



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월13일

(11) 등록번호 10-1849059

(24) 등록일자 2018년04월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 405/12 (2006.01) **A61K 31/352** (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 405/12 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7021179(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2009년12월11일
 심사청구일자 2017년08월21일
- (85) 번역문제출일자 2017년07월27일
- (65) 공개번호 10-2017-0091177
- (43) 공개일자 2017년08월08일
- (62) 원출원 특허 10-2011-7016045
 원출원일자(국제) 2009년12월11일
 심사청구일자 2014년12월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2009/067664
- (87) 국제공개번호 WO 2010/068861
 국제공개일자 2010년06월17일
- (30) 우선권주장
 61/121,787 2008년12월11일 미국(US)
 61/121,778 2008년12월11일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP소화09183774 A
 JP2008530160 A
 WO2007022138 A1

- (73) 특허권자
 악센투아 파마슈투칼스 아베
 스웨덴 후딩게 에스-141 52 알프레드 노벨스 알레 10
- (72) 발명자
 베르켄스탐, 안데르스
 스웨덴 스톡홀름 에스-11441 발할라바겐 134
 렌마르크, 스테판
 스웨덴 툴링 에스-14638 랄람스바겐 18
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 박수진

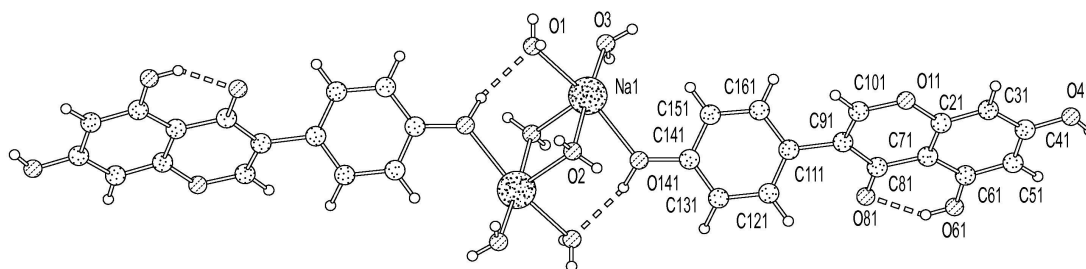
(54) 발명의 명칭 제니스테인의 결정성 형태

(57) 요약

본 개시는 제니스테인의 신규한 결정성 형태에 관한 것이다. 본 개시된 결정성 형태는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물; 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물; 결정성 제니스테인 칼슘 염; 결정성 제니스테인 마그네슘 염; 결정성 제니스테인 L-리신 염; 결정성 제니스테인 N-메틸글루카민 염; 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민

(뒷면에 계속)

대표도



염; 결정성 제니스테인 디에틸아민 염; 및 결정성 제니스테인 일수화물을 포함한다. 본 개시는 또한 이들 결정성 형태로 대표되는 신규한 제니스테인 염에 관한 것이다. 이들 제니스테인 및/또는 제니스테인 염의 결정성 형태 중 하나 이상 및 제약상 허용되는 담체를 함유하는 치료 조성물이 기술된다. 본 개시는 또한, 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 본 개시의 화합물인 제니스테인, 또는 제니스테인 염의 결정성 형태를 함유하는 치료 조성물의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07D 405/14 (2013.01)

(72) 발명자

위트, 미카엘-로빈

스웨덴 소데르탈레 에스-15137 토른로사바겐 35

로리머, 케이트

미국 47906 인디애나 웨스트 라파예트 웨이크 로빈

드라이브 2109

와트, 스티븐

영국 이에이치14 4에이퍼 리카턴 헤리엇 와트 유니
버시티 리서치 애비뉴 사우스

명세서

청구범위

청구항 1

XRPD 패턴이 6.0, 7.1, 15.3, 및 $25.0^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서 피크를 가지며, 28.3, 28.6, 및 $29.1^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 의 3가지 피크 중 2가지 이상을 갖는 것을 특징으로 하는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물.

청구항 2

XRPD 패턴이 6.0, 7.1, 15.3, 25.0, 및 $28.3^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서 피크를 갖는 것을 특징으로 하는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물.

청구항 3

치료 유효량의 제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 제니스테인 나트륨 염 이수화물 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 암의 치료 또는 예방을 위한 제약 조성물.

청구항 4

치료 유효량의 제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 제니스테인 나트륨 염 이수화물 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 염증성 질환의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 5

치료 유효량의 제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 제니스테인 나트륨 염 이수화물 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 트랜스티레틴 아밀로이드증의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 6

치료 유효량의 제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 제니스테인 나트륨 염 이수화물 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 낭포성 섬유증의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 7

치료 유효량의 제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 제니스테인 나트륨 염 이수화물 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 감염의 치료를 위한 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

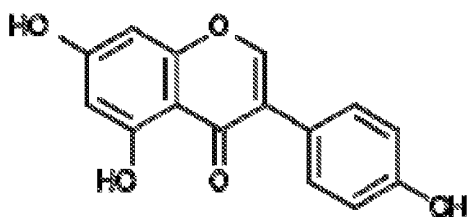
[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2008년 12월 11일 제출된 미국 가출원 61/121,778 및 2008년 12월 11일 제출된 미국 가출원 61/121,787에 대한 우선권을 주장하며, 이들 두 출원은 모두 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 암은 세포 증식에 대한 정상적인 제어가 상실될 때 일어나는 통제되지 않는 세포 성장을 특징으로 한다. 이러한 상실은 흔히 세포 성장 및 분열, 아포토시스, 혈관신생, 종양 침윤 및 전이에 연루된 세포 경로의 조절이상의 결과인 것으로 보인다.

[0004] 제니스테인, 즉, 4',5,7-트리히드록시이소플라본-5,7-디히드록시-3-(4-히드록시페닐)-4H-1-벤조피란-4-온 (하기 나타냄)은 식물, 예컨대 콩에 존재하는 천연 화합물이다.



제니스테인

[0005]

[0006]

암을 비롯한 수많은 인간 질환의 예방 및 치료에서의 제니스테인의 잠재적 역할은 활발히 연구되어 왔다. 제니스테인은 엘씨 라보라토리즈 (LC Laboratories, 미국 매사추세츠주 워번 소재)를 비롯한 수많은 공급처로부터 시중에서 입수가 가능한 BCS 클래스 II 이소플라본이다. 제니스테인에 대한 세포 표적 및 제니스테인에 의해 제어되는 신호전달 경로는 밝혀져 있으며, 암과 관련된 것으로는 세포 성장 및 분열, 아포토시스, 혈관신생, 종양 침윤 및 전이에 중요한 표적 및 경로가 있다. 제니스테인 자체의 내재된 항종양 효과 외에도, 연구에 의하면, 제니스테인은 또한 인간 암 세포주에서 시험관내 및 암의 동물 모델에서 생체내 둘 모두에서 임상적으로 사용되는 여러 화학요법제의 항종양 효과를 증강시키거나 또는 강화한다는 것으로 나타났다. 화학요법이 대부분의 고형 종양의 치료에서 주춧돌이 되는 바, 치료적 관점에서 이러한 데이터는 흥미롭다.

[0007]

제니스테인은 물에 거의 불용성이나 세포막 투과성은 높다. 낮은 수 용해도 및 느린 용출 속도는 종종 제약 화합물의 낮은 생체이용률의 원인이 되는 제한 요인이 되어, 이들의 이용을 제한한다.

[0008]

제니스테인이 항암 약물의 특정 특성을 갖고 있다는 사실이 오랫동안 공지되어 왔음에도 불구하고, 암 치료에서 제니스테인 치료 요법이 성공적으로 이용된 경우는 없었거나 없다. 이에 대한 한 가지 타당성 있는 설명은 아마도 공지된 형태의 제니스테인의 낮은 용해도 및 낮은 생체이용률, 및 이와 더불어 신속한 II상 대사일 것이다.

[0009]

지난 20년간에 걸친 신약 개발 전략의 발달로 인해, 약물 개발 후보의 물리화학적 특성이 유의미하게 변화하였다. 개발 후보는 일반적으로 보다 친유성이고, 물에 덜 가용적인데, 이는 해당 산업에 커다란 문제를 생성한다. 일부 약물 후보는 낮은 인간 생체이용률 및 제형화와 관련된 문제로 인해 임상 단계에서 탈락하는 것으로 연구에 의해 밝혀졌다. 분자를 완전히 다시 설계하지 않고 이 문제를 해결하는 전통적인 방법으로는, 염 선택, 무정형 물질 제조, 입도 축소, 전구약물, 및 상이한 제형화 접근이 있다. 최근에는, 활성 제약 성분(API)의 물리화학적 특성을 변경시키기 위해 API의 결정성 형태가 사용되었다.

[0010]

치료 효능이 치료제에 있어서 일차적 관심사이지만, 약물 후보의 염 및 고체 형태 (즉, 결정성 또는 무정형 형태)가 그의 약리학적 특성 및 성공가능한 API로서의 개발에 결정적일 수 있다. 예를 들어, 약물 후보의 각각의 염 또는 각각의 결정성 형태는 상이한 고체 (물리적 및 화학적) 특성을 가질 수 있다. API의 신규한 고체 형태 (예컨대 본래의 화합물의 공결정, 염, 또는 다형체)에 의해 나타나는 물리적 특성의 차이는 제약학적 매개변수, 예컨대 저장 안정성, 압축성 및 밀도 (제형화 및 제품 제조에 중요함), 및 용해도 및 용출 속도 (생체이용률을 결정함에 있어 중요한 인자임)에 영향을 미친다. 이러한 실제적인 물리적 특성이 API의 결정성 형태의 고체 특성에 의해 영향을 받으므로, 이들은 API로서의 화합물의 선택, 최종적인 제약 투여 형태, 제조 공정의 최적화, 및 체내 흡수에 현저한 영향을 미칠 수 있다. 나아가, 추가의 약물 개발에 가장 적절한 다형 형태를 찾는 것은 그러한 개발의 시간 및 비용을 감소시킬 수 있다.

[0011]

API의 결정성 형태를 수득하는 것은 약물 개발에서 극히 유용하다. 이는 약물 후보의 화학적 및 물리적 특성을 더욱 잘 특징화할 수 있게 한다. API의 염 및/또는 API의 결정성 염을 형성함으로써 특정 API의 원하는 특성을 달성하는 것 또한 가능하다. 결정성 형태 및 결정성 염은 보통 그의 무정형 상태의 유리 염기보다 화학적 및 물리적 특성이 더욱 양호하다. 그러한 염 및 결정성 형태는, 본 발명에서와 같이, 더 유리한 제약학적 및 약리학적 특성을 갖거나 또는 무정형 다형 형태보다 가공이 더 용이할 수 있다. 이들은 또한 저장 안정성이 더욱 양호할 수 있다.

[0012]

가공성에 영향을 미칠 수 있는 상기와 같은 물리적 특성 중 한 가지는 분쇄 (milling) 전 및 후의 고체의 유동성이다. 유동성은 제약 조성물로 가공하는 동안의 물질 취급의 용이성에 영향을 미친다. 분말화된 화합물의 입자가 서로 용이하게 흘러가지 않는 경우, 제형 전문가는 정제 또는 캡슐 제형을 개발함에 있어서, 활택제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소, 활석, 전분 또는 삼염기성 갈슘 포스페이트를 사용해야 할 필요가 있을 수 있다는 사실을 고려해야 한다.

[0013] 잠재적으로 중요한 또다른 API의 고체 특성은 수성 유체 중에서의 그의 용출 속도이다. 환자의 위액에서의 활성 성분의 용출 속도는 경구 투여된 활성 성분이 환자의 혈류에 도달할 수 있는 속도에 영향을 미치기 때문에 치료적으로 중요할 수 있다.

[0014] API의 염을 형성하고/하거나 결정화함으로써, API의 신규한 고체 형태는 API 또는 그의 염의 기존의 고체 형태와 비교하여 독특한 특성을 갖게 될 수 있다. 예를 들어, 결정성 염은 API 자체와는 상이한 용출 및 용해도 특성을 가질 수 있으며, API를 치료적으로 전달하는데 사용될 수 있다. API의 결정성 염을 포함하는 신규한 약물 제형은 기존의 약물 제형보다 우수한 특성을 가질 수 있다.

[0015] API의 결정성 염 또는 다른 결정성 형태는 일반적으로 동일한 화학적 조성을 갖는 다른 형태와 비교할 때 독특한 결정학적 및 분광학적 특성을 갖는다. 특정 형태의 결정학적 및 분광학적 특성은 여타의 기술 중에서도 전형적으로 X-선 분말 회절 (XRPD) 및 단결정 X-선 결정학으로 측정한다. 특정 결정성 형태는 또한 보통 독특한 열적 거동을 나타낸다. 열적 거동은 실험실에서 모세관 용점, 열중량 분석 (TGA) 및 시차 주사 열량측정법 (DSC)과 같은 기술을 이용하여 측정된다.

발명의 내용

[0016] 요약

[0017] 본 발명은 결정성 제니스테인 염 및 결정성 제니스테인 이수화물을 비롯한 제니스테인의 결정성 형태에 관한 것이다. 본 발명의 제니스테인의 결정성 형태를 함유한 치료 조성물은 본 발명의 또다른 실시양태를 나타내며, 본 발명의 결정성 형태 또는 이를 함유한 치료 조성물을 이용하여 암 및 다른 과증식성 질환을 치료 또는 예방하는 방법도 또한 그러하다. 결정성 제니스테인의 치료 조성물은 또한 만성 염증, 감염, 낭포성 섬유증 및 아밀로이드증의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바 및 당업계에 공지되어 있는 바, 용어 "주위 온도"는 인간이 익숙해져 있는 밀폐된 공간 내에서의 온도, 즉, 실온을 의미한다. 예를 들어, 주위 온도는, 예를 들어, 약 20℃ 내지 약 25℃ 범위일 수 있다.

[0018] 본원에 사용된 바 및 당업계에 공지되어 있는 바, 용어 "대략"은 수량 또는 양에 있어서 가까운 것을 의미한다.

[0019] 본원에 사용된 바 및 당업계에 공지되어 있는 바, 용어 "슬러리"는 액체 중의 고체의 현탁물을 의미한다.

[0020] 본원에 사용된 바 및 당업계에 공지되어 있는 바, 용어 " $^{\circ} 2\theta$ "는 [도-2-세타], 즉 [$^{\circ} 2\theta$.], 및 이의 변형어와 상호교환가능하다.

도면의 간단한 설명

[0021] 이하에 기술되어 있으며 본 명세서에 삽입되어 이의 일부를 구성하는 하기 도면은, 본 개시에 따른 예시적인 실시양태를 설명하는 것으로, 본 발명이 동등하게 효과적인 다른 실시양태도 인정할 수 있기 때문에 상기 도면을 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주해서는 안된다. 상기 도면은 반드시 크기에 맞게 되어 있는 것은 아니며, 명료성 및 간결성을 위해 도면의 특정 특징 및 특정 조망이 일정한 비율로 또는 도식적으로 확대되어 나타나 있을 수 있다.

도 1은 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 XRPD 패턴을 도시한다.

도 2는 건조된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 DSC 추적 기록을 도시한다.

도 3은 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 중량측정식 증기 흡착 (GVS) 추적 기록을 도시한다.

도 4는 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조시킨 제조된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 샘플로부터의 TGA 추적 기록을 도시한다.

도 5는 80℃에서 밤새 건조시킨 제조된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 샘플로부터의 TGA 추적 기록을 도시한다.

도 6은 80℃에서 7일 동안 및 40℃/75 상대 습도 (RH)%에서 7일 동안의 안정성 연구 후에 취해진 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 4가지 XRPD 패턴을 도시한다.

도 7은 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 ^1H 핵 자기 공명 (NMR) 스펙트럼을 도시한다.

