

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0051355 (43) 공개일자 2014년04월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07D 498/04</i> (2006.01) <i>A61K 31/553</i> (2006.01) <i>A61P 25/20</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-7004807 (22) 출원일자(국제) 2012년08월22일 심사청구일자 2014년02월25일 (85) 번역문제출일자 2014년02월25일 (86) 국제출원번호 PCT/US2012/051833 (87) 국제공개번호 WO 2013/032804 국제공개일자 2013년03월07일 (30) 우선권주장 61/528,893 2011년08월30일 미국(US)	(71) 출원인 일라이 릴리 앤드 캄파니 미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포 레이트 센터 (72) 발명자 레드가드, 앤드류, 제임스 미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내 (74) 대리인 김영, 양영준

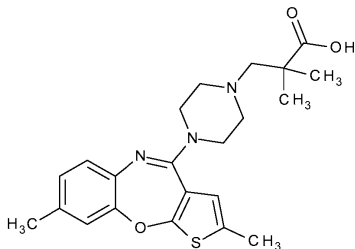
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 이중 활성 H1 역 효능제/5-HT_{2A} 길항제로서의 (티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일 화합물

(57) 요약

하기 화학식 I의 이중 H1 역 효능제/5-HT_{2A} 수용체 길항제, 그의 용도 및 그의 제조 방법이 기재되어 있다.

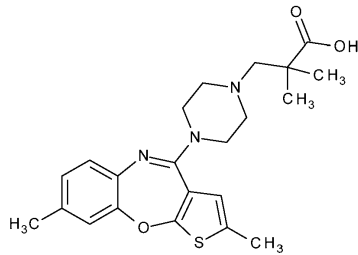
<화학식 I>



특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.



청구항 2

제1항에 있어서, HCl 염인 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 토실레이트 염인 화합물.

청구항 4

제1항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함하는 제약 조성물.

청구항 5

불면증의 치료를 필요로 하는 포유동물에게 유효량의 제1항에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 불면증을 치료하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 불면증이 수면 개시 또는 수면 유지 또는 둘 다에서의 곤란을 특징으로 하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 10

제1항에 있어서, 불면증의 치료에 사용하기 위한 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 11

제10항에 있어서, 불면증이 수면 개시 또는 수면 유지 또는 둘 다에서의 곤란을 특징으로 하는 것인 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 인간에서 사용하기 위한 화합물.

청구항 13

불면증의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서, 제1항에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도.

청구항 14

제13항에 있어서, 불면증이 포유동물에서 수면 개시 또는 수면 유지 또는 둘 다에서의 곤란을 특징으로 하는 것인 용도.

청구항 15

제1항에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 및 임의로 다른 치료 성분과 조합하여 포함하는 제약 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 다른 치료 성분이 선택적 세로토닌 재흡수 억제제를 포함하는 것인 제약 조성물.

명세서

배경기술

- [0001] 히스타민은 4종 이상의 상이한 G-단백질 커플링된 수용체인 H1-H4 수용체와의 상호작용을 통해 다양한 생리학적 과정에서 중요한 역할을 한다. CNS에서, H1 수용체는 수면 조절 주기에서 핵심적인 역할을 하고, H1 길항제/억제제는 졸림을 유발하는 것으로 알려져 있다.
- [0002] 마찬가지로, 세로토닌은 14종 이상의 상이한 G-단백질 커플링된 수용체와의 상호작용을 통해 다양한 생리학적 과정에서 중요한 역할을 한다. CNS에서 5-HT_{2A} 수용체의 조절은 수면 조절 주기에서 핵심적인 역할을 하고, 5-HT_{2A} 길항제는 불면증을 앓는 환자에서 서파 수면 및 수면 유지를 개선하는 것으로 나타났다.
- [0003] H1 또는 5-HT_{2A} 역 효능제 또는 길항제 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 각각 독세핀 및 트라조돈)은 불면증의 치료에서 사용되어 왔고 동물 수면 연구에서 유의한 약리학적 효과를 나타내었다. 그러나, 어떠한 선택적 이중 활성 H1/5-HT_{2A} 역 효능제/길항제도 현재 상업적으로 입수가능하지 않다.
- [0004] WO 2007/022068에는 수면 장애를 치료하기 위한 특정의 치환된 (티에노[2,3-b][1,5]벤조디아제핀-4-일)피페라진-1-일 및 (티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일 화합물이 기재되어 있다.

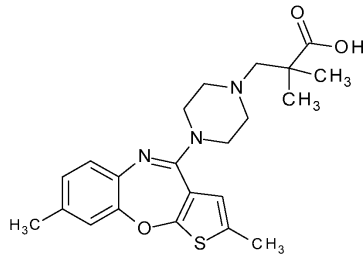
발명의 내용

- [0005] 본 발명은 H1 수용체에 대한 높은 역 효능제 효력, 5-HT_{2A} 수용체에 대한 높은 길항제 효력, 및 이들 수용체에 대한, 특히 다른 히스타민 수용체, 세로토닌 수용체 및 다른 생리학상 관련 수용체에 비해, 특히 5-HT_{2C} 수용체, GABA_A 수용체, 무스카린성 수용체, 도파민성 수용체, 아드레날린성 수용체 및 hERG 채널에 비해 우수한 선택성을 갖는 3-[4-(2,8-디메틸-티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산 및 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 이들 화합물은 또한 이들이 불량한 수면 유지를 특징으로 하는 수면 장애의 치료에 유용할 수 있다는 것을 동물 모델을 통해 보여준다. 그와 같이, 상기 화합물은 불량한 수면 잠복기 또는 불량한 수면 유지 또는 둘 다를 특징으로 하는 수면 장애의 치료, 예컨대 불면증, 예를 들어 만성 또는 일과성 원발성 불면증, 또는 만성 또는 일과성 속발성 불면증, 또는 둘 다의 치료에 유용한 것으로 여겨진다. 속발성 불면증의 예는 우울 장애 (예를 들어, 주요 우울 장애, 기분저하증 및/또는 순환기질)와 연관된 불면증, 불안 장애 (예를 들어, 범불안 장애 및/또는 사회 공포증)와 연관된 불면증, 통증 (예를 들어, 섬유근육통, 만성 골통 또는 관절통, 예컨대 염증성 관절염 또는 골관절염과 연관된 것, 또는 당뇨병성 신경병증성 통증)과 연관된 불면증, 알레르기 반응 (예를 들어, 알레르기성 천식, 소양증, 비염, 유행성 등)과 연관된 불면증, 폐 또는 기도 장애 (예를 들어, 폐쇄성 수면 무호흡, 반응성 기도 질환 등)와 연관된 불면증, 정신 장애, 치매 및/또는 신경변성 질환과 연관된 불면증, 및/또는 일주기 리듬 수면 장애 (예를 들어, 교대 근무 수면 장애, 시차 장애, 지연성 수면 위상 장애, 진행성 수면 위상 장애 및 비-24시간 수면-각성 증후군 등)와 관련된 불면증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0006] 추가로, 본 발명의 화합물은 선택적 세로토닌 재흡수 억제제와 공투여될 때 비-급속 안구 운동 수면 (NREM 수면)에 대한 그의 효과의 강화를 나타낸다.

[0007] 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

[0008] <화학식 I>



[0009]

[0010] 이것은 다시 말해, 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸프로판산 또는 그의 제약상 허용되는 염이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면에서, 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 추가로, 본 발명의 이러한 측면은 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제와 조합하여 포함하는, 불면증, 예를 들어 연장된 수면 잠복기 또는 불량한 수면 유지 또는 둘 다를 특징으로 하는 불면증, 예를 들어 원발성 불면증, 시차, 교대 근무 수면 장애, 지연성 수면 위상 장애, 진행성 수면 위상 장애 및/또는 비-24시간 수면-각성 장애를 치료하기 위한 제약 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 이러한 측면의 추가 실시양태는 화학식 I에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제, 및 임의로 다른 치료 성분과 조합하여 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명의 이러한 측면의 추가 실시양태에서, 제약 조성물은 세로토닌 재흡수 억제제, 예를 들어 시탈로프람, 파록세틴, 플루옥세틴 및/또는 플루복세틴인 제2 치료제를 추가로 포함한다.

