



등록특허 10-2712565



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

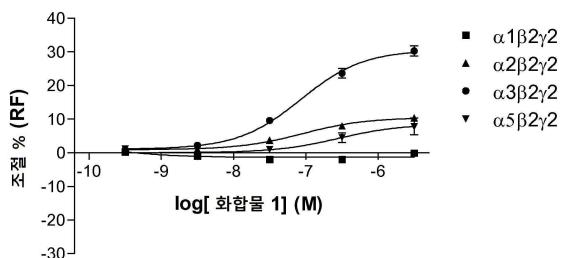
(45) 공고일자 2024년10월02일
(11) 등록번호 10-2712565
(24) 등록일자 2024년09월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/04 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01) *A61P 17/06* (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01) *A61P 25/04* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 471/04 (2022.08)
A61K 31/506 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7006185
- (22) 출원일자(국제) 2019년09월13일
심사청구일자 2022년08월31일
- (85) 번역문제출일자 2021년02월26일
- (65) 공개번호 10-2021-0061338
- (43) 공개일자 2021년05월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2019/074465
- (87) 국제공개번호 WO 2020/053377
국제공개일자 2020년03월19일
- (30) 우선권주장
18194297.0 2018년09월13일
유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2007110374 A1
(뒷면에 계속)
- 전체 청구항 수 : 총 9 항
- (54) 발명의 명칭 GABA 수용체 리간드
- 심사관 : 강신건

(57) 요 약

본 발명은 GABA 수용체 조절인자로서 유용한, 2-(3-(3-(2,4-디메톡시피리미딘-5-일)페닐-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-6-일)프로판-2-올에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 상기 화합물은 통증, 신경병증성 통증 및/또는 가려움증의 치료에 유용하다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61P 17/04 (2018.01)

A61P 17/06 (2018.01)

A61P 25/02 (2018.01)

A61P 25/04 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

(72) 발명자

야콥센 토마스 에이모스

덴마크, 2600 글로스트룹, 스메데란 26비, 씨/오

사니오나 에이/에스

다이링 티노

덴마크, 2600 글로스트룹, 스메데란 26비, 씨/오

사니오나 에이/에스

닐슨 카린 샌대저

덴마크, 2600 글로스트룹, 스메데란 26비, 씨/오

사니오나 에이/에스

(56) 선 행기술조사문헌

WO2003086406 A1

WO2000044752 A1

WO1999067245 A1

WO1998034923 A1

US10786513 B2

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 정의된 화합물의 치료학적 유효량을 포함하는, 신경병증성 통증(neuropathic pain) 또는 가려움증(itch)의 치료 방법에 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 신경병증성 통증의 치료 방법에 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 신경병증성 통증이 이질통(alldynia)인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 가려움증의 치료 방법에 사용하기 위한, 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 가려움증이 소양증(Pruritus)인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 가려움증이 피부 병증(skin condition)에 의해 유발되는, 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 피부 병증이 건선(psoriasis)인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 피부 병증이 습진(eczema)인, 약제학적 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GABA 수용체 조절인자(receptor modulator)로서 유용한, 2-(3-(3-(2,4-디메톡시페리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일)프로판-2-올에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 상기 화합물은 통증(pain), 신경병증성 통증(neuropathic pain) 및/또는 가려움증(itch)의 치료에 유용하다.

배경 기술

[0002] GABA는 통각 수용 섬유(nociceptive fiber)가 종결되는 척수 뒤뿔(spinal cord dorsal horn)의 층(lamina)-II를 포함하는 CNS에서 주요 억제성 신경 전달 물질(neurotransmitter)이다. 척수에서 억제성 신경 전달은 통증 전달에 매우 중요하며 억제의 향상은 무통증(analgesia)으로 이어진다(Zeilhofer HU. et. al. (2009), Trends in pharmacological science).

[0003] GABA_A 수용체의 조절인자는 신경병증성 통증의 동물 모델에서 극심한 무통증을 매개하는 것으로 밝혀졌다 (Munro, G. et al. (2013) European Journal of Pharmacology, 716, 1-3, 17-23). 신경병증성 통증 관리를 위한 현재의 치료요법(therapy)은 많은 환자에게 제한적인 이점을 제공하며, 바람직하지 않은 부작용 또는 용량 제한 독성(dose-limiting toxicity)을 수반한다. 또한, 현재의 치료요법은 증후성(symptomatic)이지, 질병을 개질(modifying)시키지는 않는다. 특히 질병을 개질시킬 수 있는 능력을 가진, 신경병증성 통증의 관리 및 치료를 위한 개선된 치료요법이 여전히 필요하다.

[0004] 또한, GABA_A 수용체 리간드가 가려움증의 치료에 유용할 수 있음이 이전에 입증되었다(예를 들어, WO 2017/129801 참조).

[0005] GABA_A 수용체는 다수의 아이소폼(isoform)으로 존재하는 리간드 개폐형 채널(ligand gated channel)이다. 각각의 수용체는 α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ε 및 θ 서브유닛(subunit) 아이소폼으로부터 유도된 서브유닛을 포함하는 오량체(pentamer) 복합체이다. CNS에 존재하는 대부분의 GABA_A 수용체는 2 개의 α , 2개의 β , 및 1 개의 γ 서브유닛을 함유한다(Mckernan RM. et. al. (1996). Trends in Neuroscience 19, 139-43). GABA_A 수용체 활성화의 약리학적 효과는 주로 수용체가 함유하는 서브유닛의 유형에 따른다. 통상적인 불안 완화제(anxiolytic) 벤조디아제핀(benzodiazepine)은 서브타입 선택성을 나타내지 않는다. 통상적인 벤조디아제핀의 단점(예를 들어, 진정(sedation), 의존성(dependency) 및 인지 장애(cognitive impairment))의 핵심 요소 중 하나는 GABA_A 수용체의 α_1 서브유닛과 관련이 있는 것으로 시사되었다. 디아제팜(diazepam)에 둔감한 상이한 α 서브유닛을 제공하는 점 돌연변이(point mutation)를 가진 마우스를 사용한 최근 연구는, α_2 및 α_3 서브유닛이 벤조디아제핀의 진통 효과(analgesic effect)를 매개하는 것을 시사한다(Knabl J. et al. (2009). Pain 141, 233-38). 이는 전임상 통증 모델에서 $\alpha_{2/3}$ 함유 GABA_A 수용체의 선택적 양성 조절인자의 진통 효과를 보여주는 약리학적 연구에 의해 뒷받침된다(Munro G. et. al (2008). JPET, 327, 969-81). 따라서, α_1 서브유닛 보다 α_2 및 /또는 α_3 서브유닛에 대한 선택성을 갖는 화합물은 개선된 부작용 프로파일(profile)을 가질 것으로 예상된다.

[0006] 추가로, 척수에서 GABA성 사이신경세포(GABAergic interneuron) 매개된 억제의 결여는 Bh1hb5 돌연변이 마우스에서 만성 가려움증의 원인인 것으로 나타났으며(Ross SE. et. al. (2010). Neuron 65, 886-98), 이는 척추 억제의 향상에 의한 잠재적 치료학적 활성을 시사한다.

[0007] WO 98/34923, EP 0616807, WO 2004/087690, WO 2007/110374 및 WO 2010/055132는 GABA_A 수용체 복합체의 조절에 반응성인, 중추 신경계 질환 및 장애의 치료에 유용한 벤즈이미다졸(benzimidazole) 유도체(derivative)를 기재한다.

[0008] WO 03/086406, WO 03/087099, WO 03/099816 및 WO 01/18000은 GABA 수용체에 대한 리간드로서 유용한 이미다조

-피리딘 유도체를 개시한다.

[0009] WO 2000/044752 및 WO 99/67245는 GABA 수용체에 대한 리간드로서 유용한 트리아졸로-피리다진 유도체를 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이러한 이전에 제시된 GABA 수용체 조절인자는 사소한 구조적 차이가 생물학적 활성에 큰 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다.

[0011] 그러나, 이전에 제시된 다수의 GABA 수용체의 조절인자는 원치 않는 부작용과 관련이 있다. 따라서, 최적화된 약리학적 프로파일을 갖고 원치 않는 부작용이 없는 화합물에 대한 강력한 요구가 있다.

과제의 해결 수단

개요

[0013] 주요 양태에서, 본 발명은 화학식 1(화합물 1)로 표시된, 2-(3-(3-(2,4-디메톡시피리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-6-일)프로판-2-올에 관한 것이다:

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] 추가로, 본 발명은 약제로서의 화합물 1의 용도에 관한 것이다. 본 발명자들은 화합물 1이 양성 알로스테릭 (positive allosteric) 조절인자를 선호하는 신규한 GABA_A α₃ 수용체라는 것을 발견하였다. 따라서, 하나의 양태에서, 화합물 1은 신경병증성 통증의 치료, 예방 및/또는 완화(alleviation)에 사용된다. 또 다른 양태에서, 화합물 1은 가려움증의 치료, 예방 및/또는 완화에 사용된다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1. (a) 화합물 1, (b) 화합물 9. 난모 세포(oocyte) 2-전극 전압 클램프(two-electrode voltage clamp) 기록에서 GABA_A 수용체에 대한 효능 프로파일. 각각의 실험 데이터 세트에 대해, GABA는 주어진 GABA_A 수용체 아형 조합에 대해 EC₁₀₋₂₀ 유도된 전류를 발생시키는 농도(0.5-3 μM)로 난모 세포 릴거(ringer) 용액에 용해되었다. 피크 전류를 관찰하였고 디아제팜의 최대 유효 농도로 정규화하였고, 이후 데이터 포인트를 비선형 회귀(non-linear regression)(n = 3-14)에 의해 경험적 힐 방정식(empirical Hill equation)에 맞쳤다. 화합물 1은 GABA_A-α₃ 함유 수용체에서 GABA-매개 전류의 우선적 강화작용(potentiation)과, GABA_A-α_{2/5} 서브유닛의 적은 활성화(10% 미만)를 나타내고, GABA_A-α₁ 함유 수용체의 활성화는 나타내지 않는다.

도 2. 수컷 CD-1 마우스의 긁는 행동(scratching behaviour)에 대한 급성 투여 후 화합물 1의 효과. 화합물 1을 사용한 급성 치료는 경구 투여 후 1mg/kg 이하의 최소 유효 용량(effective dose)으로 CCI 병변에 걸린 랫트(rat)에서 기계적 이질통(alloodynia)을 역전시켰다. 7일 간의 만성 치료 후, 3개 용량 모두 유의한 진통 효과가 유지된 반면, 모르핀(morphine)(6mg/kg)의 효과는 완전히 사라졌다. 모르핀은 피하로 투여되었다. 수컷 스프라그 돌리(Sprague Dawley) 랫트의 만성 수축 손상(Chronic constriction injury; CCI)은 베네테(Bennette) 및 차이(Xie)(1998)에 의해 기재된대로 수행되었다. 동물은 수술 14일 후에 테스트되었다. **p <0.01, ****p

<0.0001 대 비히클(vehicle), 이원(Two-way) ANOVA Fisher의 LSD 사후 테스트(posttest), n=7-9.

도 3. CCI 병변 랫트(lesioned rat)에서 발 움추림 역치(paw withdrawal threshold)에 대한 급성 및 만성 투여 후 화합물 1의 효과. 화합물 1은 CD-1 수컷 마우스에서 화합물 48/80 유도된 긁는 행동을 용량 의존적으로 감소시켰다. 목덜미(nape of neck)에 50 µL로 피하 주사된, 화합물 48/80은 비히클 주사된 마우스와 비교하여 긁기 횟수(bouts of scratching)에서 현저하고 유의한 증가를 유도하였다. 히스타민성(histaminergic) H1 길항제(antagonist)인, 디펜히드라민 염산염(Diphenhydramine hydrochloride)을 기준으로 사용하였고 화합물 48/80 투여 60분 전에 경구 투여한 반면, 화합물 1은 화합물 48/80 투여 30분 전에 경구 투여하였다. ##### p <0.0001 대 염수; ***p <0.001, **p <0.01, 대 비히클+화합물 48/80, 일원(One-way) ANOVA Fisher의 LSD 사후 테스트(post hoc test), n=7-9.

