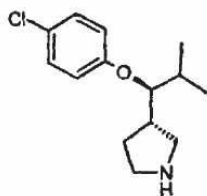
 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0041916 (43) 공개일자 2013년04월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07D 207/08</i> (2006.01) <i>A61K 31/40</i> (2006.01) <i>A61P 29/00</i> (2006.01) <i>A61P 25/04</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-7001583 (22) 출원일자(국제) 2011년06월30일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2013년01월21일 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/042518 (87) 국제공개번호 WO 2012/006205 국제공개일자 2012년01월12일 (30) 우선권주장 61/362,773 2010년07월09일 미국(US)	(71) 출원인 세라밴스 인코포레이티드 미국 캘리포니아 94080 사우쓰 샌프란시스코 게이 트웨이 불리바드 901 (72) 발명자 사이토 다이ске 룰란드 미국 캘리포니아 94401 샌 마테오 이스트 3rd 에 비뉴 1600 #2803 랍타 미로슬라브 미국 캘리포니아 94085 서니베일 이스트 두에인 에비뉴 411 (74) 대리인 리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **3-페녹시메틸피롤리딘 화합물의 결정형**

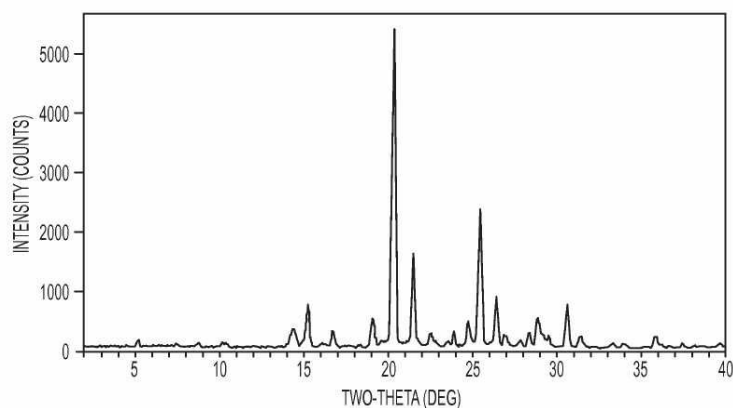
(57) 요약

본 발명은 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 결정형 염을 포함하는 약제학적 조성물, 상기 결정형 염의 제조를 위한 방법 및 중간체, 및 질병을 치료하기 위해 상기 결정형 염을 사용하는 방법을 제공한다.



(I)

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

8.78 ± 0.20 , 15.26 ± 0.20 , 19.08 ± 0.20 , 20.36 ± 0.20 , 21.50 ± 0.20 , 및 25.46 ± 0.20 의 2θ 값에서 회절 피크를 포함하는 분말 x-선 회절 패턴을 특징으로 하는, 1:1 몰비의 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘과 염산염의 결정형 염.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 26.42 ± 0.20 , 30.65 ± 0.20 , 28.91 ± 0.20 , 24.77 ± 0.20 , 14.42 ± 0.20 , 16.74 ± 0.20 , 및 5.20 ± 0.20 으로부터 선택된 2θ 값에서 하나 이상의 추가적인 회절 피크를 갖는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 도 1에 도시된 패턴의 피크 위치와 실질적으로 동일한 피크 위치를 갖는 분말 x-선 회절 패턴을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 약 128°C 의 용융점을 갖는 시차 주사 열량측정 트레이스(differential scanning calorimetry trace)를 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 도 2에 도시된 것과 실질적으로 동일한 시차 주사 열량측정 트레이스를 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

약제학적으로 허용가능한 담체 및 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 청구된 화합물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 항-알츠하이머제, 항경련제, 항우울제, 항파킨슨병제, 이중 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제(dual serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor), 비-스테로이드계 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory agent), 노르에피네프린 재흡수 억제제, 오피오이드 효능제, 오피오이드 길항제, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제, 소듐 채널 차단제, 교감신경차단제(sympatholytic), 및 이들의 조합으로부터 선택된 제2 치료제를 더 포함하는 것인 약제학적 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 청구된 화합물을 제조하는 방법으로서,

(a) (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 염산염을 극성 용매로 처리하여 제1 조성물을 형성하거나, 또는 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘-1-카르복실산 *t*-부틸 에스테르를 비활성 희석제 중 염산으로 탈보호시켜, 제1 조성물을 형성하는 단계; 및 (b) 비극성 용매를 첨가하여, 제2 조성물을 형성하는 단계로서, 상기 제2 조성물로부터 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 청구된 화합물이 형성되는 것인 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 단계 (b)는:

- (i) 비극성 용매를 첨가하여 제2 조성물을 형성하는 단계;
- (ii) 선택적으로, 냉각시켜 결정화를 수행하는 단계; 및

(iii) 결과적으로 수득된 고체를 단리시켜, 상기 화합물을 수득하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

청구항 8 또는 9에 있어서, 상기 극성 용매는 이소프로판올인 것인 방법.

청구항 11

청구항 8 또는 9에 있어서, 탈보호는 3M HCl에 의해 수행되고, 상기 비활성 희석제는 시클로헥실 메틸 에테르인 것인 방법.

청구항 12

청구항 8 또는 9에 있어서, 상기 비극성 용매는 디이소프로필 에테르인 것인 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 청구된 화합물을 제조하는 단계를 포함하는, (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘을 정제하는 방법.

청구항 14

치료법(therapy)에서 사용하기 위한, 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 청구된 화합물.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 통증 장애, 우울 장애, 정동 장애, 주의력 결핍 과잉행동 장애, 인지 장애, 스트레스성 요실금, 만성 피로 증후군, 비만, 또는 폐경과 연관된 혈관운동 증상(vasomotor symptom)을 치료하기 위한 것인 화합물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 통증 장애는 신경병증성 통증, 섬유근육통, 만성 요통, 및 골관절염으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 17

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 청구된 화합물을 포함하는 약제.

청구항 18

약제의 제조를 위한, 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 청구된 화합물의 용도.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 약제는 통증 장애, 우울 장애, 정동 장애, 주의력 결핍 과잉행동 장애, 인지 장애, 스트레스성 요실금, 만성 피로 증후군, 비만, 또는 폐경과 연관된 혈관운동 증상을 치료하기 위한 것인 용도.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 세로토닌(5-HT) 및 노르에피네프린(NE) 재흡수 억제제로서 활성을 갖는, 3-페녹시메틸피롤리딘 화합물의 신규한 결정형에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 결정형 화합물을 포함하거나 또는 그로부터 제조된 약제학적 조성물, 상기 결정형 화합물의 제조를 위한 방법 및 중간체, 및 신경병증성 통증과 같은 통증 장애 및 기타 질병의 치료에 그와 같은 화합물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 통증은 실질적 또는 잠재적인 조직 손상과 연관되거나, 또는 그러한 손상의 측면에서 기재되는, 불쾌한 감각적 및 감정적 경험이다 (International Association for the Study of Pain(IASP), Pain Terminology). 만성 통증

은 급성 통증을 넘거나 또는 손상이 치유될 것으로 예상되는 시간을 지나서 지속된다 (American Pain Society, "Pain Control in the Primary Care Setting." 2006:15). 신경병증성 통증은 신경계의 일차 병변 또는 기능 장애에 의하여 개시되거나 유발된다. 병변 또는 기능 장애가 말초 신경계에 영향을 미칠 때에는 말초 신경병증성 통증이 발생하고, 병변 또는 기능장애가 중추 신경계에 영향을 미칠 때에는 중추 신경병증성 통증이 발생한다 (IASP).

[0003] 예를 들어, 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressant, TCA), 세로토닌 및 노르에피네프린 재흡수 억제제(serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, SNRI), 칼슘 채널 리간드 (예를 들면, 가바펜틴 및 프레가발린), 국소적 리도카인, 및 오피오이드 효능제 (예를 들면, 모르핀, 옥시코돈, 메타돈, 레보르파놀 및 트라마돌)을 포함한 여러 종류의 치료제들이 현재 신경병증성 통증을 치료하는데 사용되고 있다.

[0004] Stangeland 등에 의해 2010년 7월 12일자로 출원된, 공동-양도된 미국특허출원 제12/834,128호에 기술된, (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘은 세로토닌 및 노르에피네프린 수송체(transporter)에 결합하는 것에 의해 세로토닌 및 노르에피네프린의 재흡수를 억제한다. 장기 보관을 위한 화합물을 제조하고, 약제학적 조성물 및 제제를 제조하는 경우, 흡습성 및 조해성이 아닌 치료제의 결정형을 갖는 것이 종종 요구된다. 비교적 높은 용융점(즉, 약 128°C)을 가져서, 물질이 상당한 분해 없이, 가공, 예를 들면, 미분될 수 있게 하는 결정형을 갖는 것이 유리하다. 따라서, 허용가능한 수준의 흡습성 및 비교적 높은 용융점을 갖는, 안정한, 비-조해성(non-deliquescent) 형태의 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 발명은 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염에 관한 것이다. 일 구체예에서, 본 발명은 1:1 몰비의 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘과 염산의 결정형 염에 관한 것이다.

[0007] 본 발명의 일 양태는 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염을 제조하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염을 제조하는 방법은: (a) (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 염산염을 극성 용매로 처리하여 제1 조성물을 형성하거나, 또는 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘-1-카복실산 *t*-부틸 에스테르를 비활성 희석제 중 염산으로 탈보호시켜, 제1 조성물을 형성하는 단계; 및 (b) 비극성 용매를 첨가하여, 제2 조성물을 형성하는 단계로서, 상기 제2 조성물로부터 본 발명의 결정형 염산염이 형성되는 것인 단계를 포함한다. 하나의 특정한 구체예에서, 단계 (b)는: (i) 비극성 용매를 첨가하여 제2 조성물을 형성하는 단계; (ii) 선택적으로 냉각시켜 결정화를 수행하는 단계; 및 (iii) 결과적으로 수득된 고체를 단리시켜, 본 발명의 결정형 염산염을 수득하는 단계를 포함한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 양태는 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘을 정제하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 이 방법은 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염을 형성시키는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 방법에 의해 제조된 생성물에 관한 것이다.

[0009] 본 발명의 일 양태는 약제학적으로 허용가능한 담체 및 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 그와 같은 조성물은 선택적으로, 항-알츠하이머제, 항경련제, 항우울제, 항파킨슨병제, 이중 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제(dual serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor), 비-스테로이드계 항염증제(non-steroidal anti-inflammatory agent), 노르에피네프린 재흡수 억제제, 오피오이드 효능제, 오피오이드 길항제, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제, 소듐 채널 차단제, 교감신경차단제(sympatholytic), 및 이들의 조합과 같은 기타 활성제를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에서, 약제학적 조성물은 본 발명의 결정형 염, 제2 활성제, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태는 본 발명의 결정형 염 및 제2 활성제를 포함하는, 활성제의 조합물(combination)에 관한 것이다. 본 발명의 결정형 염은 추가적인 작용제와 함께, 또는 이들과 별개로 제제화될 수 있다. 별개로 제제화되는 경우, 약제학적으로 허용가능한 담체가 추가적인 작용제와 함께 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는, 약제학적 조성물의 조합물로서, 상기 조합물은: 본 발명의 결정형 염 및 제

1 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제1 약제학적 조성물; 및 제2 활성제 및 제2 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제2 약제학적 조성물을 포함하는 것인 조합물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그와 같은 약제학적 조성물을 포함하는 키트, 예를 들면, 제1 약제학적 조성물과 제2 약제학적 조성물이 별개의 약제학적 조성물인 것인 키트에 관한 것이다.

[0010] (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘은 세로토닌 재흡수 억제 활성 및 노르에피네프린 재흡수 억제 활성을 갖는다. 이 화합물의 결정형 염산염은 세로토닌 및/또는 노르에피네프린 수송체의 억제에 의해 치료되는 질환 또는 질병을 앓는 환자를 치료하기 위한 치료제와 동일한 활성 및 따라서, 동일한 유용성을 가질 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명의 일 양태는 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 신경병증성 통증 또는 섬유근육통과 같은 통증 장애; 주요 우울증과 같은 우울 장애; 불안 장애와 같은 정동 장애; 주의력 결핍 과잉행동 장애; 치매와 같은 인지 장애; 스트레스성 요실금; 만성 피로 증후군; 비만; 또는 폐경과 연관된 혈관운동 증상(vasomotor symptom)을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 양태는 약제의 제조, 특히, 통증 장애, 우울 장애, 정서장애, 주의력 결핍 과다행동 장애, 인지 장애, 스트레스성 요실금의 치료를 위해 유용한 약제의 제조, 포유동물에서 세로토닌 재흡수의 억제, 또는 포유동물에서 노르에피네프린 재흡수의 억제를 위해 유용한 약제의 제조를 위한 본 발명의 결정형 화합물의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 기타 양태 및 구체예가 본 명세서에 개시된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염을 제공한다. 놀랍게도, 이 결정형 화합물은 대기 수분에 노출되는 경우에도, 조해성이 아닌 것으로 확인되었다. 추가적으로, 이 결정형 화합물은 허용가능한 수준의 흡습성 및 높은 용융점을 갖는다.

[0013] 정의

[0014] 본 발명의 화합물, 조성물, 방법 및 공정을 기재하는 경우, 달리 표시되지 않는 한 하기의 용어는 하기 의미를 갖는다. 또한, 본 명세서에서 사용된, 단수 형태 "하나의(a, an)" 및 "그(the)"는, 사용되는 문맥이 명백히 다르게 지시하지 않는 한, 상응하는 복수 형태를 포함한다. 용어 "포함하는(comprising, including)", 및 "갖는(having)"은 포괄적인 것으로 의도되고, 기재된 요소들 외에 추가적인 요소들이 존재할 수 있다는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된, 성분의 양, 분자량, 반응 조건 등과 같은 특성을 표현하는 모든 숫자는 달리 표시되지 않으며, 모든 경우에 용어 "약(about)"에 의해 수식되는 것으로 이해된다. 따라서, 본 명세서에 기재된 숫자는 본 발명에 의해 수득하고자 하는 원하는 특성에 따라 변할 수 있는 근사값(approximation)이다. 적어도, 및 본 발명의 범위에 대한 균등론의 적용을 제한하기 위한 시도는 아니나, 각 숫자는 적어도 기재된 유효 숫자를 고려하여 통상적인 올림 기법을 적용하여 해석되어야 한다.

[0015] 본 명세서에서 사용된, 구 "식의 (of the formula)", "식을 갖는(having the formula)", 또는 "구조를 갖는(having the structure)"은 한정하는 것으로 의도되지 않고, 용어 "포함하는(comprising)"이 통상적으로 사용되는 것과 동일한 방식으로 사용된다.

[0016] 본 명세서에서 사용된, 용어 "용융점(melting point)"은 고체-액체 상 변화(solid-to-liquid phase change)에 해당하는 열 전이에 대해, 시차 주사 열량측정법에 의해 최대 흡열 열 흐름(endothermic heat flow)이 관찰되는 온도를 의미한다.

[0017] 용어 "약제학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)"은 본 발명에서 사용될 때, 생물학적으로나 또는 달리 허용될 수 없는 것이 아닌 물질을 의미한다. 예를 들어, 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 허용될 수 없는 생물학적 효과를 야기하거나 조성물 중 다른 성분들과 허용될 수 없는 방식으로 상호작용하지 않으면서, 조성물에 포함되고 환자에게 투여될 수 있는 물질을 의미한다. 이와 같은 약제학적으로 허용가능한 물질들은 일반적으로 독성학적 및 제조 시험의 요구되는 기준을 충족시키고, 미국 식품 의약국(U.S. Food and Drug Administration)에 의해 적합한 비활성 성분으로 확인된 물질들을 포함한다.