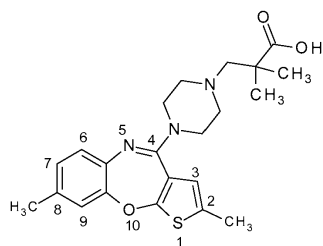
[0013] 본 발명은 또한 불면증의 치료를 필요로 하는 포유동물에게 유효량의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 불면증, 예를 들어 연장된 수면 잠복기 또는 불량한 수면 유지 또는 둘 다를 특징으로 하는 불면증, 예를 들어 원발성 불면증, 시차, 교대 근무 수면 장애, 지연성 수면 위상 장애, 진행성 수면 위상 장애 및/또는 비-24시간 수면-각성 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 이러한 측면의 또 다른 실시양태에서, 방법은 세로토닌 재흡수 억제제, 예를 들어 시탈로프람, 파록세틴, 플루옥세틴 및/또는 플루복세틴인 제2 치료제를 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 투여하는 것을 추가로 포함한다. 이들 치료 방법의 한 특정한 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0014] 본 발명은 또한 요법에 사용하기 위한 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 이러한 측면 내에서, 본 발명은 불면증의 치료에 사용하기 위한 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 추가 실시양태에서, 불면증, 예를 들어 원발성 불면증, 시차, 교대 근무 수면 장애, 지연성 수면 위상 장애, 진행성 수면 위상 장애 및/또는 비-24시간 수면-각성 장애는 연장된 수면 잠복기 또는 불량한 수면 유지 또는 둘 다를 특징으로 한다. 이러한 측면의 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 불면증의 치료에서 세로토닌 재흡수 억제제, 예를 들어 시탈로프람, 파록세틴, 플루옥세틴 및/또는 플루복세틴과 동시, 개별 또는 순차적 조합으로 사용하기 위한 화학식 I에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 본 발명의 이러한 측면의 한 특정한 실시양태에서, 용도는 포유동물, 특히 인간에서이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면은 불면증, 예를 들어 연장된 수면 잠복기 또는 불량한 수면 유지 또는 둘 다를 특징으로 하는 원발성 불면증, 예를 들어 원발성 불면증, 시차, 교대 근무 수면 장애, 지연성 수면 위상 장애, 진행성 수면 위상 장애 및/또는 비-24시간 수면-각성 장애의 치료를 위한 의약의 제조에서의 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다. 본 발명의 이러한 측면의 또 다른 실시양태는 불면증, 예를 들어 연장된 수면 잠복기 및/또는 불량한 수면 유지를 특징으로 하는 불면증, 예를 들어 원발성 불면증, 시차, 교대 근무 수면 장애, 지연성 수면 위상 장애, 진행성 수면 위상 장애 및/또는 비-24시간 수면-각성 장애의 치료를 위한 의약의 제조에서의, 화학식 I의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 세로토닌 재흡수 억제제, 예를 들어 시탈로프람, 파록세틴, 플루옥세틴 및/또는 플루복세틴인 제2 치료제의 용도를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 명확성을 위해, 트리스킬릭 고리 구조의 하기 넘버링이 본원 전반에 걸쳐 사용될 것이다.



[0017]

[0018] 본 발명의 화합물은 염기성 및 산성 모이어티를 갖고, 따라서 다수의 유기 및 무기 산 및 염기와 반응하여 제약상 허용되는 염을 형성한다. 본 발명의 화합물의 제약상 허용되는 염은 본원의 범주 내에 고려된다. 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 염"은 살아있는 유기체에 대해 실질적으로 비-독성인 본 발명의 화합물의 임의의 염을 지칭한다. 이러한 염은 당업자에게 공지되어 있는 문헌 [Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977)]에 열거된 것들을 포함한다.

[0019] 본원에 사용된 약어는 하기와 같이 정의된다.

[0020] "염수"는 포화 수성 NaCl 용액을 의미한다.

[0021] "DMEM"은 돌베코 최소 이글 배지(Dulbecco's Minimum Eagle's Medium)를 의미한다.

[0022] "DMSO"는 디메틸 술폭시드를 의미한다.

[0023] "EDTA"는 에틸렌디아민테트라아세트산을 의미한다.

[0024] "Equiv"는 당량을 의미한다.

[0025] "FBS"는 태아 소 혈청을 의미한다.

[0026] "HEPES"는 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진 에탄술포산을 의미한다.

[0027] "HPLC"는 고압 액체 크로마토그래피를 의미한다.

[0028] "hr."은 시간을 의미한다.

[0029] "IC₅₀"은 최대 역제의 50%가 달성되는 농도를 의미한다.

[0030] "LC-MS"는 HPLC-질량 분광분석법을 의미한다.

[0031] "MeOH"는 메탄올을 의미한다.

[0032] "min."은 분을 의미한다.

[0033] "MS"는 질량 분광분석법을 의미한다.

[0034] "MS (ES+)"는 전기분무 이온화를 이용하는 질량 분광분석법을 의미한다.

[0035] "NMR"은 핵 자기 공명을 의미한다.

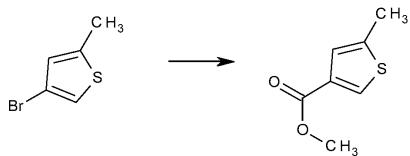
[0036] "RO"는 수용체 점유율을 의미한다.

[0037] "THF"는 테트라히드로푸란을 의미한다.

[0038] 일반 화학

[0039] 본 발명의 화합물은 하기 합성 실시예에 따라 제조할 수 있다.

[0040] 제조예 1: 메틸 5-메틸티오펜-3-카르복실레이트



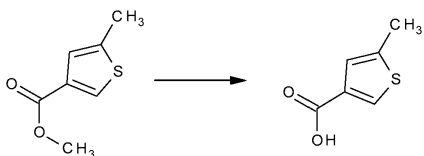
[0041]

[0042] 4-브로모-2-메틸-티오펜 (24.5 g, 138.37 mmol), 비스-(1,3-디페닐포스포노)프로판 (2.35 g, 5.53 mmol), 아세트산팔라듐 (1.24 g, 5.53 mmol), 트리에틸아민 (38.57 mL, 276.73 mmol), 메탄올 (40 mL) 및 디메틸 술폭시드 (80 mL)를 합하고, 반응 용기를 일산화탄소로 퍼징시켰다. 일산화탄소로 30 PSI까지 가압하고, 70℃로 가열하면서, 일산화탄소 하에 밤새 교반하였다. 감압 하에 휘발성 물질을 증발시켜 암오렌지색 용액을 수득하였다. 물 (300 mL)을 첨가하고, 에틸 아세테이트 (3 x 150 mL)로 추출한 다음, 합한 유기 추출물을 물 (2 x 100 mL)로 세척하였다. 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 증발시켰다. 이소-헥산 중 10% 디에틸 에테르 (500 mL)를 첨가하고, 생성된 암황색 침전을 여과에 의해 제거하였다. 여과물을 감압 하에 증발시켜 메틸 5-메틸티오펜-3-카르복실레이트 (18.894 g, 87.42% 수율)를 액체로서 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3): δ 7.84 (d, $J = 1.5$, 1H), 7.16 (t, $J = 1.5$, 1H), 3.83 (s, 3H) 및 2.46 (d, $J = 1.5$, 3H).

[0043]

[0044] 제조예 2. 5-메틸티오펜-3-카르복실산



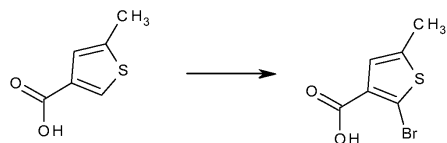
[0045]

[0046] 250 mL 플라스크에 메틸 5-메틸티오펜-3-카르복실레이트 (16.4 g, 104.99 mmol, 1.00 당량)를 첨가하고, 메탄올 (57.40 mL) 중에 용해시켰다. NaOH (12.60 g, 314.97 mmol, 3 당량) 및 물 (19.68 mL)을 첨가하였다. 반응이 LC-MS에 의해 완결될 때까지, 현탁액을 45분 동안 환류 (65℃)에서 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 이어서 5M 수성 HCl (85 mL, 5 부피)에 이어서 에틸 아세테이트 (130 mL, 7.5 부피)를 첨가하였다. 모든 고체가 용해될 때까지, 15분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 수성 층을 에틸 아세테이트 (2 x 130 mL)로 추출하였다. 합한 유기부를 물 (3 x 130 mL), 이어서 염수 (85 mL)로 세척하였다. 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켜 고체 5-메틸티오펜-3-카르복실산 (13.93 g, 93.32% 수율)을 수득하였다.

MS (m/z): 141.0 (M-H). $^1\text{H NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3): 7.99 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 2.50 (d, $J = 1.5$, 3H).

[0047]

[0048] 제조예 3. 2-브로모-5-메틸-티오펜-3-카르복실산



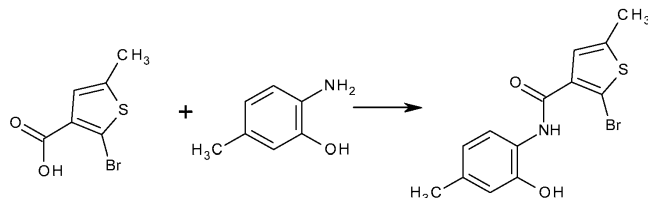
[0049]

[0050] 아세트산 (119.80 mL) 중 5-메틸-티오펜-3-카르복실산 (13.93 g, 97.98 mmol, 1.00 당량)의 용액에 아세트산 (59.90 mL) 중의 용액으로서의 브로민 (5.03 mL, 97.98 mmol, 1.00 당량)을 20분에 걸쳐 적가하였다. 반응이 LC-MS에 의해 완결될 때까지, 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온에서 물 (696.50 mL)에 천천히 붓고, 생성된 침전물을 여과에 의해 수집하였다. 물 (100 mL)로 세척하고, 패드 상에서 진공 및 질소 하에 16시간 동안 건조시켜 백색 고체 2-브로모-5-메틸-티오펜-3-카르복실산 (20.55 g, 94.88% 수율)을 수득하였다.