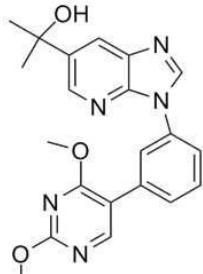
도 4. 수컷 SD 랫트의 탐색적 운동 활동(exploratory locomotor activity)에 대한 화합물 1의 효과. 494의 유리뇌 농도(free brain concentration)에 상응하는, 최대 30mg/kg까지 투여된 화합물 1은 수컷 스프라그 돌리 랫트에서 탐색적 운동 활동에 영향을 미치지 않았다(인자로서 시간 및 용량을 사용한 p> 0.05 이원 반복 측정 ANOVA). 화합물 1은 희미한 빛 조건 하에서 신규한 홈케이지(home cage)에 랫트를 도입하기 120분 전에 3, 10 및 30mg/kg, 10ml/kg으로 경구 투여하였다. 랫트의 활동은 30분 동안 자동으로 기록되었다(TSE MoTil, 독일 소재).

도 5. 수컷 SD 랫트의 로타로드 수행(rotarod performance)에 대한 화합물 1의 효과. 최대 30mg/kg까지 투여된 화합물 1은 막대(rod)에서의 낙하 지연(latency to fall)으로 측정된, 가속 회전 막대(accelerating rotating rod)에서 균형을 유지하는 랫트의 능력을 손상시키지 않았다. 대조적으로, 비-선택적 GABA_A 수용체 양성 조절인자인, 디아제팜은 낙하 지연을 상당히 단축시켰다(p <0.05). 화합물 1 및 디아제팜은 각각 테스트 시작 2 시간 및 1 시간 전에 경구 투여되었다. 랫트는 3일째에 약물 효과를 평가하기 전에 5분 동안 4-40rpm에서 2일 동안 로타로드에서 훈련되었다. 훈련 후 90초 이상 달리지 못한 랫트는 실험에 포함되지 않았다. *p <0.05, 대 비히클, 일원 ANOVA Fisher의 LSD 사후 테스트, n = 6-7.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 하나의 양태에서, 본 발명은 화학식 1로 표시된, 2-(3-(3-(2,4-디메톡시피리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]피리딘-6-일)프로판-2-올에 관한 것이다:

[0019] [화학식 1]



[0020]

[0021] 하나의 실시양태에서, 화합물 1은 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0022] 본 발명의 화합물은 호변이성질체 형태(tautomeric form)로 존재할 수 있다.

[0023] 약제학적으로 허용되는 염

[0024] 본 발명의 화학적 화합물은 약제학적으로(즉, 생리학적으로) 허용되는 염을 포함하여, 의도된 투여에 적합한 임의의 형태로 제공될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부가 염의 예는, 제한 없이, 비독성 무기 및 유기 산 부가 염, 예컨대 염산염, 브롬화수소산염, 질산염, 과염소산염, 인산염, 황산염, 포름산염, 아세테이트, 아코네이트, 아스코르베이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 신나메이트, 시트레이트, 엠보네이트, 에난테이트, 푸마레이트, 글루타메이트, 글리콜레이트, 락테이트, 말레이이트, 말로네이트, 만델레이트, 메탄설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 프탈레이트, 살리실레이트, 소르베이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 톨루엔-p-설포네이트 등을 포함한다. 이러한 염은 당해 분야에 잘 공지되어 있고 기재된 절차에 의해 형성될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 것으로 간주되지 않을 수 있는 다른 산, 예컨대 옥살산은 본 발명의 화학적 화합물 및 이의

약제학적으로 허용되는 산 부가 염을 수득하는데 중간체로서 유용한 염의 제조에 유용할 수 있다.

[0025] 본 발명의 화합물 1의 약제학적으로 허용되는 양이온성 염(cationic salt)의 예는, 제한없이, 음이온 기(anionic group)를 함유하는 본 발명의 화합물 1의, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 아연, 알루미늄, 리튬, 콜린, 리시늄(lysinium) 및 암모늄 염 등을 포함한다. 이러한 양이온성 염은 당해 분야에 잘 공지되어 있고 기재된 절차에 의해 형성될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, N-함유 화합물의 "오늄 염(onium salt)"은 또한 약제학적으로 허용되는 염으로 고려된다. 바람직한 "오늄 염"은 알킬-오늄 염, 사이클로알킬-오늄 염, 및 사이클로알킬 알킬-오늄 염을 포함한다.

표지된 화합물(*Labelled Compound*)

[0027] 본 발명의 화학적 화합물은 표지된(labelled) 또는 비표지된(un-labelled) 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 맥락에서, 표지된 화합물은 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수(mass number)와 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 하나 이상의 원자를 갖는다. 표지화(labelling)는 상기 화합물의 용이한 정량적 검출을 허용할 것이다.

[0028] 본 발명의 표지된 화합물은 다양한 진단 방법에서 진단 도구, 방사성 트레이서(radio tracer) 또는 모니터링 제제(monitoring agent)로서, 및 생체내 수용체 이미징(imaging)에 유용할 수 있다. 본 발명의 표지된 이성질체는 바람직하게는 표지로서 적어도 하나의 방사성 핵종(radionuclide)을 함유한다. 양전자 방출 방사성 핵종은 모두 사용 후보이다. 본 발명의 맥락에서, 방사성 핵종은 바람직하게는 ^2H (중수소), ^3H (삼중 수소), ^{13}C , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , 및 ^{18}F 로부터 선택된다.

[0029] 본 발명의 표지된 이성질체를 검출하기 위한 물리적 방법은 양자 방출 단층 촬영(Position Emission Tomography; PET), 단일 광자 이미징 전산화 단층 촬영(Single Photon Imaging Computed Tomography; SPECT), 자기 공명 분광법(Magnetic Resonance Spectroscopy; MRS), 자기 공명 이미징(Magnetic Resonance Imaging; MRI), 및 전산화 축성 X-레이 단층 촬영(Computed Axial X-ray Tomography; CAT) 또는 이의 조합 중에서 선택될 수 있다.

제조 방법

[0031] 본 발명의 화학적 화합물은 화학적 합성을 위한 종래의 방법, 예를 들어 작용 실시예(working example)에 기재된 것과 같이 제조될 수 있다. 본원에 기재된 공정을 위한 출발 물질은 공지되어 있거나 상업적으로 이용 가능한 화학물질로부터 종래의 방법에 의해 쉽게 제조될 수 있다.

[0032] 본원에 기재된 반응의 최종 생성물은 종래의 기술, 예를 들어, 추출, 결정화, 증류, 크로마토그래피 등에 의해 단리될 수 있다.

[0033] 본 발명의 화합물은 용매화되지 않은 형태 뿐만 아니라 물, 에탄올 등과 같은 약제학적으로 허용되는 용매와 함께 용매화된 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로, 용매화된 형태는 본 발명의 목적을 위해 용매화되지 않은 형태와 동등한 것으로 간주된다.

약제학적 조성물

[0035] 본 발명은 또한 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(excipient) 또는 희석제(diluent)와 함께, 화합물 1, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0036] 치료요법에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 1은 원료 화학적 화합물(raw chemical compound)의 형태로 투여될 수 있지만, 활성 성분을, 선택적으로 생리학적으로 허용되는 염의 형태로, 하나 이상의 애주번트(adjuvant), 부형제, 담체, 완충제(buffer), 희석제 및/또는 기타 종래의 약제학적 보조제(auxiliary)와 함께, 약제학적 조성물에 도입하는 것이 바람직하다.

[0037] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 화학적 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 및, 선택적으로, 당해 분야에 공지되어 있고 사용되는 다른 치료학적 및/또는 예방적 성분과 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 담체(들)는 제형의 다른 성분과 양립할 수 있다는 의미에서 "허용가능"하여야 하며 이의 수용체에게 해롭지 않아야 한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구, 직장, 기관지, 비강, 폐, 국소(협측(buccal) 및 설하(sub-lingual) 포함), 경피, 질 또는 비경구(피부, 피하, 근육 내, 복강 내, 정맥 내, 동맥 내, 뇌 내, 안 내(intraocular) 주사 또는 주입 포함) 투여에 적합한 것일 수

있거나, 분말 및 액체 에어로졸 투여를 포함하는 흡입 또는 주입, 또는 서방형 시스템(sustained release system)에 의한 투여에 적합한 형태의 것일 수 있다. 서방형 시스템의 적합한 예는 본 발명의 화합물을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스(semipermeable matrix)를 포함하며, 매트릭스는 성형체(shaped article), 예를 들어, 필름(film) 또는 마이크로 캡슐(microcapsule)의 형태일 수 있다.

[0038] 따라서 본 발명의 화합물 1은, 종래의 애주번트, 담체, 또는 희석제와 함께, 약제학적 조성물의 형태 및 이의 단위 투여량(unit dosage)으로 배치될 수 있다. 이러한 형태는 고체, 특히 정제(tablet), 충전된 캡슐(filled capsule), 분말 및 펠렛(pellet) 형태, 액체, 특히 수성 또는 비수성 용액, 혼탁액, 에멀젼(emulsion), 엘리시르(elixir), 및 동일한 것으로 충전된 캡슐, 경구 용도를 위한 모든 것, 직장 투여용 좌제(suppository), 및 비경구용 멸균 주사 용액을 포함한다. 이러한 약제학적 조성물 및 이의 단위 투여 형태는 추가적인 활성 화합물 또는 주성분(principle)의 존재 또는 부재 하에, 종래의 성분을 종래의 비율로 포함할 수 있으며, 이러한 단위 투여 형태는 사용될 의도된 일일 투여량 범위에 상응하는 임의의 적합한 활성 성분의 유효량을 함유할 수 있다. 본 발명의 화합물 1은 매우 다양한 경구 및 비경구 투여 형태로 투여될 수 있다. 하기 투여 형태가 활성 성분으로서, 본 발명의 화학적 화합물 또는 본 발명의 화학적 화합물의 약제학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다는 것은 당해 분야 기술자에게 명백할 것이다.

[0039] 본 발명의 화합물 1로부터 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 약제학적으로 허용되는 담체는 고체 또는 액체일 수 있다. 고체 형태 제제에는 분말, 정제, 알약(pill), 캡슐, 카세제(cachet), 좌제, 및 분산성 과립(dispersible granule)이 포함된다. 고체 담체는 희석제, 향미제(flavouring agent), 가용화제(solubilizer), 윤활제(lubricant), 혼탁제(suspending agent), 결합제(binder), 방부제(preservative), 정제 붕해제(tablet disintegrating agent), 또는 캡슐화 물질(encapsulating material)로도 또한 작용할 수 있는 하나 이상의 물질일 수 있다.

[0040] 약제학적 제제는 바람직하게는 단위 투여 형태이다. 이러한 형태에서, 제제는 적절한 양의 활성 성분을 함유하는 단위 용량으로 세분된다. 단위 투여 형태는 팩키징된(packaged) 제제일 수 있으며, 팩키지는 바이알(vial) 또는 앰플(ampoule)에 팩키징된 정제, 캡슐, 및 분말과 같은, 개별적인 양의 제제를 함유한다. 또한, 단위 투여 형태는 캡슐, 정제, 카세제 또는 로렌지(lozenge) 자체일 수 있거나, 팩키징된 형태의 이들 중 적절한 수의 어느 것 일 수 있다.