[0018] 용어 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 때 치료를 가져오기에 충분한 양, 즉 바람직한 치료 효과를 수득하기 위하여 필요한 의학의 양을 의미한다. 예를 들어, 신경병증성 통증을 치료하기 위한 치료적 유효량은 예를 들어, 신경병증성 통증의 증상들을 경감, 저해, 제거 또는 예방하거나 또는 신경병증성 통증의 근본 원인을 치료하는데 필요한 화합물의 양이다. 한편, 용어 "유효량

(effective amount)"은 반드시 치료적 결과일 필요는 없는, 바람직한 결과를 얻기에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 노르에피네프린 수송체를 포함하는 시스템을 연구하는 경우, "유효량"은 노르에피네프린 재흡수를 억제하는데 필요한 양일 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료(treating, treatment)"는 포유동물 (특히 사람)과 같은 환자에서 질병 또는 (신경병증성 통증과 같은) 의학적 상태의 치료를 의미하며, 하기 중 하나 이상을 포함한다: (a) 질병 또는 의학적 상태의 발생 예방, 즉 환자의 예방적 치료; (b) 질병 또는 의학적 상태의 개선, 즉 환자에서 질병 또는 의학적 상태를 제거하거나 퇴행(regression)을 유발하는 것; (c) 질병 또는 의학적 상태의 억제, 즉 환자에서 질병 또는 의학적 상태의 진행(development)을 둔화시키거나 저지하는 것; 또는 (d) 환자에서 질병 또는 의학적 상태의 증상을 완화시키는 것. 예를 들어, 용어 "신경병증성 통증의 치료(treating neuropathic pain)"는 신경병증성 통증이 일어나는 것을 예방하는 것, 신경병증성 통증을 개선시키는 것, 신경병증성 통증을 억제하는 것, 및 신경병증성 통증의 증상을 완화시키는 것을 포함한다. 용어 "환자(patient)"는 본 발명의 화합물이 평가되거나 또는 분석시험(assay)에 사용되는 시험 대상(test subject), 예를 들어 동물 모델뿐만 아니라, 치료 또는 질병 예방이 필요하거나, 질병 예방이나 특정한 질병 또는 의학적 상태의 치료를 위하여 현재 치료받고 있는, 사람과 같은, 포유동물을 포함하는 것으로 의도된다.

[0020] 본 명세서에서 사용된 모든 다른 용어는 그들이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의해 이해되는 바와 같은 통상적인 의미를 갖는 것으로 의도된다.

[0021] 본 발명의 결정형 화합물은 하기 및 실시예에 기재된 바와 같이 용이하게 입수가능한 출발 물질로부터 합성될 수 있다. 전형적인 또는 바람직한 공정 조건(즉, 반응 온도, 시간, 반응물질의 몰비, 용매, 압력, 등)이 주어지는 경우, 달리 명시되지 않으면, 기타 공정 조건이 또한 이용될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 특정한 공정 조건(즉, 결정화 온도, 시간, 반응물의 몰비, 용매, 압력, 등)이 주어지나, 달리 명시되지 않으면, 기타 공정 조건이 또한 이용될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 일부 경우에, 반응 또는 결정화는 실온에서 수행되었고, 실제 온도는 측정되지 않았다. 실온은 연구실 환경에서 주변 온도와 통상적으로 연관된 범위 내의 온도를 의미하는 것으로 받아들여지고, 통상적으로 약 25℃ 내지 약 50℃의 범위 내에 있을 것으로 이해된다. 다른 경우에, 반응 또는 결정화는 실온에서 수행되었고 그 온도는 실제로 측정되고 기록되었다.

[0022] 일반적으로, 결정화는 적절한 용매에서 수행된다. 결정화의 완료 후, 결정형 화합물을 석출(precipitation), 농축, 원심분리 등과 같은 통상적인 수단에 의해 반응 혼합물로부터 분리할 수 있다. 본 발명의 방법에서 기재된 몰비는 당업자에게 이용가능한 다양한 방법에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들면, 그와 같은 몰비는 ¹H NMR에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 대안적으로, 원소 분석 및 HPLC 분석이 몰비를 결정하기 위해 이용될 수 있다.

[0023] 출발 물질은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 잘 알려진 절차를 이용하여 상업적으로 입수가능한 출발 물질 및 시약으로부터 용이하게 제조될 수 있고, 예가 본 명세서 중 실시예에서 제공된다. 일 구체예에서, 출발 물질은 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 염산염이고, 이 염산염은 친핵성 방향족 치환 반응(S_NAr), 및 뒤이은 염산에 의한 탈보호에 의해 제조된다. 예를 들면, 염산염은 적절한 용매에 (S)-3-((S)-1-히드록시-2-메틸프로필)피롤리딘-1-카르복실산 *t*-부틸 에스테르 (1.0 당량) 및 1-클로로-4-플루오로벤젠 (3.0 당량)을 용해시키고, 뒤이어 수소화 나트륨 (NaH, 1.5 당량)을 첨가하여 제조할 수 있다. 이는 BOC-보호 중간체를 생성하고, 이는 EtOH 중 1.20 M HCl에 의해 탈보호시켜, 원하는 염산염을 생성한다. 또 다른 구체예에서, 출발 물질은 Mitsunobu 커플링 반응에 의해 제조되는, (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘-1-카르복실산 *t*-부틸 에스테르이다. 예를 들면, 상기 에스테르는 적절한 용매에 (S)-3-((R)-1-히드록시-2-메틸프로필)피롤리딘-1-카르복실산 *t*-부틸 에스테르 (1.0 당량), *p*-클로로페놀 (2.0 당량), 및 트리페닐포스핀 (1.1 당량)과 같은 포스핀 촉매를 용해시키고, 뒤이어 디이소프로필 아조디카르복실레이트 또는 디에틸 아조디카르복실레이트와 같은 아조디카르복실레이트를 첨가하는 것에 의해 제조할 수 있다.

[0024] 일 구체예에서, 본 발명의 결정형 염산염은 (a) (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 염산염을 극성 용매로 처리하여 완전히 용해시키고, 제1 조성물을 형성하는 단계; 및 (b) 비극성 용매를 첨가하여, 제2 조성물을 형성하며, 상기 제2 조성물로부터 본 발명의 결정형 염산염이 형성되는 것인 단계에 의해 제조될 수 있다. 극성 용매는 통상적으로 메탄올, 에탄올, 프로판올, *n*-프로판올, 이소프로판올, *n*-부탄올, 에틸렌 글리콜, 물, 아세트산, 포름산, 등과 같은 양성자성 용매(protic solvent)이다. 일반적으로, 용해는 약 50-60℃ 범위의 온도와 같은, 약 30-70℃ 범위의 상승된 온도에서 수행된다. 일 구체예에서, 용액은 약 55℃의 온도까지

가열된다.

[0025] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 결정형 염산염은 a) (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘-1-카복실산 *t*-부틸 에스테르를 비활성 희석제 중 염산으로 탈보호시켜 용해를 완료하고 제1 조성물을 형성하는 단계, 및 b) 비극성 용매를 첨가하여, 제2 조성물을 형성하고, 그로부터 결정형 염산염을 형성하는 것인 단계에 의해 제조될 수 있다. 일 구체예에서, 탈보호는 3M HCl을 이용하여 수행되고, 비활성 희석제는 시클로펜틸 메틸 에테르이다. 일반적으로, 용해는 실온에서 수행된다.

[0026] 본 발명의 방법의 단계 (b)에서 사용하기에 적합한 비극성 용매는 예시로서 및 비한정으로, 펜탄, 시클로펜탄, 헥산, 시클로헥산, 벤젠, 톨루엔, 1,4-디옥산, 클로로포름, 사염화탄소, 디에틸 에테르, 디이소프로필 에테르, 및 디부틸 에테르 등을 포함한다. 일 구체예에서, 비극성 용매는 디이소프로필 에테르이다. 그 후, 수득된 용액은 본 발명의 결정형 화합물을 형성하도록 선택적으로 냉각된다. 하나의 특정한 구체예에서, 상기 용액은 약 15-30℃까지 냉각되고, 또 다른 구체예에서, 약 실온의 온도까지 냉각된다. 적절한 양의 시간 후에, 결정이 관찰될 것이다. 일 구체예에서, 수시간 후에 결정이 관찰되고, 일 구체예에서, 약 1 내지 3시간 후에 관찰된다. 결정을 관찰한 후, 모액(mother liquor)의 부피를 감소시키고, 결정을 단리하고 건조시키며, 예를 들면, 여과에 의해 단리하고, 진공 하에 건조시킨다. 일 구체예에서, 일단 결정을 관찰한 후, 결정을 단리 전에 약 0.5 내지 3시간 동안 성장될 수 있게 한다.

[0027] 또 다른 구체예에서, 냉각 단계 동안, 용액에 이전에 형성된 염산염 결정을 접종한다. 그와 같은 모결정(seed crystal)은 염산염을 극성 용매 중에서 가열하고, 그 후, 수득된 용액을 전술된 바와 같이, 비극성 용매의 존재 하에 냉각시키는 것에 의해 생성할 수 있다.

[0028] 결정형 특성

[0029] 무엇보다도, (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염을 형성하는 것은 그 화합물 자체의 정제를 위해 유용하다는 것이 발견되었다. 예를 들면, 본 발명의 결정형 염산염은 약 99%의 순도를 갖는다.

[0030] 분말 x-선 회절의 분야에서 잘 알려진 바와 같이, PXRD 스펙트럼의 상대적 피크 높이는 샘플 제조 및 장치 구조 (instrument geometry)와 관련된 다수의 인자들에 의존적이나, 피크 위치는 실험 세부 조건에 비교적 둔감하다. 실시예 2에 표시된 것과 같은 PXRD 패턴을 수득했다. 따라서, 일 구체예에서, 본 발명의 결정형 화합물은 특정한 피크 위치를 갖는 PXRD 패턴을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 결정형 화합물은 피크 위치가 도 1에 표시된 것과 실질적으로 일치하는 것인 PXRD 패턴을 특징으로 한다. 그 피크들이 상대적 강도(relative intensity)의 내림차순으로 하기에 열거된다. 모든 PXRD 피크 강도는 각 피크에 대한 상응하는 백그라운드 강도를 차감하는 것에 의해 보정되었다.

표 1

I%	2-Theta	I%	2-Theta
100	20.36	9	19.08
43	25.46	8	24.77
29	21.50	5	14.42
15	26.42	5	16.74
14	30.65	2	5.20
13	15.26	2	8.78
9	28.91		

[0032]

[0033] 따라서, 일 구체예에서, 상기 결정형 화합물은 8.78 ± 0.20 , 15.26 ± 0.20 , 19.08 ± 0.20 , 20.36 ± 0.20 , 21.50 ± 0.20 , 및 25.46 ± 0.20 의 2 θ 값에서 회절 피크를 포함하는 분말 x-선 회절 (PXRD) 패턴을 특징으로 하고; 또한, 26.42 ± 0.20 , 30.65 ± 0.20 , 28.91 ± 0.20 , 24.77 ± 0.20 , 14.42 ± 0.20 , 16.74 ± 0.20 , 및 5.20 ± 0.20 으로부터 선택된 2 θ 값에서 하나 이상의 추가적인 회절 피크를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0034] 시차 주사 열량측정법(DSC) 트레이스를 실시예 3에 표시된 바와 같이 수득했다. 따라서, 일 구체예에서, 본 발명의 결정형 화합물은 그의 DSC 온도 기록계 (thermograph)를 특징으로 한다. 일 구체예에서, 본 발명의 결정형

화합물은 도 2에 표시된 바와 같이, 약 128℃의 용융점을 보이고, 약 200℃ 미만에서 유의성 있는 열분해가 없다는 것을 보여주는 DSC 온도 기록계를 특징으로 한다.

[0035] 본 발명의 결정형 화합물에 대해 실시예 3에 기재된 바와 같이 열중량 분석(thermogravimetric analysis, TGA)을 수행했다. 따라서, 일 구체예에서, 본 발명의 결정형 화합물은 그의 TGA 트레이스를 특징으로 한다. 일 구체예에서, 본 발명의 결정형 화합물은 도 3에 표시된 바와 같이, 약 200℃ 미만의 온도에서 유의성 있는 중량 감소(잔류 수분 또는 용매의 손실과 연관됨)를 보이지 않는 TGA 트레이스를 특징으로 한다.

[0036] 본 발명의 결정형 화합물은 허용가능한 수준의 흡습성을 갖는, 가역적 수착/탈착(sorption/desorption) 프로파일을 갖는 것으로 입증되었다. 예를 들면, 본 발명의 결정형 화합물은 유의하지 않은 흡습성을 가지며, 도 4에 도시된 바와 같이, 최대 85% 상대 습도에 노출된 경우, 약 1.0% 미만의 중량 증가를 보였다.

[0037] 본 발명의 결정형 화합물의 이러한 특성이 하기의 실시예에서 더 설명된다.

[0038] 유용성

[0039] (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘은 세로토닌 및 노르에피네프린 재흡수 억제 활성을 갖는다. 따라서, 이 화합물, 및 본 발명의 결정형 화합물은 조합된 세로토닌 및 노르에피네프린 재흡수 억제제(serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors, SNRI)로서 치료적 유용성을 갖는다.

[0040] 화합물의 억제 상수 (K_i)는 방사성 리간드 결합 억제 분석에서 방사성 리간드가 존재하지 않는 경우 수송체의 50%를 점유하는 리간드의 농도이다. K_i 값은 분석 1에 기재된 바와 같이, (노르에피네프린 수송체, NET의 경우) ^3H -니속세틴 및 (세로토닌 수송체, SERT의 경우) ^3H -시탈로프람과의 방사성 리간드 결합 연구로부터 결정될 수 있다. 이 K_i 값들은 Cheng & Prusoff 식 및 방사성 리간드의 K_d 를 사용한 결합 분석에서 IC_{50} 값으로부터 유도된다 (Cheng & Prusoff (1973) Biochem. Pharmacol. 22(23):3099-3108). 기능적 IC_{50} 값은 분석 2에 기재된 흡수의 기능적 억제 분석에서 결정될 수 있다. 이 IC_{50} 값들은 Cheng & Prusoff 식 및 수송체에 대한 전달물질의 K_m 을 이용하여 K_i 값으로 전환될 수 있다. 그러나, 분석 2에 기재된 흡수 분석 조건은 분석 2에 사용된 신경전달물질 농도 (5-HT, NE 또는 DA)가 각각의 수송체에 대한 K_m 보다 훨씬 낮기 때문에, 수학적 전환이 바람직하다면, IC_{50} 값들이 K_i 값들에 매우 근접하게 하는 것이라는 것을 유념한다.

[0041] 본 발명의 화합물의 세로토닌 및/또는 노르에피네프린 재흡수 억제 활성을 결정하기 위한 대표적인 분석은 예를 들어, 분석 1과 Tsuruda 등, (2010) *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 61(2):192-204에 기재된 바와 같은, SERT 및 NET 결합을 측정하는 분석을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 분석 1에 기재된 것과 같은 분석에서 DAT 결합 및 흡수의 수준을 이해하는 것이 유용하다. 유용한 2차 분석은 분석 2에 기재된 바와 같은, 각각의 인간 또는 랫트 재조합 수송체(hSERT, hNET, 또는 hDAT)를 발현하는 세포로의 세로토닌 및 노르에피네프린 흡수의 억제를 측정하는 신경전달물질 흡수 분석, 및 분석 3에 기재된 바와 같이, 조직에서 SERT, NET 및 DAT의 생체 내 점유를 결정하는데 사용되는 생체 외 방사성 리간드 결합 및 신경전달물질 흡수 분석을 포함한다. 테스트 화합물의 약리학적 특성을 평가하는데 유용한 다른 분석들은 분석 4에 열거된 것들을 포함한다. 대표적인 생체 내 분석은 신경병증성 통증의 치료에 대한 임상적 효능의 신뢰할 만한 예측자인, 분석 5에 기재된 포르말린 발 시험(formalin paw test), 및 분석 6에 기재된 척수 신경 결찰 모델을 포함한다. 전술된 분석들은 본 발명의 화합물의 치료적 유용성, 예를 들어, 신경병증성 통증 완화 활성을 결정하는데 유용하다. 본 발명의 화합물의 다른 특성 및 유용성은 당업자에게 잘 알려진 다양한 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo) 분석을 이용하여 입증될 수 있다.

