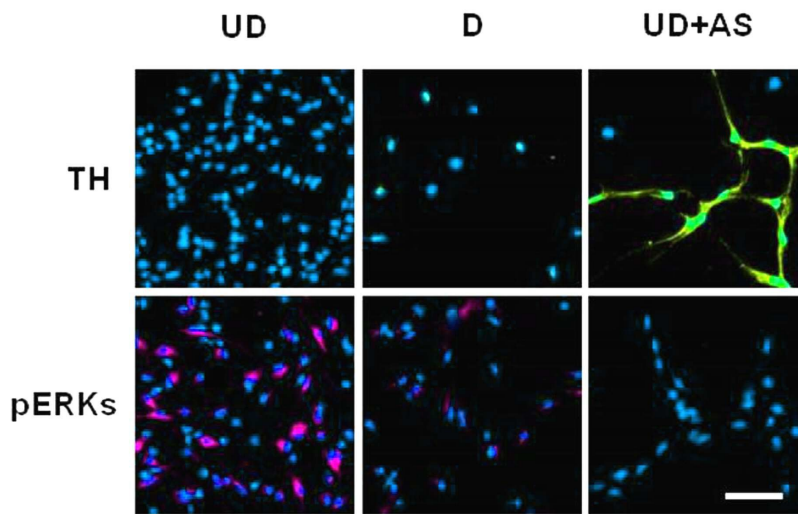
도면3



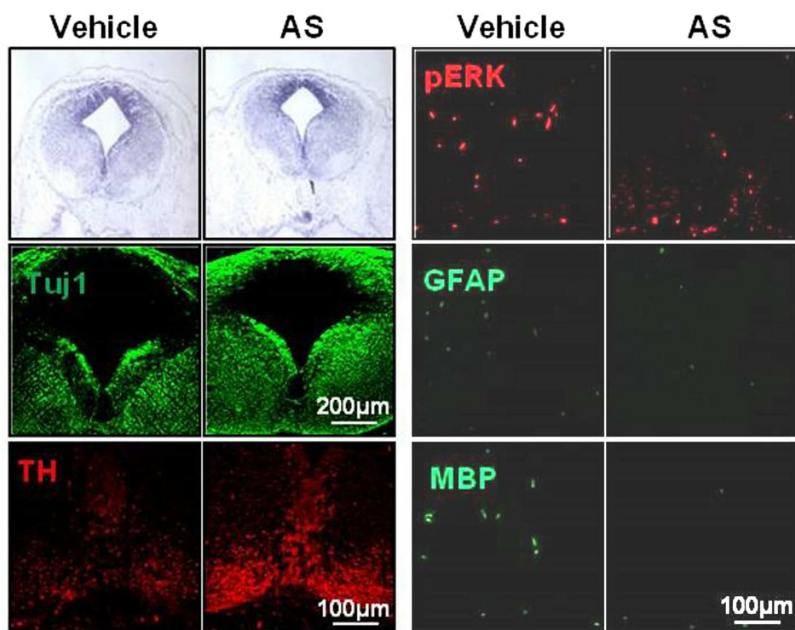
도면4



도면5



도면6



도면7