[0041] 치료학적 유효 용량은 증상 또는 병증(condition)을 개선하는, 활성 성분의 양을 지칭한다. 치료학적 효능 및 독성, 예를 들어, ED₅₀은 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약리학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 치료 효과와 독성 효과 사이의 용량 비율은 치료 지수(therapeutic index)이며 치료 효과를 초래하는 혈장 수준과 독성 효과를 초래하는 혈장 비율 사이의 비율로 표현될 수 있다. 큰 치료 지수를 나타내는 약제학적 조성물이 바람직하다.

[0042] 투여되는 용량은 물론 치료받는 개체(individual)의 연령, 체중 및 상태뿐만 아니라, 투여 경로, 투여 형태 및 섭생(regimen), 및 원하는 결과에 따라 신중하게 조정되어야하며, 정확한 투여량은 물론 진료의(practitioner)에 의해 결정되어야한다.

[0043] 실제 투여량은 치료되는 질병의 특성 및 중증도에 따라 다르고, 의사의 재량 안에 있으며, 원하는 치료 효과를 생성하기 위해 본 발명의 특정 상황에 대한 투여량의 적정에 의해 달라질 수 있다. 그러나, 현재 개별 용량 당 약 0.1 내지 약 10.000 mg의 활성 성분, 바람직하게는 약 1 내지 약 1000 mg, 가장 바람직하게는 약 10 내지 약 500 mg을 함유하는 약제학적 조성물이 치료학적 치료에 적합하다고 고려된다. 활성 성분은 하루에 하나의 또는 다수의 용량으로 투여될 수 있다. 특정 경우에, 만족스러운 결과는 0.1 µg/kg i.v. 및 1 µg/kg p.o. 만큼 낮은 투여량으로 수득할 수 있다. 투여량 범위의 상한은 현재 약 10 mg/kg i.v. 및 100mg/kg p.o.로 간주된다. 바람직한 범위는 약 0.1 µg/kg 내지 약 10mg/kg/일 i.v., 및 약 1 µg/kg 내지 약 100mg/kg/일 p.o.이다.

생물학적 활성

[0045] 본 발명의 화합물 1은 GABA_A 수용체 복합체를 조절할 수 있고, a₃ 서브유닛(subunit) 및 작은 정도로, a₂ 및 a₅ 서브유닛을 함유하는 GABA_A 수용체의 양성 알로스테릭 조절인자(positive allosteric modulator; PAM)인 것으로 입증된다. 화합물 1은 급성 및 만성 치료 후 신경병증성 통증에 대한 랫트 모델에서 기계적 이질통을 역전시키고, 가려움증-유발 화합물로 치료된 마우스에서 긁기(scratching)를 개선하며, 이는 진통 및 항소양(antipruritic) 효과를 시사한다. 화합물 1은 랫트 탐색적 운동 활동 및 로타로드 수행에서 측정된 바와 같이

진정 및 운동 손상 영향에 대한 경향성(liability)을 나타내지 않는다.

[0046] 치료요법의 방법

GABA_A 수용체에 대한 리간드인, 화합물 1은 인간을 포함한 생체의 장애의 치료, 예방 및/또는 완화에 사용된다.

바람직하게는, 화합물 1은 신경병증성 통증 및/또는 가려움증과 같은 통증의 치료, 예방 및/또는 완화에 사용된다.

[0048] 신경병증성 통증 치료

하나의 양태에서, 본 발명은 신경병증성 통증의 치료, 예방 및/또는 완화에서, 화학식 1로 표시된, 2-(3-(3-(2,4-디메톡시페리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일)프로판-2-올의 용도에 관한 것이다.

신경병증성 통증은 여러 형태의 만성 통증을 포함하고 체세포가 아닌 신경 기능 장애로 인한 통증의 범주이다. 중추 또는 말초 신경계의 기능 장애로부터 유래한 통증인, 신경병증성 통증은 말초 신경 또는 중추 신경계 부위 손상의 결과일 수 있거나, 질병으로 인한 것일 수 있거나, 특발성(idiopathic)일 수 있다. 신경병증성 통증의 증상은 작열감(burning), 따끔 거림(tingling), 전기(electricity), 저림(pins and needles), 감각 이상 (paresthesia), 감각 장애(dysesthesia), 뻣뻣함(stiffness), 사지 마비(numbness in the extremities), 신체 왜곡 느낌(feelings of bodily distortion), 이질통(alloodynia)(일반적으로 무해한 자극에 의해 유발되는 통증), 통각 과민(hyperalgesia)(비정상적인 통증에 대한 감수성), 통각 과민(hyperpathia)(통증 자극이 멈춘 후에도 오랫동안 지속되는 과장된 통증 반응), 환상 통증(phantom pain) 및 자발적 통증(spontaneous pain)의 감각을 포함한다.

[0051] 가려움증의 치료

하나의 양태에서, 본 발명은 가려움증의 치료, 예방 및/또는 완화에서, 화학식 1로 표시된, 2-(3-(3-(2,4-디메톡시페리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일)프로판-2-올의 용도에 관한 것이다.

가려움증(소양증(*Pruritus*)으로서도 공지됨)은 긁기에 대한 욕망 또는 반응을 유발하는 감각이다. 가려움증은 통증과 많은 유사점이 있음이 밝혀졌다. 대부분의 가려움증은 히스타민과 관련이 있으며, 항히스타민제 (antihistamines)로 치료한다. 그러나, 일부 경우의 가려움증은 항히스타민제로 치료가능하지 않다. 가려움증의 가능한 원인은 건조한 피부, 피부 병증(skin condition) 및 발진(rash), 내부 질환, 신경 장애, 자극 및 알레르기 반응, 약물 및 임신을 포함한다.

피부 병증, 비듬(dandruff), 점상 손발바닥 각질 피부증(punctate palmoplantar keratoderma), 옴(scabies), 흉터 성장(scar growth), 건조증(xerosis), 이(lice), 수두(chickenpox) 및 두드러기(hives)와 같은 많은 피부 질환이 가려움증을 유발한다. 상기 피부 병증에는 건선(psoriasis), 습진(eczema)(피부염(dermatitis), 일광 화상(sunburn), 무좀(athlete's foot), 화농성 한선염(hidradenitis suppurativa)이 포함된다.

가려운 피부는 기저 질환의 증상일 수 있다. 이는 간 질환(liver disease), 신부전(kidney failure), 당뇨병(diabetes mellitus), 부갑상선 기능 항진증(hyperparathyroidism), 철분 결핍 빈혈(iron deficiency anemia), 황달(jaundice), 담즙 정체(cholestasis), 요독증(uraemia), 적혈구 증가증(polycythemia), 갑상선 문제, 및 백혈병(leukemia) 및 림프종(lymphoma)을 포함한 암을 포함한다. 다발성 경화증(multiple sclerosis), 당뇨병, 신경 압박(pinched nerve) 및 대상 포진(shingles)(띠헤르페스(herpes zoster))과 같은 신경계에 영향을 미치는 병증은 가려움을 유발할 수 있다.

가려움은 양모(wool), 화장품, 비누, 히스타민, 오피오이드(opioid), 프로스타글란дин(prostaglandin), 프로테아제(protease), 사이토카인(cytokine), 신경 패티드(neuropeptide), 특히 물질 P, 세로토닌(serotonin), 클로로퀸 화합물(chloroquine Compound) 48/80(제품 번호. 94724-12-6) 및 담즙 염과 같은 다수의 물질 및 화학물질에 의해 유발되거나 향상될 수 있다. 음식 알레르기가 또한 피부 가려움을 유발할 수 있다.

가려움의 감각을 향상시키는 것으로 여겨지는 요인은 표피와 진피의 건조, 조직의 무산소증(anoxia), 모세 혈관 확장(dilation of the capillary), 자극적인 자극(irritating stimuli), 일차 피부 질환 및 정신 장애를 포함한다.

하나의 실시양태에서, 가려움증은 소양증이다. 하나의 실시양태에서, 소양증은 항문 소양증(*Pruritus ani*)이다. 하나의 실시양태에서, 가려움증은 음낭 소양증(*Pruritus scroti*)이다. 하나의 실시양태에서, 소양증은 외음부 소양증(*Pruritus vulva*)이다. 하나의 실시양태에서, 가려움증은 항문성기 소양증(*Anogenital pruritus*)이다.

[0059]

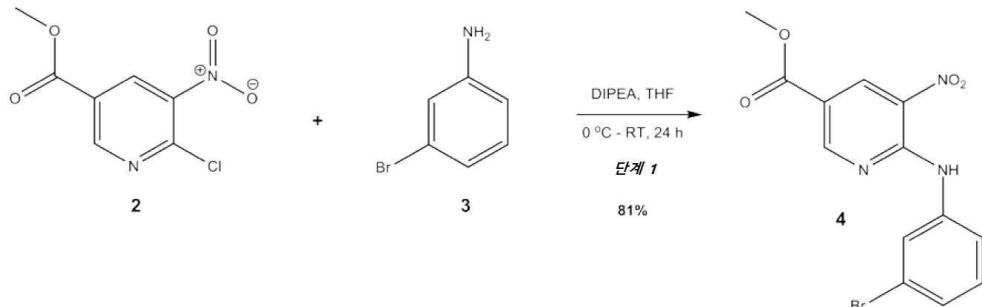
실시예

[0060]

실시예 1: 2-(3-(2,4-디메톡시페리미딘-5-일)페닐)-3*H*-이미다조[4,5-*b*]페리딘-6-일)프로판-2-올 (1)의 제조

[0061]

단계 1: 메틸 6-((3-브로모페닐)아미노)-5-니트로니코티네이트(4)의 제조



[0062]

[0063]

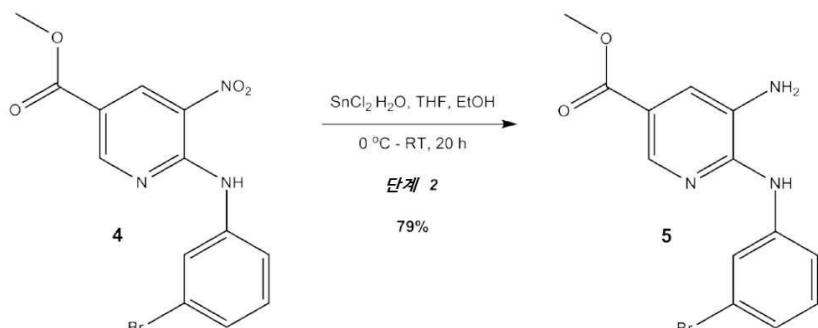
0°C에서 무수 테트라하이드로푸란(750 mL) 중 6-클로로-5-니트로-니코틴산 2(100 g, 461.72 mmol)의 교반된 용액에 *N,N*-디소프로필에틸아민(120.6 mL, 692.58 mmol)을 첨가한 다음 3-브로모아닐린 3(55mL, 494.1mmol)을 적어 하였다. 반응 혼합물을 질소 대기 하에 24 시간 동안 주변 온도(ambient temperature)에서 교반하였다. 반응은 TLC 및 UPLC로 모니터링되었다. 반응 혼합물을 감압 하에 이의 초기 용적의 절반으로 농축시켰다. 반응 혼합물에 석유 에테르(pet ether)(800 mL)를 첨가하였고 혼탁액을 1 시간 동안 교반하였다. 나타난 주황색 고체를 흡인(suction) 하에 여과하였고 석유 에테르(8 x 300 mL)로 완전히 세척하여 메틸 6-((3-브로모페닐)아미노)-5-니트로니코티네이트 4(132 g, 81%)를 주황색 고체로 제공하였다.

[0064]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.31 (s, 1H, 교환가능한 양성자), 8.94 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 7.60 Hz, 1H), 7.41–7.36 (m, 2H), 3.88 (s, 3H); LCMS (ESI): m/z: 352.9 (M+H)⁺.