[0042] 본 발명의 결정형 화합물은 모노아민(monoamine) 수송체 기능의 조절이 관여하는 의학적 상태, 특히 세로토닌 및 노르에피네프린 재흡수 억제에 의해 매개되거나 그에 반응하는 의학적 상태의 치료 및/또는 예방에 유용할 것으로 기대된다. 따라서 세로토닌 및/또는 노르에피네프린 수송체의 억제에 의해 치료되는 질병 또는 질환을 앓는 환자들은 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여함으로써 치료될 수 있을 것으로 기대된다. 그러한 의학적 상태는, 예로서, 신경병증성 통증, 섬유근육통, 및 만성 통증과 같은 통증 장애, 주요 우울증과 같은 우울 장애, 불안 장애와 같은 정동 장애, 주의력 결핍 과잉행동 장애, 치매와 같은 인지 장애 및 스트레스성 요실금을 포함한다.

[0043] 용량(dose)당 투여되는 활성제의 양 또는 1일 투여되는 총량이 미리 정해질 수 있거나, 또는 환자의 질환의 속성 및 중증도, 치료대상 질환, 환자의 연령, 체중 및 건강, 활성제에 대한 환자의 내약성(tolerability), 투여경로, 투여되는 활성제 및 2차 작용제(secondary agent)의 활성, 효능, 약동학 및 독성학 프로파일과 같은, 약리학적 고려사항 등을 포함하는, 다수의 인자들을 고려하여 개별 환자 기준으로 결정될 수 있다. (신경병증성 통증과 같은) 질병 또는 의학적 상태를 앓는 환자의 치료는 미리 결정된 투여량 또는 치료하는 의사에 의해 결정된 투여량으로 시작할 수 있고, 질병 또는 의학적 상태의 증상을 예방, 개선, 억제 또는 완화하는데 필요한 기간 동안 지속될 것이다. 그러한 치료를 받는 환자들은 치료법의 유효성을 결정하기 위해 일반적으로 규칙적으로 모니터링될 것이다. 예를 들어, 신경병증성 통증의 치료에서, 치료의 유효성 척도는 환자 삶의 질의 평가, 예를 들어, 환자의 수면 패턴, 직장 출근, 운동 능력 및 보행성 등에 대한 개선을 포함할 수 있다. 또한 점수 기준으로 적용되는 통증 정도(pain scale)가 환자의 통증 수준의 평가를 돕기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 다른 질병 및 질환에 대한 지표들은 당업자에게 잘 알려져 있고, 치료하는 의사에 의해 쉽게 이용가능하다. 의사에 의한 지속적 모니터링은 주어진 시간에 활성제의 최적량이 투여되고, 치료 지속기간의 결정이 용이하게 이루어지게 할 것이다. 이것은 2차 작용제가 또한 투여되는 경우, 2차 작용제의 선택, 투여량, 및 치료 기간도 조정을 필요로 할 수 있기 때문에 특히 중요하다. 이에 의해, 바람직한 유효성을 가져오는 최소량의 활성제가 투여되고, 투여가 질병 또는 의학적 상태를 성공적으로 치료하는데 필요한 동안만 지속될 수 있도록, 치료 계획(regimen) 및 투여 일정이 치료 과정에 걸쳐서 조정될 수 있다.

[0044] 통증 장애(pain disorders)

[0045] SNRI는 고통스러운 당뇨병성 신경병증(둘록세틴, Goldstein et al. (2005) *Pain* 116:109-118; 벤라팍신, Rowbotham et al. (2004) *Pain* 110:697-706), 섬유근육통(fibromyalgia) (둘록세틴, Russell et al. (2008) *Pain* 136(3):432-444; 밀나시프란, Vitton et al. (2004) *Human Psychopharmacology* 19:S27-S35), 및 편두통(벤라팍신, Ozyalcin et al. (2005) *Headache* 45(2):144-152)과 같은 통증에 유익한 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 일 구체예는 환자에게 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 통증 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일반적으로, 치료적 유효량은 통증을 경감시키기에 충분한 양일 것이다. 대표적인 통증 장애는, 예로서, 급성 통증, 지속성 통증, 만성 통증, 염증성 통증, 및 신경병증성 통증을 포함한다. 보다 구체적으로, 이들은 관절염; 만성 하부 요통(low back pain)을 포함한 요통; 종양 관련 통증 (예를 들어, 골 통증, 두통, 안면통 또는 내장통) 및 암 치료와 관련된 통증 (예를 들어, 화학요법-후 증후군, 만성 수술-후 통증 증후군 및 방사선 조사-후 증후군)을 포함한, 암; 손목 터널 증후군; 섬유근육통; 만성 긴장성 두통을 포함하는 두통; 다발성 근육통, 류마티스 관절염 및 골관절염과 관련된 염증; 편두통; 복합 부위 통증 증후군을 포함한 신경병증성 통증; 전반적인 통증(overall pain); 수술-후 통증; 어깨 통증; 뇌졸중-후 통증, 및 척수 손상 및 다발성 경화증과 관련된 통증을 포함한 중추성 통증 증후군; 환상지통; 파킨슨병과 관련된 통증; 및 내장통 (예를 들어, 과민성 장 증후군)과 관련되거나 또는 이들에 의해 유발된 통증을 포함한다. 당뇨병성 말초 신경병증(diabetic peripheral neuropathy, DPN), HIV-관련 신경병증, 대상포진-후 신경통(post-herpetic neuralgia, PHN), 및 화학요법-유도된 말초 신경병증을 포함하는, 신경병증성 통증의 치료가 특별한 관심분야이다. 신경병증성 통증과 같은 통증 장애를 치료하기 위해 사용되는 경우, 본 발명의 결정형 화합물은 항경련제, 항우울제, 근육이완제, NSAID, 오피오이드 효능제, 오피오이드 길항제, 선택적 세로토닌 재흡수 저해제, 나트륨 채널 차단제 및 교감신경저해제를 포함한, 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 이 종류들에 속하는 대표적인 화합물이 본 명세서에 기재된다.

[0046] 우울 장애(depressive disorders)

[0047] 본 발명의 또다른 구체예는, 환자에게 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 우울 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 일반적으로, 치료적 유효량은 우울증을 완화시키고 전반적인 행복감을 제공하기에 충분한 양일 것이다. 대표적인 우울 장애는, 비환정적인 예로서, 알츠하이머병, 양극성 장애, 암, 아동 학대, 불임, 파킨슨병, 심근경색-후(postmyocardial infarction), 및 정신병과 관련된 우울증; 기분부전장애; 울화성 노인 증후군(grumpy or irritable old man syndrome); 유도성 우울증; 주요 우울증; 소아 우울증; 폐경후 우울증; 산후 우울증; 재발성 우울증; 단일 에피소드 우울증; 및 하위증후군성 우울증(subsyndromal symptomatic depression)을 포함한다. 특별한 관심사는 주요 우울증의 치료이다. 우울 장애의 치료에 사용되는 경우, 본 발명의 결정형 화합물은 항우울제 및 이중 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 저해제를 포함한, 다른 치

료제와 조합하여 투여될 수 있다. 이 종류들에 속하는 대표적인 화합물이 본 명세서에 기재된다.

[0048] 정동 장애(Affective Disorders)

[0049] 본 발명의 또다른 구체예는, 환자에게 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 정동 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 대표적인 정동 장애는, 비한정적인 예시로서, 범불안 장애와 같은 불안 장애; 회피성 인격 장애; 신경성 식욕부진증, 신경성 폭식증, 및 비만과 같은 섭식 장애; 강박 장애; 공황 장애; 회피성 인격 장애 및 주의력 결핍 과잉행동 장애(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD)와 같은 인격 장애; 외상-후 스트레스 증후군; 광장공포증, 단순 및 기타 특이 공포증, 및 사회 공포증과 같은 공포증; 월경전 증후군; 정신분열증 및 조증과 같은 정신병성 장애; 계절성 정동 장애; 조루증, 발기부전, 및 여성 성적 흥분 장애와 같은 여성 생기능장애를 포함한, 성 기능장애; 사회 불안 장애; 및 알코올, 벤조디아제핀, 코카인, 헤로인, 니코틴 및 페노바르비탈 중독과 같은 약물 의존 및 이러한 의존으로부터 발생될 수 있는 금단 증후군을 포함한, 물질 남용 장애를 포함한다. 정동 장애의 치료에 사용되는 경우, 본 발명의 결정형 화합물들은 항우울제를 포함한, 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 이 종류들에 속하는 대표적인 화합물이 본 명세서에 기재된다.

[0050] 10배의 NET 선택성을 갖는, 아토목세틴은 주의력 결핍 과잉행동 장애 (ADHD) 치료법으로서 허가되었고, 또한 임상 연구들은 SNRI인, 벤라팍신이 또한 ADHD를 치료하는데 유의한 효과를 가질 수 있다는 것을 보여주었다 (Mukaddes et al. (2002) *Eur. Neuropsychopharm.* 12(Supp 3):421). 따라서, 본 발명의 결정형 화합물은 또한 환자에게 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여함으로써 주의력 결핍 과잉행동 장애를 치료하는 방법에서 유용할 것으로 기대된다. 우울증을 치료하기 위해 사용되는 경우, 본 발명의 결정형 화합물은 항우울제를 포함한, 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 이 종류들에 속하는 대표적인 화합물이 본 명세서에 기재된다.

[0051] 인지 장애(Cognitive Disorders)

[0052] 본 발명의 또다른 구체예는, 환자에게 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 인지 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 대표적인 인지 장애는 비한정적인 예로서, 퇴행성 치매 (예를 들어, 알츠하이머병, 크로이츠펔트-야콥병, 헌팅턴 무도병, 파킨슨병, 피크병 및 노인성 치매), 혈관성 치매 (예를 들어, 다발-경색성 치매), 및 두개강내 공간 점유성 병변, 외상, 감염 및 관련 상태 (HIV 감염 포함), 대사, 독소, 무산소증 및 비타민 결핍증과 관련된 치매를 포함한, 치매; 및 노인성 기억 손상, 기억상실 장애 및 노인성 인지 저하와 같은, 노화와 관련한 경도 인지 손상을 포함한다. 인지 장애를 치료하기 위해 사용되는 경우, 본 발명의 결정형 화합물은 항-알츠하이머제 및 항-파킨슨제를 포함한, 다른 치료제들과 조합하여 투여될 수 있다. 이 종류들에 속하는 대표적인 화합물이 본 명세서에 기재된다.

[0053] 기타 장애

[0054] SNRI는 또한, 스트레스성 요실금의 치료에 효과적인 것으로 확인되었다 (Dmochowski (2003) *Journal of Urology* 170(4): 1259-1263). 따라서, 본 발명의 또 다른 구체예는 환자에게 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 스트레스성 요실금의 치료 방법에 관한 것이다. 스트레스성 요실금을 치료하기 위해 사용되는 경우, 본 발명의 화합물은 항경련제를 포함한, 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 이 종류들에 속하는 대표적인 화합물이 본 명세서에 기재된다.

[0055] SNRI인, 돌록세틴은 만성 피로 증후군 치료에서 그의 효능을 평가하기 위한 임상 시험이 진행되고 있고, 최근에 섬유근육통을 치료하는 것에 효과적인 것으로 확인되었다 (Russell et al. (2008) *Pain* 136(3):432-444). 본 발명의 결정형 화합물은 또한, SERT 및 NET를 억제하는 기대되는 능력 때문에, 이러한 유용성을 가질 것으로 기대되고, 본 발명의 또 다른 구체예는 환자에게 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 만성 피로 증후군을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 노르에피네프린 및 도파민 재흡수 억제제인, 시부트라민은 비만을 치료하는 것에 유용한 것으로 확인되었다 (Wirth et al (2001) *JAMA* 286(11): 1331-1339). 본 발명의 결정형 화합물은 또한, NET를 억제하는 기대되는 능력 때문에, 이러한 유용성을 가질 것으로 기대되고, 본 발명의 또 다른 구체예는 환자에게 본 발명의 결정형

화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 비만을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0057] SNRI인, 데스벤라팍신은 폐경과 관련된 혈관운동 증상을 경감시키는 것으로 확인되었다 (Deecher et al. (2007) *Endocrinology* 148(3):1376-1383). 본 발명의 결정형 화합물은 또한, SERT 및 NET를 억제하는 기대되는 능력 때문에, 이러한 유용성을 가질 것으로 기대되고, 본 발명의 또 다른 구체예는 환자에게 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 폐경과 관련된 혈관운동 증상을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0058] 연구 도구

[0059] 본 발명의 결정형 화합물은 세로토닌 재흡수 억제 활성 및 노르에피네프린 재흡수 억제 활성을 가질 것으로 기대되기 때문에, 이 화합물은 세로토닌 또는 노르에피네프린 수송체를 갖는 생물학적 시스템 또는 시료를 조사 또는 연구하기 위한 연구 도구로서 또한 유용할 것으로 기대된다. 세로토닌 및/또는 노르에피네프린 수송체를 갖는 적절한 생물학적 시스템 또는 시료가, 시험관 내 또는 생체 내에서 수행될 수 있는 연구에 이용될 수 있다. 그러한 연구에 적합한 대표적인 생물학적 시스템 또는 시료는 세포, 세포 추출물, 원형질 막, 조직 시료, 단리된 기관, 포유동물(예를 들면, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 토끼, 개, 돼지, 사람) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않고, 포유동물이 특히 관심대상이다. 본 발명의 특정한 구체예에서, 포유동물에서 세로토닌 재흡수는 본 발명의 결정형 화합물의 세로토닌 재흡수-억제량을 투여함으로써 억제된다. 또다른 특정 구체예에서, 포유동물에서 노르에피네프린 재흡수는 본 발명의 결정형 화합물의 노르에피네프린 재흡수-억제량을 투여함으로써 억제된다. 또한 본 발명의 결정형 화합물은 그러한 화합물을 사용한 생물학적 분석을 수행함으로써, 연구 도구로서 사용될 수 있다.

[0060] 연구 도구로 사용되는 경우, 세로토닌 수송체 및/또는 노르에피네프린 수송체를 포함하는 생물학적 시스템 또는 시료는 일반적으로 본 발명의 결정형 화합물의 세로토닌 재흡수-저해량 또는 노르에피네프린 재흡수-억제량과 접촉된다. 생물학적 시스템 또는 시료가 상기 화합물에 노출된 후, 세로토닌 재흡수 및/또는 노르에피네프린 재흡수를 억제하는 효과는 통상적인 절차 및 장비를 사용하여 결정된다. 노출은 상기 화합물과 세포 또는 조직을 접촉시키는 것, 예를 들어 복강 내(i.p.) 또는 정맥 내(i.v.) 투여 등에 의하여, 포유동물에 상기 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 이 결정 단계는 반응을 측정하는 단계, 즉 정량적 분석을 포함할 수 있고, 또는 관찰, 즉 정성적 분석을 포함할 수 있다. 반응의 측정은 예를 들어, 세로토닌 및 노르에피네프린 재흡수 분석과 같은, 통상적인 과정 및 장비를 사용하여 생물학적 시스템 또는 시료에 대한 상기 화합물의 효과를 결정하는 단계를 포함한다. 분석 결과는 활성 수준, 및 바람직한 결과를 달성하는데 필요한 화합물의 양, 즉 세로토닌 재흡수-억제량 및 노르에피네프린 재흡수-억제량을 결정하기 위해 이용될 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명의 결정형 화합물은 다른 화학적 화합물을 평가하기 위한 연구 도구로서 사용될 수 있고, 따라서 예를 들어, 세로토닌 재흡수 억제 활성 및 노르에피네프린 재흡수 억제 활성을 모두를 갖는 신규한 화합물을 발견하기 위한 스크리닝 분석에 또한 유용하다. 이러한 방식으로, 본 발명의 결정형 화합물은 분석에서 표준으로서 사용되어 테스트 화합물과 본 발명의 결정형 화합물로 얻은 결과를 비교하여, 존재하는 경우, 거의 동등하거나 보다 우수한 재흡수-저해 활성을 갖는 테스트 화합물을 확인할 수 있게 한다. 예를 들어, 원하는 특성을 갖는 테스트 화합물, 예를 들어 본 발명의 결정형 화합물과 거의 동일하거나 보다 우수한 재흡수-억제 활성을 갖는 테스트 화합물들을 확인하기 위해, 하나의 테스트 화합물 또는 테스트 화합물들의 군에 대한 재흡수 데이터를 본 발명의 결정형 화합물에 대한 재흡수 데이터와 비교한다. 본 발명의 이 양태는, 별개의 구체예로서, (적절한 분석법을 사용한) 비교 데이터의 생성 및 목적 테스트 화합물을 확인하기 위한 테스트 데이터의 분석을 모두 포함한다. 따라서, 테스트 화합물은 하기 단계들을 포함하는 방법에 의하여, 생물학적 분석에서 평가될 수 있다: (a) 테스트 화합물로 생물학적 분석을 수행하여 제1 분석값을 제공하는 단계; (b) 본 발명의 결정형 화합물로 생물학적 분석을 수행하여 제2 분석값을 제공하는 단계로서; 단계 (a)는 단계 (b)의 전, 후 또는 그와 동시에 수행되는 것이고; 및 (c) 단계 (a)로부터 얻은 제1 분석값과 단계 (b)로부터 얻은 제2 분석값을 비교하는 단계. 대표적인 생물학적 분석은 세로토닌 및 노르에피네프린 재흡수 분석을 포함한다.