도 8은 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물에 대한 수화 연구 후의 XRPD 패턴을 도시한다.

- 도 9는, 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 이량체 구조에서의 중심대칭성 이나트륨 양이온을 나타내는, 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 분자 모델로서, 여기서 분자내 수소 결합은 점선으로 나타나 있다.
- 도 10은 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 층 형성을 나타내는 분자 모델이다.
- 도 11은 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 패킹 (packing)을 나타내는 분자 모델이다.
- 도 12는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물에 대한 단결정 데이터를 기초로 한 계산된 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 13은 제니스테인 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 십이지장내 투여 후 총 제니스테인의 혈장 농도를 도시한다(평균, n=3).
- 도 14는 대규모 합성된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 15는 무정형 제니스테인 칼륨 염에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 16은 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 17은 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 TGA 추적 기록을 도시한다.
- 도 18은 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 DSC 추적 기록을 도시한다.
- 도 19는 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 GVS 추적 기록을 도시한다.
- 도 20은 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 ^1H NMR을 도시한다.
- 도 21은 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 안정성 연구에서의 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 22는 결정성 제니스테인 칼륨 이수화물의 수화 연구에 있어서의 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 23은 결정성 제니스테인 칼슘 염에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 24는 결정성 제니스테인 칼슘 염에 대한 TGA 추적 기록을 도시한다.
- 도 25는 결정성 제니스테인 마그네슘 염 (1 당량)에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 26은 결정성 제니스테인 마그네슘 염 (1 당량)에 대한 TGA 추적 기록을 도시한다.
- 도 27은 결정성 제니스테인 마그네슘 염 (2 당량)에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 28은 결정성 제니스테인 마그네슘 염 (2 당량)에 대한 TGA 추적 기록을 도시한다.
- 도 29는 결정성 제니스테인에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 30은 톨루엔으로부터의 결정성 제니스테인 L-리신 염에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 31은 이소프로판올로부터의 결정성 제니스테인 L-리신 염에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 32는 이소프로판올로부터의 결정성 제니스테인/제니스테인 혼합물에 대한 TGA 추적 기록을 도시한다.
- 도 33은 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (메글루민) 염에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 34는 아세톤으로부터 제조된 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (에글루민) 염에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 35는 이소프로판올로부터 제조된 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (에글루민) 염에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 36은 아세톤으로부터의 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 염의 TGA 추적 기록을 도시한다.
- 도 37은 결정성 제니스테인 디에틸아민 염에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 38은 결정성 제니스테인 일수화물에 대한 XRPD 패턴을 도시한다.
- 도 39는 결정성 제니스테인 일수화물의 TGA 추적 기록을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 제니스테인이 약물 개발에 적합할 수 있도록 하는 제니스테인의 물리화학적 특성의 개선에 관한 것이다. 본원에서는, 예를 들어, 결정성 제니스테인의 나트륨, 칼륨, 마그네슘, N-메틸글루카민 (메글루민), 칼슘, L-리신, N-에틸글루카민 (에글루민), 및 디에틸아민 염, 및 이뿐 아니라 제니스테인의 결정성 일수화물을 비롯한 제니스테인의 여러가지 신규한 결정성 형태가 개시된다. 이들 제니스테인의 결정성 형태는 이하에서 기술된다. 본원에서 제니스테인의 결정성 형태가 기술되지만, 본 발명은 또한 본 개시된 제니스테인의 결정성 형태를 함유하는 신규한 화학적 조성물에도 관한 것이다. 상기 결정성 형태를 함유한 치료 조성물과 더불어 상기 결정성 형태의 치료학적 용도도 기술된다. 상기 결정성 형태를 특성화하는데 사용되는 방법도 또한 이하에서 기술된다.

[0023] 본 발명의 한 가지 실시양태는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물에 관한 것이다. 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 제약학적 개발에 적합한 특성들을 소유하고 있을 수 있다. 침상 (needle-like) 형태인 것이 이의 유일한 가능한 단점인데, 이는 제조 동안의 유동성 또는 압축에 반드시 이상적이지는 않다. 침상 형태는 편광 현미경 (PLM)을 이용하여 관찰되었다. 이 결정성의 침상 물질에 대한 분쇄, 또는 당업계에 공지된 유사한 기술을 사용하면, 보다 균일한 입자 형태를 달성할 수 있는데, 이는 그의 제약 조성물을 제조하기 위한 물질을 준비하는데 사용될 수 있다. 당업자는 원하는 제약 조성물에 적절한 입도를 결정할 수 있다. 예를 들어, 약 5 μm 의 입도가 사용될 수 있다. 그러나, 분쇄를 지속할 경우 그러한 공정 도중 수반된 높은 온도로 인해 상기 물질이 탈수화될 수 있음을 주지해야 한다. 한편, 80°C 저장 시험 결과, 상기 물질이 승온에서 7일의 기간에 걸쳐 단지 약간의 변화를 수반하면서 수화물로서 존재할 수 있는 것으로 나타났다. 이는 분쇄시의 탈수화의 위험을 완화시킨다.

[0024] 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명의 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물에는 이량체 구조의 중심대칭성 이 나트륨 양이온이 2개의 제니스테인 분자 및 4개의 물 분자와 함께 존재한다. 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 임의의 특별한 처리, 예컨대 온도 사이클링, 음파처리 또는 고속 증발 등을 필요로 하지 않으면서 주위 온도에서, 예를 들어, 통상의 용매인 IPA (이소프로판올 또는 프로판-2-올)로부터 제조될 수 있다. 하기 실시예 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 탁월한 안정성을 갖고 있다. 이는 물, 수성 용매 시스템 및 유기 용매에서 제니스테인 자체보다 더 가용적이다. 또한, 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 제니스테인과 비교하여 더 우수한 초기 및 후기 고유 동적 용해도 프로파일을 나타낸다. 본 발명의 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 또한 제니스테인보다 더 큰 생체이용률을 갖는 것으로 나타났다.

[0025] 본 발명의 또다른 실시양태는 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물이다. 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물도 또한 임의의 특별한 처리, 예컨대 온도 사이클링, 음파처리 또는 고속 증발 등을 필요로 하지 않으면서 주위 온도에서, 예를 들어, 통상의 용매인 IPA (이소프로판올 또는 프로판-2-올)로부터 제조될 수 있다. 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물은 고체 제니스테인 칼륨 염으로부터 용이하게 형성된다. 제니스테인 칼륨 염은 회수 시점에서 불안정한 무수 무정형 염인 것으로 보이는데, 회수 후에 주위환경으로부터 물을 흡수하여 신속히 이수화된 물질로 결정화된다. 이하의 실시예 2에서 논의되는 바와 같이, 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물 염은 안정성이 양호하다. 제니스테인 칼륨 염 이수화물은 결정성이며, 침상 형태를 갖는다 (그러나, 상응하는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물보다 더 두꺼운 침상임).

[0026] 본 발명의 결정성 나트륨 및 칼륨 제니스테인 염 이외에, 본 발명의 별도의 다른 실시양태는 마그네슘, N-메틸글루카민 (메글루민), 칼슘, L-리신, N-에틸글루카민 (에글루민) 및 디에틸아민을 동반한 제니스테인의 결정성 염에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 실시양태는 제니스테인의 결정성 일수화물 형태에 관한 것이다. 이들 각각의 제니스테인의 결정성 형태, 이들의 제법 및 특성화는 이하의 실시예에 기술되어 있다.

[0027] 제니스테인의 결정성 형태의 치료적 용도

[0028] 본 발명은 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태, 예를 들어, 하나 이상의 결정성 제니스테인 염의 치료적 용도에 관한 것이다. 용어 "치료" 또는 "치료하는"이란, 질환 또는 장애를 예방하거나 그에 대해 보호하는 것, 즉, 그 임상적 증상이 발달하지 않도록 하는 것; 질환 또는 장애를 억제하는 것, 즉, 임상적 증상의 발달을 저지 또는 저해하는 것; 및/또는 질환 또는 장애를 경감시키는 것, 즉, 임상적 증상의 퇴행을 야기하는 것을 비롯하여, 포유동물에서의 질환 또는 장애의 임의의 치료를 의미한다. 궁극적인 귀납적 사건 또는 사건들이 알려지지 않았거나 잠복해 있을 수 있고, 또는 상기 사건 또는 사건들의 발생 후에 관찰아질 때까지 환자가 확인되지 않기 때문에 인간 의약에서, "예방하는 것"과 "저해하는 것"을 구별하는 것이 항상 가능한 것은 아니라는 것을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, 본원에서 사용된 바 용어 "예방"은 본원에서 정의된 바와 같은 "예방하는

것" 및 "저해하는 것"을 모두 포함하는 "치료"의 한 요소로서 의도된 것이다. 본원에서 사용된 바, 용어 "보호"는 "예방"을 포함하는 것으로 의도된 것이다.

[0029] 본 발명에 따른 제니스테인의 결정성 형태는 의약으로서 유용할 수 있는데, 이는 과증식성 질환, 예컨대, 각종 암 (예를 들어, 결장직장암, 위암, 식도암, 유방암, 폐암, 전립선암, 방광암, 뇌암, 신장암, 난소암, 간암, 피부암, 갑상선암 및 췌장암 포함), 및 이뿐 아니라 백혈병 또는 림프종을 치료하는데 사용될 수 있다. 본원에서 언급되는 백혈병 및 림프종은 골수 계통의 종양, 예컨대, 급성 골수성 백혈병, 또는 림프구 계통의 종양일 수 있다.

[0030] 추가로, 본원에 개시된 제니스테인의 결정성 형태는 또한 요법에 의해 온혈동물, 예컨대, 사람을 치료하는 방법에서 사용될 수도 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 결정성 제니스테인 염은 과증식성 질환, 예컨대, 각종 암 (예를 들어, 결장직장암, 위암, 식도암, 유방암, 폐암, 전립선암, 방광암, 뇌암, 신장암, 난소암, 간암, 피부암, 갑상선암 및 췌장암 포함), 이뿐 아니라 백혈병 또는 림프종의 치료 방법에서 유용할 수 있다. 본원에서 언급되는 백혈병 및 림프종은 골수 계통의 종양, 예컨대, 급성 골수성 백혈병, 또는 림프구 계통의 종양일 수 있다.

[0031] 나아가, 본 발명에 따른 제니스테인의 결정성 형태는 과증식성 질환, 예컨대, 각종 암 (예를 들어, 결장직장암, 위암, 식도암, 유방암, 폐암, 전립선암, 방광암, 뇌암, 신장암, 난소암, 간암, 피부암, 갑상선암 및 췌장암 포함), 이뿐 아니라 백혈병 또는 림프종을 앓고 있는 인간을 치료하는 방법에서 사용될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 본 개시에 따른 제니스테인의 결정성 형태는 과증식성 질환, 예컨대, 각종 암 (예를 들어, 결장직장암, 위암, 식도암, 유방암, 폐암, 전립선암, 방광암, 뇌암, 신장암, 난소암, 간암, 피부암, 갑상선암 및 췌장암 포함), 이뿐 아니라 백혈병 또는 림프종을 예방하는데 사용될 수 있다. 본원에서 언급되는 백혈병 및 림프종은 골수 계통의 종양, 예컨대, 급성 골수성 백혈병, 또는 림프구 계통의 종양일 수 있으며, 상기 방법은 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태의 치료 유효량을 이를 필요로 하는 사람에 투여하는 단계를 포함한다. 상기 기술한 인간 치료 방법 중 임의의 방법에서의 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태의 용도도 또한 본 발명의 양상을 이룬다.

[0032] 본원에서 정의되는 치료는 단독 요법으로 적용되는 것이거나 또는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 더하여, 통상의 수술 또는 방사선요법 또는 화학요법을 수반하는 것일 수도 있다. 상기 화학요법은 하기 범주의 항종양제 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (i) 의학 종양학에서 사용되는 바의 항증식성/항신생물성 약물 및 그의 조합물, 예컨대 알킬화제 및 유사 알킬화제 (예를 들어, 시스-플라틴, 카르보플라틴, 시클로포스파미드, 질소 머스타드, 멜팔란, 클로람부실, 부설판 및 니트로소우레아), 대사길항물질 (예를 들어, 젬시타빈 HCl, 5-플루오로우라실, 테가푸르, 팔티트렉세드, 메토트렉세이트, 사이토신 아라비노사이드 및 히드록시우레아), 항종양 항생제 (예를 들어, 안트라사이클린류, 예컨대 아드리아마이신, 블레오마이신, 독소루비신, 다우노마이신, 에피루비신, 이다루비신, 미토마이신-C, 닥티노마이신 및 미트라마이신), 유사분열 억제제 (예를 들어, 빈카 알칼로이드류, 예컨대 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈, 및 탁소이드류, 예컨대 텍솔 및 탁소텔), 및 토포이소머라제 억제제 (예를 들어, 에피도도필로톡신류, 예컨대 에토포시드 및 테니포시드, 암사크린, 토포테칸 및 캄토테신); (ii) 세포성장억제제, 예컨대 항에스트로겐제 (예를 들어, 타목시펜, 토레미펜, 랄록시펜, 드롤록시펜 및 요오독시펜), 에스트로겐 수용체 길항제 (예를 들어, 풀베스트란트), 항안드로겐제 (예를 들어, 비칼루타미드, 플루타미드, 닐루타미드 및 시프로테론 아세테이트), LHRH 길항제 또는 LHRH 효능제 (예를 들어, 고세렐린, 류프로렐린 및 부세렐린), 프로게스토겐 (예를 들어, 메게스트롤 아세테이트), 아로마타제 억제제 (예를 들어, 아나스트로졸, 레토로졸, 보라졸 및 엑세메스탄), 및 5-알파-리덕타제 억제제 (예를 들어, 피나스테리드); (iii) 암 세포 침윤 억제제 (예를 들어, 메탈로프로테이나제 억제제, 예컨대 마리마스타트 및 유로키나제 플라스미노겐 활성화제 수용체 기능 억제제); (iv) 성장 인자 기능 억제제, 예를 들어, 이러한 억제제로는 성장 인자 항체, 성장 인자 수용체 항체 (예를 들어, 항-ErbB2 항체 트라스투주맙 (허셉틴), 및 항-ErbB1 항체 (세툰시맙)), 파르네실 트랜스페라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 및 세린-트레오닌 키나제 억제제, 예를 들어, 표피 성장 인자 부류에 대한 억제제 (예를 들어, EGFR 부류 티로신 키나제 억제제, 예컨대 N-(3-클로로-4-플루오로페닐)-7-메톡시-6-(3-모르폴리노프로폭시)퀴나졸린-4-아민 (게피티닙, AZDI 839), N-(3-에틸닐페닐)-6,7-비스(2-메톡시에톡시)퀴나졸린-4-아민 (예로티닙, OSI-774) 및 6-아크릴아미도-N-(3-클로로-4-플루오로페닐)-7-(3-모르폴리노프로폭시)퀴나졸린-4-아민 (CI 1033)), 혈소판-유래 성장 인자 부류에 대한 억제제, 및 간세포 성장 인자 부류에 대한 억제제가 포함됨; (v) 항혈관신생제, 예컨대 혈관 내피 성장 인자의 효과를 억제하는 제제 (예를 들어, 항-혈관 내피 세포 성장 인자 항체인 베바시주맙 (아바스틴) 및 국제 특허 출원 WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 및 WO 98/13354에 개시된 것들과 같은 화합물) 및 다른 메카니즘으로 작용하는 화합물

(예를 들어, 리노마이드, 인테그린 기능 억제제 및 안지오테닌); (vi) 혈관 손상제, 예컨대 콤프레타스타틴 A4 및 국제 특허 출원 WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 및 WO 02/08213에 개시된 화합물; (vii) 안티센스 요법제, 예를 들어, 상기 열거한 표적들을 지향하는 것, 예컨대 ISIS 2503, 항-라스(ras) 안티센스; (viii) 유전자 요법 접근법, 예를 들어, 비정상 유전자를 대체하는 접근법, 예컨대 비정상 p53 또는 비정상 BRCA1 또는 BRCA2, GDEPT (유전자-지시된 효소 전구약물 요법) 접근법, 예컨대 사이토신 데아미나제, 티미딘 키나제 또는 박테리아 니트로리덕타제 효소를 이용한 접근법, 및 화학요법 또는 방사선요법에 대한 환자 관용을 증가시키는 접근법, 예컨대 다약제 내성 유전자 요법이 포함됨; 및 (ix) 면역요법 접근법, 예를 들어 환자 종양 세포의 면역원성을 증가시키는 생체의 및 생체내 접근법, 예컨대 사이토킨, 예컨대 인터류킨 2, 인터류킨 4 또는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자를 이용한 트랜스펙션, 트랜스펙션된 면역 세포, 예컨대 사이토킨-트랜스펙션된 수지상 세포를 이용한 접근법, 사이토킨-트랜스펙션된 종양 세포주를 이용한 접근법, 및 항이디오타입 항체를 이용한 접근법이 포함됨.