[0065]

단계 2: 메틸 5-아미노-6-((3-브로모페닐)아미노)니코티네이트 (5)의 제조



[0066]

[0067]

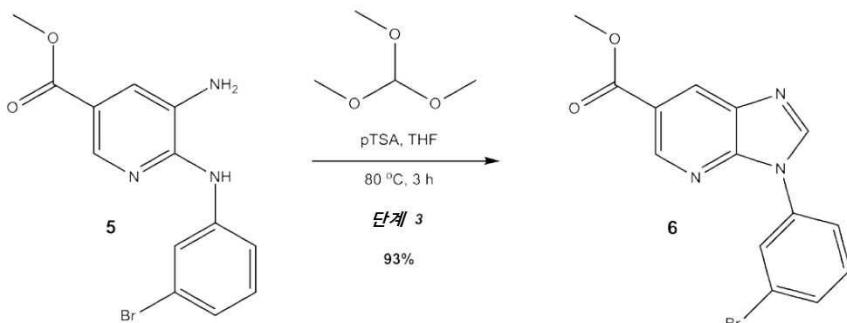
에탄올:THF [1:1; (2600 mL)]의 혼합물 중 메틸 6-((3-브로모페닐)아미노)-5-니트로니코티네이트 4(485g; 1377.28mmol)의 냉각된(0°C) 혼탁액에, 염화주석 이수화물(stannous chloride dihydrate)(932.3 g; 4131.8 mmol)을 0°C에서 부분적으로 첨가하였고 반응 혼합물을 질소 대기 하에서 20 시간 동안 교반하면서 반응 혼합물의 온도를 주변 온도로 하였다. 반응의 진행은 TLC 및 UPLC로 모니터링되었다. 20 시간 후, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하였고, 수득된 잔류물을 물(1000 mL)로 희석하였다. 수성 혼합물을 5°C에서 고체 중탄산나트륨으로 염기성화(basifying)하였다(pH~ 9-10 까지). 이후 클로로포름(1500 mL)을 수성 부분에 첨가하였고 15분 동안 교반하였고, 나타난 불용성 무기물을 셀라이트(Celite)의 베드(bed)에서 여과하였다. 베드를 클로로포름(5 x 500 mL)으로 완전히 세척하였다. 유기층을 분리하였고, 포화 염수 용액(800 mL)으로 세척하였고, 무수 황산나트륨위에서 건조하였고, 여과하고 농축하여 메틸 5-아미노-6-((3-브로모페닐)아미노)니코티네이트 5(350g, 78.88%)를 회색빛(greyish) 고체로서 수득하였다.

[0068]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.38 (s, 1H, 교환가능한 양성자), 8.13 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 10.00 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.27–7.22 (m, 1H), 7.13–7.10 (m, 1H), 5.31 (s, 2H, 교환가능한 양성

자), 3.80 (s, 3H); LCMS (ESI): m/z: 324.0 ($M+H$)⁺.

[0069] 단계 3: 메틸 3-(3-브로모페닐)-3*H*-이미다조[4,5-*b*]파리딘-6-카르복실레이트 (6)의 제조



[0070]

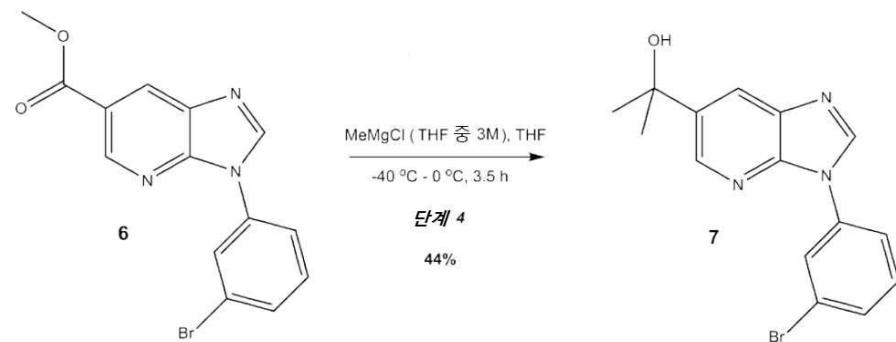
[0071] 무수 THF(3000mL) 중 메틸 5-아미노-6-((3-브로모페닐)아미노)니코티네이트 5(350g, 1086.41mmol)의 교반된 용액에 트리메틸 오르토포르메이트(Trimethyl orthoformate)(172.94g, 1629.6mmol)에 이어 *p*-톨루엔설피산(pTSA)(61.99g, 325.92mmol)을 한 부분으로 첨가하였고, 반응물(reaction mass)을 질소 대기 하에서 80°C로 가열하였다. 반응의 진행은 TLC 및 UPLC로 모니터링되었다. 3 시간 후, 반응 혼합물이 주변 온도에 도달하도록 하였고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 수득된 조물질(crude)을 물(1000 mL)로 희석하였고, 실온에서 교반하면서 수성 부분을 pH ~ 9-10까지 중탄산나트륨으로 염기성화시켰다. 추가로 1 시간 동안 교반을 계속하였다. 나타난 고체를 흡인 하에 여과하였고 진공 하에 완전히 건조시켜 조물질 둉어리(crude mass)(380g, 105.3% 물질 균형(mass balance))를 회백색(off white) 고체로서 제공하였다. 조물질을 클로로포름(5000 mL)에 용해시켰고, 염수로 세척하였고, Na₂SO₄ 위에서 건조하였고, 여과하고 감압 하에 농축하여 메틸 3-(3-브로모페닐)-3*H*-이미다조[4,5-*b*]파리딘-6-카르복실레이트 6(335g, 92.83%)을 회백색 고체로서 제공하였다.

[0072]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.12 (s, 1H), 9.03 (d, J = 2.00 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 2 Hz, 1H), 8.27-8.26 (m, 1H), 8.04-8.01 (m, 1H), 7.73-7.71 (m, 1H), 7.63-7.59 (m, 1H), 3.94 (s, 3H); LCMS (ESI): m/z: 334.0 ($M+H$)⁺.

[0073]

단계 4: 2-(3-(3-브로모페닐)-3*H*-이미다조[4,5-*b*]파리딘-6-일)프로판-2-올 (7)의 제조



[0074]

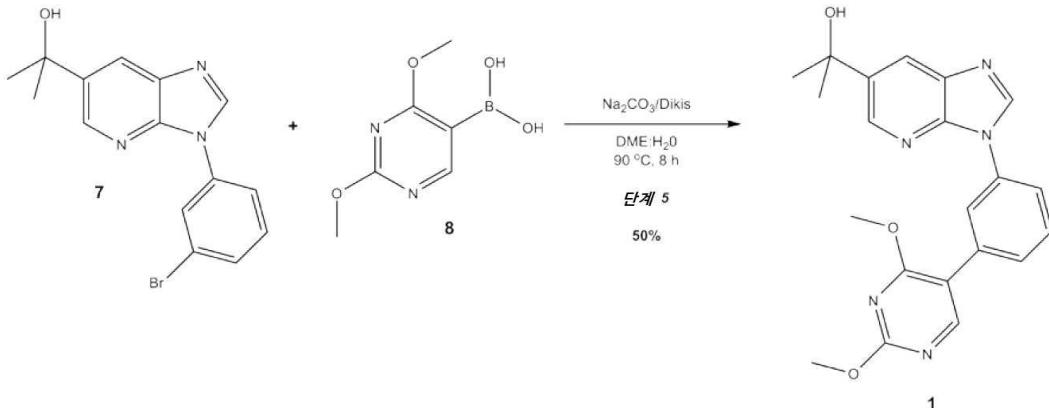
[0075] -20°C에서 무수 THF(600 mL) 중 메틸 3-(3-브로모페닐)-3*H*-이미다조[4,5-*b*]파리딘-6-카르복실레이트 6(50 g, 150.53 mmol)의 교반된 혼탁액에 MeMgCl 용액 [(72 mL, 143.92mmol); THF 중 2M]을 질소 대기 하에서 30분 동안 적가하였다. 반응 혼합물을 질소 대기 하에서 3.5 시간 동안 교반하면서 반응 온도를 -20°C 내지 0°C로 유지하였다. 반응의 진행은 TLC 및 UPLC로 모니터링되었다. 3.5 시간 후, 반응물을 포화 염화 암모늄 용액(1500 mL)으로 퀘칭(quenching)하였고, 수성 층을 에틸 아세테이트(3x1000 mL)로 추출하였고, 조합된 유기층을 포화 염수 용액(500 mL)으로 세척하였고, 무수 황산나트륨 위에서 건조하였고, 여과하고 농축하여 조물질 둉어리(51 g, 102% 물질 균형)를 갈색 검(gum)으로서 제공하였다. 조물질을 헥산 중 20% 에틸 아세테이트를 용리액으로 사용하여 중성 알루미나 베드 상에서 플래시 컬럼(flash column)으로 정제하여 원하는 생성물 2-(3-(3-브로모페닐)-3*H*-이미다조[4,5-*b*]파리딘-6-일)프로판-2-올 7(22g, 44%)을 갈색 검으로서 제공하였다.

[0076]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.95 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.00

Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.00 Hz, 1H), 7.59–7.55 (m, 1H), 5.32 (s, 1H, 교환가능한 양성자), 1.55 (s, 6H); LCMS (ESI): m/z: 334.0 ($M+H$).

[0077] 단계 5: 2-(3-(3-(2,4-디메톡시피리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일)프로판-2-올(1)의 제조



[0078]

[0079]

1,2-디메톡시에탄:물[2:1;(45 mL)]의 혼합물 중 2-(3-(3-브로모페닐)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일)프로판-2-올 7(0.75g, 2.25mmol)의 교반된 용액에, 2,4-디메톡시피리미딘-5-보론산 8(0.456 g, 2.48 mmol)에 이어서, Na_2CO_3 (0.478 g, 4.51 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 질소 가스로 25분 동안 털기시켰다. 상기 반응 혼합물을 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 디클로라이드(0.079g, 0.112 mmol)를 첨가하였고 질소 대기 하에서 90°C로 가열하였다. 반응의 진행은 TLC 및 UPLC로 모니터링되었다. 15 시간 후, 반응 혼합물을 주변 온도에 도달하도록 허용하였고 냉수(75 mL)로 훈청시켰다. 수성 부분을 에틸 아세테이트(3 x 200 mL)로 추출하였고, 조합된 유기층을 염수(2 x 50 mL)로 세척하였고, 무수 황산나트륨 위에서 건조하였고, 여과하고 농축하여 조물질(0.865 g; 물질 균형 97.8%)을 갈색 검으로서 제공하였다. 조물질을 헥산 중 50% 에틸 아세테이트를 용리액으로 사용하는 플래쉬 컬럼으로 정제하여 원하는 생성물(0.575 g)을 회백색 고체로서 제공하였고, 이를 추가로 분쇄(triturating)하였고, 여과하고 흡인 하에 건조시켜 2-(3-(3-(2,4-디메톡시피리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]페리딘-6-일)프로판-2-올(1)(0.5 g, 56.62%)을 회백색 고체로서 제공하였다.

[0080]

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-\text{d}_6$): d=8.94(s, 1H), 8.60(d, J = 2.00 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.24 (d, J = 2.00 Hz, 1H), 8.13–8.12 (m, 1H), 8.01–7.98 (m, 1H), 7.70–7.63 (m, 2H), 5.3 (s, 1H, 교환가능한 양성자), 3.98 (d, J = 4.00 Hz, 6H), 1.55 (s, 6H); LCMS (ESI): m/z: 392.3 ($M+H$)⁺, MR: 86.0°C – 93.4°C.