[0062] 약제학적 조성물 및 제제

[0063] 본 발명의 결정형 화합물은 일반적으로 약제학적 조성물 또는 제제의 형태로 환자에게 투여된다. 그러한 약제학적 조성물은 경구, 직장, 질, 비강, 흡입, 국소 (경피 포함) 및 비경구 투여 방식을 포함하나 이에 한정되지 않

는, 허용가능한 투여 경로로 환자에게 투여될 수 있다. 그러나, 당업자는 본 발명의 결정형 화합물이 제제화되면, 더 이상 결정형이지 않을 수 있고, 즉, 적절한 담체 중에 용해될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 본 발명의 결정형 화합물은, 1일 다회 투여량 (예를 들어, 1일 2회, 3회 또는 4회), 1일 1회 투여량, 1일 2회 투여량, 1주 1회 투여량 등으로, 예를 들어 경구로 투여될 수 있다.

[0064] 따라서, 일 구체예에서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체 및 본 발명의 결정형 화합물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 필요한 경우, 다른 치료제 및/또는 제제화 작용제를 포함할 수 있다. 조성물을 논의하는 경우, "본 발명의 결정형 화합물(compound of the invention)"은 본 명세서에서, 담체와 같은 제제의 다른 성분들과 구별하기 위해, "활성제(active agent)"로도 지칭될 수 있다.

[0065] 본 발명의 약제학적 조성물은 일반적으로 본 발명의 결정형 화합물의 치료적 유효량을 포함한다. 그러나, 당업자들은, 약제학적 조성물이 치료적 유효량을 초과하여 포함할 수 있고, 즉 벌크 조성물이거나, 또는 치료적 유효량 미만을 포함할 수 있으며, 즉 치료적 유효량을 달성하기 위한 다회 투여를 위해 고안된 개별 단위 투여량을 포함할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일반적으로, 상기 조성물은 약 0.01 - 10 wt%와 같은, 약 0.01 - 30 wt%를 포함하는, 약 0.01-95 wt%의 활성제를 포함할 것이고, 실제 양은 제제 자체, 투여 경로, 투여 빈도 등에 따라 결정될 것이다. 일 구체예에서, 경구 투여 형태에 적절한 조성물은, 예를 들어, 약 5 - 70 wt%, 또는 약 10 - 60 wt%의 활성제를 포함할 것이다. 하나의 예시적 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 1 내지 15 mg의 활성제 및 약 1 내지 10 mg의 활성제를 포함한, 약 1 내지 20 mg의 활성제를 포함한다. 또 하나의 예시적 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 7.5 내지 15 mg의 활성제를 포함한, 약 5 내지 20 mg의 활성제를 포함한다. 예를 들면, 활성제는 1 mg 및 10 mg 단위 투여량으로 제제화될 수 있다.

[0066] 통상적인 담체 또는 부형제가 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있다. 특정한 담체 또는 부형제, 또는 담체나 부형제의 조합의 선택은, 특정한 환자를 치료하기 위해 사용되는 투여 방식, 또는 의학적 상태의 종류나 질병 상태에 따라 결정될 것이다. 이와 관련하여, 특정한 투여 방식에 적절한 조성물의 제조는 약학 분야 당업자의 통상적인 범위 내에 속한다. 또한, 그러한 조성물에 사용되는 담체 또는 부형제들은 상업적으로 이용가능하다. 추가적인 예로서, 통상적인 제제화 기술은 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); 및 H. C. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999)에 기재되어 있다.

[0067] 약제학적으로 허용가능한 담체로서 사용될 수 있는 물질들의 대표적인 예는 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 락토오스, 글루코오스 및 수크로오스와 같은 당; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은, 전분; 미정질 셀룰로오스와 같은 셀룰로오스, 및 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트와 같은 그의 유도체; 트래거칸스 분말(powdered tragacanth); 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터, 및 좌약 왁스와 같은, 부형제; 땅콩유, 면실유, 홍화씨유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일; 프로필렌 글리콜과 같은, 글리콜; 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은, 폴리올; 에틸 올리에이트 및 에틸 라우레이트와 같은, 에스테르; 한천; 마그네슘 히드록시드 및 알루미늄 히드록시드와 같은, 완충제; 알긴산; 발열성 물질-제거수(pyrogen-free water); 등장성 염수; 링거 용액; 에틸 알코올; 포스페이트 완충 용액; 클로로포름으로 카본 및 히드로플루오로카본과 같은, 압축 추진제 가스; 및 약제학적 조성물에 사용되는 기타 무독성의 적합한 물질.

[0068] 약제학적 조성물은 일반적으로 활성제를 약제학적으로 허용가능한 담체 및 하나 이상의 선택적 성분과 완전히 및 밀접하게 혼합 또는 블렌딩시켜 제조된다. 그 후 결과적으로 수득된 균일하게 블렌딩된 혼합물을 통상적인 절차 및 장비를 사용하여, 정제, 캡슐제, 환제, 캐니스터, 카트리지, 디스펜서 등으로 성형하거나 또는 적재할 수 있다.

[0069] 일 구체예에서, 상기 약제학적 조성물은 경구 투여에 적합하다. 하나의 예시적 투여 계획은 1일 1회 또는 2회 투여되는 경구 투여 제형이다. 경구 투여에 적절한 조성물은 캡슐, 정제, 환제, 로젠지(lozenge), 카셰(cachet), 드라제(dragee), 분말, 과립; 수성 또는 비수성 액체 중의 용액 또는 현탁액; 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 액체 에멀전; 엘릭서(elixir) 또는 시럽 등의 형태일 수 있으며, 각각은 미리 정해진 양의 활성제를 포함한다.

[0070] 고체 투여 제형(즉, 캡슐, 정제, 환제 등)으로의 경구 투여가 의도된 경우, 상기 조성물은 일반적으로, 활성제 및 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트와 같은, 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 것이

다. 고체 투여 형태는 또한 전분, 미정질 셀룰로오스, 락토오스, 수크로오스, 글루코오스, 만니톨, 및/또는 규산과 같은, 충전제 또는 증량제; 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로오스 및/또는 아카시아와 같은, 결합제; 글리세롤과 같은, 보습제; 아가-아가, 칼슘 카르보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정한 실리케이트, 및/또는 소듐 카르보네이트와 같은, 봉해제; 과라판과 같은, 용해지연제; 4차 암모늄 화합물과 같은, 흡수 촉진제; 세틸 알코올 및/또는 글리세롤 모노스테아레이트와 같은, 습윤제; 카올린 및/또는 벤토나이트 진흙과 같은, 흡수제; 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트, 및/또는 이들의 혼합물과 같은 윤활제; 착색제; 및 완충제를 포함할 것이다.

[0071] 방출제(release agent), 습윤제, 코팅제, 감미제, 향미제 및 방향제, 보존제 및 항산화제가 또한 약제학적 조성물 중에 존재할 수 있다. 정제, 캡슐제, 환제 등을 위한 대표적 코팅제는, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 프탈레이트, 메타크릴산-메타크릴산 에스테르 공중합체, 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트, 카르복시메틸 에틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트 등과 같은, 장용성 코팅(enteric coating)을 위해 사용되는 코팅제를 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 항산화제의 예는 아스코르브산, 시스테인 히드로클로리드, 소듐 비숑페이트, 소듐 메타비숑페이트, 소듐 설피드와 같은, 수용성 항산화제; 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은, 지용성 항산화제; 및 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산, 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은, 금속-킬레이트제(metal chelating agent)를 포함한다.

[0072] 또한 조성물은 활성제의 느린 방출 또는 제어된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있고, 예로서, 다양한 비율의 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스나 기타 폴리머 매트릭스, 리포솜 및/또는 마이크로스피어(microsphere)를 사용하여, 제제화될 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 불투명화제(opacifying agent)를 포함할 수 있고, 위장관의 특정한 부분에서만, 또는 우선적으로, 선택적으로 지연된 방식으로 작용제를 방출하도록 제제화될 수 있다. 사용될 수 있는 포매용 조성물(embedding composition)의 예는 폴리머 물질 및 왁스를 포함한다. 또한 상기 활성제는, 적절한 경우, 하나 이상의 전술된 부형제를 포함하는, 마이크로-캡슐화된 형태일 수 있다.

[0073] 경구 투여를 위한 적절한 액체 투여 제형은 예로써, 약제학적으로 허용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함한다. 액체 투여 제형은 일반적으로, 활성제, 및 물 또는 기타 용매와 같은 비활성 희석제, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (예를 들어, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라히드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물과 같은, 가용화제 및 유화제를 포함한다. 현탁액은 예를 들어, 에톡시화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가-아가 및 트래거캔스, 및 이들의 혼합물과 같은, 현탁제를 포함할 수 있다.

[0074] 경구 투여용으로 의도된 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 단위 투여 형태로 포장될 수 있다. 용어 "단위 투여 형태(unit dosage form)"은 환자에게 투여하기에 적절한 물리적으로 구별된 단위를 의미하고, 즉, 각 단위는 단독으로 또는 하나 이상의 추가적인 단위와 조합되어, 원하는 치료 효과를 생성하는 것으로 계산된, 미리 정해진 양의 활성제를 포함한다. 예를 들어, 그러한 단위 투여 형태는 캡슐, 정제, 환제 등일 수 있다.

[0075] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 흡입 투여에 적합하고, 일반적으로는 에어로졸 또는 분말의 형태일 것이다. 그러한 조성물은 일반적으로, 분무기, 건조 분말 흡입기 또는 정량 흡입기(metered-dose inhaler)와 같은, 잘 알려진 전달 장치를 사용하여 투여된다. 분무 장치는 조성물을 환자의 호흡 기도 내로 운반되는 미스트(mist)로서 분사되도록 하는, 고속의 기류를 생성한다. 예시적인 분무 제제는 담체에 용해되어 용액을 형성하거나, 또는 미분화되고(micronized) 담체와 조합되어 호흡가능한 크기의 미분화 입자의 현탁액을 형성한, 활성제를 포함한다. 건조 분말 흡입기는 활성제를 흡입 동안 환자의 기류 중에 분산되는 자유-유동성 분말로서 투여한다. 예시적 건조 분말 제제는 락토오스, 전분, 만니톨, 텍스트로오스, 폴리락트산, 폴리락티드-글리콜리드 공중합체(poly lactide-co-glycolide), 및 이들의 조합과 같은 부형제와 건조-혼합된 활성제를 포함한다. 정량 흡입기는 압축된 추진제 가스를 사용하여 활성제의 측정된 양을 방출한다. 예시적인 정량 제제는 클로로플루오로 카본 또는 히드로플루오로알칸과 같은, 액화 추진제 중 활성제의 용액 또는 현탁액을 포함한다. 그러한 제제의 선택적 성분은 에탄올 또는 펜탄과 같은 공용매(co-solvent), 및 소르비탄 트리올리에이트, 올레산, 레시틴 및 글리세린과 같은 계면활성제를 포함한다. 그러한 조성물은 일반적으로, 활성제, 에탄올 (존재하는 경우) 및 계면활성제 (존재하는 경우)를 담은 적절한 용기에, 냉각되거나 가압된 히드로플루오로알칸을 첨가함으로써 제조

된다. 현탁액을 제조하기 위해, 활성제는 미분화된 후에, 추진제와 조합된다. 대안적으로, 현탁액 제제는 활성제의 미분화된 입자에 계면활성제 코팅을 분무 건조함으로써 제조될 수 있다. 그 후, 제조된 제제는 에어로졸 캐니스터(aerosol cannister)로 적재되어, 흡입기의 일부를 형성한다.

[0076] 본 발명의 결정형 화합물은 또한 비경구적으로 (예를 들어, 피하, 정맥 내, 근육 내, 또는 복강 내 주사에 의해) 투여될 수 있다. 그러한 투여를 위해, 활성제는 멸균 용액, 현탁액 또는 에멀전으로 제공된다. 그러한 제제를 제조하기 위한 예시적 용매는 물, 염수, 프로필렌 글리콜과 같은 저분자량 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 오일, 젤라틴, 에틸 올리에이트와 같은 지방산 에스테르 등을 포함한다. 일반적인 비경구 제제는 활성제의 멸균된 pH 4-7 수용액이다. 또한 비경구 제제는 하나 이상의 가용화제, 안정화제, 보존제, 습윤제, 유화제, 및 분산제를 포함할 수 있다. 이 제제들은 멸균된 주사용 매질, 살균제, 여과, 방사선조사, 또는 열의 사용에 의해 멸균 상태가 되게 할 수 있다.

[0077] 또한 본 발명의 결정형 화합물은 공지된 경피 전달 시스템 및 부형제를 사용하여 경피적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물을 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 아자시클로알칸-2-온 등과 같은 투과 촉진제와 혼합하고, 패취 또는 유사한 전달 시스템에 내포(incorporate)시킬 수 있다. 필요한 경우, 겔화제(gelling agent), 유화제 및 완충제를 포함한 추가적인 부형제가 그러한 경피 조성물에 사용될 수 있다.

[0078] 필요한 경우, 본 발명의 결정형 화합물은 하나 이상의 다른 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 따라서, 일 구체예에서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 결정형 화합물과 병용-투여되는 다른 약물들을 선택적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은, 항-알츠하이머제, 항경련제 (항간질제), 항우울제, 항-파킨슨제, 세로토닌-노르에피네프린 이중 재흡수 억제제 (SNRI), 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 노르에피네프린 재흡수 억제제, 오피오이드 효능제 (오피오이드 진통제), 오피오이드 길항제, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제, 나트륨 채널 차단제, 교감신경저해제, 및 이들의 조합의 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물 ("2차 작용제(secondary agent) (들)"로도 지칭됨)을 더 포함할 수 있다. 그러한 치료제들의 다수의 예가 당업계에 잘 알려져 있고, 그의 예가 본 명세서에 기재되어 있다. 2차 작용제와 본 발명의 결정형 화합물을 조합함으로써, 단지 2개의 활성 성분을 사용하여 삼중 요법(triple therapy), 즉, 세로토닌 재흡수 억제 활성, 노르에피네프린 재흡수 억제 활성, 및 2차 작용제와 관련된 활성 (예를 들어, 항우울 활성)이 달성될 수 있다. 일반적으로, 2개의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물은 3개의 활성 성분을 포함하는 조성물보다 제제화하기가 더 용이하므로, 그러한 2-성분 조성물(two-component composition)은 3개의 활성 성분을 포함하는 조성물에 비해 상당한 이점을 제공한다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에서, 약제학적 조성물은 본 발명의 결정형 화합물, 제2 활성제, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 또한 제3, 제4 등의 활성제가 상기 조성물에 포함될 수 있다. 조합 요법에서, 투여되는 본 발명의 결정형 화합물의 양, 및 2차 작용제의 양은 단일 요법(monotherapy)에서 일반적으로 투여되는 양보다 적을 수 있다.