MS (m/z): 218.89, 220.79 (M-H). $^1\text{H NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3): 7.08 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 2.42 (s, 3H).

[0051]

[0052] 제조예 4. 2-브로모-N-(2-히드록시-4-메틸-페닐)-5-메틸-티오펜-3-카르복스아미드



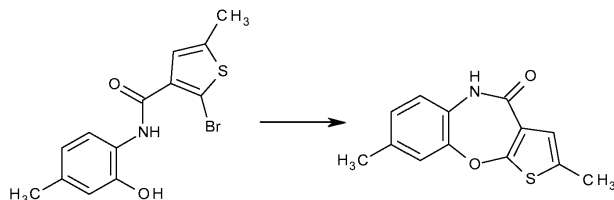
[0053]

[0054] 1 L 플라스크에서 디클로로메탄 (316.40 mL) 중 2-브로모-5-메틸-티오펜-3-카르복실산 (45.2 g, 204.46 mmol, 1.00 당량)의 현탁액에 디클로로메탄 (500 μ L)에 이어서 디메틸포름아미드 중 2M 옥살릴 클로라이드 (112.45 mL, 224.90 mmol, 1.1 당량)를 적가하였다 (기체 발생 주의). 반응 혼합물이 투명한 암색 용액이 되고, 반응이 TLC (용리액: 이소-헥산 중 EtOAc 30%)에 의해 완결될 때까지, 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 용액을 증발 건조시키고, 이어서 생성된 고체를 무수 테트라히드로푸란 (678 mL) 중에 재용해시켰다. 이 용액을 6-아미노-m-크레졸 (33.40 g, 265.79 mmol 1.3 당량), 피리딘 (82.67 mL, 1.02 mol, 5 당량) 및 무수 테트라히드로푸란 (678 mL)을 함유하는 플라스크에 첨가하였다. 반응이 LC-MS에 의해 완결될 때까지, 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 교반하면서 1M 수성 HCl (2.71 L, 60 부피)에 붓고, 생성된 침전물을 여과에 의해 수집하였다. 1M 수성 HCl (250 mL), 이어서 물 (250 mL)로 세척하고, 필터 패드 상에서 진공 하에 밤새 건조시켜 적색 고체 2-브로모-N-(2-히드록시-4-메틸-페닐)-5-메틸-티오펜-3-카르복스아미드 (62.34 g; 93.47% 수율)를 수득하였다. 필요하다면, 고체를 메탄올로 추가 세척함으로써 정제할 수 있다.

[0055]

MS (m/z): 325.98, 327.93 (M+H).

[0056] 제조예 5. 2,8-디메틸-5H-티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-온



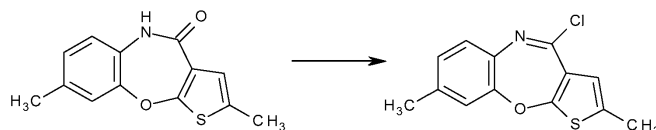
[0057]

[0058] 500 mL 플라스크에서 2-브로모-N-(2-히드록시-4-메틸-페닐)-5-메틸-티오펜-3-카르복스아미드 (62.34 g, 191.10 mmol, 1.00 당량)를 디메틸 술폭시드 (1.56 L) 중에 용해시키고, 탄산칼륨 (79.23 g, 573.30 mmol, 3 당량)을 첨가하였다. 반응이 LC-MS에 의해 완결될 때까지, 반응 혼합물을 4시간 동안 교반하면서 140℃로 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 이어서 빙조로 발열을 제어하면서 물 (2.5 L)에 부었다. 2M 수성 HCl (450 mL)로 산성화시키고, 디클로로메탄 (4 x 800 mL)으로 추출하고, 유기 상을 포화 수성 중탄산나트륨 (1.2 L), 이어서 물 (2 x 2 L)로 세척하였다. 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 실리카 겔 (750 g) 상에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 디클로로메탄 중 0%→20% 에틸 아세테이트로 용리하면서 정제하여 고체 2,8-디메틸-5H-티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-온 (28.1 g; 59.94%)을 수득하였다.

[0059]

MS (m/z): 246.09 (M+H).

[0060] 제조예 6. 4-클로로-2,8-디메틸-티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀



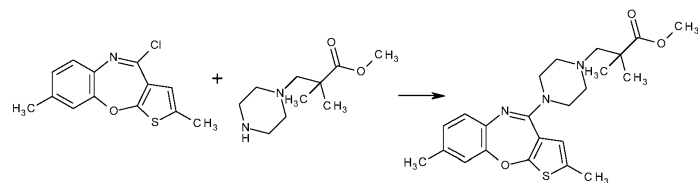
[0061]

[0062] 500 mL 플라스크에서 메톡시벤젠 (107.36 mL) 중 2,8-디메틸-5H-티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-온 (26.84 g, 109.42 mmol, 1.00 당량)의 현탁액을 약 60℃로 가열하였다. N,N-디메틸아닐린 (38.89 mL, 306.37 mmol, 2.8 당량)을 한번에, 이어서 포스포릴 클로라이드 (23.39 mL, 251.66 mmol, 2.3 당량)를 15분에 걸쳐 첨가하였다. 반응이 LC-MS에 의해 완결될 때까지, 생성된 용액을 2시간 동안 100℃에서 가열하였다. 반응 혼합물을 약간 냉각시키고, 증발시켜 암색 오일 4-클로로-2,8-디메틸-티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀 (28.85g, 추정 정량적)을 수

특하였다.

MS (m/z): 264.0 (M+H).

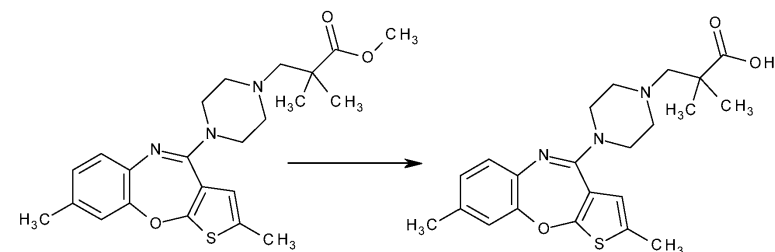
제조예 7. 메틸 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로파노에이트



아세트니트릴 (288.50 mL) 중 4-클로로-2,8-디메틸-티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀 (28.85 g, 109.39 mmol, 1.00 당량)의 용액에 메틸 2,2-디메틸-3-피페라진-1-일-프로파노에이트 (59.77 g, 218.77 mmol, 2 당량) 및 탄산칼륨 (136.06 g, 984.47 mmol, 9 당량)을 첨가하였다. 반응이 LC-MS에 의해 완결될 때까지, 혼합물을 3시간 동안 완전한 환류에서 가열하였다 (82℃). 반응물을 냉각시키고 증발시켰다. 이어서, 물 (300 mL) 및 에틸 아세테이트 (3 x 300 mL) 사이에 분배하였다. 합한 유기 추출물을 물 (2 x 300 mL)에 이어서 염수로 세척하였다. 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 증발시켰다. 실리카 겔 (800 g) 상에서 플래쉬 크로마토그래피에 의해 이소-헥산 중 0%→30% 에틸 아세테이트로 용리하면서 정제하여 농후한 오일 메틸 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로파노에이트 (37.95 g; 81.14% 수율)를 수득하였다.

MS (m/z): 428.1 (M+H).

실시예 1. 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산

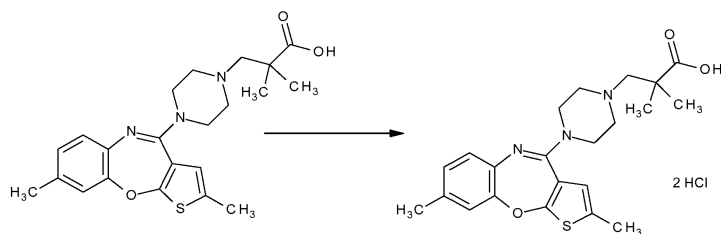


이소프로필 알콜 (227.70 mL) 및 물 (227.70 mL) 중 메틸 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로파노에이트 (37.95 g, 88.76 mmol, 1.00 당량)의 슬러리에 수산화나트륨 (10.65 g, 266.27 mmol, 3 당량)을 첨가하고, 완전한 용해가 발생하고 반응이 LC-MS에 의해 완결될 때까지, 혼합물을 1.5시간 동안 완전한 환류로 가열하였다 (85℃). 실온으로 냉각시키고, 2M 수성 HCl (대략 120 mL)를 사용하여 약 pH 6.0 - 6.5로 중화시켜 침전된 고체를 수득하였다. 유기 용매를 진공 하에 제거하여 현탁액을 수득하였다. 현탁액의 pH를 체크하고, 필요한 경우 2M 수성 HCl (대략 15 mL)를 사용하여 pH 6.0-6.5로 추가로 조정하였다. 현탁액을 여과하고, 물로 세척한 다음, 밤새 진공 하에 건조시켰다. 조 고체 물질을 아세트니트릴 (100 mL, 2.5 부피) 중에 슬러리화하고, 초음파처리하고, 이어서 15분 동안 교반하면서 부드럽게 가열하였다 (40℃). 여과하고, 아세트니트릴 (3 x 20 mL)로 세척하고, 이어서 생성물을 진공 하에 건조시켜 고체 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산 (29.5 g, 80.37% 수율)을 수득하였다.