[0081] 실시예 2: ^3H -플루마제닐 결합(flumazenil binding)의 시험판내 억제

[0082] 조직 준비

[0083] 둘베코의 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM)에서 울트라글루타민(Ultralglutamine) 1,4500 mg/1 D-글루코스, 10% 소 태아 혈청이 있고 다음 항생제: 제오신(zeocin)(0.1mg/ml), 하이그로마이신(hyromycin) B(0.15mg/ml) 및 G418(0.5mg/ml)를 함유하는 둘베코의 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM)에서 재조합 GABA $\alpha_3 \beta_3 \gamma_2$ 수용체를 안정적으로 발현하는 HEK-293 세포주를 배양하였다.

[0084]

배양액이 대형 배양 플라스크(large culture flask)(175cm²)에서 컨플루언시(confluence)에 도달하는 경우 DMEM 을 제거하였고 세포를 둘베코의 인산염 완충 염수(DPBS; KCl : 0.2g/1, KH₂PO₄ : 0.2g/1, NaCl : 8g/1, Na₂HPO₄ : 1.15 g/1)에서 1회 세척하였다. 대략 5분 동안 2ml DPBS를 배양액에 첨가한 다음, 배양 플라스크 바닥의 세포를 부드럽게 긁어 낸 후 세포를 수확(harvesting)하였다. 또 다른 15ml DPBS를 첨가한 후, 세포 혼탁액을 팔콘(Falcon) 튜브로 옮기고 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 펠렛을 Ultra-Turrax 균질화기를 사용하여 15ml 트리스-HCl 또는 트리스-시트레이트 완충제(50mM, pH 7.1)에서 1회 세척하였고 27,000 x g에서 10분 동안 2°C에서 원심분리하였다. 세척된 펠렛을 15ml 트리스-HCl 또는 트리스-시트레이트 완충제(50mM, pH 7.1)에 재현탁하였고 결합 실험일까지 -80°C에서 냉동시켰다.

[0085] 분석

[0086] 실험 당일, 막 제제(membrane preparation)를 실온에서 해동하였고 27,000 x g로 10분 동안 2°C에서 원심분리 하였다. 펠렛을 트리스-시트레이트 완충제(50mM, pH 7.1)에서 Ultra-Turrax 카밀화기를 사용하여 분석 당 30 ~ 150 µg 단백질로 재현탁한 다음 결합 분석에 사용하였다. 세포 혼탁액 0.5ml의 분취량을 25 µl의 테스트 용액 및 25 µl의 ³H-플루마제닐(1nM, 최종 농도)에 첨가하였고, 혼합하였고 2°C에서 40분 동안 이중으로 배양하였다. 비특이적 결합은 클로나제팜(1 µM, 최종 농도)을 사용하여 결정되었다.

[0087] 테스트 화합물의 모든 회석 및 분석 배양은 유리 바이알/플레이트에서 수행되었다. 테스트 화합물 및 ³H-플루마제팜의 용액을 원하는 최종 농도의 22 배로 제조하였다. 화합물을 100% DMSO(10mM 스톡(stock))에 용해시켰고, 48% 에탄올-물에 회석하였고, 연속 회석으로 삼중으로 테스트하였다. 결합은 Brandel Cell Harvester를 사용하여 Whatman GF/C 유리 섬유 필터(glass fibre filter) 상의 금속 여과에 의해 종결시킨 다음, 1ml 빙냉(ice-cold) 트리스-시트레이트 완충제로 10회 세척하였다. 필터 상의 방사능(radioactivity)의 양은 Tri-Carb™ 계수기(PerkinElmer Life and Analytical Sciences)를 사용하여 종래의 액체 섬광 계수(liquid scintillation counting)에 의해 결정되었다. 특이적 결합은 총 결합에서 비특이적 결합을 공제한 값이다.

[0088] 결과

표 1

화합물 1에 대한 K_i 및 IC₅₀ 값

화합물	K _i (µM)	IC ₅₀ (µM)
2-(3-(3-(2,4-디메톡시파리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-6-일)프로판-2-올 (1)	0.015	0.038

[0089] IC₅₀ 값은 ³H-플루마제닐의 특이적 결합을 50% 억제하는 테스트 물질의 농도이고,

$$IC_{50} = (1\text{의 적용된 농도}) * \frac{1}{(\frac{C_0}{C_x} - 1)}$$

[0090]

여기서 C₀은 대조 분석의 특이적 결합이고 C_x는 테스트 분석의 특이적 결합이다.

[0091] 결론

[0092] 2-(3-(3-(2,4-디메톡시파리미딘-5-일)페닐)-3H-이미다조[4,5-b]파리딘-6-일)프로판-2-올 (1)은 0.015 µM의 K_i 값 및 0.038 µM의 IC₅₀ 값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0093] 실시예 3: 난모세포 전기생리학(Oocyte electrophysiology)

[0094] 본원에 보고된 분석은 주요 뇌 GABA_A 수용체 아형에서 PAM의 효능뿐만 아니라 시험관내 기능적 효력(functional potency)을 결정하기 위해 수행된다. 이를 확립하기 위해, 제노푸스 라에비스(*Xenopus laevis*) 난모 세포에서 발현된 α₁β₂γ₂, α₂β₂γ₂, α₃β₂γ₂ 및 α₅β₂γ₂ 수용체로부터 최대 GABA 유발 반응의 5-20%를 발생시키는 GABA 농도에서 전체 농도 반응 프로필을 결정하였다.

[0095] 제노푸스 라에비스 난모 세포 준비

[0096] 콜라게나제 데폴리클레이티드(Collagenase defolliculated) X. 라에비스 난모세포는 Ecocyte Bioscience으로부터 수득하였다. 주입을 위해, 난모 세포를 모드. 바쓰(Mod. Barth)의 용액(90 mM NaCl, 1 mM KC1, 0.66 mM NaNO₃, 2.4 mM NaHCO₃, 0.74 mM CaCl₂, 0.82 mM MgCl₂, 100 µg/ml 젠타마이신(Gentamicin) 및 pH 7.55로 조정된 10mM HEPES)에서 맞춤형 설계 챔버(custom designed chamber)에 배치하였고 Pico Pump(WPI)를 사용하여 25-50 nL의 cRNA 혼합물과 함께 주입하였다. cRNA 혼합물은 GABA_AR 서브유닛 α_x, β₂, 및 γ_{2s}를 3:1:3의 비율로 및 0.5 µg/µL의 총 농도로 함유한다. 주입 후, 난모 세포는 1-5일 동안 모드. 바쓰에서 18°C로 유지되었다.

2-전극 전압 클램프 실험(Two-electrode voltage clamp experiment)

X. 라에비스 난모 세포의 전기생리학적 반응은 2-전극 전압 클램프 기술을 사용하여 측정되었다. 단일 난모 세포를 > 2 ml/min OR2(90 mM NaCl, 2.5 mM KC1, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ 및 5 mM HEPES pH 7.4)로 연속적으로 관류(perfusing)하는 맞춤형 설계 기록 챔버에 배치하였다. 실험 분석 용액은 측정된 삼투압이 대략 180mOsm인 표준 OR2 완충 용액이었다. 기록 전극은 DMZ-범용 풀러(Universal puller)(Zeitz Instrument)를 사용하여 필라멘트가 있는 보로실리케이트 유리 튜빙(borosilicate glass tubing)(Sutter BF150-110-10)으로 제작되었으며, 2M KC1로 다시 채웠고(backfilling) OR2 용액에 잠길 때 전극 저항은 0.5-1 MΩ 범위였다. 난모 세포는 수동 마이크로 조작기(manual micro manipulator)를 사용하여 절렸고 실험이 개시되기 전에 100 nA의 최대 누설 전류를 보장하기 위해 적어도 1분 동안 -50 mV 내지 -80 mV의 유지 전위(holding potential)에서 평형을 이루도록 하였다. 유지 전위는 일반적으로 -60mV로 설정되었고, 이는 전형적인 휴지 전위인 -25mV보다 상당히 낮다. 난모 세포의 배치(batch)에서 전류 진폭(current amplitude)이 낮았던 경우, 누설 전류가 100 nA를 초과하지 않는 한 -80 mV의 유지 전위가 사용되었다. 전류는 Geneclamp 500B 증폭기(amplifier)(Axon)에 의해 증폭되었고, 20Hz에서 저역 필터링(low-pass filtering)되었고, Digidata 1322A(Axon)에 의해 200Hz에서 디지털화된 다음, 기록되었고 pClamp9 세트(Axon)을 사용하여 PC(Compaq Evo)에 의해 분석되었다.

화합물 용액을 내경(inner diameter) 1.5 mm(Modulohm 214813)의 모세관을 통해 적용하였고, 난모 세포로부터 대략 2mm 떨어진 곳에 배치하였고 텤플론튜빙(Teflon tubing)을 통해 Gilson 233XL 자동 시료 주입기(autosampler)에 연결하였다. Gilson 735 소프트웨어 제품군은 모든 Gilson 장비(233XL 자동 시료 주입기, 402 회석 기 및 Minipuls 3 펌프)를 제어하고 pCLAMP9에 의한 기록을 촉발하는데 사용되었다. 적용 중에 모세관을 통과한 2.5 ml/분의 유속은 난모 세포를 둘러싼 액체의 신속한 교환을 보장하였다. 애플리케이션 길이(application length)는 피크 전류를 수득하기에 충분한 60초 동안 지속되도록 설정되었다. 기록 사이의 시간 간격은 5분이었으며, 이 동안 난모 세포도 모세관을 통해 OR2로 관류되었다.

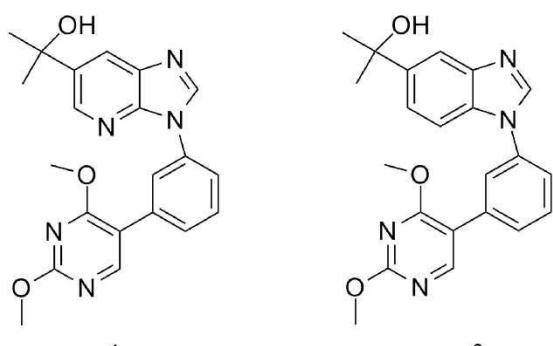
실험 데이터

각 실험 데이터 세트에 대해, GABA는 주어진 GABA_A 수용체 아형 조합(0.5-5 μM)에 대해 EC_{50} - EC_{20} 유도 전류를 발생시키는 것으로 공지된 농도로 OR2에 용해되었고, 이후 이 용액은 대조군으로 뿐만 아니라 실험에서 테스트 할 화합물을 용해하기 위한 스톡 용액에 대해 사용되었다. 완전한 실험 세트는 GABA의 4개의 대조군 트레이스(trace), 기준 0.5 μM 디아제팜 트레이스, 10개의 GABA 대조군 트레이스, 및 마지막으로 증가하는 농도의 테스트 화합물의 트레이스를 함유하였다. 개별 난모 세포는 하나의 실험 세트 후에 폐기되었다.

디아제팜의 조절 효과는 디아제팜 트레이스를 직전의 대조군 트레이스와 비교하여 계산되었다. 마찬가지로, 테스트 트레이스에서 화합물의 조절 효과를 테스트 트레이스 직전의 대조군과 비교하여 수득하였다. 개별 난모 세포 사이의 화합물의 효과를 비교할 수 있도록 모든 화합물 강화작용을 동일한 난모 세포에서 대조군 디아제팜 강화작용으로 정규화하였다.

결과

분석은 화합물 1 및 9에 대해 수행되었고, 결과는 도 1에 나타낸다.



결론

높도록 반응 프로파일로부터 볼 수 있는 바와 같이, 화합물 1 및 9에 의한 조절을 특히 $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ 수용체의 조절과

관련하여 다양하다. 중요한 것은, $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ 수용체의 조절은 화합물 1의 경우 0에 가까운 반면, 화합물 9의 경우 명백하게 부정적이다. 본 실시예는 또한 두 분자 사이의 상대적으로 작은 구조적 차이가 생물학적 활성에 큰 영향을 미친다는 것을 입증한다.