[0079] 본 발명의 결정형 화합물은 제2 활성제와 물리적으로 혼합되어 두 작용제 모두를 포함하는 조성물을 형성하거나; 또는 각각의 활성제가 환자에게 동시에 또는 순차적으로 투여되는 분리된 별개의 조성물 중에 존재할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 결정형 화합물은 통상적인 절차 및 장비를 사용하여 제2 활성제와 조합되어, 본 발명의 결정형 화합물 및 제2 활성제를 포함하는 활성제의 조합물을 형성할 수 있다. 또한, 활성제는 약제학적으로 허용가능한 담체와 조합되어 본 발명의 결정형 화합물, 제2 활성제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 형성할 수 있다. 이 구체예에서, 조성물의 성분들은 일반적으로 혼합되거나 또는 블렌딩되어 물리적 혼합물을 생성한다. 그 후, 수득된 물리적 혼합물은 본 명세서에 기재된 경로를 이용하여 치료적 유효량으로 투여된다.

[0080] 대안적으로, 상기 활성제들은 환자에게 투여되기 전에, 분리된 별개의 상태를 유지할 수 있다. 이 구체예에서, 활성제는 투여 전에 물리적으로 함께 혼합되지 않으나, 별개의 조성물로서 동시에 또는 별개의 시간에 투여된다. 그러한 조성물들은 별개로 포장되거나 또는 키트로 함께 포장될 수 있다. 별개의 시간에 투여되는 경우, 2차 작용제는 일반적으로 본 발명의 결정형 화합물의 투여 후 24시간 내에, 본 발명의 화합물 투여와 동시 시점 내지 투여 후 약 24시간 경과 시점까지의 범위 내의 시점에 투여될 것이다. 이것은 순차적인 투여로도 지칭된다. 따라서, 본 발명의 결정형 화합물은 각 활성제에 대한 1개의 정제로, 2개의 정제를 사용하여 또 다른 활성제와 동시에 또는 순차적으로 경구 투여될 수 있으며, 순차적은 본 발명의 결정형 화합물의 투여 직후, 또는 미리 정해진 시간 경과 후 (예를 들어, 1시간 후 또는 3시간 후)에 투여되는 것을 의미할 수 있다. 대안적으로, 상기 조합은 서로 다른 투여 경로, 즉 하나는 경구로 및 다른 하나는 흡입에 의해 투여될 수 있다.

- [0081] 일 구체예에서, 키트는 본 발명의 결정형 화합물을 포함하는 제1 투여 형태, 및 본 명세서에 기재된 2차 작용제들 중 하나 이상을 포함하는 하나 이상의 추가적인 투여 형태를 본 발명의 방법을 실시하기에 충분한 양으로 포함한다. 제1 투여 제형 및 제2 (또는 제3, 등) 투여 형태는 함께, 환자의 질병 또는 의학적 상태의 치료 또는 예방을 위한 활성제들의 치료적 유효량을 포함한다.
- [0082] 2차 작용제(들)은, 포함되는 경우, 치료적 유효량으로 존재하며, 즉 일반적으로, 본 발명의 결정형 화합물과 병용-투여될 때 치료적으로 유의한 효과를 생성하는 양으로 투여된다. 2차 작용제는 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 광학적으로 순수한 입체이성질체 등의 형태일 수 있다. 따라서, 하기 열거된 2차 작용제들은 모든 그러한 형태들을 포함하는 것으로 의도되고, 상업적으로 이용가능하거나 또는 통상적인 절차 및 시약을 사용하여 제조될 수 있다.
- [0083] 대표적인 항-알츠하이머제는, 도네페질, 갈란타민, 메만틴, 리바스티그민, 셀레길린, 타크린, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0084] 대표적인 항경련제 (항간질제)는, 아세타졸아미드, 알부토인, 4-아미노-3-히드록시부티르산, 베클라미드, 카르바마제핀, 신로미드, 클로메티아졸, 클로나제팜, 디아제팜, 디메타디온, 에테로바르브, 에타디온, 에토숙시미드, 에토토인, 펠바메이트, 포스페니토인, 가바펜틴, 라코사미드, 라모트리진, 로라제팜, 마그네슘 브로마이드, 마그네슘 술페이트, 메페니토인, 메포바르비탈, 메트숙시미드, 미다줄람, 니트라제팜, 옥사제팜, 옥스카르바제핀, 파라메타디온, 페나세미드, 페네투리드, 페노바르비탈, 펜숙시미드, 페니토인, 포타슘 브로마이드, 프레가발린, 프리미돈, 프로가비드, 소듐 브로마이드, 소듐 발프로에이트, 술티암, 티아가빈, 토피라메이트, 트리메타디온, 발프로산, 발프로미드, 비가바트린, 조니사미드, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정한 구체예에서, 상기 항경련제는 카르바마제핀, 가바펜틴, 프레가발린 및 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0085] 대표적인 항우울제는, 아디나졸람, 아미트립틸린, 클로미프라민, 데시프라민, 도티에핀(예를 들면, 도티에핀 히드로클로라이드), 독세핀, 이미프라민, 로페프라민, 미르타자핀, 노르트리프틸린, 프로트립틸린, 트리미프라민, 벤라팍신, 지멜리딘, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0086] 대표적인 항-파킨슨제는, 아만타딘, 아포모르핀, 벤트트로핀, 브로모크립틴, 카르비도파, 디펜히드라민, 엔타카폰, 레보도파, 페르골리드, 프라미펙솔, 로피니롤, 셀레길린, 톨카폰, 트리헥시페니딜, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0087] 대표적인 이중 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제 (serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor, SNRI)는, 비시파딘, 데스벤라팍신, 돌록세틴, 밀나시프란, 네파조돈, 벤라팍신, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0088] 대표적인 비스테로이드성 항염증제 (non-steroidal anti-inflammatory agents, NSID)는, 아세메타신, 아세트아미노펜, 아세틸 살리실산, 아클로페낙, 알미노프로펜, 암페낙, 아미프릴로오스, 아목시프린, 아니롤락, 아파존, 아자프로파존, 베노틸레이트, 베녹사프로펜, 베즈피페릴론, 브로페라몰, 부클록산, 카르프로펜, 클리다나, 디클로페낙, 디플루니살, 디프탈론, 에놀리캄, 에토돌락, 에토리콕시브, 펜부펜, 펜클로페낙, 펜클로진산, 페노프로펜, 펜티아작, 페프라존, 플루페남산, 플루페니살, 플루프로펜, 플루르비프로펜, 푸로페낙, 이부페낙, 이부프로펜, 인도메타신, 인도프로펜, 이속세팍, 이속시캄, 케토프로펜, 케톨락, 로페미줄, 로르녹시캄, 메클로페나메이트, 메클로페남산, 메페남산, 멜록시캄, 메살라민, 미로프로펜, 모페부타존, 나부메톤, 나프록센, 니플롭산, 니메술리드, 니트로플루르비프로펜, 올살라진, 옥사프로진, 옥스피낙, 옥시펜부타존, 페닐부타존, 피록시캄, 피르프로펜, 프라노프로펜, 살살레이트, 수독시캄, 술과살라진, 술린닥, 수프로펜, 테녹시캄, 티오피낙, 티아프로펜산, 티옥사프로펜, 톨페남산, 톨메틴, 트리플루미데이트, 지도메타신, 조메피락, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정한 구체예에서, 상기 NSAID는 에토돌락, 플루르비프로펜, 이부프로펜, 인도메타신, 케토프로펜, 케톨락, 멜록시캄, 나프록센, 옥사프로진, 피록시캄, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 특정한 구체예에서, 상기 NSAID는 이부프로펜, 인도메타신, 나부메톤, 나프록센 (예를 들어, 나프록센 소듐), 및 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0089] 대표적인 근육 이완제는, 카리소프로돌, 클로르족사존, 시클로벤자프린, 디플루니살, 메타살론, 메토카르바몰, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0090] 대표적인 노르에피네프린 재흡수 억제제는, 아토목세틴, 부프로프리온 및 부프로프리온 대사산물 히드록시부프로프리온, 마프로틸린, 레복세틴 (예를 들면, (S,S)-레복세틴), 빌록사진, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한

정되지 않는다. 특정한 구체예에서, 상기 노르에피네프린 재흡수 억제제는 아토목세틴, 레복세틴, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0091] 대표적인 오피오이드 효능제 (오피오이드 진통제) 및 길항제는, 부프레노르핀, 부토르파놀, 코데인, 디히드로코데인, 펜타닐, 히드로코돈, 히드로모르폰, 레발로르판, 레보르파놀, 메페리딘, 메타돈, 모르핀, 날부핀, 날메펜, 날로르핀, 날록손, 날트렉손, 날로르핀, 옥시코돈, 옥시모르폰, 펜타조신, 프로폭시펜, 트라마돌, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정한 구체예에서, 상기 오피오이드 효능제는 코데인, 디히드로코데인, 히드로코돈, 히드로모르폰, 모르핀, 옥시코돈, 옥시모르폰, 트라마돌, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0092] 대표적인 선택적 세로토닌 재흡수 억제제 (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI)는 시탈로프람 및 시탈로프람 대사산물 데스메틸시탈로프람, 다폭세틴, 에스시탈로프람 (예를 들면, 에스시탈로프람 옥살레이트), 플루옥세틴 및 플루옥세틴 데스메틸 대사산물 노르플루옥세틴, 플루복사민 (예를 들면, 플루복사민 말레에이트), 파록세틴, 세르트랄린 및 세르트랄린 대사산물 데메틸세르트랄린, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정한 구체예에서, 상기 SSRI는 시탈로프람, 파록세틴, 세르트랄린, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0093] 대표적인 나트륨 채널 차단제(sodium channel blockers)는, 카르바마제핀, 포스페니토인, 라모트리그닌, 리도카인, 맥실레틴, 옥스카르바제핀, 페니토인, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0094] 대표적인 교감신경저해제는 아테놀롤, 클로니딘, 독사조신, 구아네티딘, 구안파신, 모다피닐, 펜톨아민, 프라조신, 레세르핀, 톨라졸린 (예를 들면, 톨라졸린 히드로클로라이드), 탐솔로신, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0095] 하기 제제들은 본 발명의 대표적인 약제학적 조성물을 예시한다:

[0096] *대표적인 경구 투여용 경질 젤라틴 캡슐*

[0097] 본 발명의 결정형 화합물 (50 g), 분무 건조된 락토오스 (440 g) 및 마그네슘 스테아레이트 (10 g)를 완전히 혼합한다. 그 후, 결과적으로 수득된 조성물을 경질 젤라틴 캡슐로 적재한다 (캡슐당 500 mg의 조성물).

[0098] 대안적으로, 본 발명의 결정형 화합물 (20 mg)을 전분 (89 mg), 미정질 셀룰로오스 및 마그네슘 스테아레이트 (2 mg)와 완전히 혼합한다. 그 후, 수득된 혼합물을 No. 45 메쉬 U.S. 체(No. 45 mesh U.S. sieve)를 통해 통과시키고 경질 젤라틴 캡슐로 적재한다 (캡슐당 200 mg의 조성물).

[0099]

[0100] *대표적인 경구 투여용 젤라틴 캡슐 제제*

[0101] 본 발명의 결정형 화합물 (100 mg)을 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트 (50 mg) 및 전분 분말 (250 mg)과 완전히 블렌딩한다. 그 후 혼합물을 젤라틴 캡슐로 적재한다 (캡슐당 400 mg의 조성물).

[0102] 대안적으로, 본 발명의 결정형 화합물 (40 mg)을 미정질 셀룰로오스 (Avicel PH 103; 259.2 mg) 및 마그네슘 스테아레이트 (0.8 mg)와 완전히 블렌딩한다. 그 후 혼합물을 젤라틴 캡슐 (크기 #1, 백색, 불투명)로 적재한다 (캡슐당 300 mg의 조성물).

[0103] *대표적인 경구 투여용 정제 제제*

[0104] 본 발명의 결정형 화합물 (10 mg), 전분 (45 mg) 및 미정질 셀룰로오스 (35 mg)를 No. 20 메쉬 U.S. 체를 통해 통과시키고, 완전히 블렌딩한다. 그에 의해 생성된 과립을 50 내지 60°C에서 건조시키고, 제16호 메쉬 미국 체를 통해 통과시킨다. 폴리비닐피롤리돈 용액 (평균수 중 10 % 용액으로서 4 mg)을 소듐 카르복시메틸 전분 (4.5 mg), 마그네슘 스테아레이트 (0.5 mg), 및 탈크 (1 mg)와 혼합하고, 그 후 이 혼합물을 No. 16 메쉬 U.S. 체를 통해 통과시킨다. 그 후, 소듐 카르복시메틸 전분, 마그네슘 스테아레이트 및 탈크를 상기 과립에 첨가한다. 혼합한 후에, 혼합물을 타정기에서 압축하여 100 mg 중량의 정제를 수득한다.

[0105] 대안적으로, 본 발명의 결정형 화합물 (250 mg)을 미정질 셀룰로오스 (400 mg), 건식(fumed) 실리콘 디옥사이드 (10 mg) 및 스테아르산 (5 mg)과 완전히 블렌딩한다. 그 후, 수득된 혼합물을 압축하여 정제를 형성한다 (정제

당 665 mg의 조성물).

[0106] 대안적으로, 본 발명의 결정형 화합물 (400 mg)을 옥수수 전분 (50 mg), 크로스카르멜로오스 소듐 (25 mg), 락토오스 (120 mg), 및 마그네슘 스테아레이트 (5 mg)와 완전히 혼합한다. 그 후, 수득된 혼합물을 압축하여 단일-할선(single-scored) 정제를 형성한다 (정제 당 600 mg의 조성물).

[0107] 대표적인 경구 투여용 현탁액 제제

[0108] 하기 성분들을 혼합하여 현탁액 10 mL 당 100 mg의 활성제를 포함하는 현탁액을 형성한다:

표 2

[0109]

성분	함량
본 발명의 결정형 화합물	1.0 g
푸마르산	0.5 g
염화나트륨	2.0 g
메틸 파라벤	0.15 g
프로필 파라벤	0.05 g
과립당(Granulated sugar)	25.5 g
소르비톨 (70% 용액)	12.85 g
Veegum® K (마그네슘 알루미늄 실리케이트)	1.0 g
향미제(Flavoring)	0.035 mL
착색제	0.5 mg
증류수	100 mL로 만드는 양

[0110] 대표적인 주사 투여용 주사용(injectable) 제제

[0111] 본 발명의 결정형 화합물 (0.2 g)을 0.4 M 소듐 아세테이트 완충 용액 (2.0 mL)과 블렌딩한다. 결과적으로 수득된 용액의 pH를, 필요에 따라, 0.5 N 염산 수용액 또는 0.5 N 수산화나트륨 수용액을 사용하여 pH 4로 조정하고, 그 후, 20 mL의 총 부피를 제공하기 위해 충분한 주사용수를 첨가한다. 그 후, 수득된 혼합물을 멸균 필터 (0.22 마이크론)를 통하여 여과시켜 주사에 의한 투여에 적절한 멸균 용액을 제공한다.

[0112] 대표적인 흡입 투여용 조성물

[0113] 본 발명의 결정형 화합물 (0.2 mg)을 미분화시키고, 락토오스 (25 mg)와 블렌딩한다. 이 블렌딩된 혼합물을 젤라틴 흡입 카트리지로 적재한다. 상기 카트리지의 내용물은 예를 들어, 건조 분말 흡입기를 사용하여 투여된다.