[0033] 상기 논의한 치료법에서, 본 발명에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태는 또한 하나 이상의 세포 주기 억제제와 조합하여, 예를 들어, 사이클린-의존성 키나제 (CDK)를 억제하는 세포 주기 억제제와 조합하여, 또는 이마티닙 메실레이트 (글리벡)와 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 연합 치료는 상기 치료법의 개별 성분의 동시 투여, 순차적 투여 또는 개별적 투여에 의해 달성될 수 있다. 이러한 조합 생성물은 본원에 기재된 투여량 범위 내의 하나 이상의 본 발명의 화합물 및 일반적으로 인정된 투여량 범위 내의 하나 이상의 다른 제약 활성제를 이용할 수 있다. 조합 생성물은 단일 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한, 앞서 정의된 바와 같은 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태, 예컨대 하나 이상의 결정성 제니스테인 염, 및 앞서 정의된 바와 같은 하나 이상의 추가 항종양제를 포함하는, 세포 증식성 장애 (예컨대, 암)의 치료에 사용하기에 적합할 수 있는 조합물을 제공한다. 이러한 조합물은 세포 증식성 장애 (예컨대, 암)에 대한 연합 치료를 위한 제약 생성물로서 소용될 수 있다.

[0035] 치료적 의약에서의 용도 외에도, 본 발명에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태는 또한, 신규한 치료제에 대한 탐색의 일부로서 실험 동물, 예컨대 고양이, 개, 토끼, 원숭이, 래트 및 마우스에서 세포 주기 활성 억제제의 효과를 평가하는 시험관내 및 생체내 테스트 시스템의 개발 및 표준화에 있어서 약리학적 도구로서 유용할 수 있다.

[0036] 본 발명의 또다른 측면은, 염증의 억제가 유익한 질환, 예컨대, 만성 염증, 염증성 장 질환, 크론병, 쇼그렌 질환, 류마티스관절염, 관절염, 아토피성 피부염, 혈관염, 건선, 양성 전립선 증식증, 창상 치유, 말기 신장 질환, 만성 신장 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환, 또는 천식의 치료를 위한 약제의 제조에서의 본 발명에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태의 치료적 용도에 관한 것이다.

[0037] 추가적으로, 본 발명에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태는 또한 감염의 억제가 유익한 질환, 예컨대, 국소 감염, 전신 감염, 패혈증, 전신 진균 감염, 또는 국소 진균 감염의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용될 수도 있다.

[0038] 본 발명의 또다른 측면은, 신체 기관 및 사람의 선에서의 정상적인 염화물 및 염 (물)의 이동을 회복시키는 것 (예컨대, 낭포성 섬유증 막횡단 전도도 조절인자를 자극하는 것)이 유익한 질환의 치료를 위한 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태의 용도에 관한 것이다.

[0039] 본 발명의 또다른 측면은, 가용성 단백질이 기관 기능 이상을 유발하는 불용성 세포외 피브릴(fibril) 침착물의 형성을 억제하는 것 (예를 들어 트랜스티레틴 (TTR) 유전자 생성물의 아미노산 서열의 변경에 의해 유발된 TTR 아밀로이드증의 억제)이 유익한 질환의 치료를 위한 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태의 용도에 관한 것이다. 본 개시의 또다른 실시양태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태는 가족성 아밀로이드 다발신경병증의 치료에 사용될 수 있다.

[0040] **제니스테인의 결정성 형태를 함유하는 제약 조성물**

[0041] 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태 및 제약상 허용되는 담체 (또한 제약상 허용되는 부형제로서 알려짐)를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 상기 논의된 바와 같이, 본 발명에 따른 제니스테인의 결정성 형태는, 예를 들어 비정상적 혈관신생과 관련된 질환 상태를 비롯한 상기 논의된 질환 상태의 치료 또는 예방에 치료적으로 유용할 수 있다.

[0042] 상기 질환 상태의 치료를 위한 제약 조성물은, 치료 유효량의 본 발명에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태를 함유하여, 특정 질환을 갖는 환자의 치료를 위해 혈관신생을 제어하는데 관여하는 유전자의 전사를 하향

-조절할 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 본 발명에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태를 함유하는 임의의 제약 형태로 존재할 수 있다. 제약 조성물은, 예를 들어 정제, 캡슐, 액체 현탁액, 주사용, 국소용 또는 경피용일 수 있다. 제약 조성물은 일반적으로, 예를 들어 약 1 중량% 내지 약 99 중량%의 본 발명의 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태, 및 예를 들어 99 중량% 내지 1 중량%의 하나 이상의 적합한 제약 부형제를 함유한다. 한 실시양태에서, 조성물은 약 5 중량% 내지 약 75 중량%의 본 발명의 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태와, 나머지는 하기 논의되는 바와 같은 하나 이상의 적합한 제약 부형제 또는 하나 이상의 다른 보조제일 수 있다.

[0043] "치료 유효량의 본 발명에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태"는 일반적으로 약 0.05 내지 약 500 mg/kg의 범위이다. 임의의 특정 환자의 예방 또는 치료에 요구되는 실제량은, 예를 들어 치료될 질환 상태 및 그의 중증도; 사용된 특정 제약 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 투여 방식; 투여 시간; 투여 경로; 및 제니스테인의 결정성 형태의 배출률; 치료 기간; 사용된 특정 화합물과 조합되거나 동시에 사용되는 임의의 약물; 및 의학 분야에 널리 공지된 다른 상기 인자를 비롯한 다양한 인자에 좌우될 수 있다. 이들 인자는 문헌 [Goodman and Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Tenth Edition, A. Gilman, J. Hardman and L. Limbird, eds., McGraw-Hill Press, 155-173, 2001] (본원에 참고로 포함됨)에서 논의되어 있다. 본 발명에 따른 제니스테인의 결정성 형태 및 이를 함유하는 제약 조성물은, 암 치료를 위해 일반적으로 환자에게 투여되는 항암제 또는 다른 작용제와 조합되어 사용될 수 있다. 또한, 그들은 단일 제약 조성물 내에 하나 이상의 상기 작용제와 공동-제형화될 수 있다.

[0044] 제약 조성물의 유형에 따라, 제약상 허용되는 담체는 당업계에 공지된 담체 중 어느 하나 또는 이의 조합물로부터 선택될 수 있다. 제약상 허용되는 담체의 선택은 제약 형태 및 사용될 원하는 투여 방법에 좌우된다. 본 발명의 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태를 갖는 것인 본 발명의 제약 조성물의 경우, 결정성 형태를 유지시키는 담체가 선택되어야 한다. 즉, 담체는 제니스테인의 결정성 형태를 실질적으로 변경하지 않아야 한다. 또한, 담체는 사용된 제니스테인 염의 결정성 형태와 비상용성이어서는 안되며, 예컨대 임의의 원하지 않는 생물학적 효과를 나타내거나 제약 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용하여서는 안된다.

[0045] 본 발명의 제약 조성물은 제약 제형물 분야에 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990)] (본원에 참고로 포함됨) 참조). 고체 투여 형태에서, 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태는 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제, 예를 들어 나트륨 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트 또는 (a) 충전제 또는 연장제, 예를 들어, 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산, (b) 결합제, 예를 들어 셀룰로스 유도체, 전분, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스 및 아카시아 검, (c) 보습제, 예를 들어 글리세롤, (d) 봉해제, 예를 들어 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 크로스카멜로스 나트륨, 실리케이트 착체 및 탄산나트륨, (e) 용액 지연제, 예를 들어 파라핀, (f) 흡수 촉진제, 예를 들어 4급 암모늄 화합물, (g) 습윤제, 예를 들어 세틸 알콜, 및 글리세롤 모노스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트 등, (h) 흡착제, 예를 들어 카올린 및 벤토나이트, 및 (i) 윤활제, 예를 들어 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리 에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 술페이트, 또는 이들의 혼합물과 함께 혼합될 수 있다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우에, 투여 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다.

[0046] 제약 제형물 분야에 공지된 제약상 허용되는 보조제도 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있다. 이들에는 보존제, 습윤제, 현탁제, 감미제, 향미제, 방향제, 유화제 및 분배제가 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등을 포함시킴으로써 보장할 수 있다. 또한, 등장성 작용제, 예를 들어 당, 염화나트륨 등을 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 원하는 경우, 본 발명의 제약 조성물은 또한 소량의 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 항산화제 등, 예를 들어 시트르산, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트, 부틸화 히드록시톨루엔 등을 함유할 수 있다.

[0047] 상기 기재된 고체 투여 형태는 코팅 및 셸(shell), 예컨대 장용성 코팅 및 당업계에 널리 공지된 다른 것으로 제조될 수 있다. 그들은 완화제(pacifying agent)를 함유할 수 있고, 또한 장관의 특정 부분에서 활성 화합물 또는 화합물들을 지연 방식으로 방출하도록 하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 삽입 조성물의 비제한적인 예는 중합체 물질 및 왁스이다. 활성 화합물은 또한 마이크로캡슐화 형태로, 적절한 경우 상기 언급된 하나 이상의 부형제와 함께 존재할 수 있다.

[0048] 활성 화합물 이외에 현탁액은 현탁제, 예를 들어 에톡시화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소

르비탄 에스테르, 미세결정성 셀룰로스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트래거캔스, 또는 이들 물질의 혼합물 등을 함유할 수 있다.

[0049] 직장 투여용 조성물은, 예를 들어 본 개시에 따른 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태를 예를 들어 적합한 비자극성 부형제 또는 담체, 예컨대 코코아 버터, 폴리에틸렌글리콜 또는 좌제용 왁스 (이들은 상온에서는 고체 이나 체온에서는 액체이어서 적합한 체강에 있는 동안 용해되어 내부의 활성 성분을 방출시킬 수 있음)와 혼합하여 제조될 수 있다.

[0050] 제니스테인의 결정성 형태는 제조 동안 유지되기 때문에, 본 발명의 제약 조성물에는 고체 투여 형태가 바람직하다. 캡슐, 정제, 환제, 분말 및 과립을 포함하는 경구 투여용 고체 투여 형태가 사용될 수 있다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성 화합물은 하나 이상의 불활성인 제약상 허용되는 부형제 (또한 제약상 허용되는 담체로서 알려짐)와 혼합될 수 있다. 본 발명에 따른 제니스테인의 결정성 형태는 또한 액체 제약 조성물의 제형화시 전구체로서 사용될 수 있다. 제니스테인의 결정성 형태를 순수한 형태로 또는 적절한 제약 조성물로 투여하는 것은, 승인된 투여 방식 또는 유사한 유용성을 제공하는 작용제 중 임의의 것을 통해 수행될 수 있다. 따라서, 투여는, 예를 들어 경구, 구강, 비강, 비경구 (정맥내, 근육내, 또는 피하), 국소, 경피, 질내, 혈관내, 전신내, 또는 직장으로, 예를 들어 정제, 좌제, 환제, 연질 탄성 및 경질 젤라틴 캡슐, 분말, 용액, 현탁액 또는 에어로졸 등과 같은 고체, 반-고체, 동결건조 분말의 형태 또는 액체 투여 형태로, 예를 들어 정확한 투여의 단순 투여에 적합한 단위 투여 형태일 수 있다. 하나의 투여 경로는, 치료될 질환-상태의 중증도에 따라 조정될 수 있는 편리한 일일 투여 계획을 사용하는 경구 투여일 수 있다.

[0051] 본 발명은 또한 다양한 질환의 치료를 위한 하나 이상의 제니스테인의 결정성 형태를 사용하는 약제의 제법에 관한 것이다. 상기 질환에는, 하나 이상의 단백질 티로신 키나제(들)의 억제가 유익한 질환, 예를 들어 제니스테인에 의해 영향받는 키나제가 가능한 표적인 질환; 과증식성 질환, 예컨대 각종 암, 예를 들어 결장직장암, 유방암, 폐암, 전립선암, 방광암, 신장암 또는 췌장암, 또는 백혈병 또는 림프종 또는 증식성 염증성 위축; 염증의 억제가 유익한 질환, 예를 들어 만성 염증, 염증성 장 질환, 크론병, 쇼그렌 질환, 류마티스성 관절염, 관절염, 아토피성 피부염, 혈관염, 건선, 양성 전립선 증식증, 창상 치유, 말기 신장 질환, 만성 신장 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환, 천식; 감염의 억제가 유익한 질환, 예를 들어 국소 감염, 전신 감염, 패혈증, 전신 진균 감염, 국소 진균 감염; 인간의 신체 기관 및 선에서 정상 염화물 및 염 (물)의 이동을 회복시키는 것, 예를 들어 낭포성 섬유증 막횡단 전도도 조절인자를 자극하는 것이 유익한 질환, 뿐만 아니라 일과성 열감 및 골다공증과 같은 폐경 후 상태와 관련된 질환 및 증상, 뿐만 아니라 가용성 단백질이 기관 기능 이상을 유발하는 불용성 세포외 피브릴 침착물의 형성을 억제하는 것이 유익한 질환, 예컨대 아밀로이드증, 예를 들어 피브릴 침착물이 트랜스 티레틴 (TTR)으로 구성된 아밀로이드증, 예컨대 가족성 아밀로이드 다발신경병증이 포함되나, 이들로 한정되지는 않는다.

[0052] 실시예

[0053] 하기 분석 기술이 이하의 실시예에 사용되었다.

[0054] X-선 분말 회절 (XRPD): 브루커 D8-디스커버(Bruker D8-Discover) 회절계 상에서 X-선 분말 회절 연구를 수행하였다. XRPD 0 배경 단일 96 웰 플레이트 샘플 홀더 상에서 대략 5 mg의 샘플을 서서히 압축시켰다. 이어서, 샘플을 전달 모드로 브루커 D8-디스커버 회절계 내에 로딩하고, 하기 표 1에 제시된 실험 조건을 사용하여 분석하였다.