[0110] **실시예 4: 랫트의 만성 수축 손상(CCI)에서 기계적 이질통에 대한 화합물 1의 급성 및 만성 효과.**

[0111] **방법**

[0112] **동물:**

[0113] 수컷 SPRD 랫트(Taconic), 수술 시 140-160g

[0114] **수술:**

[0115] 마취는 산소(30%) 및 아산화질소(68%)와 조합된 2.5% 이소플루란에 의해 유도되고 유지되었다. 좌골 신경 (sciatic nerve)은 좌골 삼분지(trifurcation)에 근접한 허벅지 중간 수준에서 노출되었다. 4개의 크로믹 장 결찰실(chromic gut ligature)(4/0)(Ethicon, 뉴저지주 뉴브런즈윅(New Brunswick, NJ) 소재)은 혈관 공급이 명백히 손상되지 않도록, 1-2mm 간격으로, 신경 주위에 느슨하게 묶었다. 피개(overlying) 근육은 4/0 합성 흡수성 외과 봉합사(surgical suture)를 사용하여 총총이 폐쇄되었다. 피부는 1-2 개의 클립을 사용하여 폐쇄되었다.

[0116] **신경 손상 랫트의 행동 테스트:**

[0117] 수술 3-14일 후, 동물은 기계적 이질통의 존재에 대해 모니터링되었다. 평가 전에, 개별 랫트를 홈케이지(home cage)로부터 내보내고 개방적으로 환기된 15 x 20 cm 흰색 플렉시글래스(Plexiglass) 테스트 케이지에서 60분 동안 길들여지도록 허용하였고, 손상된 뒷발의 발바닥 표면에 접근할 수 있도록 하는 높은 금속 격자(metal grid) 위에 놓았다. 기계적 이질통의 존재는 일련의 보정된 von Frey hairs(하한=0.1 및 상한=26g, Stoelting Co, 일리노이주 우두 데일(Wood Dale IL) 소재)를 사용하여 평가되었으며, 이는 사용된 개별 필라멘트가 막 구부러지기 시작할 때까지 증가하는 힘으로 발의 발바닥 표면에 적용됐다. 필라멘트는 1-2초 동안 적용되었고 1-2 초 간격으로 5회 반복되었다. 5개의 적용 중 3개에서 발 움추림을 유도한 필라멘트는 기계적 이질통 반응이 발생하기 위한 발 역치 임계값(paw threshold threshold; PWT)을 나타내는 것으로 간주되었다. 뚜렷한 신경병증성 통증 행동(이질통)을 보이는 동물만 약물 테스트 실험에 포함되었다. 동측성 발(ipsilateral paw)에서 PWT가 4g 이하이고 대측성 발(contralateral paw)에서 PWT가 8g 이상인 동물은 이질통성(alloodynic)으로 간주되었다. 약물 테스트 날에 실험자는 치료에 대해 블라인드(blind) 되었다. 약물 치료는 수술 후 15일에 이루어졌다.

[0118] **약물 치료:**

[0119] **급성 약물 효과:**

[0120] 화합물 1: 경구 투여 당 1, 3, 10 mg/kg, 10 ml/kg.

[0121] 예비 치료: 2 시간

[0122] 모르핀-염산염: 6mg/kg 유리 염기 중량, 1ml/kg, 피하 투여. 예비 치료: 30분

[0123] 화합물 1 및 모르핀의 비히클: 수 중 5% DMSO + 30%(2-하이드록시프로필)- β -사이클로덱스트린(HPBCD).

[0124] 통계적 평가: 일원 ANOVA에 이어 다수의 비교를 위한 Fishers LSD 테스트.

[0125] **만성 약물 효과:**

[0126] 화합물 1: 7일 동안 1일 1회 경구 투여 당 1, 3, 10 mg/kg, 10 ml/kg.

[0127] 모르핀 염산염: 6 mg/kg 유리 염기 중량, 1 ml/kg, 7일 동안 매일 1회 피하 투여. 8일 째에, 기계적 이질통은 von Frey 필라멘트("기초 수준")를 적용하여 모니터링되었으며, 이후 랫트에게 화합물 1 또는 모르핀 염산염을 투여하였고, 기계적 이질통은 투여(화합물 1) 2 시간 및 3 시간 후 또는 투여(모르핀 염산염) 30분 후 다시 von Frey 필라멘트로 모니터링하였다.

[0128] 비히클: 5% DMSO + 30% HPBCD(수 중)

[0129] 통계적 평가: 일원 ANOVA에 이어 다수의 비교를 위한 Fishers LSD 테스트.

[0130] **결과**

[0131] 화합물 1의 급성 투여는 von Frey hairs를 사용하여 기계적 이질통을 모니터링함으로써 평가된 바와 같이 신경 병증성 통증 행동의 유의한 개선을 초래하였다. 치료 후 2 시간 및 3 시간에 모니터링된, 최저 테스트 용량의 1mg/kg, 및 3mg/kg은 비히클 치료와 비교하여 발 움추림 역치를 유의하게 향상시켰다, 도 2 참조(2 시간:p <0.01, 3 시간:p <0.05, 일원 ANOVA에 이어 Fishers LSD 사후 테스트). 10mg/kg은 통계적 유의성에 도달하는데 실패하였다. 치료 2 시간 및 3 시간 후 비히클 치료와 비교하여 모르핀 염산염 6 mg/kg은 또한 발 움추림 역치를 유의하게 향상시켰다(p <0.05 및 p <0.001 대 각각의 비히클). 화합물 1의 일일 투여 7일 후, 테스트 3시간 전 예비 치료된 1-3, 및 10 mg/kg(p<0.05, 0.01 및 0.01 대 각각의 비히클) 및 테스트 2시간 전 투여된 10 mg/kg(p<0.001 대 비히클)(일원 ANOVA에 이어 Fishers LSD 사후 테스트) 후 발 움추림 역치의 유의한 향상이 유지되었다. 대조적으로, 급성 약물 투여 이전에 모르핀을 사용한 만성 치료는 내성 발달을 나타내는 이질통성 효과를 완전히 폐지하였다(도 2).

[0132] **결론**

[0133] 이 실시예는 화합물 1이 급성 약물 투여 후 신경병증성 통증 행동을 개선하고 효과가 만성 약물 투여 후에도 유지된다는 것을 입증하며, 이는 내성 발달이 없음을 나타낸다. 대조적으로, 오피오이드, 모르핀 염산염의 효과는 내성 발달로 인해 만성 약물 투여 후에 완전히 상실된다.

[0134] **실시예 5: 수컷 CD-1 마우스에서 화합물 48/80 유도된 긁기에 대한 화합물 1의 급성 효과**

[0135] **방법**

[0136] 동물:

[0137] 수컷 CD-1 마우스(22-30g)(InterVivo Solutions, 캐나다 소재)

[0138] 약물 치료:

[0139] 동물에게 다음 치료 중 하나를 투여하였다: 화합물 1, 비히클(음성 대조군) 또는 디펜히드라민 염산염(양성 대조군); 그룹 당 N = 8 마우스. 화합물 1은 테스트 30분 전에 비히클(수 중 5% DMSO + 30% HPBCD) 중 3, 10 및 30 mg/kg의 농도로 경구 위관 영양법(oral gavage)에 의해 투여되었다. 디펜히드라민 염산염은 테스트 60분 전에 증류수(BEW = 1.14)에서 5% Tween 80 중 60mg/kg의 용량으로 경구 위관 영양법으로 투여되었다. 모든 치료는 10 ml/kg의 투여 용적으로 투여되었다. 화합물 48/80은 염수 중 50 ug/0.02 ml로 목에 피내 투여되었다.

[0140] 행동 모니터링:

[0141] 30분에 걸친 긁기 횟수의 육안 관찰. 육안 평가는 치료에 대해 블라인드로 수행되었다.

[0142] 통계적 평가:

[0143] 일원 ANOVA에 이어 사후 비교를 위한 Fishers LSD 테스트.

[0144] **결과**

[0145] 화합물 1은 비히클 치료와 비교하여 10mg/kg의 최소 유효 용량으로, 긁기 횟수로 평가하였을 때, 가려움증을 유의하게 완화시켰다(p <0.01/0.001 대 각각의 10- 및 30mg/kg에 대한 비히클 치료, 일원 ANOVA에 이어 사후 비교를 위한 Fishers LSD 테스트), 도 3 참조.

[0146] **결론**

[0147] 본 실시예는 화합물 1이 마우스에서 긁기 행동을 유의하게 개선한다는 것을 입증하며 이는 가려움증에 대한 긍정적인 효과를 나타낸다.

[0148] **실시예 6: 수컷 스프라그 둘리(SD) 랫트에서 탐색적 운동 활동에 대한 화합물 1의 급성 효과.**

[0149] **방법**

[0150] 동물:

[0151] 수컷 SD 랫트(180-250g, NTac: SD, Taconic, 덴마크 소재)

[0152] 약물 치료:

[0153] 동물에게 다음 치료 중 하나를 투여하였다: 비히클(물 중 5% DMSO + 30% HPBCD) 또는 화합물 1(경구 투여 당 3, 10, 30 mg/kg, 10 ml/kg), 테스트 120분 전. 용량 그룹 당 n = 6-7.

행동 모니터링:

[0155] 투여 2 시간 후, 랫트를 텁밥 깔짚(sawdust bedding)이 감소된 신규 표준 흄케이지에 개별적으로 두었다. 케이지는 운동 행동의 자동 기록을 허용하는 광전지(photocell)와 빔(bean)이 장착된 프레임에 배치되었다(TSE MoTil, 독일 소재). 탐색적 운동 활동은 30분 동안 기록되었다.

통계적 평가:

[0157] 일원 ANOVA에 이어 사후 비교를 위한 Fishers LSD 테스트.

결과

[0159] 화합물 1은 테스트된 최고 용량(30 mg/kg)에서 수컷 SD 랫트에서 탐색적 운동 활동에 어떠한 영향도 나타내지 않았다(일원 ANOVA에 이어 사후 비교를 위한 Fishers LSD 테스트), 도 4 참조.

결론

[0161] 본 실시예는 화합물 1이 테스트된 용량에서 랫트의 탐색적 운동 활동에 영향을 미치지 않았음을 입증하며, 이는 진정을 유발하는 성향이 없음을 나타낸다.

실시예 7: 수컷 스프라그 돌리(SD) 랫트에서 로타로드 수행에 대한 화합물 1의 급성 효과.

방법

동물:

[0165] 수컷 SD 랫트(150-180g, NTac:SD, Taconic, 덴마크 소재)

약물 치료:

[0167] 동물에게 다음 치료 중 하나를 투여하였다: 비히클(수 중 5% DMSO + 30% HPBCD), 화합물 1(3, 10, 30 mg/kg, 10 ml/kg, 경구 투여 당) 또는 디아제팜 10 mg/kg(경구 투여 당 10 ml/kg) 각각 테스트 120분 또는 60분 전. 용량 그룹 당 n = 6-7.

행동 모니터링:

[0169] 랫트는 약물 테스트 전 2일 동안 가속 로타로드(4-40rpm, PanLab)에서 하루에 5분씩 1회의 시험으로 훈련되었다. 2일 간의 훈련 후 90초 이상 회전 막대에 머무를 수 있는 랫트만 연구에 포함되었다. 테스트 당일, 랫트를 회전하는 막대에 올려 놓고, 0초로 지정된 막대에서 소요할 수 있는 최소 시간 및 300초로 설정된 막대에서 소요되는 최대 시간으로 4-40rpm/5분의 속도로 가속한다. 화합물 1은 테스트 2 시간 전에 투여된 반면, 양성 대조군인 디아제팜은 테스트 60분 전에 투여되었다.