[0114] 대안적으로, 본 발명의 미분화된 화합물 (10 g)을, 탈염수(demineralized water) (200 mL)에 레시틴 (0.2 g)을 용해시켜 제조된 용액에 분산시킨다. 결과적으로 수득된 현탁액을 분무 건조시키고, 미분화하여 약 1.5 μ m 미만의 평균 직경을 갖는 입자를 포함하는 미분화된 조성물을 형성시킨다. 그 후, 상기 미분화된 조성물은 흡입기로 투여할 때, 투여량 당 약 10 μ g 내지 약 500 μ g의 본 발명의 화합물을 제공하기에 충분한 양으로, 가압된 1,1,1,2-테트라플루오로에탄을 포함하는 정량 흡입기 카트리지(metered-dose inhaler cartridge)에 적재된다.

[0115] 대안적으로, 본 발명의 결정형 화합물 (25 mg)을 시트레이트 완충된 (pH 5) 등장성 염수 (125 mL)에 용해시킨다. 본 발명의 결정형 화합물이 용해될 때까지 혼합물을 교반하고 초음파 처리한다. 수득된 용액의 pH를 확인하고, 필요한 경우, 1 N 수산화나트륨 수용액을 서서히 첨가하여 pH 5로 조정한다. 상기 용액을 투여량 당 약 10 μ g 내지 약 500 μ g의 본 발명의 결정형 화합물을 제공하는 분무 장치를 사용하여 투여한다.

도면의 간단한 설명

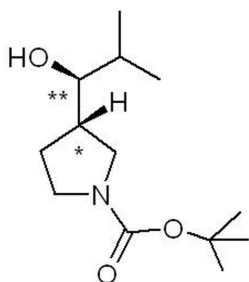
[0116] 본 발명의 다양한 양태가 첨부된 도면을 참조하여 설명된다.

도 1은 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의 결정형 염산염의 분말 x-선 회절 (PXRD) 패턴을 보여준다. 도 2는 시차주사 열량측정법(DSC) 온도 온도기록계를 보여준다. 도 3은 열중량측정 분석(thermal gravimetric analysis, TGA) 트레이스를 보여준다. 도 4는 동적 수분 흡착(dynamic moisture sorption, DMS)

프로파일을 보여준다. 도 5는 현미경 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0117] 하기의 제조예 및 실시예들은 본 발명의 특정한 구체예를 설명하기 위하여 제공된다. 그러나 이 특정한 구체예들은, 특별히 표시되지 않는 한 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0118] 하기 약어들은 달리 표시되지 않는 한 하기 의미를 가지며 본 명세서에서 사용되지만 정의되지 않은 임의의 다른 약어들은 그들의 표준적 의미를 갖는다:
- [0119] BOC t -부톡시카르보닐(t -butoxycarbonyl)
- [0120] BSA 소 혈청 알부민
- [0121] DMEM 둘베코 변형 이글 배지
- [0122] (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- [0123] DMF N,N -디메틸포름아미드
- [0124] DMSO 디메틸설폭시드
- [0125] EDTA 에틸렌디아민테트라아세트산
- [0126] EtOAc 에틸 아세테이트
- [0127] EtOH 에탄올
- [0128] FBS 소 태아 혈청
- [0129] HEPES 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산
- [0130] PBS 인산염 완충 염수
- [0131] THF 테트라히드로퓨란
- [0132] 본 명세서에서 사용되지만 정의되지 않은 다른 약어들은 그들의 표준적, 일반적으로 인정된 의미를 갖는다. 달리 언급되지 않는 한, 시약, 출발 물질 및 용매와 같은 모든 물질들은 (Sigma-Aldrich, Fluka Riedel-de Haen 등과 같은) 상업적 공급처로부터 구입하고 추가적인 정제 없이 사용했다.
- [0133] 하기에 기재된 화합물에서, 두개의 키랄 중심은 * 및 ** 기호로 표시된다. 달리 표시되지 않으면, 시약, 출발 물질, 및 용매와 같은 모든 물질은 상용 공급처(예를 들면, Sigma-Aldrich, Fluka Riedel-de Haen, 등)로부터 구매하고 추가적인 정제 없이 사용했다.
- [0134] 하기에 기재된 화합물에서, 두 개의 키랄 센터는 * 및 ** 부호로 표시한다. * 키랄 센터는 알려져 있으나; ** 키랄 센터는 명확하게 알려져 있지 않고, 부분입체이성질체 중간체(보호된 알코올)로부터의 역상 HPLC에 의한 제1 용리 피크에 기초한다는 것에 유의한다.
- [0135] 제조예 1
- [0136] (S)-3-((S)-1-히드록시-2-메틸프로필)피롤리딘-1-카르복실산 t -부틸 에스테르



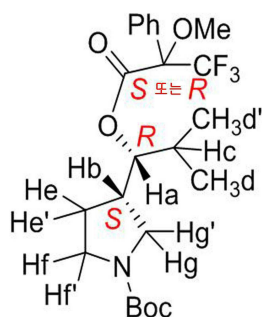
- [0137]
- [0138] (S)-3-포르밀피롤리딘-1-카르복실산 t -부틸 에스테르 (10.0 g, 50.2 mmol) 및 THF (100 mL, 1000 mmol)를 질소

하에서 조합하고, 결과적으로 수득된 용액을 -78℃까지 냉각시켰다. 그 후 THF (30.1 mL, 60.2 mmol) 중 2.0M 이소프로필마그네슘 클로라이드를 10분에 걸쳐서 점적하였다. 수득된 혼합물을 밤새 천천히 실온까지 가온시켰다. 그 후 포화 수성 NH₄Cl (100 mL)를 점적하여 반응을 중단(quench)시켰다. 진공 하에서 THF를 제거하고 결과적으로 수득된 혼합물을 EtOAc (2 x 100 mL)로 추출하고, 합쳐진 유기 층들을 포화된 수성 NaCl (1 x 100 mL)로 세척하고, 그 후, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 진공 하에 농축시켰다. 조 생성물을 정상 크로마토그래피 (300 g SiO₂, 12 g 조 생성물(crude), hexan 중 50-60% 디에틸 에테르)에 의하여 정제하여 투명한 오일로서 하기를 수득하였다:

[0139] (S)-3-((S)-1-히드록시-2-메틸프로필)피롤리딘-1-카르복실산 t-부틸 에스테르 (3.8 g; 제1 용리 피크). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.60-4.38 (brs, 1H), 3.40-3.22 (m, 2H), 3.28-3.02 (m, 2H), 2.94-2.82 (m, 1H), 2.28-2.12 (m, 1H), 1.92-1.82 (m, 1H), 1.70-1.56 (m, 1H), 1.52-1.44 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 0.87 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.83 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

[0140] (S)-3-((R)-1-히드록시-2-메틸프로필)피롤리딘-1-카르복실산 t-부틸 에스테르 (2.8 g; 제2 용리 피크). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 4.50-4.40, (brs, 1H) 3.42-3.28 (m, 2H), 3.18-3.06 (m, 2H), 3.04-2.92 (m, 1H), 2.26-2.12 (m, 1H), 1.78-1.68 (m, 1H), 1.62-1.46 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.88 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.7 Hz, 3H).

[0141] 표제 화합물의 입체화학의 배정은 두번째로 용리된 물질에 대한 모셔 에스테르(Mosher ester) 분석 (Dale and Mosher (1969) *J. Org. Chem.* 34(9):2543-2549)에 의하여 수행하였다. 이 분석을 사용하여, 제2 용리 피크 물질이 (S,R)임을 결정하였다:



[0142]

표 3

양성자	δ (S,R,S)	δ (S,R,R)	δ (S,R,S) - δ (S, R, R)
Ha	5.040	5.029	0.011
Hb	2.486	2.511	-0.025
Hc, He	비-균등 H'의 위치와 중첩됨	비-균등 H'의 위치와 중첩됨	ND
Hd, Hd'	0.912	0.876	0.036
He'	Boc와 중첩됨	Boc와 중첩됨	ND
Hf	3.209	3.212	-0.003
Hf'	2.988	3.050	-0.062
Hg	OMe 와 중첩됨	OMe 와 중첩됨	ND
Hg'	3.364	3.389	-0.025

[0143]

[0144] ND: 결정될 수 없음

[0145] 부분입체이성질체의 최초 두 개의 문자는 제2 용리 피크 물질에 해당하고 부분입체이성질체의 세번째 문자는 Mosher의 에스테르 키랄 중심을 의미한다는 것에 유념한다.

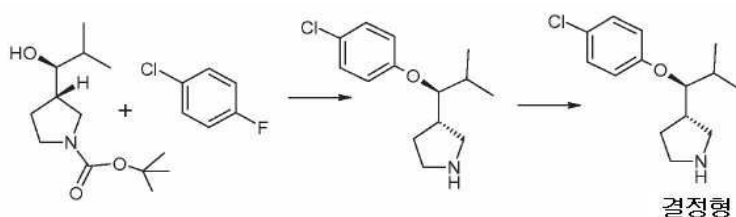
[0146] SRS 부분입체이성질체: ^1H , CDCl_3 , δ ppm 7.60-7.51 (m, 2H); 7.43-7.37 (m, 3H); 5.04 (dd, $J = 8.0, 4.0$, 1H); 3.52 (s, 3H); 3.51-3.45 (m, 1H); 3.36 (t, $J = 8.4$, 1H); 3.28-3.12 (m, 1H); 3.07-2.90 (m, 1H); 2.59-2.39 (m, 1H); 1.97-1.80 (m, 2H); 1.59-1.45 (m, 1H); 1.43 (s, 9H); 0.93 (d, $J = 6.8$, 3H); 0.90 (d, $J = 6.8$, 3H).

[0147] SRR 부분입체이성질체: ^1H , CDCl_3 , δ ppm 7.62-7.52 (m, 2H); 7.44-7.36 (m, 3H); 5.06-4.98 (m, 1H); 3.52 (s, 3H); 3.52-3.45 (m, 1H); 3.39 (t, $J = 8.8$, 1H); 3.30-3.14 (m, 1H); 3.10-2.96 (m, 1H); 2.60-2.40 (m, 1H); 1.96-1.80 (m, 2H); 1.58-1.45 (m, 1H); 1.43 (s, 9H); 0.96 (m, 6H).

[0148] 실시예 1

[0149] (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘의

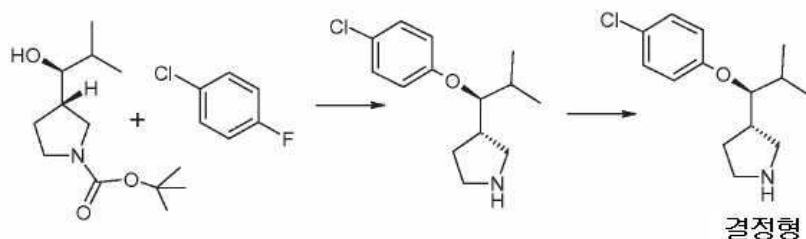
[0150] 결정형 염산염



[0151]

[0152] (S)-3-((S)-1-히드록시-2-메틸프로필)피롤리딘-1-카르복실산 *t*-부틸 에스테르 (2.6 g, 10.7 mmol, 1.0 당량) 및 1-클로로-4-플루오로벤젠 (3.4 mL, 32.0 mmol, 3.0 당량)을 DMF (12 mL, 150 mmol)에 용해시켰다. NaH (385 mg, 16.0 mmol, 1.5 당량)를 세 부분으로 천천히 첨가하고, 상기 혼합물을 질소 하에서 실온에서 10분 동안 교반하였다. 상기 혼합물을 90℃에서 3시간 동안 가열한 후, 실온까지 냉각시켰다. 혼합물을 헥산 (50 mL)로 추출하고 물 (50 mL)로 세척하였다. 수성층을 헥산 (50 mL)로 재추출하였다. 유기층들을 조합하고, Na_2SO_4 하에서 건조시키고, 여과시키고, 농축시켰다. 그 후 조 BOC-보호된 중간체를 컬럼 크로마토그래피(헥산 및 에테르, 0-100%에 의해 용리시킴, 플래쉬 크로마토그래피)에 의하여 정제하였다. EtOH (150 mL, 180 mmol) 중 1.2 M HCl 을 사용하여 탈보호를 수행하였다. 수득된 혼합물을 실온에서 48 시간 동안 교반하였다. 수득된 용액을 건조될 때까지 농축시켜 모노-HCl 염으로서 조 생성물을 수득하였다. 조 모노-HCl 염을 이소프로판올 (5 mL)에 용해시켜 오일을 제조하고, 55℃까지 가열하였다. 디이소프로필 에테르(25 mL)를 지속적인 교반 하에 서서히 첨가하여 균질한 용액을 형성하고, 실온에서 냉각시켰다. 반응 용기에 흔적을 내고(scarred) 모결정(seed crystal)(유사한 조건을 사용하여 100 mg의 조 HCl 염을 가열하고 천천히 냉각시켜 수득됨)을 냉각 과정 동안에 첨가하였다. 형성된 고체와 용액을 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 상기 고체를 여과하고 디이소프로필 에테르 (10 mL)로 세척하여 백색 고체 (1.4 g)를 수득하였다. 여과물을 농축하고 결정화를 2회 반복하여 총 2.4 g (3회의 석출로부터)을 수득하였다. 석출물을 물에 용해시키고 동결 건조하여 황백색(off-white) 결정형 고체로서 표제 화합물 (2.4 g, 99% 순도)을 얻었다.

[0153] 표제 결정형 염산염의 대안적 제조



[0154]

[0155] (S)-3-((R)-1-히드록시-2-메틸프로필)피롤리딘-1-카르복실산 *t*-부틸 에스테르 (35.0 g, 144 mmol, 1.0 eq.), 트리페닐포스핀 (41.5 g, 158 mmol, 1.1 eq.), *p*-클로로페놀 (37.0 g, 288 mmol, 2.0 eq.) 및 2-메틸-테트라히드로퓨란 (300 mL)을 합치고 용기를 질소로 퍼징(purge)시켰다. 디이소프로필 아조디카르복실레이트 (31.2 mL,

1.1 당량)를 실온에서 2시간에 걸쳐 서서히 첨가했다. 수득된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시켰다. 헥산 (600 mL)을 첨가하고 결과적으로 수득된 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반시켰다. 상을 분리시키고 유기층을 물 중 1.0 M NaOH (600 mL)로 세척하고, 희석시킨 포화 NaCl 수용액 (20 mL)으로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시켜, 조(crude) BOC-보호 중간체를 수득했다. 추가적인 헥산 (50 mL)을 첨가하고, 결과적으로 수득된 혼합물을 30분 동안 교반했다. 고체를 여과에 의해 분리하여 진한 오일로서 조 BOC-보호 중간체를 수득하고, 이를 실리카 겔 크로마토그래피 (헥산 중 0-10-20% EtOAc)에 의해 정제하여 (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘-1-카르복실산 *t*-부틸 에스테르 (5.5 g)를 수득했다.

[0156] (S)-3-[(S)-1-(4-클로로페녹시)-2-메틸프로필]피롤리딘-1-카르복실산 *t*-부틸 에스테르 (24.7 g, 69.8 mmol, 1.0 당량)를 시클로펜틸 메틸 에테르(200 mL, 8.0 당량) 중 3 M HCl과 합쳤다. 수득된 혼합물을 실온에서 밤새 교반시켰다. 회전 증발에 의해 대부분의 용매를 제거하여 진한 오일을 수득했다. 디이소프로필 에테르 (300 mL)를 첨가하고, 부피를 회전 증발에 의해 서서히 ~ 200 mL까지 감소시켜, 슬러리를 수득했다. 수득된 슬러리를 실온에서 2시간 동안 교반하고, 여과시키고, 필터 케이크를 디이소프로필 에테르 (50 mL)로 세척하고, 건조시켜 표제 화합물 (18.1 g, 98.5% 순도)을 수득했다. 생성물을 5 부피부(volume)의 EtOH 중에 재슬러리화시켜(실온, 50℃까지 가열, 그 후, 실온까지 냉각) 결정형 고체로서 표제 화합물 (18.0 g, >99% 순도)을 수득했다.