표 1

XRPD 측정 조건

로 데이터 원본	브루커-마이너리 V3 (.RAW)
스캔 축	고니오(Gonio)
출발 위치 [°2 θ .]	4.0000
말단 위치 [°2 θ .]	49.9800
단계 크기 [°2 θ .]	0.0200
스캔 단계 시간 [s]	39.1393
스캔 유형	연속
오프셋 [°2 θ .]	0.0000
발산 슬릿 유형	고정
발산 슬릿 크기 [°]	2.0000
표본 길이 [mm]	10.00
수용 슬릿 크기 [mm]	0.1000
측정 온도 [°C]	25.00
음극 재료	Cu
K-알파1 [Å]	1.54060
K-알파2 [Å]	1.54443
K-베타 [Å]	1.39225
K-A2 / K-A1 비율	0.50000
생성기 설정	40 mA, 40 kV
회절계 수	0
각도계 반경 [mm]	250.00
거리 초점-발산 슬릿 [mm]	91.00
입사빔 단색화장치	없음
회전	없음

[0055]

[0056]

시차 주사 열량측정법 (DSC): 대략 2 mg의 샘플을 알루미늄 DSC 팬에서 중량측정하고, 알루미늄 덮개 (비-밀폐형)로 밀봉하였다. 이어서, 샘플 팬을 피리스 1 퍼킨-엘머(Pyris 1 Perkin-Elmer) DSC (액체-질소 냉각 유닛이 장착됨) 내에 로딩하고, 냉각시키고, 25°C에서 유지시켰다. 안정적인 열-유동 반응을 획득하였을 때, 샘플을 10°C/분의 스캔 속도로 300°C로 가열하고, 생성된 열 유동 반응을 모니터링하였다. 20 cm³/분 헬륨 퍼지를 사용하여 가열 동안 샘플의 열 유도된 산화를 방지하고, 또한 샘플을 통한 열적 지연을 감소시켜 기구 민감도를 증가시켰다. 분석 전에, 인듐 참조 표준물질을 사용하여 기구를 온도 및 열-유동 보정하였다.

[0057]

중량측정식 증기 흡착 (GVS): 대략 15 mg의 샘플을 와이어-메쉬 증기 흡착 밸런스 팬에 넣고, 공급된 SMS 고유 증기 흡착 밸런스 (표면 측정 시스템 기구) 내에 로딩하였다. 이어서, 추가의 중량 변화가 기록될 때까지 0% 습도 환경을 유지함으로써 샘플을 건조시켰다. 이후, 평형이 달성(99.5% 단계 완료)될 때까지 각각의 단계에서 샘플을 유지하면서 10% RH 증분으로 0에서 90% RH까지의 램핑(ramping) 프로파일에 샘플을 제공하였다. 평형에 도달하였을 때, 장치 내의 % RH를 다음 단계로 램핑하고, 평형 절차를 반복하였다. 흡착 사이클의 완료 후, 이어서 동일한 절차를 사용하여 샘플을 건조시켰다. 이어서, 흡착/탈착 사이클 동안의 중량 변화를 모니터링하여, 측정된 샘플의 흡습 성질을 허용하였다.

[0058]

열중량측정법 (TGA): 대략 5 mg의 샘플을 백금 TGA 팬에서 정확하게 중량측정하고, 실온에서 유지된 퍼킨-엘머 TGA 7 중량측정 분석기 내에 로딩하였다. 이어서, 중량의 변화를 모니터링하는 시간 동안 샘플을 25°C에서 300°C로 10°C/분의 속도로 가열하였다. 사용된 퍼지 가스는 20 cm³/분의 유속의 질소였다. 분석 전에, 기구를 100 mg의 참조 중량을 사용하여 중량 보정하고, 알루미늄 참조 표준물질을 사용하여 온도 보정하였다.

[0059]

편광 현미경 (PLM): 고 해상도 라이카(Leica) 카메라 및 이미지 캡처 소프트웨어 (파이어캠(Firecam) V.1.0)가 장착된 라이카 라이즈 DMRB 편광 광학 현미경을 사용하여 결정성의 존재 (복굴절)를 측정하였다. 달리 기술되지 않는 한 10배의 대물렌즈를 사용하여 모든 이미지를 기록하였다.

[0060]

¹H 핵 자기 공명 (NMR): 브루커 AC200 200 MHz 분광계 상에서 ¹H NMR을 수행하였다. 각각의 샘플의 NMR을 중수소-메탄올에서 수행하였다. 각각의 샘플을 약 5 mg의 농도로 제조하였다.

[0061]

실시예 1 - 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물

[0062]

1.1 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 제조: 약 300 mg의 제니스테인을 6 cm³ (20배 부피)의 IPA에 넣었다. 1M 수산화나트륨 (NaOH)의 첨가시 반응은 신속히 뚜렷해졌다 (담황색에서 밝은 황색(vibrant yellow)으로의

색변화). 혼합물을 주위 온도에서 약 3시간 동안 진탕한 다음, 약 2일 (주말)에 걸쳐 유지시켰다. 고체를 여과에 의해 단리하고, 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조시켰다. 이 방법에 따라 제조된 제니스테인 나트륨 염은 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물이며, 하기 방법에 의해 특성화하였다.

1.2 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 XRPD

상기 기재된 절차를 사용하여 도 1에 도시된 바와 같은 XRPD 패턴을 획득하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, XRPD 분석은 가능한 경우 나트륨 염의 IPA 용매화물에 존재하는 고체 형태의 불순물을 드러낸다. 물질을 80℃에서 밤새 건조시켜 불순물을 제거한다. 실험 ° 2θ + 0.2 ° 2θ에서 XRPD 패턴의 피크는 표 2에 나열되어 있다. 피크의 전체 목록 또는 이의 하위세트는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 1로부터 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 특성화하기 위해 개별적으로 또는 조합으로 사용될 수 있는 피크의 한 하위세트는 5.9, 11.6, 11.8, 15.2, 24.8, 28.2, 28.9, 및 28.9 ° 2θ + 0.2 ° 2θ를 포함한다.

표 2

위치 [°2θ ± 0.2 °2θ]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
5.4	16.5	6.25
5.9	15.0	14.05
7.5	11.8	21.61
8.2	10.8	4.19
11.6	7.6	6.4
11.8	7.5	7.42
14.8	6.0	4.3
15.2	5.8	71.86
16.0	5.5	5.13
16.8	5.3	8.89
17.1	5.2	7.31
23.5	3.8	5.6
24.3	3.7	22.41
24.8	3.6	100
25.5	3.5	7.31
26.7	3.3	4.87
27.0	3.3	5
28.2	3.2	17.86
28.5	3.1	22.31
28.9	3.1	14.37
29.7	3.0	4.35

1.3 건조된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 DSC

상기 1.1에 기재된 절차에 따라 제조한 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 염을 80℃에서 밤새 건조시킴으로써 샘플을 제조하였다. 도 2는 건조된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 샘플의 DSC를 도시한다. DSC는 약 91℃에서의 탈수화 후 약 132℃에서의 용융을 나타낸다. 다른 피크는 아마도 분해와 관련된다 (하기 논의되는 도 4 및 5에 도시된 TGA 추적 기록에 의해서도 나타내어짐).

1.4 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 GVS

도 3에 도시된 바와 같이, 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 GVS 연구는 수화물 형성 (분석 전 GVS 사이클 탈수화물 물질) 및 흡착된 최대 45 중량%의 물을 나타냈다. 그러나, 20 내지 70 RH% (물질의 전형적인 작업 범위)에서는 단지 약 2% 수분 변화만이 관찰되었다.

1.5 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 TGA

도 4는 상기 1.1에서와 같이 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 샘플로부터의 TGA 추적 기록을 도시한다. 도 5는 80℃에서 밤새 건조된, 제조된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 염 샘플로부터의 TGA이다. TGA는 나트륨 염이 수화되고 수분 손실이 약 75℃에서 시작됨 (추가적 개발에 적

합합)을 나타낸다. 중량 손실은 물 1몰 대 나트륨 1몰과 일치한다.

1.6 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 PLM

결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 PLM은 침상 형태를 나타냈다.

1.7 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 용해도 측정

수성 용해도: 하기 프로토콜을 사용하여 수성 용해도를 측정하였다.

제니스테인의 슬러리 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 염의 슬러리를 pH가 4.5, 6.7, 및 7.5로 설정된 수성 매질에서 제조하고, 각각의 슬러리를 주위 온도에서 약 24시간 동안 진탕한 다음, 0.2 μm 필터를 사용하여 깨끗한 바이알 내로 여과하였다. 이어서, 포화 용액을 희석하고, 키로바이오틱(Chirobiotic) T HPLC 컬럼 및 UV 검출기 세트 상에서 $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$ 로 N-Ac-DL-메티오닌을 사용하여 API (제니스테인) 함량에 대해 분석하였다. 이동상은 30분의 시간에 걸쳐 등용매 모드로 진행하는 아세토니트릴/물이었다. 결과를 하기 표 3에 제시한다 (BDL = 검출 한계 미만). 제니스테인을 이용한 HPLC 추적 기록 진행으로부터의 API 피크는 뚜렷하지 않았으며 (약 6-7분에 나타나야함), 이는 제니스테인이 수성 매질에서 매우 불용성이고, 그 수준이 사용된 HPLC 기법의 민감도 (mg 내지 μg 수준의 기법의 민감도) 미만임을 나타낸다. 제니스테인은 10-40 nM 범위의 수성 용해도를 나타내는 것으로 보고된다.

표 3

용매	제니스테인, mg/ml	결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물, mg/ml
물/슬러리 pH 4.5	BDL	0.136
물/슬러리 pH 6.7	BDL	0.707
물/슬러리 pH 7.5	BDL	0.650

상이한 용매에서의 용해도: 하기 프로토콜을 사용하여 상이한 유기 용매에서의 용해도를 측정하였다. 제니스테인 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 염의 대략 25 mg 부분을 48개의 상이한 바이알에 별개로 넣었다. 각각의 용매의 5배 부피 분취액을 바이알에 배타적으로 첨가하였다. 각각의 첨가 사이에, 혼합물을 용해에 대해 체크하고, 용해가 보이지 않으면, 용해가 관찰될 때까지 또는 50배 부피가 첨가될 때까지 절차를 계속하였다. 결과는 하기 표 4에 제시되어 있다.

표 4

용매	제니스테인 용해도, mg/ml	결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 용해도, mg/ml
메탄올 (MeOH)	<10.6	<8.8
에탄올 (EtOH)	<10.8	98
2-프로판올 (i PA)	<10.5	<10.2
아세톤/IPA (50:50)	20.1	20.2
1-부탄올 (BuOH)	<10.5	19.3
메틸 아세테이트 (MeOAc)	<10.3	<10.2
아세톤	ca. 17	<10.2
1,4-디옥산	<10.3	<10.6
아세토니트릴 (MeCN)	<10.1	<10.4
테트라히드로퓨란 (THF)	26.3	<10.4
디클로로메탄 (DCM)	<10.3	<10.8
tert-부틸메틸 에테르 (TBME)	<10.5	<9.2
메틸에틸 케톤 (MEK)	<10.8	<9.2
헵탄	<10.5	<9.9
옥탄올	<10.5	<11
N-N-디메틸포름아미드 (DMF)	ca. 100	> 217.6
디메틸 술폰사이드 (DMSO)	ca. 100	>235.2
톨루엔	<10.1	<9.9
N-메틸-2-피롤리디논 (NMP)	ca. 68	90.4
메틸 이소부틸 케톤 (MIBK)	<10.1	<9.0
아세톤/물 (50:50)	<10.1	69.6
톨루엔/디옥산 (50:50)	<10.1	<9.7
시클로헥산	<10.7	<10.9
디이소프로필에테르 (DIPE)	<10.6	<9.7

[0079]

[0080]

1.8 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 안정성 연구

[0081]

샘플 안정성을 80℃에서 7일 동안 및 40℃/75 RH%에서 7일 동안 시험하였다. 색 변화와 같은 관찰을 7일 후에 기록하고, 샘플의 XRPD를 7일 후에 취하여 임의의 고체 형태 변화를 조사하였다. 도 6은 80℃에서 7일 동안 및 40℃/75 RH%에서 7일 동안 원래의 샘플 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 샘플의 XRPD 패턴을 도시한다. 40℃/75 RH% 연구는 7일의 기간에 걸쳐 어떠한 변화도 나타내지 않았다. 80℃에서 7일의 기간에 걸친 물질의 저장은 약간의 결정성 손실을 나타냈으며, 이는 느린 탈수화를 시사한다. 7일의 광 안정성 시험은 색 또는 고체 형태의 어떠한 변화도 보이지 않았다.

[0082]

1.9 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 ¹H NMR 스펙트럼

[0083]

도 7은 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 ¹H NMR 스펙트럼을 예시한다. 표 5는 ¹H NMR 스펙트럼에서의 피크를 나열한다. 도 8의 ¹H NMR에서 제니스테인 중의 약 5.9의 방향족 양성자에 대한 화학적 이동이 6.1 ppm으로 대체되는 것은 염 형성을 확인시켜 준다.

표 5

화학적 이동	다중도	범위 (ppm)
7.952	s	7.932 - 7.919
7.372	m	7.429 - 7.306
6.861	m	6.927 - 6.791
6.101	dd	6.187 - 6.028
4.936	s	5.256 - 4.723
3.34	q	3.577 - 3.096
1.085	s	1.213 - 0.934

[0084]

s = 단일항, m = 다중항, dd = 이중의 이중항, q = 사중항

[0085]

1.10 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 불균등화 연구

[0086]

50 mg의 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 샘플을 250 μL 증류수에서 약 48시간 동안 슬러리화한 다음,

불균등화에 대해 XRPD로 체크하였다. 또한, 코닝(Corning) 240 pH 미터를 사용하여 상등액의 pH를 측정하였다. 불균등화의 징후는 관찰되지 않았다. 슬러리화 후 상등액의 pH는 7.1이었다.

[0087] **1.11 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 수화 연구**

[0088] 대략 100 mg의 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 물 수준에서 약 500 μ L IPA/물 혼합물 (3%, 5% 및 10%)에 넣었다. 각각의 혼합물을 주위 온도에서 약 48시간 동안 교반한 다음, 여과하여 XRPD 및 TGA 연구를 위한 고체를 회수하였다. 도 8에 도시된 바와 같이, 수화는 TGA로부터의 중량 손실에 상응하는 XRPD 패턴에서의 원래 물질의 변화로부터 나타내어졌다 (물질에 좌우됨). 수화 연구는 추가의 수화물을 드러내지 않았으나, IPA 용매화물 불순물을 제거하였다.

[0089] **1.12 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 단결정 X-선 회절**

[0090] 단결정 제조: 50:50 IPA/물 (3 cm^3)에 용해된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 (약 48 mg)의 용액으로부터 결정을 성장시켰다. 이어서, 용액을 천공된 파라필름을 통해 서서히 증발시켰다. 증발 약 2주 후 침상(針狀) 결정이 보였다.

[0091] 단결정 X-선 회절: 외가지 모양 바늘의 샘플을 데이터 수집을 위해 선택하였다. 150K에서 작동하는 옥스포드 크리오시스템즈(Oxford Cryosystems) 저온 장치가 장착된 브루커 스마트 아펙스(Bruker Smart Apex) CCD 회절계를 사용하여 Mo-K α 방사선으로 회절 데이터를 수집하였다.

[0092] 데이터 세트의 지수화시, 결정 구조는 가대칭(pseudosymmetric)인 것으로 측정되었다. 치수 $a = 3.76$, $b = 30.23$, $c = 12.12\text{ \AA}$, $\beta = 106.2^\circ$, $V = 1324\text{ \AA}^3$ 을 갖는 원시의 단사정계로 측정된 셀에 대해 유력한 데이터를 지수화할 수 있었다. 모든 데이터의 완전한 지수화는 오직 치수 $a = 7.52$, $b = 11.65$, $c = 30.46\text{ \AA}$, $\alpha = 89.8^\circ$, $\beta = 82.9^\circ$, $\gamma = 88.1^\circ$, $V = 2647\text{ \AA}^3$ 을 갖는 보다 큰 삼사정계 셀을 이용하여 얻을 수 있었다. 이러한 셀은 그 자체가 치수 $a = 7.52$, $b = 60.46$, $c = 11.65\text{ \AA}$, $\beta = 91.9^\circ$, $V = 5295\text{ \AA}^3$ 을 갖는 가 단사정계 C-중심 셀로 전환가능하다.