MS (m/z): 414.1 (M+H). ¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃):

6.99 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 7.8 and 1.5 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 3.67 (br s, 4H), 2.86 (br s, 4H), 2.59 (s, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.28 (s, 3H) 1.26 (s, 6H)

실시예 2. 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤족사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산 디히드로 클로라이드



[0073]

[0074]

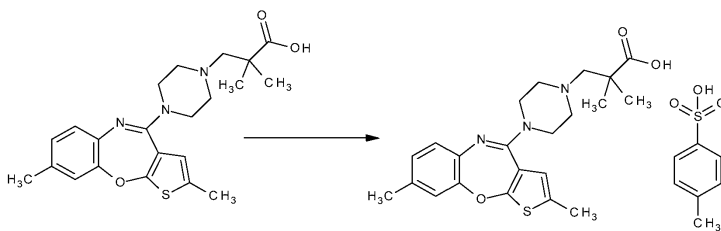
이소프로필 알콜 (4.50 mL) 중 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산 (300 mg, 725.44 μ mol, 1.00 당량)의 현탁액에 50℃에서 1,4-디옥산 중 4M HCl (453.40 μ L, 1.81 mmol, 2.5 당량)을 첨가하였다. 생성된 용액을 30분 동안 60℃로 가열하고, 이어서 실온으로 냉각시켰다. 진공 하에 증발시키고, 생성된 고체를 디에틸 에테르 (4.50 mL) 중에 15분 동안 슬러리화시키고, 이어서 여과로 수집하고, 패드 상에서 건조시켰다. 진공 오븐에서 1시간 동안 추가 건조시켜 결정질 고체 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산 디히드로클로라이드 (346 mg, 98.0%)를 수득하였다.

[0075]

MS (m/z): 414.0 (M+H).

[0076]

실시예 3. 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산; 4-메틸벤젠술폰산



[0077]

[0078]

에탄올 (6 mL) 중 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산 (300 mg, 725.44 μ mol, 1.00 당량)의 현탁액에 50℃에서 p-톨루엔술폰산 (124.92 mg, 725.44 μ mol, 1 당량)을 첨가하고, 생성된 용액을 30분 동안 50℃에서 교반하였다. 실온으로 냉각하고, 진공 하에 증발시켜 고체를 수득하였다. 고체를 15분 동안 디에틸 에테르 (4.50 mL) 중에 슬러리화시키고, 이어서 여과에 의해 수집하고, 패드 상에서 건조시켰다. 진공 오븐 내에서 1 시간 동안 추가 건조시켜 결정질 고체 3-[4-(2,8-디메틸티에노[2,3-b][1,5]벤조사제핀-4-일)피페라진-1-일]-2,2-디메틸-프로판산; 4-메틸벤젠술폰산 (413 mg, 97%)을 수득하였다.

[0079]

MS (m/z): 414.0 (M+H).

[0080]

문헌 데이터 ([Morairty SR, Hedley L, Flores J, Martin R, Kilduff TS. (2008) Selective 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptor antagonists promote sleep in rats. Sleep 31, 34-44.; 및 Barbier, A.J., and Bradbury, M.J., Histaminergic Control of Sleep-Wake Cycles: Recent Therapeutic Advances for Sleep and Wake Disorders, CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, vol 6, pg. 31-43 (2007)]) 및 비-임상 동물 연구에서 생성된 데이터는 불면증의 치료 및 다른 장애, 예컨대 우울 장애, 불안 장애, 통증, 알레르기, 폐 또는 기도 장애, 정신 장애, 치매, 및/또는 신경변성 질환, 및/또는 일주기 리듬 수면 장애와 연관된 불면증의 대중 치료에서의 이중 활성 H1 역 효능제 / 5-HT_{2A} 길항제에 대한 역할을 지지한다. 구체적으로, 특정의 이중 활성 H1 역 효능제 / 5-HT_{2A} 길항제는 불균형한 또는 임상적으로 관련된 활동저하, REM 수면의 감소 또는 과다졸림 없이 EEG 모니터링된 설치류를 사용하여 총 수면 시간을 증가시키는데 유효한 것으로 밝혀졌다.

[0081]

본 발명의 화합물의 특징을 추가로 입증하기 위해, 이들을 하기 시험관내 및 생체내 검정에서 실행할 수 있었다.

[0082]

시험관내 결합 및 활성 검정:

[0083]

H1 경쟁 결합 검정

- [0084] [^3H]-피릴아민 결합 실험을 SPA (섬광 근접 검정) 96-웰 포맷에서 수행하였다. 본 검정에서 사용된 막은 제조합 H1 수용체 (인간)를 안정하게 발현하는 HEK-293 세포로부터 제조하였다. WGA PVT SPA 비드 (1mg/웰, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) (미국 매사추세츠주) RPNQ0001)와 3 μg 막의 혼합물을 3.5 nM [^3H]-피릴아민 및 다양한 농도의 시험 화합물 (10 포인트 농도 반응 곡선)을 함유하는 검정 완충제 (67 mM 트리스(Tris); pH 7.6)에 첨가함으로써 인큐베이션을 개시하였다. 비-특이적 결합을 10 μM 트리프롤리딘의 존재 하에 결정하였다. 샘플을 실온 (22°C)에서 4시간 동안 인큐베이션한 다음, 마이크로베타 트리룩스(Microbeta Trilux)에서 판독하였다.
- [0085] 5-HT_{2A} 경쟁 결합 검정
- [0086] [^3H]-케탄세린 결합 실험을 SPA 96-웰 포맷에서 수행하였다. 본 검정에서 사용된 막은 제조합 5-HT_{2A} 수용체 (인간)를 안정하게 발현하는 AV-12 세포로부터 제조하였다. WGA YSi SPA 비드 (1mg/웰, 퍼킨 엘머 (미국 매사추세츠주) RPNQ0011)와 2 μg 막의 혼합물을 3.1 nM [^3H]-케탄세린 및 다양한 농도의 시험 화합물 (10 포인트 농도 반응 곡선)을 함유하는 검정 완충제 (67 mM 트리스, 0.5 mM EDTA; pH 7.6)에 첨가함으로써 인큐베이션을 개시하였다. 비-특이적 결합을 20 μM 1-(1-나프틸) 피페라진의 존재 하에 결정하였다. 샘플을 실온 (22°C)에서 4시간 동안 인큐베이션한 다음, 마이크로베타 트리룩스에서 판독하였다.
- [0087] 5-HT_{2C} 경쟁 결합 검정
- [0088] [^{125}I]-($\pm$)DOI 결합 실험을 SPA 96-웰 포맷에서 수행하였다. 본 검정에서 사용된 막은 제조합 5-HT_{2C} 수용체 (인간)를 안정하게 발현하는 AV-12 세포로부터 제조하였다. WGA PVT SPA 비드 (0.5 mg/웰, 퍼킨 엘머 (미국 매사추세츠주) RPNQ0001)와 2.5 μg 막의 혼합물을 0.2 nM [^{125}I]-($\pm$)DOI 및 다양한 농도의 시험 화합물 (10 포인트 농도 반응 곡선)을 함유하는 검정 완충제 (50 mM 트리스-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 10 μM 파르길린, 0.1% 아스코르브산, pH 7.4)에 첨가함으로써 인큐베이션을 개시하였다. 비-특이적 결합을 20 μM 1-(1-나프틸) 피페라진의 존재 하에 결정하였다. 샘플을 실온 (22°C)에서 4시간 동안 인큐베이션한 다음, 마이크로베타 트리룩스에서 판독하였다.
- [0089] 결합 데이터 분석
- [0090] 4-파라미터 로지스틱 비선형 방정식을 사용하여 곡선을 평가함으로써 방사성리간드 결합의 50% 억제를 유발하는 경쟁자의 농도 (IC₅₀)를 얻었다. 평형 해리 상수 (K_i)를 방정식 $K_i = \text{IC}_{50}/(1+L/K_d)$ (여기서, L은 실험에서 사용된 방사성리간드의 농도이고, K_d는 표준 포화 분석 또는 동종 경쟁 실험으로부터 결정된 수용체에 대한 방사성리간드의 평형 해리 상수임)에 따라 계산하였다. K_i에 대한 보고된 값 (여기서, n 값은 제시됨)은 기하 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차 (SEM)로서 나타내며, 여기서 반복 결정의 횟수는 n에 의해 제시된다. 기하 평균은 방정식 $\text{GeoMean} = 10^{(\text{평균}(\log K_i 1 + \log K_i 2 + \dots \log K_i n)/\text{제곱근 } n)}$ 에 의해 계산하였다.
- [0091] 일차 신경 배양물 중 천연 수용체를 사용하는 GABA_A 길항작용
- [0092] 천연 GABA_A 수용체에 대한 화합물의 활성은 96 웰 포맷 FLIPR® 시스템 (형광측정 영상화 플레이트 판독기 (FLIPR®, 몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices)))를 사용하여 칼슘 플럭스를 모니터링함으로써 평가하였다. 간략하게, 피질 배아 뉴런을 E18 래트 배아로부터 해리시키고, 흑색-벽, 투명 바닥 폴리-D-리신 코팅된 96-웰 FLIPR® 플레이트에 최적 밀도로 플레이팅하였다. 세포를 칼슘 민감성 염료 (플루오4(Fluo4)-AM, 몰레큘라 디바이시스)와 함께 로딩한 후, 세포를 클로라이드를 적게 함유하는 용액 (클로라이드가 글루코네이트에 의해 대체됨) 중에 침지시켰다. 이들 조건 하에 GABA_A 수용체의 활성화는 (화학 구배의 방향으로) 클로라이드 이온의 유출을 유발하였고, 이는 막 탈분극 및 결과적으로 전압 게이팅 칼슘 채널 (VGCC)의 활성화를 일으켰다. VGCC를 통한 칼슘 유입을 FLIPR® 시스템을 사용하여 기록하고, 오프라인으로 분석하였다. 검정의 약리학적 검증을 위해, 농도 반응 곡선 (CRC)을 표준 효능제 (GABA) 및 표준 길항제 (가바진)에 대해 기록하였다. 임의의 효과를 10 μM (EC₉₀ GABA 반응에 해당함)에서의 효능제 GABA의 고정 농도에 대해 CRC 모드에서 결정하였다.
- [0093] 방법:
- [0094] 화합물의 길항제 효과는 화합물의 존재 및 부재 하에 효능제 GABA에 대한 피크 형광 반응을 비교함으로써 10-포