통계적 평가:

[0171] 일원 ANOVA에 이어 사후 비교를 위한 Fishers LSD 테스트.

결과

[0173] 화합물 1은 비히클 치료된 랫트와 비교하여 테스트된 최고 용량(30mg/kg)에서, 낙하 지연으로 측정된, 가속 막대에서 균형을 잡는 랫트의 능력에 영향을 미치지 않았다. 대조적으로, 디아제팜은 막대에서 떨어지는 시간을 유의하게 단축시켰다($p < 0.05$ 대 비히클 치료)(일원 ANOVA에 이어 사후 비교를 위한 Fishers LSD 테스트), 도 5 참조.

결론

[0175] 본 실시예는 화합물 1이 테스트된 용량에서 가속 막대에서 균형을 유지하는 랫트의 능력을 손상시키지 않았음을 입증하며, 이는 운동 장애를 유발하는 경향이 없음을 나타낸다.

실시예 8: 급속 평형 투석(Rapid Equilibrium Dialysis)에 의해 추정된 혈장 단백질 결합

[0177] 본 분석의 목적은 혈장 단백질에 대한 테스트 화합물의 결합 정도를 결정하는 것이다.

[0178] 방법**[0179] 급속 평형 투석(RED) 장치:**

투석막의 수직 실린더(MWCO ca. 8000)에 의해 분리된 두 개의 나란한 챔버(혈장 및 완충제)로 구성된 일회용 삽입물이 사용되었다. RED 장치를 텤플론 베이스 플레이트(Teflon Base Plate)에 놓고 100rpm으로 설정된 헤이돌프(Heidolph) 배양기(incubator) 상에서 37°C에서 4시간 동안 배양하였다.

[0181] 분석

분석은 다음 분석 설명에 따라 액체 취급 시스템에서 수행되었다:

- 스파이크 혈장(spiked plasma)의 준비

[0184] • 텤플론 베이스 플레이트에 적절한 수의 RED 장치를 놓고 배양기에서 플레이트를 예열(pre-heating)한다.

[0185] • 혈장 챔버에 400 μl 혈장을 첨가하고 완충제 챔버에 600 μl PBS 완충제를 첨가한다.

[0186] • 140rpm으로 설정된 헤이돌프 배양기에서 37°C에서 4 시간 동안 배양한다.

[0187] • 배양 후, 혈장 챔버에서 에펜도르프 투브(eppendorf tube)로 50 μl를 옮기고 50 μl PBS 완충제를 첨가한다.

[0188] • 상응하게, 완충제 챔버에서 에펜도르프 투브로 50 μl를 옮기고 50 μl PBS 혈장을 첨가한다.

[0189] • 300 μl MeCN으로 모든 샘플을 침전시킨다.

[0190] • 5°C 및 14000rpm(16000g)에서 25분 동안 원심분리한다.

[0191] • 동일한 용적의 MilliQ 수(water)를 사용하여 상청액을 HPLC 바이알로 옮긴다.

[0192] • SRM 검출을 사용하여 LC-MS/MS에 의해 분석한다.

[0193] 결과

단백질 결합은 다음 식을 사용하여 계산되었다.

$$\text{단백질 결합 \%} = \left(1 - \frac{A_{\text{완충제}}}{A_{\text{혈장}}} \right) * 100\%$$

[0195]

[0196] 유리 분획(Free fraction): $fu = 100 - \text{단백질 결합 \%}$

[0197] 여기서,

[0198] $A_{\text{완충제}}$ 는 완충제 챔버 샘플로부터 LC-MS/MS에 의해 결정된 면적(area)이다.

[0199] $A_{\text{혈장}}$ 은 혈장 챔버 샘플로부터 LC-MS/MS에 의해 결정된 면적이다.

[0200] 화합물 1의 혈장 유리 분획은 마우스에서 16%, 랫트에서 19%였다.

[0201] 결론

[0202] 화합물 1은 약리학적 효과를 발휘하기 위해 혈장에서 풍부하게 유리한다.

[0203] 실시예 9: 뇌 조직 결합

본 실시예의 목적은 급속 평형 투석(RED) 방법을 사용하여 마우스 뇌 균질물(brain homogenate)에 대한 화합물 1의 단백질 결합을 평가하는 것이다.

[0205] 재료 및 장비**[0206] 랫트 뇌 균질물**

[0207] 랫트 뇌 단백질 분획은 성체 위스타(Wistar) 랫트에서 분리된 신선한 뇌 조직으로부터 제조되었다. 수컷 위스타 랫트(Harlan 네털란드 소재)를 안락사시키고(승인된 방법에 따라) 뇌 조직을 즉시 수집하였다. 백질(white matter)을 해부하였고, 조직 균질물(10% w/v)을 인산염 완충 염수(pH 7.4)에서 제조한다. 이러한 분획은 뇌 균질물이라고 불리며 실험에 사용되었다.

[0208] 평형 투석 절차

[0209] 테프론 베이스 플레이트의 준비

[0210] 테프론® 베이스 플레이트 웰을 20% 에탄올로 10분 동안 세정하였다. 에탄올을 제거하였고 웰을 증류수로 두 번 세정한 후, 플레이트를 사용하기 전에 건조시켰다.

[0211] 평형 투석

[0212] 1 μ l 화합물 1(100% DMSO 중 2mM 스톡)을 200 μ l 뇌 추출물(최종 농도 10 μ M)에 첨가하였다. 200 μ l의 샘플을 샘플 챔버(sample chamber)에 놓았다. 350 μ l의 10mM PBS를 완충제 챔버에 첨가하였다. 유닛(unit)을 밀봉 테이프(sealing tape)로 덮고 평형을 달성하기 위해 대략 350 rpm에서 4 시간 동안 오비탈 진탕기(orbital shaker)에서 37°C에서 배양하였다. 그런 다음 완충제와 추출 챔버로부터 동일한 용적을 제거하였고 별도의 마이크로 원심분리 투브에 놓았다.

[0213] 샘플 분석 절차

[0214] 50 μ l의 투석 후 샘플 각각을 완충제 및 추출물 챔버로부터 별도의 마이크로 원심분리 투브로 피펫팅(pipetting)하였다. 50 μ l의 추출물을 완충제 샘플에 첨가하였을 뿐만 아니라 동일한 용적의 PBS를 수집된 추출물 샘플에 첨가하였다. 300 μ l의 침전 완충제(90/10 아세토니트릴:0.1% 포름산을 함유한 물 + 내부 표준, 즉 톨부타마이드(Tolbutamide) 또는 이부프로펜(Ibuprofen), 5 μ g/ml)를 첨가하여 단백질을 침전시키고 화합물을 방출시켰고, 이를 와동(vortexing)시켰고 13,000–15,000 g에서 원심분리 10분 전에 열음 상에서 30분 동안 배양하였다. 상청액을 바이알 또는 96-웰 플레이트로 옮기고, LC/MS/MS로 정량적 측정을 수행하였다. 완충제 및 추출물 챔버에서 화합물 1의 농도는 내부 표준에 대한 피크 면적에서 결정되었다.

[0215] 결과

[0216] 결합되지 않은 부분(f_u)은 다음 공식을 사용하여 계산되었다.

$$f_{u,\text{회석됨}} = \frac{A_{\text{완충제}}}{A_{\text{뇌 균질물}}}$$

$$f_{u,\text{회석되지 않은}} = \frac{\frac{1}{D}}{\frac{1}{f_{u,\text{회석됨}}} + \frac{1}{D}} * 100\%$$

[0217]

[0218] 여기서,

[0219] $A_{\text{완충제}}$ 는 완충제 챔버 샘플로부터 LC-MS/MS에 의해 결정된 면적이다.

[0220] $A_{\text{뇌 균질물}}$ 은 뇌 균질물 샘플로부터 LC-MS/MS에 의해 결정된 면적이다.

[0221] 기준 화합물: 할로페리돌(높은 결합) 및 카페인(낮은 결합)

[0222] 뇌 조직 중 화합물 1의 유리 분획은 랫트에서 7% 였다.

[0223] 결론

[0224] 화합물 1은 약리학적 효과를 나타내기 위해 뇌에서 풍부하게 유리한다.

[0225] 실시예 10: 약동학적 프로파일

[0226] 본 실시예의 목적은 약동학적 데이터를 수득하는 것이다. 혈장 샘플은 전형적으로 6-8 시점(N = 3-4)에서 취하였다. 샘플을 10개의 표준물을 사용하는 긴 표준 곡선을 사용하여 분석하였다. 혈장 샘플은 단백질 침전시켰고

LC-MS/MS를 사용하는 분석에 따른 액체 취급 시스템을 사용하여 희석하였다.

[0227] 분석

[0228] 표준물의 제조

표준물의 2개의 개별 세트를 전형적으로 다음의 농도 수준을 따라 제조하였다: 1, 3, 10, 100, 300, 1,000, 3,000, 5,000 및 10,000 ng/ml. 표준물의 첫 번째 세트는 실행 초기에 분석되었으며 보정에 사용되었다. 표준물의 두 번째 세트는 실행 말기에 분석되었으며, QC로서 사용되었다.

[0230] 혈장 샘플 제조

- 50 μl 혈장을 아세토니트릴 중 150 μl 내부 표준으로 침전시켰다.
- 16,000 g(에펜도르프 퓨브) 또는 3,000 g 미량역가 플레이트(microtiter plate)에서 5°C에서 25분 원심분리 후
- 50 μl 상청액 및 150 Milli-Q 수(water)를 HPLC 바이알/MTP에 옮겼다

[0234] 결과

[0235] 승인 기준

보정 곡선 상의 각각의 포인트는 공칭값(nominal value)으로부터 15% 변하도록 허용하였다(LLOQ는 20% 변할 수 있음). 더 많이 변하는 경우 포인트는 배제될 수 있다. 표준 곡선은 최소한으로 5 포인트를 함유해야 하고 2개의 연속 포인트는 배제되지 않을 수 있다. QC는 보정 곡선에서 표준물과 동일한 승인 기준을 갖는다.

[0237] 약동학적 파라미터를 WinNonlin에서 계산하였다.

표 2

[0238] 약동학적 파라미터. 화합물 1은 30% HP-베타-CD 및 5% DMSO의 투명한(clear) 용액으로 투여되었다.

경로	용량 (mg/kg)	AUC _(0-8h) (h * ng/ml)	C ₀ (ng/ml)	t _{1/2} (h)	Cl (l/h/kg)	V _z (l/kg)	B/P
IV	0.5	985	863	4.3	0.38	2.4	0.5

표 3

[0239] 약동학적 파라미터. 화합물 1은 30% HP-베타-CD 및 5% DMSO의 투명한 용액으로 투여되었다.

용량 (mg/kg)	AUC _(0-24h) (h * ng/ml)	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	B/P 3h
1	1134 *	163	4	0.4
3	8005	552	6	0.5
10	342528	2267	8	0.5
30	98537	6591	4	0.6

[0240] *AUC는 0-8h로 계산되었으며, 8h 후 농도는 149 ng/ml이다.

[0241] 결론

[0242] 화합물 1은 랫트에서 긴 반감기와 낮은 클리어런스(clearance)를 보여준다. 화합물 1은 또한 용량 선형성(C_{max}), 높은 혈장 노출 및 높은 노출률을 나타낸다.

[0243] 실시예 11: 인간 및 랫트 간세포를 사용한 고유 클리어런스 연구

[0244] 본 분석에서, 화합물 1은 상이한 시점에서 냉동 보존된(ryopreserved) 간세포와 함께 배양되었고 화합물 1의 소

물을 LC-MS/MS로 모니터링하였다.

[0245] 본 분석에 사용된 조건은 아래에 요약되어 있다.