[0093] 회절 데이터를 통합 및 축소하고 (SAINT), 멀티스캔 절차 SADABS를 사용하여 시스템 에러에 대해 보정하였다. 상기 기재된 삼사정계 셀에 대해 통합된 데이터-세트를 사용하여 직접적 방법 (SHELXS)에 의해 P-1에서 구조를 해결하였다. 모든 데이터를 사용하여 $|F|^2$ 에 대해 구조를 정밀화하였다 (SHELXL). 구조의 완성을 위해 트윈 로(twin law)의 도입이 필요하였다. 사용된 트윈 로는 $[-1\ 0\ 2]$ 방향 주위의 2배 회전이었으며, 이는 상기 기재된 단사정계 셀의 b-축 방향에 상응한다.

[0094] 구조는 트윈화 이외에 가대칭이다. 이는 유기 단편 내의 원자 좌표가 서로 관련되어 있음을 의미하며, 그 결과 최소 자승 정밀화에서 상관관계 및 수학적 불안정성을 초래한다. 이들 유사성을 극복하기 위해, 모든 화학적으로 관련된 결합 거리 및 각에 제한을 적용하였다. 분자 쌍 (1 및 2, 및 3 및 4)은 $a/2$ 의 번역에 의해 관련되고, 상기 동등한 광학적이방성 대체 파라미터를 강제로 동일하게 하였다. 수렴을 달성하는데 일부 감폭(damping)이 필요하였다. 상관관계는 또한 동등한 결합 길이를 인위적으로 상이하게 하고, 예를 들어 화학적으로 동등한 결합 거리의 뚜렷한 차이에 어떠한 유의성도 기인하지 않음을 주의해야 한다. 보다 정교한 정밀화 모델이 이들 효과를 해결하는데 필요할 것이다.

[0095] 탄소에 부착된 수소 원자를 계산된 위치에 놓았다. 산소에 부착된 일부 수소 원자를 상이한 맵에 배치할 수 있었다. 특히, H-원자는 나트륨 이온을 연결하는 O-원자 (O141 및 O144)에 부착하였다. 리간드-물 H-원자에 대한 위치는 가능한 H-위치의 좌위에 관하여 계산된 푸리에(Fourier) 맵에 배치하였으며; 기하학적으로 민감한 H-결합을 만들고 짧은 접촉을 방지하는 위치들을 모델에 포함시켰다. O8에 부착된 H-원자를 상이한 맵에 배치하였고, 이어서 전체 분자를 회전하는 강성 군으로서 먼저 정밀화한 다음, H-원자를 라이딩 모델로 처리하였다. 남아있는 H-원자 (H7A 및 H142)를 짧은 0...0 벡터를 따라 놓았다. 푸리에 맵에는 O42 및 O43 상의 H-원자에 대한 어떠한 증거도 존재하지 않았으며, 그들을 배치하려는 시도는 다른 H-원자와의 불합리하게 짧은 H...H 접촉을 발달시켰다.

[0096] 마지막 '전형적인' R-인자 $[F > 4\sigma(F)]$ 를 이용하여 F 및 7355 데이터를 기준으로 함]는 0.0616이었다. 다른 결정 및 정밀화 파라미터는 하기 표 6에 나열되어 있다.

표 6

결정성 제니스타인 나트륨 염 이수화물에 대한 단일 결정 데이터 및 구조 정밀화

A. 결정 데이터	
실험식	$C_{60}H_{54}Na_2O_{28}$, $C_{30}H_{32}Na_2O_{16}$, $2(C_{15}H_9O_5)$, $2(H_2O)$
화학식량	1269.01
파장	0.71073 Å
온도	150(2) K
결정계	삼사정계
공간 군	P-1
단위 셀 치수	$a = 7.524(2)$ Å 알파 = $89.762(7)$ deg. $b = 11.646(3)$ Å 베타 = $82.902(10)$ deg. $c = 30.464(6)$ Å 감마 = $88.073(10)$ deg.
부피	$2647.4(12)$ Å ³
셀에 대한 반사 수	7324 ($2.5 < \theta < 25$ deg.)
Z	2
밀도 (계산치)	1.592 Mg/m ³
흡수 상수	0.141 mm ⁻¹
F(000)	1320
B. 데이터 수집	
결정 설명	무색의 침상 외가지
결정 크기	0.70 x 0.16 x 0.10 mm
기구	브루커 스마트 아펙스 CCD
데이터 수집을 위한 θ 범위	0.67에서 24.55 deg.
지수 범위	$-8 \leq h \leq 8$, $-13 \leq k \leq 13$, $-35 \leq l \leq 35$
수집된 반사	33227
독립적인 반사	8758 [$R(int) = 0.0574$]
스캔 유형	오메가
흡수 보정	멀티스캔, ($T_{min} = 0.804$, $T_{max} = 0.984$)
C. 용액 및 정밀화	
용액	직접 (SHELXS-97 (셸드릭(Sheldrick)), 2008)
정밀화 유형	F ² 상에서 풀-매트릭스 최소-자승법
정밀화에 사용된 프로그램	SHELXL-97
수소 원자 배치	geom/difmap
수소 원자 처리	라이팅/회전 군
데이터 / 제한 / 파라미터	8758/1636/580
F ² 상에서 적합도	1.088
전형적인 R [$F > 4\sigma(F)$]	$R1 = 0.0616$ [7355 데이터]
중량측정된 R (F ² 및 모든 데이터)	$wR2 = 0.1489$
마지막 최대 델타/시그마	0.073
중량측정 식	$calc\ w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0.0598P)^2 + 2.2931P]$ 여기서 $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$
가장 큰 회절 피크 및 홀	0.316 및 -0.310 e.Å ⁻³

[0097]

[0098]

논의: 결정성 제니스타인 나트륨 염 이수화물의 단결정 구조는 화합물이 전체 화학식 $[Na_2(H_2O)_4(\mu-H_2O)_2(LH)_2]L_2 \cdot 2H_2O$ (여기서 LH는 전부 양성자화된 제니스타인 리간드 $C_{15}H_{10}O_5$ 이고, $\mu-H_2O$ 는 Na 이온 사이의 가교 물 분자임 (즉, Na 이온은 2개의 말단 물 및 2개의 가교 물 (지정된 $\mu-H_2O$), 또한 1개의 LH 리간드에 각각 결합됨, 도 9 참조))를 가짐을 보여준다. 이러한 결론은 상기 기재된 H-원자 배치 모델에 좌우된다. X-선 데이터를 사용하는 수소 원자 배치는 통상 시험적인 것으로 여겨지며, 구조 분석 동안 마주칠 수 있는 문제들 때문에 본원에서는 더욱 그러하다. 언급된 바와 같이, 제한된 H-원자 위치는 기하학적으로 정상인 수소 결합에 관여하는 모든 H-원자와 가능성 있는 H-결합 세트를 형성한다.

[0099]

도 9에 도시된 바와 같이, 양이온성 나트륨 착체는 역전 중심을 가로질러 형성된 이량체 유닛으로 이루어져 있다. 나트륨 이온은 5-좌표이고, 좌표 구는 2개의 말단 및 2개의 가교 물 리간드 및 1개의 LH 리간드로 이루어져 있다. 수소 결합은 연결 알콜 잔기와 말단 물 분자 중 하나 사이에 형성된다 (H141...01 및 H141...04). L^- 이온은 페놀성 O42 및 O43 부위에서 탈양성자화된다. C-O⁻ 거리는 매우 짧다 (평균 1.34 Å). 내부 수소 결합은 H6*과 O8* 사이, 연결 LH와 L^- 음이온 사이에 형성된다.

- [0100] 도 9는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 이량체 구조 내 중심대칭 이나트륨 양이온을 예시하며, 여기서 분자내 수소 결합은 점선으로 도시된다.
- [0101] 결정 내의 팩킹은 수소 결합에 의해 지배된다. 양이온은 물 분자를 통해 음이온에 연결되어, 양이온과 음이온 사이의 적층결합 상호작용을 또한 특징으로 하는 층을 형성한다. 도 10은 011 기준의 양이온 및 012 기준의 음이온을 포함하는 하나의 상기 층을 도시한다. 터키석에서의 물 분자가 도시되어 있다. 조망은 [010]을 따른다.
- [0102] 013 및 014 기준의 분자로 구성된 유사층이 또한 형성되고, 두 유형의 층이 b-축을 따라 교대하며, H-결합에 의해 연결된다. 도 11은 3차원 네트워크로서 전체 그림을 예시한다. 도 11은 [100] 방향을 따라 보이는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 팩킹을 예시한다.
- [0103] PLATON/MISSYM 절차를 사용하는 분석은 유기 단편들이 스스로 작은 ($1324 \text{ \AA}^3$) 셀 및 공간 군 $P2_1/c$ 를 사용하여 설명될 수 있음을 나타내고, 이러한 대칭을 파괴하는 것은 단지 나트륨 이온 및 물 분자이며, 이는 회절 패턴에서 강한 데이터 및 약한 데이터의 패턴, 및 정밀화에서 경험한 가대칭 문제들을 설명한다.
- [0104] 단결정 데이터를 기준으로 계산된 XRPD 패턴 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물에 대한 구조는 도 12에 도시되어 있다. 하기 표 7은 계산된 XRPD 패턴에서의 피크를 나열한다. 피크의 전체 목록 또는 이의 하위세트는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 12로부터 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 특성화하기 위해 개별적으로 또는 조합으로 사용될 수 있는 피크의 한 하위세트는 5.8, 11.6, 15.2, 17.6, 25.1, 28.4, 28.8, 및 $29.2^\circ 2\theta \pm 0.2^\circ 2\theta$ 를 포함한다.

표 7

위치 [2θ]	d-간격 [$\text{\AA}$]	상대 강도 [%]
5.8	15.1	23.520
8.1	10.9	5.770
11.6	7.6	12.620
15.2	5.8	69.700
17.6	5.0	5.570
23.7	3.8	4.540
24.6	3.6	35.590
25.0	3.6	32.830
25.1	3.6	97.090
25.1	3.6	98.070
25.1	3.5	100.000
25.2	3.5	73.730
25.3	3.5	14.020
25.3	3.5	9.220
25.7	3.5	7.900
25.8	3.5	10.480
28.4	3.1	23.020
28.5	3.1	15.880
28.8	3.1	10.520
28.8	3.1	27.560
29.2	3.1	23.560
29.2	3.1	22.670
32.3	2.8	7.540

- [0105]
- [0106] 1.13 수컷 스프라그-돌리(Sprague-Dawley) 래트에서 십이지장내 및 정맥내 투여 후, 제니스테인 단독 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 생체이용률
- [0107] 생체내 연구를 위한 투여 용액의 제조: 제니스테인 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 실온에서 건조제 하에 저장하고, 광으로부터 보호하였다. 투여 용액은 투여하는 날 분말로부터 새로이 제조하였다. 정맥내 투여 (IV)를 위한 투여 용액은 50:50 DMSO:염수에서 1 mg/mL (유리 산)로 제조하였다. 십이지장내 투여 (ID)를 위한 투여 용액은 물 중 0.2% 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스 (Na CMC) 용액에서 2 mg/mL (제니스테인 유리

산)로 제조하였다.

[0108] 동물 투여: 단식시킨 수컷 스프라그-돌리 래트에서 제니스테인의 약역학을 평가하였다. 혈액 샘플링을 위해 각각의 동물에 경정맥 캐놀라 (JVC)를 찌팅시켰다. 정맥내 투여를 위해 의도된 동물은 투여량의 투여를 위해 추가의 JVC를 찌팅시켰다. 십이지장내 투여를 위해 의도된 동물은 투여량의 투여를 위해 십이지장내 캐놀라 (ID C)를 찌팅시켰다. 외과적으로 변형된 동물을 우리마다 한마리씩 집어넣었다. 모든 동물에게 연구 개시 전 시판용 설치류 식이 (랩다이어트(LabDiet), 인증된 설치류 다이어트 #5002)를 무제한으로 공급하였다. 이어서, 연구 전 및 연구 중 최소 12시간 동안, 투여 후 8시간 (음식물이 회수될 때)까지 동물로부터 음식을 보류하였다. 물은 무제한으로 공급하였다.

[0109] 십이지장내 투여 용액은 투여하는 날 0시에 단일 볼루스 투여량으로 투여하였다. 정맥내 투여는 대략 1분에 걸쳐 느린 IV 주사로서 투여하였다. 혈액 샘플링 시간은 주입 말기에 시작하였다. 혈액 샘플을 수집하였다. 연구 디자인은 하기 표 8에 제시되어 있다.

표 8

래트에서 제니스테인 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 비교 약역학 연구의 개요

처리군	시험 화합물	투여 경로	투여량 (mg/kg)	투여 용액 농도 (mg/ml)	투여 부피 (ml/kg)	비히탈	혈액 샘플링 시점
1	제니스테인	ID	20	10	2	물 중 0.2% NACMC	투여전, 15, 30 분, 1, 2, 3, 4, 6, 8 및 24시간
2	결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물	ID	20	10	2	물 중 0.2% NACMC	투여전, 15, 30 분, 1, 2, 3, 4, 6, 8 및 24시간
3	제니스테인	IV	1	1	1	염수 중 50% DMSO	투여전, 2, 5, 15, 30 분, 1, 2, 3, 4, 8 및 24시간
4	결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물	IV	1	1	1	염수 중 50% DMSO	투여전, 2, 5, 15, 30 분, 1, 2, 3, 4, 8 및 24시간

[0110]

[0111] 각각의 혈액 샘플을 경정맥 캐놀라를 통해 래트로부터 수집하고, 항응고제로서 헤파린나트륨을 함유하는 냉각 폴리프로필렌 튜브에 넣었다. 샘플을 4℃의 온도에서 5분 동안 13,000 rpm의 속도로 원심분리하였다. 샘플을 처리 동안 냉각상태로 유지하였다. 각각의 혈장 샘플을 2개의 분취액으로 분할하였다. 첫번째 분취액은 50 μ L의 혈장을 함유하였다. 모든 남아있는 혈장 부피는 두번째 분취액에 사용되었다. 이어서, 샘플을 드라이아이스 상에 놓고, 냉동기 세트에 저장하여 -60℃ 내지 -80℃로 유지하였다. 혈장 샘플 중 제니스테인의 총 농도는 글루쿠로나이디드/아릴sulphatase 효소 혼합물과 함께 밤새 인큐베이션한 후 LC-MS/MS에 의해 분석하였다. 약역학 파라미터는 윈논린(WinNonlin) 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.

[0112] 혈장 샘플의 분석: 래트 혈장에서의 제니스테인의 측정을 위한 LC-MS/MS 분석 방법을 개발하였다. 샘플 분석 전에, 표준 곡선을 분석하여 방법의 특이성, 범위 및 선형도를 측정하였다. 혈장 샘플 중 총 제니스테인은, 모든 샘플을 β -글루쿠로나이디드/아릴sulphatase 효소를 이용하여 전처리하고 분석 전에 인큐베이션함으로써 측정하였다. 효소 혼합물과의 인큐베이션은 제니스테인의 임의의 글루쿠로나이드 또는 sulphaite 대사물질을 다시 모 형태로 비접합시켰다.

[0113] LC-MS/MS 분석을 위한 승인 기준: 1개의 표준 곡선을 각각의 분석 진행에 걸쳐 분산시켰다. 표준물질의 5/8 이상은, 진행을 통과시키기 위해, $\pm 25\%$ 가 허용되는 LLOQ를 제외하고는 $\pm 20\%$ 이내로 정확해야 한다.

[0114] 약역학 분석: 제니스테인에 대한 개별 혈장농도 대 시간 데이터를 약역학 프로그램 윈논린 v.4.1을 사용하여 비-구획 분석에 제공하였다. 정량 한계 (10 ng/mL) 미만의 혈장 농도는 단지 PK 분석을 위해 0의 값으로 지정되었다.