인트 용량 반응 곡선을 이용하여 정량화하였다. 검정 윈도우는 그의 예정된 EC₉₀ 농도에서 GABA에 의해 얻은 최대 반응 마이너스 가바진의 완전 억제 농도 (50 μ M)에 의해 얻은 반응으로서 정의된다. 길항제 효과는 검정 윈도우의 퍼센트로서 계산하였다. 모든 데이터는 4-파라미터 로지스틱 곡선 적합 프로그램 (프리즘 그래프패드 (Prism Graphpad)® 3.01)을 사용하여 상대적 IC₅₀ 값으로서 계산하였다. 모든 화합물에 대한 길항제 효력을 각각의 검정 실행에서 3회 반복으로 가바진과 비교하였다.

[0095] 추가로, 본 발명의 화합물을 다른 생리학상 중요한 수용체, 예컨대 비제한적으로 hERG 채널, 다른 세로토닌 수용체 (구체적으로 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} 수용체, 5-HT_{2B} 수용체에서 효능제 활성의 결여, 5-HT_{2C}, 5-HT₅, 5-HT₆ 및 5-HT₇ 수용체), 도파민성 수용체 (구체적으로 D1, D2, 및 D3), GABA_A 수용체, 아드레날린 수용체 및 모노아민 수송체에 대해 널리 공지된 방법에 의해 결합 검정 및 기능적 활성 검정으로 시험할 수 있었다.

[0096] 실시예 2의 화합물은 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 시험하였으며, 이는 표 1에 나타난 바와 같은 활성 프로파일을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0097] 표 1. 선택성 데이터

	실시예 2
H1 K _i (nM)	131
5-HT _{2A} K _i (nM)	11.3
5-HT _{2B} K _i (nM)	95.8
5-HT _{2B} 효능제 EC ₅₀ (nM)	>10,000
5-HT _{2B} 길항제 K _b (nM)	45
5-HT _{2C} K _i (nM)	883
GABA _A IC ₅₀ (μ M)	98
hERG 채널 (μ M)	>100
도파민 D ₁ K _i (nM)	2,350
도파민 D ₂ K _i (nM)	2,480
도파민 D ₃ K _i (nM)	>5,660
5-HT _{1B} K _i (nM)	ND
5-HT _{1D} K _i (nM)	>3,980
5-HT ₅ K _i (nM)	>8,830
5-HT ₇ K _i (nM)	>2,060
아드레날린성 알파 _{1A} K _i (nM)	>10,500
아드레날린성 알파 _{1B} K _i (nM)	>16,200
아드레날린성 알파 _{2A} K _i (nM)	>9,020
아드레날린성 알파 _{2B} K _i (nM)	3,710
아드레날린성 알파 _{2C} K _i (nM)	>5,550
세로토닌 수송체 K _i (nM)	>651
노르에피네프린 수송체 K _i (nM)	>674
도파민 수송체 K _i (nM)	>877

[0098]

[0099] 따라서, 본 발명의 화합물의 생리학상 관련 용량은 생체내에서 H1 및 5-HT_{2A} 수용체의 실질적 억제를 제공하며, 한편 다른 생리학상 관련 수용체와 실질적으로 상호작용하지 않을 것으로 예상되고, 따라서 표적을 벗어난 활성과 연관된 바람직하지 않은 효과를 피하면서 목적 약리를 제공할 것으로 예상된다. 이러한 바람직하지 않은 효과는 하기를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 치리에 의한 갑작스러운 체중 증가와 연관된 5-HT_{2C} 길항제 활성, 판막증과 연관된 5-HT_{2B} 효능제 활성, QT 연장과 연관된 hERG 채널 조절, 및 발작 활성과 연관된 GABA_A 활성. 추가로, 수면/각성 생리 기능 간섭은 도파민 수용체, 다른 세로토닌 수용체, 아드레날린성 수용체, 및 모노아민 수송체에 대한 선택성에 의해 회피된다.

[0100] 5-HT_{2A} 수용체 점유율: 생체내에서 5-HT_{2A} 수용체에서의 길항제/역 효능제 활성을 입증하기 위해 수용체 점유율

(RO)을 검정하였다. 간략하게, 대략 230-280 그램 체중의 수컷 스프라그-돌리 래트 (하틀란 스프라그-돌리 (Harlan Sprague-Dawley), 인디애나주 인디애나폴리스)에게 3-시간 실험 프로토콜이 시작될 때까지 음식 및 물을 무제한으로 제공하였다. 1 mg/kg 케탄세린 (비-선택적 5-HT_{2A} 길항제)을 양성 대조군으로서 사용하여 검정 타당성을 확립하였다. 시험 화합물 또는 대조군을 20% 히드록시프로필 베타-시클로덱스트린으로 구성된 비히클 중에서 경구 위관영양에 의해 투여하였다. 선택적 5-HT_{2A} 길항제인 MDL 100907 ((R)-(+)- α -(2,3-디메톡시페닐)-1-[2-(4-플루오로페닐)에틸]-4-피페리딘메탄올)을 추적자로서 사용하였다. MDL 100907을 5 μ l 묽은 락트산 (1 mg/ml)과 함께 물 중에 현탁시키고, 염수로 6 μ g/ml로 희석하고, 외측 꼬리 정맥을 통해 1 mL/kg의 부피로 정맥내 투여하여 3 μ g/kg의 추적자 용량을 생성하였다. 래트에게 시험 화합물, 케탄세린 또는 비히클을 투여하고 (N = 4), 이어서 1시간 후 3 μ g/kg 추적자 용량의 MDL 100907을 정맥내 투여하였다. RO를 측정해야 하는 것으로 여겨지는 것은 추적자 투여시였다. 추적자 투여 15분 후, 경추 탈구에 의해 래트를 안락사시켰다. 혈장 샘플을 수집하고, 전두 피질 및 소뇌의 샘플을 제거하였다. MDL 100907 추적자의 수준을 각각의 피질 및 소뇌 샘플에서 측정하였다. 수용체를 갖지 않거나 또는 매우 낮은 수준의 수용체를 갖는 영역 (소뇌)에 의해 정규화된 전체 결합을 대표하는 고 수용체 밀도의 영역 (전두 피질)을 사용하는 잘 확립된 비율 방법을 이용하여 RO를 계산하였다. 널(null) 영역으로 지칭되는 이러한 영역은 리간드 프로브의 비특이적 결합을 나타낸다. 소뇌에 대한 피질 중 추적자 수준의 비히클 비율은 0% 점유율을 나타낸다. 1의 비율은 100% 점유율을 나타내고, 이것은 MDL 100907 추적자의 5-HT_{2A} 수용체에 대한 모든 특이적 결합이 차단될 때 달성된다. 5-HT_{2A} RO 퍼센트를 결정하기 위해, 시험 화합물 전처리군으로부터 피질 대 소뇌 추적자의 중간 비율을 비히클-처리 동물에서의 추적자 수준의 비율 (0% 점유율)과 1의 비율 (100% 점유율) 사이에서 선형 내삽하였다.