[0157] 실시예 2

[0158] 분말 X-선 회절

[0159] Cu K α (30.0 kV, 15.0 mA) 방사선을 이용한 Rigaku Miniflex PXRD 회절계로 분말 X-선 회절 패턴 (PXRD)을 수득했다. 분석은 2 내 40° 범위의 2-세타 각의 범위에 걸쳐 0.03° 의 단계(step) 크기로 분당 2° (2 θ)의 연속-스캔 모드로 운영된 측각계(goniometer)를 이용하여 수행했다. 샘플을 분말 물질의 박층으로 석영 시료 고정 장치 (quartz specimen holder) 상에 제조했다. 장치를 실리콘 메탈 표준으로 \pm .20 이-세타 각 내에서 보정했다. 본 발명의 결정형 염산염에 대한 대표적인 PXRD 패턴이 도 1에 표시된다. 상대적 강도에 대한 입자 크기 간섭을 줄이기 위해, 테스트 전에, 샘플을 수동으로 분쇄시켰다.

[0160] 도 1에 도시된 다수의 강한 분말 회절 피크 및 상대적으로 편평한 기준선(baseline)은 상기 결정형 염산염이 우수한 결정도(crystallinity)를 갖는다는 것을 강력하게 나타낸다.

[0161] 실시예 3

[0162] 열 분석(Thermal Analysis)

[0163] Thermal Analyst 컨트롤러가 장착된 TA Instruments Model Q-100 모듈을 이용하여 시차 주사 열량측정법 (Differential scanning calorimetry, DSC)을 수행했다. 데이터를 수집하고 TA Instruments Thermal Solutions 소프트웨어를 이용하여 분석했다. 본 발명의 결정형 염산염의 1.22 mg 샘플을 커버가 덮인(covered) 알루미늄 팬 내로 정확하게 칭량했다. 22℃에서 5분의 등온 평형화 기간 후에, 샘플을 22℃부터 250℃까지 10℃/분의 선형적 가열 기울기(linear heating ramp)를 이용하여 가열시켰다. 대표적인 DSC 온도기록계가 도 2에 도시된다.

[0164] DSC 온도기록계는 본 발명의 결정형 염산염이 약 128℃에서 용융점을 갖고, 약 200℃ 미만에서 유의한 열 분해를 갖지 않는 탁월한 열 안정성을 갖는다는 것을 보여준다.

[0165] 대표적인 TGA 트레이스가 도 3에 도시되고, 상기 결정형 염산염의 샘플이 실온에서 200℃까지 유의한 양의 중량을 손실하지 않았다는 것을 나타내고, 이는 잔류 수분 또는 용매의 손실과 일치한다.

[0166] 실시예 4

[0167] 동적 수분 흡착 평가(Dynamic Moisture Sorption Assessment)

[0168] 본 발명의 결정형 염산염에 대해 VTI 대기 미량 천칭(atmospheric microbalance), SGA-100 시스템 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016)을 사용하여 동적 수분 흡착(DMS) 평가 (수분 흡착-탈착 프로파일로도 알려짐)를 수행했다. 약 2.73 mg의 샘플 크기를 사용하고, 습도는 분석의 개시 시에 주위 값(ambient value)으로 설정했다. DMS 분석은 2% 상대 습도부터 90% 상대 습도까지의 전체 습도 범위에 걸쳐, 5% 상대 습도/단계(step)의 스캔 속도로 구성되었다. DMS 진행은 25℃에서 등온으로 수행했다. 대표적인 DMS 프로파일이 도 4에 도시된다.

[0169] DMS 프로파일은 상기 결정형 염산염이 가역적 흡착/탈착 프로파일을 가지며, 미미한 흡습성을 갖는다는 것을 보여주었다. 상기 결정형 염산염은 2% 상대 습도 내지 90% 상대 습도의 광범위한 습도 범위에 노출되었을 때, 소량의 중량 증가를 갖고, 최대 85% 상대 습도에 노출된 경우, 약 1.0% 미만의 중량 증가를 가지며, 이는 상기 결정형 염산염이 85% 미만의 상대 습도에서 흡습성의 최소 위험만을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0170] 실시예 5

[0171] 용해도 및 안정성

[0172] 본 발명의 결정형 염산염은 광범위한 pH 범위에서 매우 우수한 수성 용해도를 갖는다:

표 4

용해도	농도 (mg/mL)
HCl pH 2.0	>10
50 mM 인산염 완충 pH 7.4	>10
비-완충수(un-buffered water)	>10

[0174] 본 발명의 결정형 염산염 (10 µg/mL 농도)은 또한 40°C에서 3일 동안 보관 후 순도 손실이 없는 우수한 안정성을 갖는다:

표 5

용액	HPLC 피크 면적 변화 (%)
50 mM 시트르산 pH 2.2	100.5
50 mM 인산염-완충 pH 7.4	100.0

[0176] 본 발명의 결정형 염산염은 또한 1 mg/mL 및 10 mg/mL의 농도에서 30일 동안 분해 없이, 실온에서 우수한 안정성을 갖는다.

[0177] 분석 1

[0178] hSERT, hNET, 및 hDAT 결합 분석

[0179] 수송체(transporter)에서 테스트 화합물들의 pKi를 결정하기 위하여, 막 방사성리간드 결합 분석(membrane radioligand binding assay)을 이용하여 표지된 리간드 (³H-시탈로프람 또는 ³H-니속세틴 또는 ³H-WIN35428)의 각각의 사람 재조합 수송체(hSERT 또는 hNET 또는 hDAT)를 발현하는 세포로부터 준비된 막으로의 결합 억제를 측정하였다.

[0180] hSERT, hNET, 또는 hDAT를 발현하는 세포로부터 막의 준비

[0181] hSERT 또는 hNET로 안정적으로 형질감염된 재조합 인간 배아 신장 (HEK-293) 유래 세포주를 각각, 37 °C에서, 5% CO₂ 가습 인큐베이터에서, 10% 투석된(dialyzed) FBS (hSERT의 경우) 또는 FBS (hNET의 경우), 100 µg/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민 및 250 µg/ml의 아미노글리코시드 항생제 G418로 보충된, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 성장시켰다. 배양물이 80 % 컨플루언스(confluence)에 도달했을 때, 세포들을 (Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 불포함) PBS에서 완전히 세척하고 PBS 중 5 mM EDTA를 사용하여 떼어냈다. 세포들을 원심분리에 의해 펠릿으로 수득하고, 용해 완충액 (1 mM EDTA를 포함하는, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 중에 재현탁시키고, 균질화하고, 원심분리에 의해 펠릿으로 수득하고, 그 후, 4°C에서 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 및 10% 수크로오스 중에 재현탁시켰다. 막 현탁액의 단백질 농도를 Bio-Rad Bradford 단백질 분석 키트를 사용하여 결정하였다. 막을 급속 동결시키고 -80°C에서 보관하였다. hDAT을 발현하는 중국 햄스터 난소 막 (CHO-DAT)을 PerkinElmer로부터 구입하여 -80°C에서 보관하였다.

- [0182] 결합 분석
- [0183] 96-웰 분석 플레이트에서 전체 부피 200 μl 의 분석 완충액 (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4) 중에서, 각각 SERT, NET 및 DAT에 대한 막 단백질 0.5, 1, 및 3 μg 을 사용하여 결합 분석을 실시하였다. ^3H -시탈로프람, ^3H -니속세틴 또는 ^3H -WIN35428 각각에 대한 방사성 리간드 K_d 값을 결정하기 위한 포화 결합 연구를, 0.005-10 nM (^3H -시탈로프람); 0.01-20 nM (^3H -니속세틴) 및 0.2-50 nM (^3H -WIN35428) 범위의 12개의 상이한 농도의 방사성 리간드를 사용하여 수행하였다. 테스트 화합물의 pK_i 값을 결정하기 위한 억제 분석은 1.0 nM ^3H -시탈로프람, 1.0 nM ^3H -니속세틴 또는 3.0 nM ^3H -WIN35428을 사용하여, 10 pM 내지 100 μM 범위의 11개의 상이한 농도의 테스트 화합물로 수행하였다.
- [0184] 테스트 화합물의 스톱 용액 (DMSO 중 10 mM)을 준비하고, 희석 완충액 (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4, 0.1% BSA, 400 μM 아스코르브산)을 사용하여 연속적으로 희석시켰다. hSERT, hNET 또는 hDAT 분석 각각을 위해, (희석 완충액 중 각각) 1 μM 돌록세틴, 1 μM 데시프라민 또는 10 μM GBR12909의 존재 하에서 비특이적 방사성 리간드 결합을 결정하였다.
- [0185] 22 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간(또는 평형에 도달하기에 충분한 시간) 인큐베이션한 후에, 0.3% 폴리에틸렌이민으로 전처리된, 96-웰 UniFilter GF/B 플레이트 상에서 급속 여과에 의해 막을 수득하고, 300 μl 세척 완충액 (4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.5)으로 6회 세척하였다. 플레이트를 실온에서 밤새 건조시키고, 약 45 μl 의 MicroScintTM-20 (Perkin Elmer)를 첨가하고 결합된 방사능을 액체 신타레이션 분광분석(liquid scintillation spectroscopy)으로 정량하였다. GraphPad Prism Software 패키지 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 사용하여 억제 곡선 및 포화 등온선(saturation isotherm)을 분석하였다. Prism GraphPad의 Sigmoidal Dose Response (가변적 기울기) 알고리즘을 사용하여, 농도 반응 곡선으로부터 IC_{50} 값을 도출하였다. 방사성 리간드에 대한 K_d 및 B_{max} 값을 Prism GraphPad의 Saturation Binding Global Fit 알고리즘을 사용하여 포화 등온선으로부터 도출하였다. 테스트 화합물들에 대한 pK_i (K_i 의 음의 상용로그값) 값을, 방사성리간드의 최적합(best-fit) IC_{50} 값, 및 K_d 값으로부터, 쉹-프루소프 식 (Cheng & Prusoff (1973) Biochem. Pharmacol. 22(23):3099-3108): $K_i = \text{IC}_{50}/(1+[L]/K_d)$, 식 중에서 $[L]$ = 방사성 리간드 농도)를 이용하여 계산하였다.
- [0186] 실시예 1의 화합물 (TFA 염)을 이 분석에서 테스트하고 SERT $pK_i \geq 8.0$ 및 NET $pK_i \geq 8.0$ 을 보이는 것으로 확인했다.
- [0187] 분석 2
- [0188] hSERT, hNET, 및 hDAT 신경전달물질 흡수 분석
- [0189] 수송체에서 테스트 화합물들의 $p\text{IC}_{50}$ 값을 결정하기 위하여, 신경전달물질 흡수 분석을 이용하여, 각각의 수송체 (hSERT, hNET 또는 hDAT)를 발현하는 세포의 ^3H -세로토닌 (^3H -5-HT), ^3H -노르에피네프린 (^3H -NE), 및 ^3H -도파민 (^3H -DA) 흡수의 억제를 측정했다.
- [0190] ^3H -5-HT, ^3H -NE, 및 ^3H -DA 흡수 분석
- [0191] hSERT, hNET, 또는 hDAT로, 각각, 안정적으로 형질감염된 HEK-293 유래 세포주를 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 가습 인큐베이터에서, 10% 투석 FBS (hSERT의 경우) 또는 FBS (hNET 및 hDAT의 경우), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 페닐실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민 및 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아미노글리코사이드 항생제 G418 (hSERT 및 hNET의 경우) 또는 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (hDAT의 경우)이 보충된, DMEM 배지에서 성장시켰다. 배양이 80% 컨플루언스에 도달했을 때, 세포들을 (Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 불포함) PBS로 완전히 세척하고, PBS 중 5 mM EDTA로 떼어냈다. 5분 동안 1100 rpm으로 원심분리하여 세포를 수집하고, PBS 중 재현탁에 의해 1회 세척하고, 원심분리하였다. 상층액을 버리고, 세포 펠릿을

HEPES (10 mM), CaCl_2 (2.2 mM), 아스코르브산 (200 μM) 및 파르길린 (200 μM)을 포함하고, pH 7.4인 실온의 Krebs-Ringer 중탄산염 완충액에 완만한 분쇄(gentle titration)에 의해 재현탁시켰다. 세포 현탁액 중 세포의 최종 농도는 SERT, NET, 및 DAT 세포주 각각에 대해, 7.5×10^4 세포/mL, 1.25×10^5 세포/mL, 및 5.0×10^4 세포/mL였다.

[0192] 신경전달물질 흡수 분석은 SERT, NET 및 DAT 각각에 대해, 1.5×10^4 및 2.5×10^4 개의 세포로, 총 부피 400 μL 의 분석 완충액 (HEPES (10 mM), CaCl_2 (2.2 mM), 아스코르브산 (200 μM) 및 파르길린 (200 μM)을 포함하고 pH 7.4인 Krebs-Ringer 중탄산염 완충액) 중에서, 96-웰 분석 플레이트에서 실시하였다. 테스트 화합물의 pIC_{50} 값을 결정하기 위한 억제 분석은 10 pM 내지 100 μM 범위의, 11개의 상이한 농도로 수행하였다. 테스트 화합물의 스톱 용액 (DMSO 중 10 mM)을 제조하고, 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.4, 0.1% BSA, 400 μM 아스코르브산을 사용하여 연속 희석액(serial dilution)을 수행하였다. 방사성 표지된 신경전달물질, ^3H -5-HT (최종 농도 20 nM), ^3H -NE (최종 농도 50 nM), 또는 ^3H -DA (최종 농도 100 nM)를 첨가하기 전에, 테스트 화합물들을 각각의 세포와 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. hSERT, hNET 또는 hDAT 분석 각각에 대하여, (희석 완충액 중 각각) 2.5 μM 돌록세틴, 2.5 μM 데시프라민 또는 10 μM GBR-12909의 존재 하에 비특이적 신경전달물질 흡수를 결정하였다.

[0193] 37°C에서, 방사성 리간드와 10분간 인큐베이션한 후에, 1 % BSA로 전처리된 96-웰 UniFilter GF/B 플레이트 상에서 급속 여과에 의해 세포를 수집하고, 650 μL 세척 완충액 (얼음냉각 PBS)으로 6회 세척하였다. 37°C에서 플레이트를 밤새 건조시키고, ~45 μL 의 MicroScintTM-20 (Perkin Elmer)를 첨가하고, 결합된 방사능을 액체 신틸레이션 분광분석으로 정량하였다. GraphPad Prism Software 패키지 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 억제 곡선을 분석하였다. Prism GraphPad의 Sigmoidal Dose Response (가변적 기울기) 알고리즘을 사용하여 농도 반응 곡선으로부터 IC_{50} 값을 도출하였다.

[0194] 실시예 1의 화합물 (TFA 염)을 이 분석에서 테스트하고 8.0 이상의 세로토닌 재흡수 억제 pIC_{50} 값 및 8.0 이상의 노르에피네프린 재흡수 억제 pIC_{50} 값을 보이는 것으로 확인했다.

[0195] 분석 3

[0196] 생체 외(Ex Vivo) SERT 및 NET 수송체 점유 연구

[0197] 테스트 화합물의 생체 내 투여 (급성 또는 만성) 후에, 선택된 뇌 영역에서, SERT 및 NET의 생체 내 점유(occupancy)를 결정하기 위하여, 생체 외 방사성 리간드 결합 및 신경전달물질 흡수 분석을 이용하였다. 적절한 용량 (0.0001 내지 100 mg/kg)으로 테스트 화합물을 (정맥내, 복강내, 경구, 피하 또는 기타 경로에 의해) 투여한 후에, 랫트 (그룹당 n=4 이상)를 특정 시점 (10분 내지 48시간)에 단두(decapitation)에 의해 안락사시키고, 뇌를 얼음 위에서 절제하였다. 관련된 뇌 영역을 절제하고, 사용할 때까지 -80 °C에서 동결시켜 보관하였다.