[0115] 결과: 도 13에 도시된 바와 같이, 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물과 비교되는 제니스테인의 평균 혈장 농도 및 PK 프로파일은 ID 투여 후 현저히 상이하였다. 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 염으로부터의 제니스테인의 평균 피크 혈장 농도 (C_{max})는 제니스테인의 피크 혈장 농도에 비해 4.2배 높았으며, 각각 8330 ± 2176 ng/mL 및 1983 ± 1130 ng/mL이었다. 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 ID 투여 후 15분 내에 이미 제니스테인의 최대 혈장 농도 (C_{max})가 관찰된 반면, 제니스테인의 C_{max} 는 투여 후 2시간에 관찰되었다 (도 13 및 표 10). 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물로부터의 제니스테인 생체이용률은 $55 \pm 16\%$ 이었으며, 이에 비해 제니스테인의 경우 $16 \pm 4.4\%$ 였다 (표 9).

표 9

각 형태의 20 mg/Kg의 십이지장내 투여 후 약역학 파라미터 (평균±표준편차, n = 3)

PK 파라미터	제니스테인	결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물
C_{max} (ng/ml)	1983 ± 1130	8330 ± 2176
t_{max} (h)	2.0 ± 0	0.83 ± 1.0
AUC_{last} (h·kg·ng/ml/mg)	414 ± 111	1161 ± 358
생체이용률 (%)	16 ± 4.4	55 ± 16

[0116]

[0117] 하기 표 10에 제시된 바와 같이, IV 투여 후 제니스테인 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 약역학 프로파일은 두 형태간에 유의하게 상의하지 않았다.

표 10

각 형태의 1 mg/kg의 정맥내 투여 후 약역학 파라미터 (평균±표준편차, n = 3).
 $t_{t=0}$ 으로 외삽

PK 파라미터	제니스테인	결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물
C_0 (ng/ml) ¹	6617 ± 1059	6640 ± 1223
$T_{1/2}$ (h)	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.9
CL (L/h/kg)	0.40 ± 0.09	0.47 ± 0.08
Vss (L/kg)	0.40 ± 0.06	0.36 ± 0.09
AUC_{last} (h·kg·ng/ml/mg)	2533 ± 638	2129 ± 331
AUC_{∞} (h·kg·ng/ml/mg)	2584 ± 639	2189 ± 356

[0118]

[0119] 1.14 제니스테인과 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 사이의 물리화학적 특성 및 동적 및 평형 용해도

[0120] 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 EtOH/dH₂O 용액에서 제니스테인과 비교하여 우수한 초기 및 후기 고유 동적 용해도 프로파일을 보여준다. 100% EtOH에서 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 낮은 후기 고유 동적 용해도는 용매의 비-생리학상 성질하에 전임상 개발을 위한 실제적인 암시를 덜 갖는다.

[0121] 실험: 제니스테인 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 슈퍼솔(SuperSol) 1000 (PREVENTOR GmbH) 용해도 검정에서 진행시키고, 화합물의 농도를 유통(flow-through) 측정 챔버에서 250 nm의 파장으로 흡광도를 측정함으로써 폐쇄계에서 시간에 따라 측정하였다. 두 화합물 모두 순수한 탈이온화 H₂O에서 현탁액을 형성하기 때문에, 100% EtOH 용액 뿐만 아니라 유럽 약전 지침 01/2008, 섹션 2.9.3., 표 2.9.3.5에 따른 dH₂O와 EtOH의 혼합물, 구체적으로 EtOH 50/50 (vol/vol)와 EtOH/dH₂O 75/25 (vol/vol)의 혼합물로부터 물리화학적 성질을 평가

하였다.

하기 파라미터를 측정하였다:

$t_{[MSS]}$ 정의: 분석 시작부터 최대 가용화 속도까지의 시간 (분)

$C_{[MSS]}$ 정의: 최대 가용화 속도에서의 농도로서 표현되는 초기 동적 용해도 ($mg \times l^{-1}$)

$C_{[Eq]}$ 정의: 평형 동적 용해도에서의 농도로서 표현되는 후기 동적 용해도 ($mg \times l^{-1}$)

$t_{[Eq]}$ 정의: 분석 시작부터 평형 동적 용해도까지의 시간 (분)

$\Delta C [C_{Eq}-C_{MSS}]$ 정의: 상기 정의된 바와 같은 초기 및 후기 동적 용해도 사이의 농도 차이 ($mg \times l^{-1}$)

$\Delta t [C_{Eq}-C_{MSS}]$ 정의: 초기 및 후기 동적 용해도 종말점 사이의 시간 차이 (분)

MSS 정의: $C_{[MSS]} / t_{[MSS]}$ 로 정의되는 최대 가용화 속도 ($mg \times l^{-1} \times 분^{-1}$)

$|S|$ 정의: $\Delta C [C_{Eq}-C_{MSS}] / \Delta t [C_{Eq}-C_{MSS}]$ 로 정의되는 고유 용해도 지수

$|S|$ 값이 높을수록, 가용화가 빨라지고, 후기 고유 동적 평형 용해도 $C_{[Eq]}$ 의 상대적 기여도가 강해진다.

KSR 정의: $C_{[MSS]} / C_{[Eq]}$ 로 주어지는 동적 용해도 비율.

KSR은 전체 후기 동적 평형 용해도에 대한 초기 동적 용해도의 상대적 기여도의 수치 비율 지시자이다. KSR 값이 높을수록, 초기 동적 용해도 $C_{[MSS]}$ 의 상대적 기여도가 강해진다.

결과: 제니스테인 및 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 열역학적 동적 및 평형 용해도 데이터를 표 11, 12, 및 13에서 보고된 조건하에서 평가하였다.

표 11에서 보여주듯이, 제니스테인은 (a) 양호한 MSS, (b) 허용되는 KSR 및 (c) 양호한 후기 용해도 프로파일을 나타낸 한편, 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 (a) 탁월한 MSS (b) 탁월한 KSR 및 (c) 양호한-내지-허용되는 $|S|$ 를 보여주었다. EtOH/dH₂O 50/50 (부피/부피)에 대해서는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물이 가장 우수한 초기 고유 동적 용해도 프로파일을 보여주었다.

표 11

EtOH/dH₂O 50/50 (부피/부피)

	MSS	$t_{[MSS]}$	$C_{[MSS]}$	$C_{[Eq]}$	$t_{[Eq]}$	ΔC $[C_{Eq}-C_{MSS}]$	Δt $[C_{Eq}-C_{MSS}]$	$ S $	KSR
제니스테인	12.18	0:61	7.43	12.87	4:12	5.44	3:51	1.55	0.58
결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물	20.66	0:71	14.67	17.40	5:28	2.73	4:57	0.60	0.84

표 13에서 보여주듯이, EtOH/dH₂O 75/25 (부피/부피)에 대해서는, 제니스테인은 (a) 양호한 MSS, (b) 양호한 KSR 및 (c) 양호한 후기 용해도 프로파일을 보여주었다. 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 가장 우수한 초기 및 후기 동적 용해도 프로파일인 (a) 탁월한 MSS (b) 탁월한 KSR 및 (c) 탁월한 $|S|$ 를 보여주었다.

표 12

EtOH/dH₂O 75/25 (부피/부피)

	MSS	t _[MSS]	C _[MSS]	C _[Eq]	t _[Eq]	ΔC [C _{Eq} - C _{MSS}]	Δt [C _{Eq} - C _{MS}]	ISI	KSR
제니스테인	19.67	0:44	8.52	14.03	4:15	5.51	3:71	1.49	0.61
결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물	37.33	0:30	11.20	15.86	4:01	4.66	3:71	1.26	0.71

[0138]

[0139]

표 13에서 보고된 바와 같이, EtOH 100%에서, 제니스테인은 (a) 양호한 MSS, (b) 허용되는 KSR 및 (c) 양호한 후기 용해도 프로파일을 보여주었고, 이에 비해, 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 (a) 탁월한 MSS (b) 탁월한 KSR 및 (c) 좋지 못한 ISI를 보여주었다. 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물은 가장 우수한 초기 고 유 동적 용해도 프로파일을 보여주었지만, 전체 프로파일에는 조금 기여하였다.

표 13

EtOH 100%

	MSS	t _[MSS]	C _[MSS]	C _[Eq]	t _[Eq]	ΔC [C _r -C _{MSS}]	Δt [C _{Eq} -C _{MS}]	ISI	KSR
제니스테인	23.81	0:24	5.81	13.79	4:03	7.98	3:79	2.11	0.42
결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물	36.90	0:29	10.85	11.20	5:14	0.35	4:85	0.07	0.97

[0140]

[0141]

1.15 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 대규모 합성

[0142]

합성: 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 킬로그램 단위로 하기 절차에 따라서 제조하였다:

[0143]

1. 2-프로판올 (IPA) 5.2 kg 및 중성 제니스테인 320 g을 15 L 유리 반응기에 넣었다.

[0144]

2. 혼합물의 온도를 22±3℃로 조절하고 2M 수성 NaOH 632 g을 약 40 분 동안 22±4℃에서 적가하였다.

[0145]

3. 혼합물을 22±4℃에서 약 19 시간 동안 진탕시키고 약 15℃로 냉각시키고 4시간 동안 진탕시켰다.

[0146]

4. 혼합물을 온도 사이클 (15±3℃ -> 1 시간 동안 35±3℃ -> 4시간 동안 35±3℃ -> 1 시간 동안 15±3℃ -> 4시간 동안 15±3℃)에서 약 90 시간 동안 진탕시키고 최종적으로 15±3℃에서 약 4.5 시간 동안 진탕시켰다.

[0147]

5. 침전된 생성물을 여과하고 예비-냉각시킨 2-프로판올 1.2 kg으로 세척하였다.

[0148]

6. 여과된 생성물을 진공 접시 건조기에서 초기에는 진공 없이 30℃의 고정 온도에서 약 19 시간 동안, 이어서 40℃의 고정 온도에서 약 20 시간 동안, 이어서 50℃의 고정 온도에서 약 24시간 동안, 이어서 60℃의 고정 온도에서 약 16 시간 동안, 그리고 최종적으로 70℃의 고정 온도에서 약 10 시간 동안 KF-역가측정에 의해 측정되는 물 함량이 표준 사양에 부합될 때까지 건조시켰다.

[0149]

7. 최종적으로, 생성물 (0.24 kg)을 갈아서 PE-백에 포장하였다.

- [0150] 임의의 재결정화 절차 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 하기 절차에 따라서 재결정화시켰다:
- [0151] 1. 상기에 따라 제조된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 24 g을 에탄올 240 mL에 첨가하였다.
- [0152] 2. 이 혼합물을 약 30 분 동안 250 rpm에서 교반하고 45℃에서 가열하였다.
- [0153] 3. 생성된 용액을 실온으로 냉각시켰다.
- [0154] 4. 이어서 헵탄을 분취액으로 (하기에 나열됨), 1 분당 1 분취액으로 첨가하였다. 각각의 첨가 사이에 40 rpm에서 간헐적인 교반을 사용하였다.
- [0155] · 헵탄 4.151 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0156] · 헵탄 3.272 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0157] · 헵탄 5.209 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0158] · 헵탄 3.505 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0159] · 헵탄 3.885 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0160] · 헵탄 5.465 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0161] · 헵탄 6.314 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0162] · 헵탄 6.656 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0163] · 헵탄 8.258 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0164] · 헵탄 6.969 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0165] · 헵탄 11.115 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0166] · 헵탄 10.750 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0167] · 헵탄 14.219 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0168] · 헵탄 9.261 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0169] · 헵탄 14.913 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0170] · 헵탄 13.471 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0171] · 헵탄 15.753 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0172] · 헵탄 19.172 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0173] · 헵탄 23.441 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0174] · 헵탄 25.503 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0175] · 헵탄 26.856 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0176] · 헵탄 28.126 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0177] · 헵탄 28.070 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0178] · 헵탄 36.738 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0179] · 헵탄 35.989 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0180] · 헵탄 49.677 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0181] · 헵탄 50.145 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0182] · 헵탄 32.579 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0183] · 헵탄 61.538 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0184] · 헵탄 57.143 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.

- [0185] · 헵탄 51.948 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0186] · 헵탄 90.909 mL을 첨가하고 40 rpm에서 간헐적으로 교반하였다.
- [0187] 5. 이어서 샘플이 결정화되도록 밤새 실온에 놓아두었다 (약 18 시간).
- [0188] 6. 결정성 생성물을 진공 여과에 의해 수집하였다.
- [0189] 7. 이어서 결정성 생성물을 약 21 시간 동안 건조시키는 한편, 탈수의 위험을 피하기 위해서 칼 피셔 (Karl Fischer) 역가측정으로 물 함량을 모니터링 하였다.
- [0190] 도 14는 재결정화된 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서의 XRPD 패턴의 피크가 표 14에 나열되어 있다. 나열된 피크 전부, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 14로부터 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 6.0, 7.1, 11.8, 11.9, 15.3, 17.8, 21.3, 25.0, 28.3, 28.6, 및 $29.1^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 을 포함한다. 바람직한 피크의 하위세트는 6.0, 7.1, 15.3, 25.0 및 3가지 피크 28.3, 28.6, 및 $29.1^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 중 2가지 이상 및 6.0, 7.1, 15.3, 25.0 및 $28.3^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 를 포함한다.

표 14

위치 [$^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$]	d-간격[Å]	상대 강도[%]
6.0	14.6	33.53
7.1	12.4	21.77
8.3	10.7	5.53
11.8	7.5	15.05
11.9	7.4	12.04
15.3	5.8	90.11
15.6	5.7	5.91
17.8	5.0	17.38
19.3	4.6	7.99
21.3	4.2	10.78
22.1	4.0	4.67
23.4	3.8	5.61
23.7	3.8	9.49
24.5	3.6	35.37
25.0	3.6	100
25.4	3.5	9.09
25.6	3.5	16.02
25.8	3.5	18.24
27.6	3.2	6.76
28.3	3.2	21.60
28.6	3.1	22.15
29.1	3.1	20.45
29.9	3.0	5.12
30.7	2.9	12.80
30.8	2.9	9.80
32.1	2.8	5.32
35.4	2.5	8.63
35.7	2.5	8.78
36.6	2.5	5.38
39.1	2.3	5.66
40.5	2.2	6.66
41.0	2.2	8.72
41.1	2.2	7.29
41.9	2.2	8.62
42.6	2.1	8.97

[0191]

[0192] 실시예 2 - 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물

- [0193] 2.1 제니스테인 칼륨 염의 제조: 제니스테인 약 300 mg을 IPA 6 cm³ (20배 부피)에 넣었다. 1M 수산화칼륨 (KOH)을 첨가한 결과 슬러리의 반응이 눈에 띄었다 (즉, 슬러리가 투명 용액이 됨). 혼합물이 주위 온도에서 약 3 시간 동안 교반되도록 하였고, 이때 침전이 눈에 띄었다. 이어서, 혼합물을 주위 온도에서 약 2일 동안 (주말) 가만히 놓아두었다. 고체를 여과에 의해 분리시키고 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조되도록 하였다.

[0194] 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물은 무정형 칼륨 염으로부터 주위 실내 조건하에 공기에 접촉 가능하게 가만히 놓아둘 경우 형성된다. 이는 또한 상기 수화 연구에서 기재된 바와 같이 제니스테인 칼륨 염을 IPA/물 혼합물 중에 슬러리화 시켜서 무정형 칼륨 염으로부터 제조될 수 있고, 이는 물의 흡수에 의해 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물을 형성한다.