- 분석의 화합물 농도: $1 \mu\text{M}$

[0247] • 간세포와의 배양 시간: 5% CO_2 로 37°C 에서 0, 15, 30, 60, 90 및 120분

[0248] • 간세포 밀도: 106개 세포/ ml

[0249] • 분석 용적: $500 \mu\text{l}$

[0250] • 반복 수: 2

[0251] • 기준 화합물: 테스토스테론(높은 클리어런스)

[0252] 결과

표 4

인간과 랫트의 간세포 클리어런스.

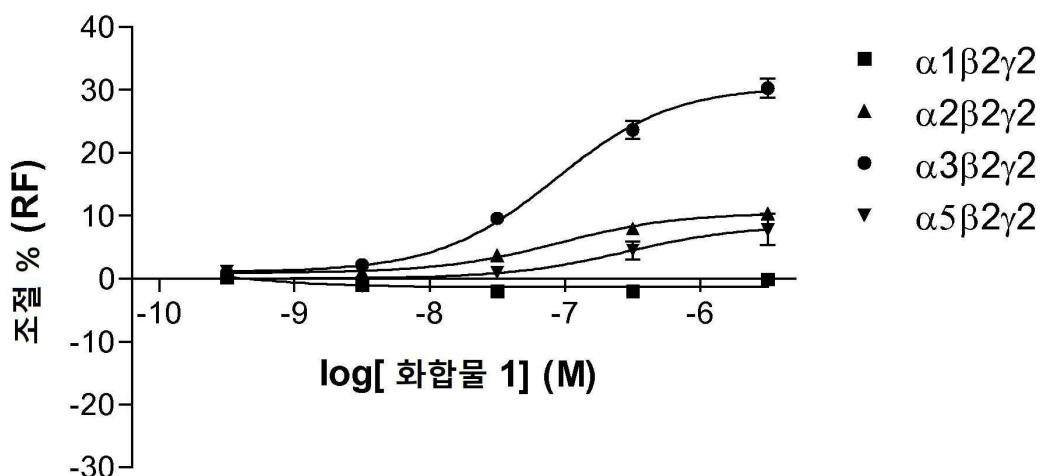
간세포 클리어런스	
종	$C_{1\text{int}}$ 생체내 ($\mu\text{l}/\text{분}/\text{백만개 세포}$)
인간	1.87
랫트	2.11

[0254] 결론

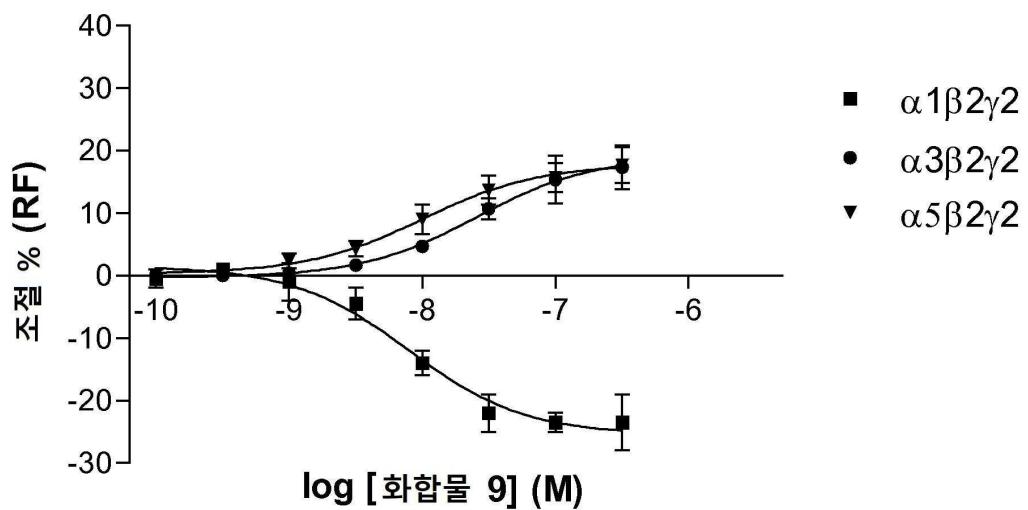
화합물 1은 인간 및 랫트 간세포에서 낮은 클리어런스를 갖는다.

도면

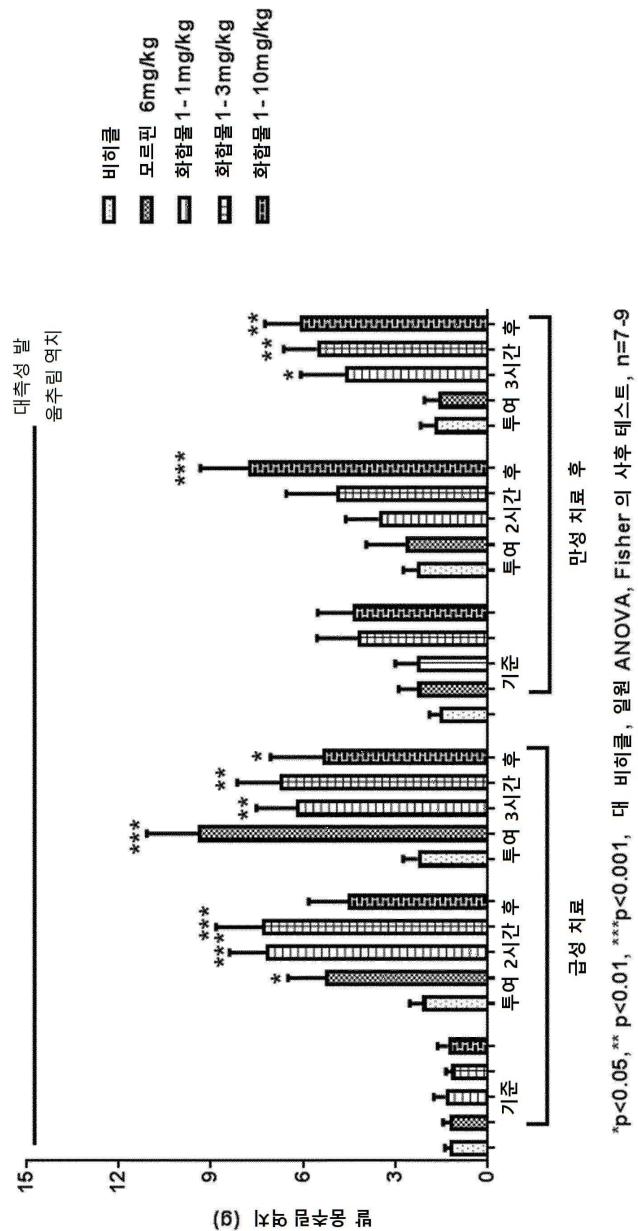
도면 1a



도면 1b



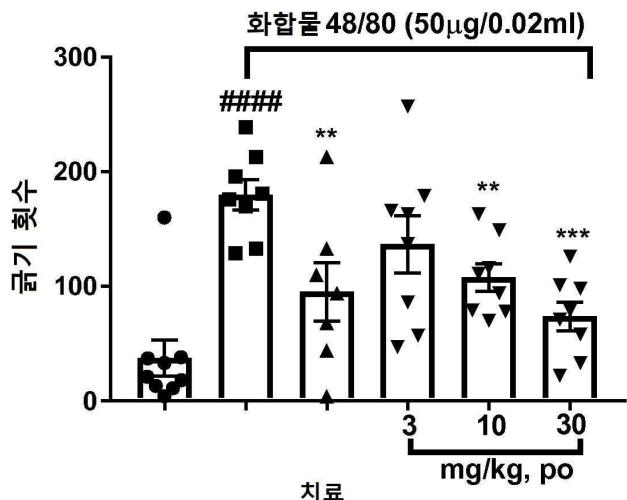
도면2



*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 대 비하클, 일원 ANOVA, Fisher 의 사후 테스트, n=7-9

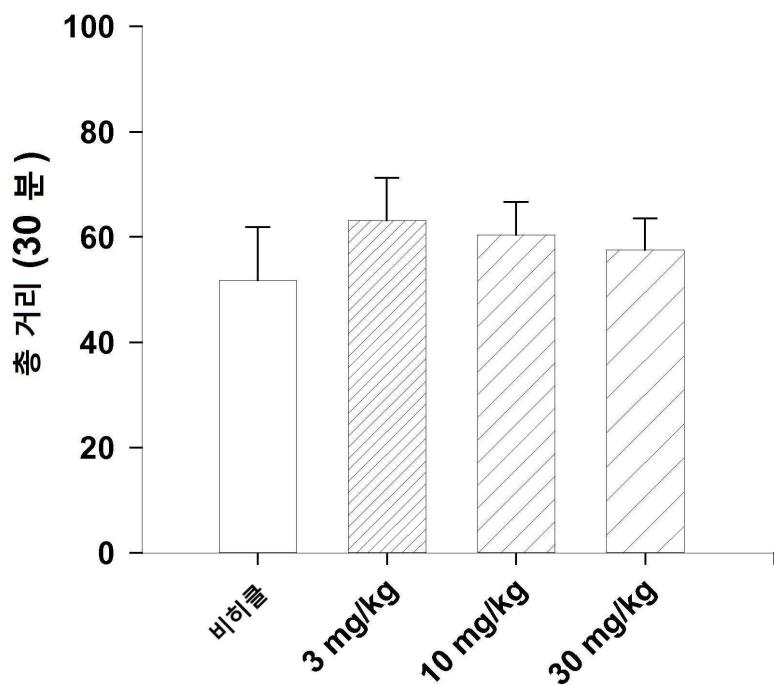
도면3

- 염수
- 비히클 (MQ 중 5% DMSO+ 30% Hbcd)
- ▲ 디페닐히드라민 염산염 60mg/kg
- ▼ 화합물 1

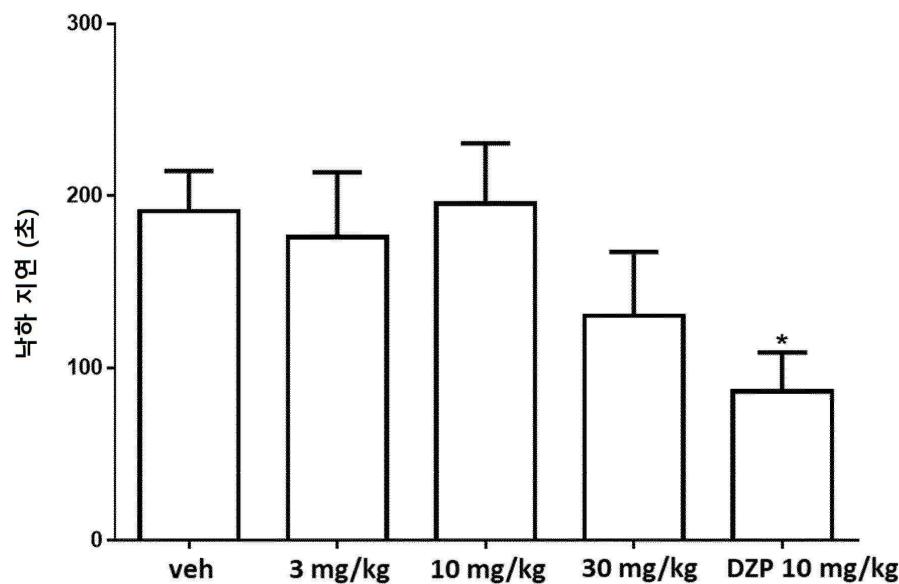


#####p<0.0001 대 염수, ***p<0.001, **p<0.01 vs
비히클, 일원 ANOVA Fisher 의 LSD 테스트 , n=7-9

도면4



도면5



*p<0.05 대 비히클, 일원 ANOVA Fisher의 LSD 사후 테스트
n=6-7