[0198] 생체 외 SERT 및 NET 방사성리간드 결합 분석

[0199] 생체 외 방사성리간드 결합 분석을 위하여, 비히클 및 테스트 화합물-처리 동물로부터 준비된, 랫트 뇌 조 균질물과 SERT (^3H -시탈로프람), 및 NET-(^3H -니속세틴) 선택적 방사성리간드의 결합(association)의 초기 속도를 모니터링한다 (Hess et al. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310(2):488-497 참조). 조 뇌조직 균질물을, 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5mM KCl, pH 7.4 완충액의 0.15 mL (mg 습중량 당) 중 동결 조직 단편을 균질화하여 제조하였다. 방사성 리간드 결합 분석을 (25 μg 단백질에 상응하는) 650 μg 습중량 조직을 사용하여, 총 부피 200 μL 의 분석 완충액 (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.025 % BSA, pH 7.4)으로 96-웰 분석 플레이트에서 실시한다. 0.3% 폴리에틸렌이민으로 전처리된 96-웰 UniFilter GF/B 플레이트 상에서 급속 여과시켜 분석을 종료하기 전, 균질물을 각각 ^3H -시탈로프람 (3 nM) 및 ^3H -니속세틴 (5 nM)과 최대 5분 동안 인큐베이션한다. 그후 필터를 300 μL 의 세척 완충액 (50 mM Tris-HCl, 0.9 % NaCl, 4°C에서 pH 7.4)으로 6회 세척한다. 비특이적 방사성리간드 결합을 ^3H -시탈로프람 또는 ^3H -니속세틴 각각에 대해, 1 μM 돌록세틴 또는 1

μM 테스피라민의 존재하에 측정하였다. 플레이트를 실온에서 밤새 건조시키고, $\sim 45 \mu\text{l}$ 의 MicroScintTM-20 (Perkin Elmer)을 첨가하고 결합된 방사능을 액체 신틸레이션 분광분석으로 정량한다. ^3H -시탈로프람 또는 ^3H -니속세틴의 초기 결합 속도를 GraphPad Prism Software 패키지 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 이용하여 선형 회귀에 의해 결정한다. 비히클-처리 동물로부터 유래된 뇌조직 균질물로의 방사성리간드 결합의 평균 속도를 결정한다. 그 후 테스트 화합물들의 % 점유(occupancy)를 하기 식을 이용하여 결정한다:

[0200] $\% \text{ 점유} = 100 \times (1 - (\text{테스트 화합물-처리 조직에 대한 초기 결합 속도} / \text{비히클-처리 조직에 대한 평균 결합 속도}))$

[0201] % 점유에 대한 테스트 화합물 투여량의 \log_{10} 을 플롯팅하여 ED_{50} 값을 결정한다. GraphPad Prism의 Sigmoidal Dose Response (가변적 기울기) 알고리즘을 이용하여 농도 반응 곡선으로부터 ED_{50} 값을 도출한다.

[0202] 생체 외 SERT 및 NET 흡수 분석

[0203] 생체 내 SERT 및 NET 수송체 점유를 측정하기 위하여 비히클 및 테스트 화합물-처리된 동물로부터 제조된, 랫트 뇌 조 균질물로의 ^3H -5-HT 또는 ^3H -NE의 흡수를 측정하는, 생체 외 신경전달물질 흡수 분석을 이용한다. Wong et al. (1993) *Neuropsychopharmacology* 8(1):23-33을 참조한다. 22 °C에서, 0.32 M 수크로오스, 200 μM 아스코르브산 및 200 μM 파르길린을 포함하는, pH 7.4인 10 mM HEPES 완충액의 0.5 mL (mg 젖은 중량 당)에 동결된 조직 단편들을 균질화시켜 조 뇌조직 균질물을 제조한다. 50 μg 단백질과 350 μl 분석 완충액 (10 mM HEPES, 2.2 mM CaCl_2 , 200 μM 아스코르브산 및 200 μM 파르길린을 포함하는 Krebs-Ringer 중탄산염 완충액, pH 7.4)의 총 부피로 96-웰 Axygen 플레이트에서 신경전달물질 흡수 분석을 실시한다. 균질물을 ^3H -5-HT (20 nM) 및 ^3H -NE (50 nM) 각각과 37 °C에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 1% BSA로 전처리된 96-웰 UniFilter GF/B 플레이트 상에서 급속 여과에 의해 분석을 종료한다. 플레이트를 650 μl 세척 완충액 (얼음냉각 PBS)으로 6회 세척하고 37 °C에서 밤새 건조시킨 후, $\sim 45 \mu\text{l}$ 의 MicroScintTM-20 (Perkin Elmer)을 첨가한다. 액체 신틸레이션 분광분석에 의해 결합(incorporate)된 방사능을 정량한다. 조직 균질물을 4 °C에서 5분 동안 ^3H -5-HT (20 nM) 또는 ^3H -NE (50 nM)으로 인큐베이션시키는 병행 분석으로 비특이적 신경전달물질 흡수를 결정한다.

[0204] 분석 4

[0205] 기타 분석

[0206] 테스트 화합물들의 약리학적 특성을 평가하기 위하여 사용된 기타 분석들은 hSERT 또는 hNET를 발현하는 세포로부터 제조된 막을 이용한 저온 리간드 결합 동역학(cold ligand binding kinetics) 분석(Motulsky and Mahan (1984) *Molecular Pharmacol.* 25(1): 1-9); 방사성표지된, 예를 들어, 삼중수소화된 테스트 화합물을 이용한 통상적인 막 방사성 리간드 결합 분석; 예를 들어, 설치류 또는 인간 뇌로부터 유래한 원(native) 조직을 사용한 방사성 리간드 결합 분석; 사람 또는 설치류 혈소판을 이용한 신경전달물질 흡수 분석; 설치류 뇌로부터 유래한 조, 또는 순수한 시냅소솜 제조물을 이용한, 신경전달물질 흡수 분석을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0207] 분석 5

[0208] 포르말린 발 시험

[0209] 화합물을 포르말린 (5 %)의 50 μl 주사에 의해 유발된 행동 반응을 저해하는 능력에 대하여 평가한다. 수컷 Sprague-Dawley 랫트 (200-250 g)의 좌측 뒷발에 금속 밴드를 고정시키고 각 랫트를 플라스틱 실린더 (직경 15 cm) 내에서 60분 동안 상기 밴드에 적응시킨다(condition). 화합물을 약제학적으로 허용가능한 비히클 중에 준비하고 포르말린 집중(challenge) 전에 미리 지정된 시간에 전신으로(복강 내(i.p.), 경구(p.o.)) 투여한다. 자동화된 통증수용 분석기 (UCSD Anesthesiology Research, San Diego, CA)를 사용하여, 60분 동안 지속적으로 주사된(밴드가 고정된) 뒷발의 움츠림으로 구성된 자발적인 통증수용 행동의 횟수를 측정한다. 비히클로 처리된 랫트 및 화합물로 처리된 랫트의 움츠림 횟수를 비교하여 시험 대상의 항통증수용 특성을 결정한다 (Yaksh et al., "An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay" (2001) *J.*

Appl. Physiol. 90(6):2386-2402).

[0210] 분석 6

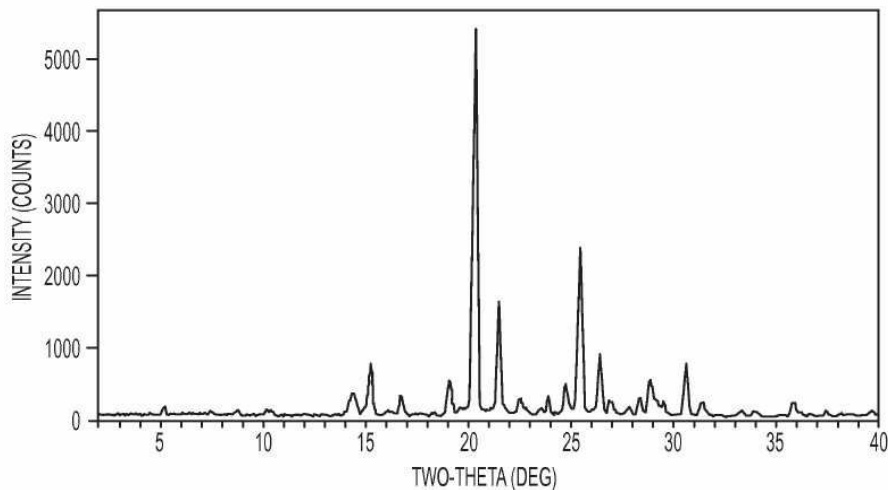
[0211] 척수 신경 결찰 모델

[0212] 신경 손상에 의해 유도된 촉각 이질통증(tactile allodynia) (무해한 기계적 자극에 대한 증가된 민감성)을 반전시키는 능력에 대하여 화합물을 평가한다. Kim and Chung "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat" (1992) *Pain* 50(3):355-363에 개시된 바에 따라, 수컷 Sprague-Dawley 랫트를 수술에 의해 준비한다. 기계적 민감성을 신경 손상의 전후, 무해한 기계적 자극에 대한 50% 회피 반응(withdrawal response)으로 결정한다 (Chaplan et al., "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw" (1994) *J. Neurosci. Methods* 53(1):55-63). 수술 후 1 내지 4주에, 약제학적으로 허용가능한 비히클 중에 화합물들을 준비하고, 전신 투여(i.p., p.o.)한다. 처리 전후의 신경 손상-유도 기계적 감수성의 정도가 화합물의 항통증수용성(antinociceptive)의 지표로서 기능한다.

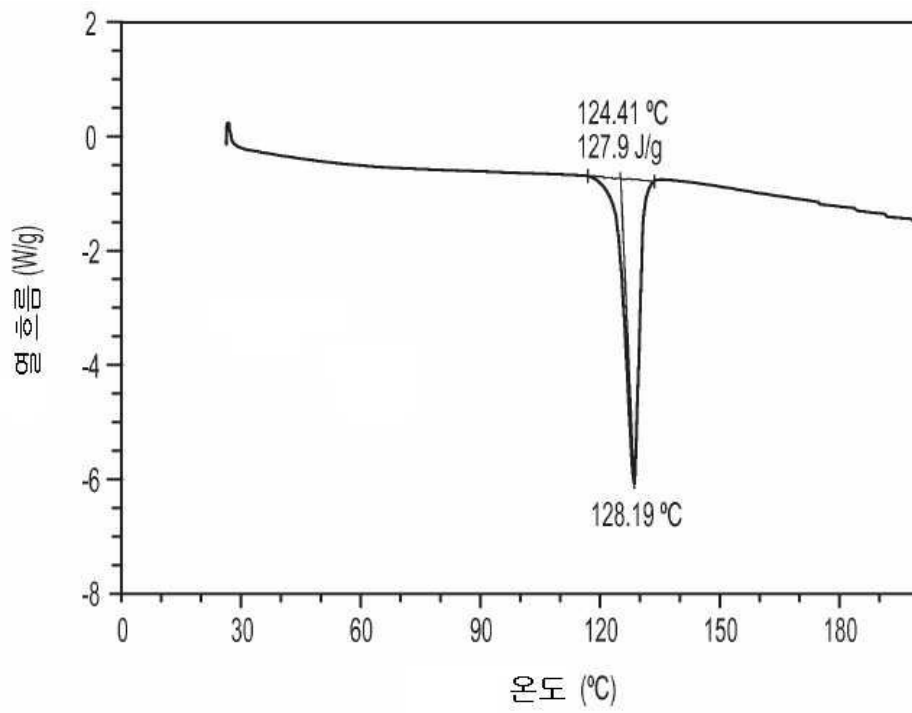
[0213] 본 발명은 그의 특정한 양태 또는 구체예를 참조하여 기술되었으나, 당업자는 본 발명의 진정한 사상 및 범위를 벗어남 없이, 다양한 변형이 이루어지거나 또는 균등물로 치환될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 적용가능한 특허법 및 규정에 의해 허용되는 정도까지, 본 명세서에서 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 문헌이 본 명세서에 참조에 의해 개별적으로 포함되는 것과 동일한 범위로, 전체로 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

도면

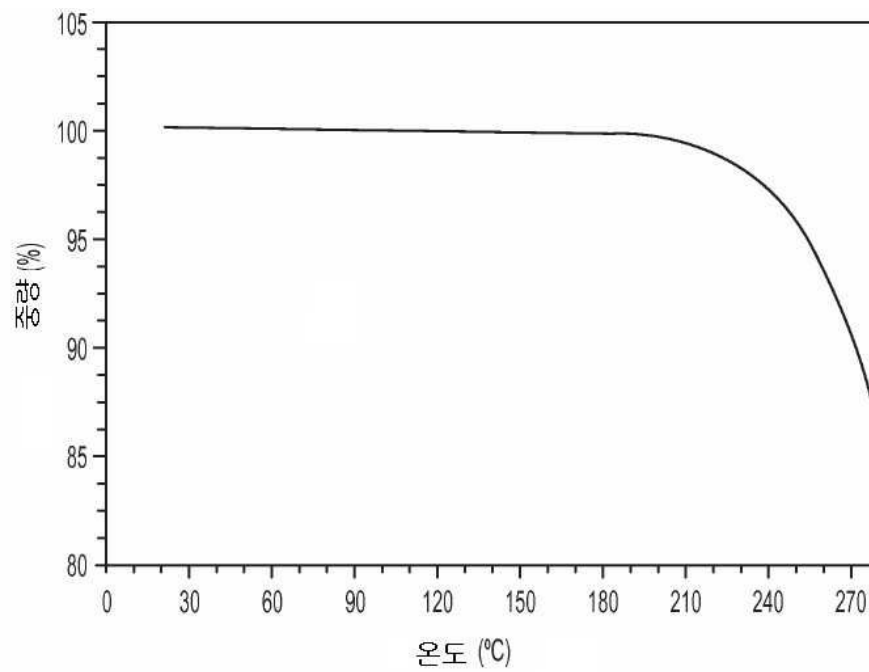
도면1



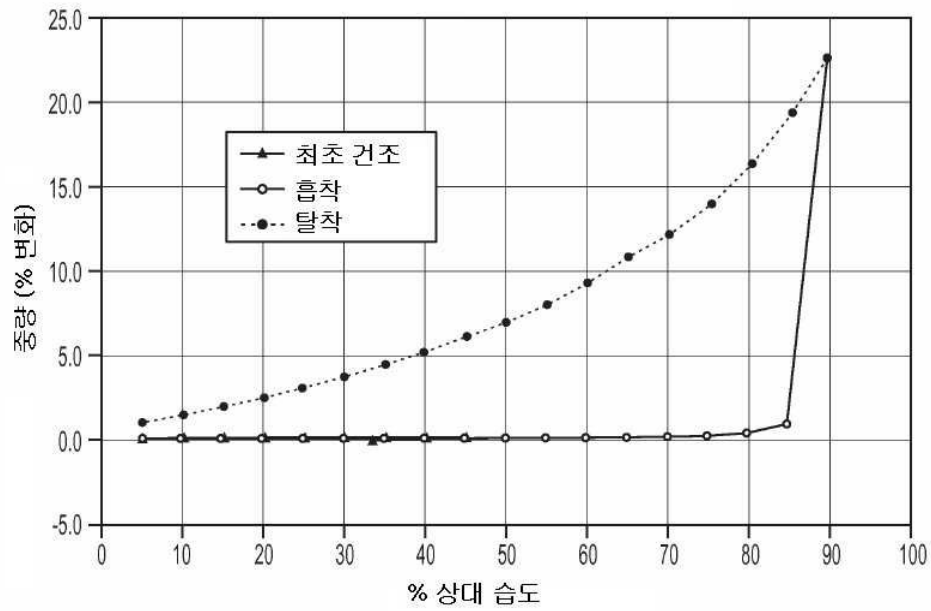
도면2



도면3



도면4



도면5