[0101] MDL 100907 분석: 피질 및 소뇌 샘플을 칭량하고, 얼음 상의 원추형 원심분리 튜브에 넣었다. 0.1% 포름산을 함유하는 4 부피 (w/v)의 아세토니트릴을 각각의 튜브에 첨가하였다. 이어서, 샘플을 균질화시키고, 14,000 RPM (21,920 x g)에서 16분 동안 원심분리하였다. LC/MS/MS 분석용 HPLC 주입 바이알에서 100 - 900 μ L 멸균수를 첨가함으로써 상청액을 희석하였다. 애질런트(Agilent) 모델 1200 HPLC (애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), 캘리포니아주 팔로 알토) 및 API 4000 질량 분광계를 사용하여 MDL 100907의 분석을 수행하였다. 물 중 60% 아세토니트릴로 이루어지고 전체 0.1% 포름산 함량을 갖는 이동상을 사용하여 2.1 X 50 mm C18 칼럼 (애질런트 부품 번호 971700-907) 상에서 크로마토그래피 분리하였다. 질량 대 전하 비 (m/z) 374.2 대 123.0으로 전구체에서 생성물로의 이온 전이를 모니터링함으로써 MDL 100907의 검출을 완수하였다. 공지된 양의 분석물을 비-처리 래트 및 상기 기재된 바와 같은 가공으로부터의 뇌 조직 샘플에 첨가함으로써 표준물을 제조하였다.

[0102] 통계적 방법: 각 연구의 곡선을 JMP® 버전 8.0 (SAS 인스티튜트 인크(SAS Institute Inc), 노스캐롤라이나주 캐리)을 사용하여 기저부가 0%로 고정된 4 파라미터 로지스틱 함수에 적합화시키고, 절대 ED₅₀을 소프트웨어에 의해 계산하였다. 값은 평균, 표준 오차 및 95% 신뢰 구간으로서 제공하였다. 실시예 2의 화합물을 본질적으로 기재된 바와 같이 시험하였으며, 이것은 0.09 mg/kg의 ED₅₀으로 높은 5-HT_{2A} 수용체 점유율을 달성하는 것으로 밝혀졌다.

[0103] DOI 유도된 헤드셰이크 동작의 억제: 본 발명의 화합물의 생체내 5-HT_{2A} 수용체 길항제 활성은 5-HT_{2A} 수용체 효능제 2,5-디메톡시-4-아이오도암페타민 (DOI)에 의해 유도된 헤드 셰이킹 동작을 차단하는 그의 능력에 의해 입증되었다. (예를 들어, 문헌 [Bartoszyk GD, van Amsterdam C, Boettcher H, Seyfried CA. EMD 281014, a new selective serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist. Eur J Pharmacol. 2003 473: 229-230] 참조.) 간략하게, 수컷 C57BL/6J 마우스 (20-25 g, 찰스 리버(Charles River))를 표준 하우징 조건 (대형 IVC 케이지 내 32 마리의 마우스, 07.00 내지 19.00 명 단계, 항온 (19-23°C) 및 습도 (50% +/-10), 음식 및 물 무제한) 하에 하우징하였다. 마우스에게 비히클 (0.25% 메틸 셀룰로스), DOI (염수 중 3 mg/kg), 또는 10 mg/kg PO로 시험 화합물 플러스 DOI (염수 중 3 mg/kg)를 제공하였다. 시험 화합물을 각각의 화합물에 대해 n=4로 실험당 4개의 군에서 비히클 및 DOI+비히클 (n=8)과 함께 개별적으로 평가하였다. 60분의 시험 화합물 전처리 시간 후 마우스에게 비히클 (염수) 또는 3 mg/kg DOI를 피하로 투여한 다음, 투명한 퍼스펙스 관찰 챔버 내에 위치시켰다. DOI 또는 비히클 투여 5분 후, 각각의 개별 마우스에 의해 나타난 육안으로 스코어링된 헤드 셰이크의 횟수를 15분 동안 카운팅하였다. ANOVA 및 사후 던넷(Dunnet) 검정을 이용하여 데이터를 분석하였다. 실시예 2의 화합물을 본질적으로 기재된 바와 같이 시험하였으며, 이것은 10 mg/kg에서 DOI 유도된 헤드셰이크 반응을 100%로

억제하는 것으로 밝혀졌다.

- [0104] 래트에서의 수면 및 거동 모니터링: 본 발명의 화합물을 바람직하지 않은 효과, 예컨대 REM 수면의 억제, 각성 운동 장애 및/또는 반동성 불면증 없이 수면의 양을 증가시키거나 또는 수면 중단을 감소시키거나 또는 둘 다를 일으키는 그의 능력에 대해 래트에서 시험하였다. 시험 동물을 전기-뇌파도 (EEG), 근전도 (EMG) 및 운동에 의해 계속 모니터링하여 누적 비REM 수면, 누적 총 수면, 평균 수면 바우트 지속시간, 최장 수면 바우트 지속시간, 반동성 불면증, REM 수면 억제 및 각성 동안의 운동 활성 강도를 측정하였다. 이러한 연구를 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Edgar DM, Seidel WF. Modafinil induces wakefulness without intensifying motor activity or subsequent rebound hypersomnolence in the rat. J Pharmacology & Experimental Therapeutics 1997; 283: 757-769; van Gelder RN, Edgar DM, Dement WC. Real-time automated sleep scoring: validation of a microcomputer-based system for mice. Sleep 1991, 14: 48-55; 및 Gross BA, Walsh CM, Turakhia AA, Booth V, Mashour GA, Poe GR. Open-source logic-based automated sleep scoring software using electrophysiological recordings in rats. J Neurosci Methods. 2009; 184(1):10-8]에 기재된 방법 참조.) 연구는 하기와 같이 수행하였다.
- [0105] 동물 준비. 성체 수컷 위스타(Wistar) 래트 (수술 시점에 대략 270-300 g)를 EEG, EMG 및 운동을 장기간 기록 하기 위해 하기와 같이 수술로 적합화하였다. 래트에 EEG 기록을 위한 4개의 스테인레스 스틸 스크류 (전두부에 2개 [브레그마 앞쪽으로 3.9 mm, 및 중간에서 내외측으로 ± 2.0 mm] 및 후두부에 2개 [브레그마 뒤쪽으로 6.4 mm, 중간에서 내외측으로 ± 5.5 mm])로 이루어진 두개골 임플란트, 및 EMG 기록을 위한 2개의 테플론-코팅된 스테인레스 스틸 와이어 (경부 소능형 근육 아래 위치)를 수술로 설치하였다. 수술 전에 모든 납을 소형 커넥터 (마이크로테크(Microtech), 펜실베이니아주 부스윈)에 납땜하였다. 임플란트 어셈블리를 스테인레스 스틸 EEG 기록 스크류, 임플란트 커넥터와 두개골 사이에 적용된 시아노아크릴레이트 및 치과용 아크릴의 조합에 의해 두개골에 부착하였다. 복부 내에 수술로 위치시킨 소형 송신기 (미니미터(Minimitter) PDT4000G, 필립스 레스피로닉스(Philips Respironics), 오리건주 벤드)를 통해 운동 활성을 모니터링하였다. 회복을 위해 3주 이상을 허용하였다.
- [0106] 기록 환경. 각각의 래트를 추가의 버티칼 헤드룸을 허용하기 위해 삽입된 폴리카르보네이트 필터-탑 라이저로 변형된 마이크로아이스레이터 케이스 내에 개별적으로 하우징하였다. 동작을 최소한으로 제한하는 가요성 케이블을 한쪽 끝은 케이스 최상부에 부착된 정류기에 연결하고 다른 한쪽 끝은 동물의 두개골 임플란트에 연결하였다. 각각의 케이스를 스테인레스 스틸 수면-각성 기록 챔버의 별도의 환기된 구획 내에 위치시켰다. 음식 및 물은 무제한으로 이용가능하였고, 주위 온도를 약 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 유지하였다. 형광등을 사용한 24-시간 명암 주기 (LD 12:12)를 연구 전반에 걸쳐 유지하였다. 상대 습도는 평균 대략 50%였다. 각각의 처리 전후 적어도 30 시간 동안 동물을 방해하지 않았다.
- [0107] 연구 설계 및 투여. 비히클 (위약, 물 중 메틸셀룰로스 15 센티포아즈 0.25%) 또는 시험 화합물 용량 수준 중 하나를 의사-무작위로 1 mL/kg으로 경구 투여하여 어떠한 래트도 동일한 처리를 2회 받지 않도록 하고, 어떠한 래트도 임의의 한 연구에서 8회의 처리 중 2회 초과를 받지 않도록 하였다. 각각의 래트를 약 1분 동안 그의 케이스로부터 꺼내어 칭량하고, 처리하였다. 6일 이상의 "위시아웃" 기간이 각각의 처리에 선행하고 후속되었다.
- [0108] 데이터 수집. 수면 및 각성 식별을 자동화할 수 있었다 (예를 들어, 문헌 [Van Gelder et al. 1991 (상기); Edgar et al. 1997 (상기); Winrow CJ, et al., Neuropharmacology 2010; 58(1):185-94.; 및 Gross et al., 2009 (상기)]). EEG를 증폭시키고, 필터링하고 (X10,000, 대역통과 1-30 Hz), EMG를 증폭시키고, 통합하고 (대역통과 10-100 Hz, RMS 통합), 비-특이적 운동 활성 (LMA)을 동시에 모니터링하였다. 각성 상태를 10초에 포크로 비-REM 수면, REM 수면, 각성 또는 세타-우세 각성으로서 분류하였다. 운동 활성 (LMA)을 분당 카운트로서 기록하고, 상업적으로 입수가 가능한 원격측정 수신기 (ER4000, 미니미터, 오리건주 벤드)에 의해 검출하였다.
- [0109] 통계적 분석. 하나 이상의 결과를 갖는 모든 동물을 요약 결과치에 포함시켰다 (예를 들어, 본 발명자들은 동물 처리로부터 적절한 데이터를 포함시켰고, 이는 원격측정 데이터는 이용가능하지만 EEG 데이터는 이용가능하지 않기 때문임). 처리후 관찰 기간을 각각의 결과에 적절한 투여후 간격으로 나누었고, 여기서 투여 시간은 시간 = 0의 시작으로서 정의하였고, 결과를 관찰 기간에서 각각의 기간에 걸쳐 시간당 평균 또는 누적 값을 계산함으로써 요약하였다 (각각의 결과의 엄밀한 정의에 대해서는 표 2의 범례 참조). 수면 바우트를 로그 스케일로 분석하여 변동을 안정화시키고, 모든 다른 변량을 선형 스케일로 분석하였다. 각각의 기간에서의 각각의