[0195] 제니스테인 칼륨 염은, 따라서, 회수 시점에서는 불안정적인 무수 무정형 염으로 보이고, 이때 주위에서 물을 빠르게 흡수하여 이수화물로 결정화된다. 이 결과는 하기에 전부 기재된 광 안정성 시험; 수화 연구; 40℃/75 RH% 연구; 80℃ 저장 연구 및 TGA 시험에 의해 지지된다. 80℃ 저장 연구는 물질이 이 상승된 온도에서 물을 흡수하는 것으로 나타나기 때문에 특히 주목할만 하며; 이는, 수화물이 80℃에서 안정적이라는 것을 시사한다. GVS 데이터 역시 제니스테인 칼륨 염 이수화물이 가장 안정된 형태이고 따라서 개발 가능하다는 것을 가리킨다. 비록 상기 기재된 합성 절차가 이수화물 물질을 직접적으로 산출하는 것은 아니지만, 이는 용매 시스템이 더 높은 물 함량 (즉, 3% 물/IPA)을 포함하도록 추가로 처리 또는 변형시킴으로써 생산될 수 있다. 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물처럼, 분쇄 (milling)에서 탈수의 위험이 80℃ 저장 시험에 의해 다소 완화된다.

[0196] 2.2 무정형 제니스테인 칼륨 염의 XRPD

[0197] 도 15에서 보여지듯이, XRPD 분석은 2.1에서 기재된 바와 같은 생성된 고체 제니스테인 칼륨 염이 무정형 (즉, 피크가 없음) 이라는 것을 밝힌다.

[0198] 2.3 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 XRPD

[0199] 도 16은 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 에서의 XRPD 패턴의 피크는 표 15에 나열되어 있다. 피크 목록 전체, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 16으로부터 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 11.6, 14.5, 14.8, 24.5, 25.2, 27.6, 28.0, 및 $28.4^\circ 2\theta \pm 0.2^\circ$ 를 포함한다. 바람직한 피크의 하위세트는 11.6, 14.5, 24.5, 25.2 및 27.6, 28.0, 및 $28.4^\circ 2\theta \pm 0.2^\circ$ 의 3가지 피크 중 2가지 이상을 포함한다.

표 15

위치 [$2\theta \pm 0.2^\circ 2\theta$]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
11.6	7.6	12.95
14.5	6.1	51.58
14.8	6.0	30.96
18.0	4.9	4.42
22.3	4.0	4.25
22.6	3.9	11.47
24.0	3.7	15.84
24.2	3.7	20.16
24.5	3.6	100
25.2	3.5	19.35
25.6	3.5	8.28
27.0	3.3	11.63
27.1	3.3	12.14
27.6	3.2	31.86
28.0	3.2	29
28.4	3.1	23.21
29.3	3.0	4.53
29.5	3.0	4.67
30.0	3.0	5.34
30.5	2.9	5.25
30.9	2.9	4.46
31.3	2.9	6.03
31.7	2.8	5.5
35.0	2.6	4.76

[0200]

[0201] 2.4 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 PLM

[0202] 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 PLM 분석은 칼륨 염이 결정성이고 침상 형태를 갖는 것을 보여주었다. 바늘은

결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물의 것 보다 더 두껍다.

[0203]

2.5 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 TGA

[0204]

도 17에서 보여주듯이, TGA는 칼륨 염이 수화되었고 물 손실이 약 75℃에서 시작되어, 추가적인 개발에 적합하다는 것을 나타낸다. 중량 감소는 물 2 몰 대 칼륨 1 몰과 일치한다.

[0205]

2.6 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 DSC

[0206]

도 18에서 보여주듯이, DSC는 약 91℃에서 용융되지 않고 탈수되는 것을 나타낸다. 다른 피크는 아마도 분해와 연관이 있을 것이다 (또한 도 16의 TGA에 의해서도 나타남).

[0207]

2.7 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 GVS

[0208]

도 19에서 보여주듯이, GVS 연구는 수화물 형성 (분석 전에 GVS 사이클 탈수화물 물질) 및 최대 16 중량 %의 물 흡착을 나타낸다. 그러나, 20 및 70 RH% (물질의 전형적인 작업 범위) 사이에서 약 3 %만의 수분 변화가 관찰되었다. 이는 제약학적 개발에서 가치있는 특성이다.

[0209]

2.8 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 용해도 연구

[0210]

결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 수성 용해도를 실시예 1.7에 기재된 프로토콜을 사용하여 측정하였다. 표 16은 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물 및 제니스테인의 수성 용해도를 비교한다.

표 16

용매	제니스테인, mg/ml	결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물, mg/ml
물/슬러리 pH 4.5	BDL	0.04
물/슬러리 pH 6.7	BDL	0.057
물/슬러리 pH 7.5	BDL	0.069

[0211]

[0212]

2.9 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 ¹H NMR

[0213]

도 20은 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 ¹H NMR 스펙트럼을 보여준다. 표 17은 ¹H NMR 스펙트럼의 피크를 나열한다. 제니스테인에서 약 5.9에서 도 20의 ¹H NMR에서 6.1 ppm으로 방향족 양성자에 대한 화학적 이동의 변위는 염 형성을 확인해 준다.

표 17

화학적 이동	다중도	범위
7.959	s	8.009 - 7.941
7.375	m	7.437 - 7.322
6.861	m	6.932 - 6.800
6.154	dd	6.246 - 6.068
4.949	s	5.148 - 4.714
3.34	q	3.444 - 3.137
1.182	d	1.228 - 1.149

s =단일항, m =다중항, d =이중항, dd = 이중 이중항, q = 사중항

[0214]

[0215]

2.10 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물의 안정성 연구

[0216]

샘플 안정성을 7일 동안 80℃ 및 7일 동안 40℃/75 RH%에서 시험하였다. 색 변화와 같은 관찰이 7일 후에 보였고 샘플의 XRPD를 7일 후에 취하여 고체 형태의 변화를 조사하였다. 도 21은 7일 동안 80℃에서, 그리고 7일 동안 40℃/75 RH%에서 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물 샘플의 XRPD 패턴을 보여준다. 40℃/75 RH% 연구는 제니스테인 칼륨 염이 결정화되어 제니스테인 칼륨 염 이수화물을 형성하는 것을 나타낸다. 결정성 제니스테인 칼륨 염 이수화물을 80℃에서 7일의 기간 동안 보관하면 제니스테인 칼륨 염 이수화물로 결정화되는 것으로 나

타났다.

2.11 결정성 제니스테인 칼슘 염 이수화물의 수화 연구

결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물 대략 100 mg을 IPA/물 혼합물 (3%, 5% 및 10%) 약 500 μ L에 상기 물 수준으로 넣었다. 각각의 혼합물을 약 48 시간 동안 주위 온도에서 진탕시키고 이어서 여과하여 XRPD 및 TGA 연구를 위해 고체를 회수하였다. 도 22에서 보여주듯이, 수화 연구에서 결정성 제니스테인 칼슘 염 이수화물과 일치하는 수화물이 밝혀졌다.

2.12 결정성 제니스테인 칼슘 염 이수화물의 불균등화 연구

결정성 제니스테인 칼슘 염 이수화물 샘플을 증류수에서 약 48 시간 동안 슬러리화하고 이어서 XRPD로 불균등화를 점검하였다. 코닝 (Corning) 240 pH 미터를 사용하여 상등액의 pH 또한 측정하였다. 불균등화의 흔적은 관찰되지 않았다. 상등액 액체의 pH는 7.3으로 불균등화가 없음을 나타냈다.

실시예 3 - 결정성 제니스테인 칼슘 염

3.1 결정성 제니스테인 칼슘 염의 제조

제니스테인 대략 25 mg을 고체 수산화칼슘 약 7 mg과 같은 용기에 놓았다. 이 고체 혼합물에, IPA/물 (50:50) 500 μ L를 첨가하고, 혼합물을 주위 온도에서 약 24시간 동안 교반하였다. 교반 이후에, 이어서 슬러리를 약 72시간 동안 교반하면서 온도 사이클 (4시간 주기로 40°C 에서 주위 온도로) 시켰다. 이어서, 고체를 여과에 의해 분리시키고 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조되도록 하였다.

3.2 결정성 제니스테인 칼슘 염의 특성화

도 23은 결정성 제니스테인 칼슘 염의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서 XRPD 패턴의 피크는 표 18에 나열되어 있다. 피크 목록 전체, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 칼슘 염 이수화물을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 23으로부터 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 칼슘 염 이수화물을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 8.0, 15.3, 25.1, 및 25.6 $^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 을 포함한다. 결정성 제니스테인 칼슘 염의 TGA는 도 24에서 도시된다. 결정성 제니스테인 칼슘 염의 PLM 상은 바늘 모양의 결정체를 보여주었다.

표 18

위치 [$^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
5.4	16.2	21.82
8.0	11.0	98.01
9.3	9.5	17.32
15.3	5.8	100.00
15.5	5.7	17.27
16.0	5.6	31.04
16.3	5.5	24.40
16.8	5.3	6.33
18.5	4.8	17.43
19.0	4.7	6.23
20.3	4.4	16.69
21.5	4.1	5.44
22.5	3.9	7.30
22.7	3.9	14.06
23.0	3.9	7.86
24.1	3.7	6.61
25.1	3.5	37.75
25.6	3.5	72.44
26.1	3.4	15.90
27.8	3.2	20.14
29.2	3.1	23.14
29.5	3.0	34.31
30.0	3.0	15.01
33.5	2.7	19.69

[0227] 실시예 4 - 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 1 당량 조제물

[0228] 4.1 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 1 당량의 제조

[0229] 제니스테인 대략 25 mg을 고체 수산화마그네슘 약 5.5 mg과 같은 용기에 넣었다. 고체 혼합물에, IPA/물 (50:50) 500 μ L를 첨가하고, 혼합물을 주위 온도에서 약 24시간 동안 교반하였다. 교반 이후에, 이어서 슬러리를 약 72시간 동안 교반하면서 온도 사이클 (4시간 주기로 40℃ 에서 주위 온도로) 시켰다. 이어서, 고체를 여과에 의해 분리시키고 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조되도록 하였다.

[0230] 4.2 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 1 당량의 특성화

[0231] 도 25는 상기 1 당량 조제물로부터의 결정성 제니스테인 마그네슘 염의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서 XRPD 패턴의 피크는 표 19에 나열되어 있다. 피크 목록 전체, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 마그네슘 염 이수화물을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 25로부터 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 마그네슘 염 이수화물을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 9.0, 18.6, 23.7, 25.7, 및 38.0 $^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 를 포함한다. 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 1 당량 조제물의 TGA는 도 26에서 도시된다. 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 1 당량 조제물의 PLM 상은 제니스테인 마그네슘 염이 결정체인 것을 보여준다.

표 19

위치 [$^{\circ} 2\theta$ $\pm 0.2^{\circ} 2\theta$]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
5.8	15.2	10.51
9.0	9.8	65.09
13.9	6.4	49.78
18.6	4.8	84.23
20.8	4.3	17.43
23.7	3.8	81.78
25.7	3.5	57.42
27.3	3.3	15.2
29.8	3.0	15.46
34.9	2.6	4.44
38.0	2.4	100

[0232]

[0233] 실시예 5 - 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 2 당량 조제물

[0234] 5.1 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 2 당량의 제조

[0235] 제니스테인 대략 25 mg을 고체 수산화마그네슘 약 11 mg과 같은 용기에 넣었다. 고체 혼합물에, IPA/물 (50:50) 500 μ L를 첨가하고, 혼합물을 주위 온도에서 약 24시간 동안 교반하였다. 교반 이후에, 이어서 슬러리를 약 72시간 동안 교반하면서 온도 사이클 (4시간 주기로 40℃ 에서 주위 온도로) 시켰다. 이어서, 고체를 여과에 의해 분리시키고 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조되도록 하였다.

[0236] 5.2 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 2 당량 조제물의 특성화

[0237] 도 27은 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 2 당량 조제물의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서의 XRPD 패턴의 피크는 표 20에 나열되어 있다. 피크 목록 전체, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 마그네슘 염을 특성화하는데 충분할 수 있다. 결정성 제니스테인 마그네슘 염, 2 당량의 TGA 추적 기록은 도 28에서 도시된다.

표 20

위치 [$^{\circ}2\theta$ 0.2 ± 0.2]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
9.0	9.8	30.28
13.9	6.4	20.73
18.6	4.8	81.86
20.8	4.3	12.63
23.7	3.8	38.11
25.7	3.5	28.52
27.3	3.3	8.99
29.7	3.0	9.05
38.0	2.4	100

[0238]

[0239]

1 당량 조제물 및 2 당량 조제물 둘 다로부터의 결정성 제니스테인 마그네슘 염에 대한 유사한 XRPD 패턴 및 TGA 추적 기록은 동일한 결정성 제니스테인 마그네슘 염이 2개의 조제물 모두로부터 얻어졌다는 것을 시사한다. 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 마그네슘 염을 특성화하는데 사용될 수 있는 XRPD 피크의 1개 하위세트는 9.0, 18.6, 23.7, 25.7, 및 38.0 ° 2 θ ± 0.2 ° 2 θ 를 포함한다.

[0240]

실시예 6 - 결정성 제니스테인 L-리신 염

[0241]

6.1 결정성 제니스테인 L-리신 염의 제조

[0242]

제니스테인 대략 25 mg을 고체 L-리신 일수화물 약 15 mg과 동일한 용기에 넣었다. 고체 혼합물에, IPA 또는 톨루엔 500 μ L를 첨가하고, 혼합물을 주위 온도에서 약 24시간 동안 교반하였다. 교반 이후에, 이어서 슬러리를 약 72시간 동안 교반하면서 온도 사이클 (4시간 주기로 40°C 에서 주위 온도로) 시켰다. 이어서, 고체를 여과에 의해 분리시키고 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조되도록 하였다.

[0243]

6.2 결정성 제니스테인 L-리신 염/제니스테인 혼합물의 특성화

[0244]

톨루엔 및 IPA로 부터 결정성 제니스테인 L-리신 염 샘플을 XRPD로 분석하였고 도 30 및 31에서 도시된 XRPD 패턴이 생성되었다. 결정성 제니스테인에 대한 XRPD 패턴 또한 하기에 나타나 있다. XRPD에 의해 나타나듯이, 두 방법 모두 제니스테인 및 제니스테인 L-리신 염의 혼합물을 생성하였다. 도 29는 결정성 제니스테인의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 ° 20 ± 0.2 ° 2 θ 에서 도 29의 XRPD 패턴이 표 21에 나열되어 있다.

표 21

위치[°2θ ± 0.2 °2θ]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
7.5	11.7	81.81
12.2	7.3	15.94
12.8	6.9	52.19
14.3	6.2	27.23
14.6	6.1	28.38
14.8	6.0	30.72
15.0	5.9	11.15
16.0	5.5	52.69
16.6	5.3	15.61
18.1	4.9	100
19.2	4.6	21.11
21.0	4.2	47.41
22.4	4.0	12.28
22.6	3.9	10.2
23.2	3.8	23.76
23.6	3.8	9.17
24.8	3.6	51.75
25.1	3.6	33.66
25.6	3.5	24.89
26.3	3.4	81.12
26.7	3.3	23.35
27.0	3.3	10.41
27.4	3.3	56.24
28.7	3.1	56.15
29.4	3.0	30.44
33.6	2.7	14.28
35.9	2.5	7.63
39.5	2.3	13.43
40.1	2.3	7.68

[0245]

[0246]

6.3 톨루엔으로부터 결정성 제니스테인 L-라이신 염의 특성화

[0247]

도 30은 톨루엔으로부터 결정성 제니스테인 L-리신 염의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서 XRPD 패턴의 피크가 표 22에 나열되어 있다.