결과를 인자로서의 처리군 및 처리일 및 공변량으로서의 상응하는 전처리 간격 (24시간 전에)을 사용하여 공분산의 분석에 의해 분석하였다. 조정된 평균 및 비히클 평균으로부터의 변화 및 그의 상응하는 표준 오차를 각각의 처리군에 대해 요약하였다. 로그 스케일로 분석된 결과를 역-변환시켜 기하 평균 및 평균 비-대-비히클 결과치를 기록하였다.

[0110] 실시예 2의 화합물은 본질적으로 기재된 바와 같이 시험하였다. 실시예 2의 화합물은 3 mg/kg에서 유의한 반동성 불면증 또는 운동 강도 (LMI)의 억제 없이 누적 NREM 수면 시간 및 누적 총 수면 시간을 유의하게 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나, REM 수면 억제는 이러한 데이터에 의해 제외될 수 없다. (하기 표 2에서의 수면 프로파일 및 운동 활성 강도 참조).

표 2. 실시예 3의 화합물.

용량 (mg/kg PO)	효능 변수			바람직하지 않은 효과 변수		
	누적 NREM 수면			반동성 불면증		
	N	보정 평균	SE	N	보정 평균	LCL
10	4	36.7	8.8	4	0.4	-9.0
3	8	29.2	6.9	8	-1.3	-8.5
1	10	31.9	6.5	10	-3.8	-10.6
0.5	9	21.7	6.8	9	-0.3	-7.4
0.25	4	34.3	9.1	4	1.0	-8.2
0.025	4	1.3	8.9	4	0.3	-9.0

용량 (mg/kg PO)	누적 총 수면			REM 억제		
	N	보정 평균	SE	N	보정 평균	LCL
	N	보정 평균	SE	N	보정 평균	LCL
10	4	32.8	9.9	4	-12.1	-20.9
3	8	26.9	7.8	8	-4.2	-11.2
1	10	30.8	7.3	10	0.1	-6.4
0.5	9	21.7	7.9	9	0.7	-6.1
0.25	4	33.5	10.3	4	-1.5	-10.4
0.025	4	-2.3	10.1	4	-2.7	-11.6

용량 (mg/kg PO)	평균 수면 바우트			운동 활성 강도		
	N	보정 평균	SE	N	보정 평균	LCL
	N	보정 평균	SE	N	보정 평균	LCL
10	4	1.7	0.3	4	-3.7	-6.5
3	8	1.5	0.2	8	-2.6	-4.8
1	10	1.7	0.2	10	-2.5	-4.6
0.5	9	1.6	0.2	9	0.0	-2.2
0.25	4	1.6	0.2	4	-1.6	-4.4
0.025	4	1.0	0.1	4	-0.1	-2.9

용량 (mg/kg PO)	최장 수면 바우트		
	N	보정 평균	SE
	N	보정 평균	SE
10	4	1.9	0.4
3	8	1.9	0.3
1	10	2.2	0.3
0.5	9	2.1	0.3
0.25	4	1.6	0.3
0.025	4	1.0	0.2

[0111]

[0112] 표 2. 결과 통계: 약어: N = 샘플 크기; 보정 평균 = 비히클 대조군에 대해 보정된 군 평균 값; SE = 평균의 표준 오차; LCL = 95% 신뢰 하한치, NREM = 비-REM, 즉, REM 수면 이외의 모든 수면. 평행 참조 비히클 군 샘플 크기는 N=27이었다.

[0113] 정의 및 단위 - 평균은 비히클 대조군으로부터 보정된 차이이다.

[0114] · 누적 수면: 처리후 최초 6시간에 걸쳐, 분 단위 ('총 수면'은 NREM 수면 + REM 수면을 나타냄).

[0115] · 평균 수면 바우트: 처리후 최초 6시간에 걸쳐, 시간당 평균된 수면 바우트의 평균, 비히클 대조군에 비해 n배 증가로서 나타냄.

[0116] · 최장 수면 바우트: 처리후 최초 6시간에서의 최장 수면 바우트, 비히클 대조군에 비해 n배 증가로서 나타냄.

[0117] · 반동성 불면증: 조명이 켜진 기간의 최초 3시간, 즉, 처리후 제7, 제8 및 제9시간 동안 NREM+REM 수면의 누적 분.

[0118] · REM 억제: 처리후 최초 12시간 동안 REM 수면의 누적 분.

[0119] · 운동 활성 (LMA) 강도: 처리후 최초 6시간에 걸쳐 평균된, EEG-정의된 각성의 분당 LMA 카운트로서 나타냄.

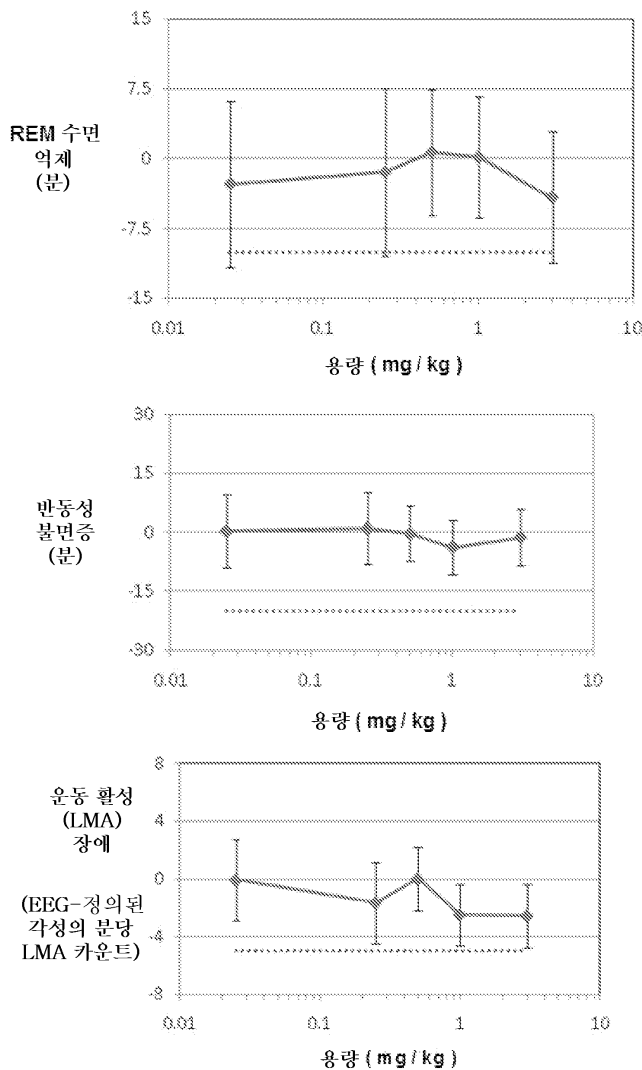
[0120] 효능 결정. 각각의 4개의 효능 변수에 대한 역치 효능을 로그(용량)에 대해 처리후 6시간 기간 동안 비히클 대조군에 대한 각각의 변수의 증가를 플롯팅함으로써 계산하였다. 각각의 변수에 대한 역치 효능은 정의된 효능 역치 값; +30분의 추가의 누적 비-REM 수면, +25분의 추가의 누적 총 수면, 평균 수면 바우트 지속시간의 1.75x 증가, 및 최장 수면 바우트 지속시간의 1.5x 증가를 제공하는, 4 파라미터 로지스틱 비선형 회귀에 의해 추정된 용량이다. 실시예 2의 화합물은 하기 표 3에 나타난 바와 같은 역치 유효 용량을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0121] <표 3>

	추정 효능 용량 (mg/kg)	95% 신뢰 구간 (mg/kg)
NREM 축적 = 30 분	0.05	0.04-n.e.*
총 수면 축적 = 25 분	0.07	0.03-0.09
최장 수면 바우트 (1.75배 증가)	0.26	0.07-0.20
평균 수면 바우트 (1.5배 증가)	0.21	0.03-0.06

[0122]

[0123] *n.e. = 통계적으로 추정 불가



[0124]

[0125] 바람직하지 않은 효과 결정. 각각의 '바람직하지 않은 효과' 결과 변수 (정의에 대해서는 표 2의 범례 참조)를 로그(용량)에 대해 플롯팅하였다. REM 수면 억제에 대한 역치 값은 -10분의 REM 수면의 누적 감소로서 정의하였다. 반동성 불면증에 대한 역치 값은 -20분으로서 정의하였다. 감소된 LMI에 대한 역치 값은 EEG-정의된 각성의 분당 -5 운동 활성 카운트로서 정의된다. 유의한 바람직하지 않은 효과는 신뢰 하한치가 평균 유효 용량

의 10배 또는 그 미만의 임의의 용량에서의 역치 값 미만이 될 때 발생하는 것으로 정의하였고, 용량 반응 경향은 역치 유효 용량 초과 용량에 대해 명백하였다. 실시예 2의 화합물의 경우에, REM 수면 억제는 3 mg/kg에서 역치 값을 초과하지만, 이 용량은 가장 보존적 효능 용량 0.26 mg/kg의 10배 초과이고 (표 3); 0.25 mg/kg 및 0.025 mg/kg에서의 명백한 REM 수면 억제는 용량 관련 경향의 일부가 아니고 그러한 용량에서 통계적으로 유의하지 않으며, 따라서 그러한 용량에서의 작은 샘플 크기의 아티팩트로 고려될 수 있고; 그럼에도 불구하고, REM 수면 억제는 이들 데이터에 의해 제외될 수 없다. REM 반동성 불면증 및 LMI의 감소의 바람직하지 않은 발생은 최대 보존적 효능 용량의 10배 내에서 전혀 관찰되지 않지만, REM 수면 억제는 제외될 수 없다. 음수 값은 각각 REM 억제, 반동성 불면증 및 감소된 LMI를 나타내었다.

[0126] 추가의 연구에서, 본 발명의 화합물을 선택적 세로토닌 재흡수 억제제와 공투여하여 비-급속 안구 운동 수면(NREM 수면) 및 수면 유지에 대한 그의 효과의 강화를 입증할 수 있었다. 실시예 2의 화합물을 본질적으로 화합물 단독에 대해 상기 기재된 바와 같은 래트 수면 연구에서 시탈로프람과 공투여하였으며, 이것은 유의하게 보다 낮은 용량에서 NREM 수면을 유의하게 증가시키는 것으로 밝혀졌다.

[0127] 혈장 클리어런스: 수면 장애, 예컨대 불면증을 치료하는데 유용한 화합물에서 이것이 유리한 클리어런스 속도로 신체로부터 적절히 클리어되는 것은, 원치않은 효과, 예컨대 목적 수면 기간을 넘는 연장된 졸림, 주간 졸림증, 각성 후의 인지 장애 등을 회피하기 위해 중요하다. 본 발명은 개선된 클리어런스 속도를 갖는 화합물을 제공한다. 클리어런스 속도는 본질적으로 하기 기재된 바와 같이 검정할 수 있었다.

[0128] 대퇴부 동맥 캐놀라를 유지한 수컷 스프라그 돌리 래트 (체중 범위 250-320 g)를 찰스 리버 (미국 01887 매사추세츠주 윌밍턴)로부터 입수하였다. 시험 화합물을 22.5 mM 포스페이트 완충제, pH 2 중 20% 캡티솔(Captisol)® 중의 용액 (1 mL/kg)으로 1.0 mg/mL (유리 염기 등가물)의 최종 약물 농도로 정맥내로 투여하였다. 혈액 샘플을 24시간에 걸쳐 유지 캐놀라를 사용하여 수득하였다. 혈장 샘플을 원심분리에 의해 수득하고, 분석 전에 냉동 보관 (-20°C)하거나 또는 드라이아이스 상에 보관하였다.

[0129] 수컷 비글 개 (체중 범위 10-12 kg)를 마샬 바이오리소시스(Marshall Bioresources, 미국)로부터 입수하였다. 시험 화합물을 22.5 mM 포스페이트 완충제, pH 2 중 20% 캡티솔® 중의 용액 (1 mL/kg)으로 1.0 mg/mL (유리 염기 등가물)의 최종 약물 농도로 정맥내로 투여하였다. 혈액 샘플을 24시간에 걸쳐 정맥으로부터 수득하였다. 혈장 샘플을 원심분리에 의해 수득하고, 분석 전에 냉동 보관 (-20°C)하였다.

[0130] 동결된 혈장 샘플을 시험 화합물의 농도의 바이오분석을 위해 실온으로 해동시켰다. 아세토니트릴/메탄올 (1:1, v/v) 중 관련 내부 표준 화합물을 모든 혈장 샘플에 첨가하였다 (1:1, v/v). 샘플을 원심분리하여 침전된 단백질을 제거한 후, 분석하였다. 상청액을 자벨린 베타실(Javelin Betasil) C18 칼럼 (20 x 2.1 mm 카트리지, 이동상 A: 물/1 M NH₄HCO₃, 2000:10 v/v, 이동상 B: MeOH/1 M NH₄HCO₃, 2000:10 v/v) 상에 주입하고 신속 구배 용리함으로써 분석하였다. 용리된 분석물을 사이엑스(Sciex) API 4000 삼중 사중극자 질량 분광계를 사용하여 LC-MS-MS 분석에 의해 검출하였다. 화합물의 농도를 동일한 조건 하에 제조 및 분석된 표준물로부터 결정하였다. 클리어런스를 왓슨(Watson) 7.4, 써모 피셔 사이언티픽, 인크.(Thermo Fisher Scientific, Inc.)에서 비-구획 분석을 이용하여 계산하였다.

$$\text{클리어런스} = \frac{\text{용량}}{\text{혈장 농도 / 시간에 대한 곡선하 면적}}$$

[0131]

[0132] 실시예 2의 화합물은 본질적으로 기재된 바와 같이 실행하였고, 유리한 클리어런스 프로파일을 갖는 것으로 밝혀졌다.

실시예	클리어런스 (mL/min./Kg)	
	래트	개
2	27 (+/- 7.3, n=3)	2.8 (+/- 1.2, n=3)

[0133]

[0134] 본 발명의 방법에서 사용된 바와 같이 화합물을 임의의 제제화 없이 직접 투여하는 것이 가능하기는 하지만, 상기 화합물은 통상적으로 활성 성분으로서의 상기 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제를 포함하는 제약 조성물의 형태로 투여된다. 이들 조성물은 경구, 설하, 비강, 피하, 정맥내 및 근육내를 비롯한 다양한 경로에 의해 투여될 수 있다. 이러한 제약 조성물 및 그를 제조하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (University of the Sciences in Philadelphia, ed., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins

Co., 2005)]을 참조한다.

[0135] 조성물은 바람직하게는 단위 투여 형태로 제제화되고, 각각의 투여량은 약 0.1 내지 약 60 mg, 보다 통상적으로 약 0.5 내지 약 30 mg, 예를 들어 약 1 내지 약 10 mg의 활성 성분을 함유한다. 용어 "단위 투여 형태"는 각 단위가 목적 치료 효과를 생성할 것으로 계산된 예정량의 활성 물질을 하나 이상의 적합한 제약상 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제와 함께 함유하는, 인간 대상체 및 다른 포유동물을 위한 단위 투여량으로서 적합한 물리적 이산 단위를 지칭한다.

[0136] 화학식 I의 화합물은 일반적으로 넓은 투여량 범위에 걸쳐 효과적이다. 예를 들어, 1일 투여량은 통상적으로 약 0.002 내지 약 1.0 mg/kg 체중, 보다 통상적으로 약 0.008 내지 0.5 mg/kg 체중, 및 예를 들어 0.015 내지 0.15 mg/kg 체중의 범위 내에 속한다. 일부 경우에 상기 언급된 범위의 하한치 미만의 투여량 수준은 충분하고도 남을 수 있는 한편, 다른 경우에 훨씬 더 큰 용량을 어떠한 해로운 부작용의 유발 없이 사용할 수 있고, 따라서 상기 투여량 범위는 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하도록 의도되지 않는다. 실제로 투여되는 화합물의 양은 치료할 상태, 선택된 투여 경로, 투여되는 실제 화합물 또는 화합물들, 개별 환자의 연령, 체중 및 반응, 및 환자 증상의 증증도를 비롯한 관련 상황에 비추어, 의사에 의해 결정될 것이라는 점이 이해될 것이다.