표 22

위치[°2 θ ± 0.2 °2 θ]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
5.2	17.1	73.48
7.5	11.7	94.46
10.2	8.7	12.47
12.2	7.2	23.99
12.8	6.9	57.82
14.3	6.2	28.25
14.6	6.1	27.59
14.8	6.0	32.21
15.0	5.9	17.49
16.0	5.5	45.2
16.6	5.3	19.53
18.1	4.9	77.67
18.6	4.8	46.56
19.2	4.6	28.29
19.7	4.5	34.98
20.6	4.3	20.97
21.0	4.2	17.82
21.2	4.2	11.09
22.4	4.0	17.25
22.6	3.9	12.61
23.2	3.8	21.8
23.6	3.8	12.36
24.8	3.6	25.82
25.1	3.6	27.26
25.6	3.5	30.47
26.3	3.4	100
26.7	3.3	23.56
27.0	3.3	14.34
27.4	3.3	50.01
27.9	3.2	6.19
28.7	3.1	46.23
29.4	3.0	40.47
32.9	2.7	9.67
33.6	2.7	12.33
36.0	2.5	7.24
36.3	2.5	7.15
39.5	2.3	5.12
40.0	2.3	6.87

[0248]

[0249]

6.4 IPA로부터 결정성 제니스테인 L-리신 염의 특성화

[0250]

도 31은 IPA로부터 결정성 제니스테인 L-리신 염의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 ° 2 θ ± 0.2 ° 2 θ 에서 XRPD 패턴의 피크가 표 23에 나열되어 있다. 결정성 제니스테인 L-리신/제니스테인 혼합물의 TGA는 도 32에서 도시된다. IPA로부터의 제니스테인 L-리신/제니스테인 혼합물의 PLM 상은 톨루엔으로부터 결정성 혼합물의 PLM 상과 마찬가지로 결정성 물질임을 보여주었다.

표 23

위치 [$^{\circ}2\theta$ $\pm 0.2^{\circ}2\theta$]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
5.2	17.1	31.93
7.5	11.7	73.22
12.2	7.2	16.11
12.8	6.9	50.35
14.3	6.2	19.6
14.6	6.1	24.47
14.8	6.0	30.13
16.0	5.5	43.55
16.6	5.3	12.52
18.1	4.9	100
18.6	4.8	28.99
19.2	4.6	20.18
19.7	4.5	24.98
20.6	4.3	18.1
21.0	4.2	14.36
22.4	4.0	9.6
23.2	3.8	22.54
23.6	3.8	9.93
24.8	3.6	16.59
25.1	3.6	22.5
25.6	3.5	25.73
26.3	3.4	70.86
26.7	3.3	17.84
27.0	3.3	12.67
27.4	3.3	43.34
28.7	3.1	38.7
29.4	3.0	28.79
32.9	2.7	6.17
33.4	2.7	6.94
36.3	2.5	7
40.0	2.3	7.5

[0251]

[0252]

이소프로판올 및 톨루엔 둘 다로부터 결정성 제니스테인 L-리신 염의 유사한 XRPD 패턴은 두 조제물에서 동일한 결정성 제니스테인 L-리신 염이 얻어진다는 것을 시사한다. 표 21 또는 22로부터 나열된 피크 전부, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 L-리신 염을 특정짓는데 충분할 수 있다. 도 30 및 31에서 결정성 제니스테인 L-리신 염 XRPD 패턴을 도 29의 결정성 제니스테인의 XRPD 패턴과 비교함으로써, 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 L-리신 염을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 $5.2, 18.6, 19.7, 20.6$ 및 $21.0^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 를 포함한다.

[0253]

실시예 7 - 결정성 제니스테인 N-메틸글루카민 (메글루민) 염

[0254]

7.1 결정성 제니스테인 N-메틸글루카민 염의 제조

[0255]

제니스테인 대략 25 mg을 고체 N-메틸글루카민 약 20 mg과 동일한 용기에 넣었다. 고체 혼합물에, 아세톤 500 μ L을 첨가하고, 혼합물을 주위 온도에서 약 24시간 동안 교반하였다. 교반 이후에, 이어서 슬러리를 약 72시간 동안 교반하면서 온도 사이클 (4시간 주기로 40°C 에서 주위 온도로) 시켰다. 이어서, 고체를 여과에 의해 분리시키고 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조되도록 하였다.

[0256]

7.2 결정성 제니스테인 N-메틸글루카민 염의 특성화

[0257]

도 33은 결정성 제니스테인 N-메틸글루카민 염의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서 XRPD 패턴의 피크가 표 24에 나열되어 있다. 나열된 피크 전부, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 N-메틸글루카민 염을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 33으로부터 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 N-메틸글루카민 염을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 $7.5, 7.8, 12.3, 14.8, 16.5, 17.1, 17.6, 18.8, 19.4, 20.0, 20.8$, 및 $29.1^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 를 포함한다. 바람직한 하위세트는 $12.3, 14.8, 17.6$, 및 $19.4^{\circ} 2\theta \pm 0.2^{\circ} 2\theta$ 에서의 피크를 포함한다.

표 24

위치 [2θ $\pm 0.2^\circ 2\theta$]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
7.5	11.7	8.64
7.8	11.4	8.13
12.3	7.2	13.7
12.8	6.9	3.35
14.0	6.3	17.93
14.8	6.0	4.11
16.0	5.5	4.38
16.5	5.4	8.33
17.1	5.2	7.93
17.6	5.0	47.95
18.1	4.9	5.5
18.8	4.7	21.35
19.4	4.6	100
20.0	4.4	7.27
20.8	4.3	12.4
26.1	3.4	6.87
26.9	3.3	8.11
27.4	3.3	7.6
29.1	3.1	11.01
36.6	2.5	9.51

[0258]

[0259] 실시예 8 - 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (에글루민) 염

[0260] 8.1 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (에글루민) 염의 제조

[0261] 제니스테인 대략 25 mg을 고체 N-에틸글루카민 약 19 mg과 같은 용기에 넣었다. 고체 혼합물에, 아세톤 또는 IPA 500 μ L를 첨가하고, 혼합물을 주위 온도에서 약 24시간 동안 교반하였다. 교반 이후에, 이어서 슬러리를 약 72시간 동안 교반하면서 온도 사이클 (4시간 주기로 40 $^\circ$ C 에서 주위 온도로) 시켰다. 이어서, 고체를 여과에 의해 분리시키고 주위 온도에서 약 24시간 동안 건조되도록 하였다.

[0262] 8.2 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (에글루민) 염의 특성화

[0263] 상기에서 제조된 결정성 제니스테인 n-에틸글루카민 (에글루민) 염 샘플을 XRPD로 분석한 결과 도 34 및 35에서 보여주는 패턴이 형성되었다. 불안정적인 결정성 염이 아세톤 및 IPA 둘 다로부터 확인되었다. 도 34는 아세톤으로부터의 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (에글루민) 염의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^\circ 2\theta \pm 0.2^\circ 2\theta$ 에서 XRPD 패턴의 피크가 표 25에 나열되어 있다. 도 35는 IPA로부터의 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (에글루민) 염의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^\circ 2\theta \pm 0.2^\circ 2\theta$ 에서 XRPD 패턴의 피크는 표 26에 나열되어 있다. 둘 중 임의의 표의 피크 목록 전부, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 나트륨 염 이수화물을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 34 및 35에 기반을 두어 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 N-에틸글루카민 (에글루민) 염을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 7.4, 12.7, 14.7, 16.0, 18.1, 19.0, 19.2, 21.7, 22.1, 및 26.3 $^\circ 2\theta \pm 0.2^\circ 2\theta$ 를 포함한다. 바람직한 피크의 하위세트는 7.4, 12.7, 14.7, 16.0, 18.1, 및 26.3 $^\circ 2\theta \pm 0.2^\circ 2\theta$ 를 포함한다. 아세톤으로부터의 결정성 제니스테인 n-에틸글루카민 염의 TGA 추적 기록은 도 36에서 도시된다. 아세톤으로부터의 제니스테인 n-에틸글루카민 염의 PLM 상은 상기 물질이 결정성인 것을 보여준다.

표 25

위치 [$^{\circ}2\theta$ $\pm 0.2^{\circ}2\theta$]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
7.4	12.0	100
7.5	11.7	14.48
12.7	6.9	25.42
14.7	6.0	34.98
16.0	5.5	8.49
18.1	4.9	9.32
19.0	4.7	26.42
19.5	4.6	43.35
21.7	4.1	72.24
22.1	4.1	22.61
24.1	3.7	6.38
25.2	3.5	10.46
26.3	3.4	19.16
26.6	3.3	7.45
27.4	3.3	7.06
28.3	3.2	6.07
28.7	3.1	8.56
29.3	3.1	9.52
30.2	3.0	11.72
32.0	2.8	7.13
32.1	2.8	6.66
33.7	2.7	4.59
35.3	2.5	7
42.0	2.1	4.96

[0264]

표 26

위치 [$^{\circ}2\theta$ $\pm 0.2^{\circ}2\theta$]	d-간격 [Å]	상대 강도 [%]
7.4	12.0	100
7.5	11.7	49.75
12.8	6.9	37.57
14.7	6.0	42.98
16.0	5.5	19.76
16.6	5.3	8.05
18.1	4.9	27.66
19.0	4.7	32.79
19.2	4.6	12.86
19.4	4.6	48.27
21.7	4.1	80.33
22.1	4.0	24.33
23.2	3.8	8.12
24.8	3.6	7.52
25.0	3.6	14.01
25.2	3.5	15.58
25.6	3.5	14.97
26.3	3.4	84.13
26.7	3.3	27.05
27.4	3.3	24.39
28.6	3.1	33.81
29.3	3.0	11.44
29.4	3.0	16.47
30.2	3.0	14.82
32.0	2.8	10.04
33.7	2.7	6.79
35.3	2.5	8.64
47.1	1.9	7.99

[0265]

[0266] 실시예 9 - 결정성 제니스테인 디에틸아민 염

[0267] 9.1 결정성 제니스테인 디에틸아민 염의 제조

[0268] THF 중의 제니스테인 (THF 19.25 mL 중 520.2 mg)의 스톡 용액 및 THF:EtOH (1:1) 중의 디에틸아민을 제조하였다. 제니스테인의 스톡 용액 및 디에틸아민을 화학량적 양으로 첨가하고 용액을 0.2 μ m 나일론 필터를 통하여 깨끗한 바이알로 여과시키고 주위 조건하에 증발되도록 하였다.

[0269] 9.2 결정성 제니스테인 디에틸아민 염의 특성화

[0270] 2θ 범위가 120° 인 CPS (커브 위치 감지) 검출기가 장비된 이넬 (Inel) XRG-3000 회절계; Cu K α 방사선을 사용하는 시마즈 (Shimadzu) XRD-6000 X-레이 분말 회절계 및 브루커 제네럴 에어리아 디프랙션 디텍션 시스템 (Bruker's General Area Diffraction Detection System)(GADDS, v. 4.1.19)이 장비된 브루커 D-8 디스커버 회절계를 사용하여 상기에 단리된 고체 물질을 XRPD 분석하였다. 구체적인 획득 파라미터는 데이터 부분의 각각 샘플의 패턴에 나열되어 있다. 도 37은 결정성 제니스테인 디에틸아민 염의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $^\circ 2\theta \pm 0.2^\circ$ 2θ 에서 XRPD 패턴의 피크는 표 27에 나열되어 있다. 나열된 피크 전부, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 디에틸아민 염을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 37로부터 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 디에틸아민 염을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 7.4, 8.2, 15.3, 25.3, 및 $28.4^\circ 2\theta \pm 0.1^\circ 2\theta$ 를 포함한다.

표 27

2θ	d 간격 (Å)	강도 (%)
6.7 ± 0.1	13.215 ± 0.200	30
7.4 ± 0.1	11.922 ± 0.163	50
8.2 ± 0.1	10.768 ± 0.133	41
9.1 ± 0.1	9.671 ± 0.107	21
10.0 ± 0.1	8.837 ± 0.089	29
11.2 ± 0.1	7.910 ± 0.071	25
13.4 ± 0.1	6.608 ± 0.049	22
14.9 ± 0.1	5.937 ± 0.040	36
15.3 ± 0.1	5.803 ± 0.038	73
17.1 ± 0.1	5.185 ± 0.030	20
18.0 ± 0.1	4.937 ± 0.027	19
18.3 ± 0.1	4.844 ± 0.026	18
20.1 ± 0.1	4.430 ± 0.022	18
21.1 ± 0.1	4.207 ± 0.020	16
22.4 ± 0.1	3.969 ± 0.018	20
23.4 ± 0.1	3.796 ± 0.016	15
24.7 ± 0.1	3.607 ± 0.014	33
25.3 ± 0.1	3.524 ± 0.014	100
26.5 ± 0.1	3.370 ± 0.013	22
27.0 ± 0.1	3.297 ± 0.012	18
27.8 ± 0.1	3.213 ± 0.011	23
28.4 ± 0.1	3.143 ± 0.011	43
28.7 ± 0.1	3.110 ± 0.011	30
29.3 ± 0.1	3.049 ± 0.010	18

[0271]

[0272] 실시예 10 - 결정성 제니스테인 일수화물

[0273] 10.1 결정성 제니스테인 일수화물의 제조

[0274] 제니스테인의 스톡 용액을 THF 중에서 제조하였다 (THF 17.47 mL 중 472 mg). 제니스테인 스톡 용액 (1 mL)을 유리 바이알에 첨가하고, 이어서 D-글루쿠로닉산 용액 (물 4.33 mL 중 84.1 mg) 1 mL을 첨가하였다. 용액을 주위 조건하에 증발되도록 하였다. 남은 용액을 따라냄으로써 1일 후에 고체를 단리시키고 여과지로 건조 블롯팅 하였다.

[0275] 10.2 결정성 제니스테인 일수화물의 특성화

[0276] 2θ 범위가 120° 인 CPS (커브 위치 감지) 검출기가 장비된 이넬 (Inel) XRG-3000 회절계; Cu K α 방사선을 사

용하는 시마즈 XRD-6000 X-레이 분말 회절계 및 브루커 제네럴 에어리아 디프랙션 디텍션 시스템 (GADDS, v. 4.1.19)이 장비된 브루커 D-8 디스커버 회절계를 사용하여 결정질 제니스테인 일수화물의 XRPD 분석을 수행하였다. 도 38에서 결정성 제니스테인 일수화물의 XRPD 패턴을 보여준다. 실험적 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 에서 XRPD 패턴의 피크는 표 28에 나열되어 있다. 나열된 피크 전부, 또는 그의 하위 세트는 결정성 제니스테인 일수화물을 특성화하는데 충분할 수 있다. 도 38로부터 개별 또는 조합으로, 결정성 제니스테인 일수화물을 특성화하는데 사용될 수 있는 피크의 1개 하위세트는 9.0, 11.3, 13.4, 14.8, 23.1, 25.0, 26.8, 및 $28.5 \pm 0.1^\circ 2\theta$ 를 포함한다.

표 28

2θ	d 간격 (Å)	강도 (%)
9.0 ± 0.1	9.819 ± 0.110	65
11.3 ± 0.1	7.862 ± 0.070	52
13.0 ± 0.1	6.800 ± 0.052	36
13.4 ± 0.1	6.591 ± 0.049	100
14.1 ± 0.1	6.269 ± 0.044	31
14.8 ± 0.1	5.992 ± 0.041	50
18.3 ± 0.1	4.844 ± 0.026	36
22.1 ± 0.1	4.024 ± 0.018	40
22.5 ± 0.1	3.951 ± 0.017	32
23.1 ± 0.1	3.857 ± 0.017	70
23.8 ± 0.1	3.741 ± 0.016	36
24.0 ± 0.1	3.709 ± 0.015	34
24.7 ± 0.1	3.612 ± 0.014	34
25.0 ± 0.1	3.562 ± 0.014	55
25.9 ± 0.1	3.436 ± 0.013	45
26.8 ± 0.1	3.331 ± 0.012	61
27.8 ± 0.1	3.209 ± 0.011	25
28.5 ± 0.1	3.136 ± 0.011	54
29.0 ± 0.1	3.081 ± 0.010	26

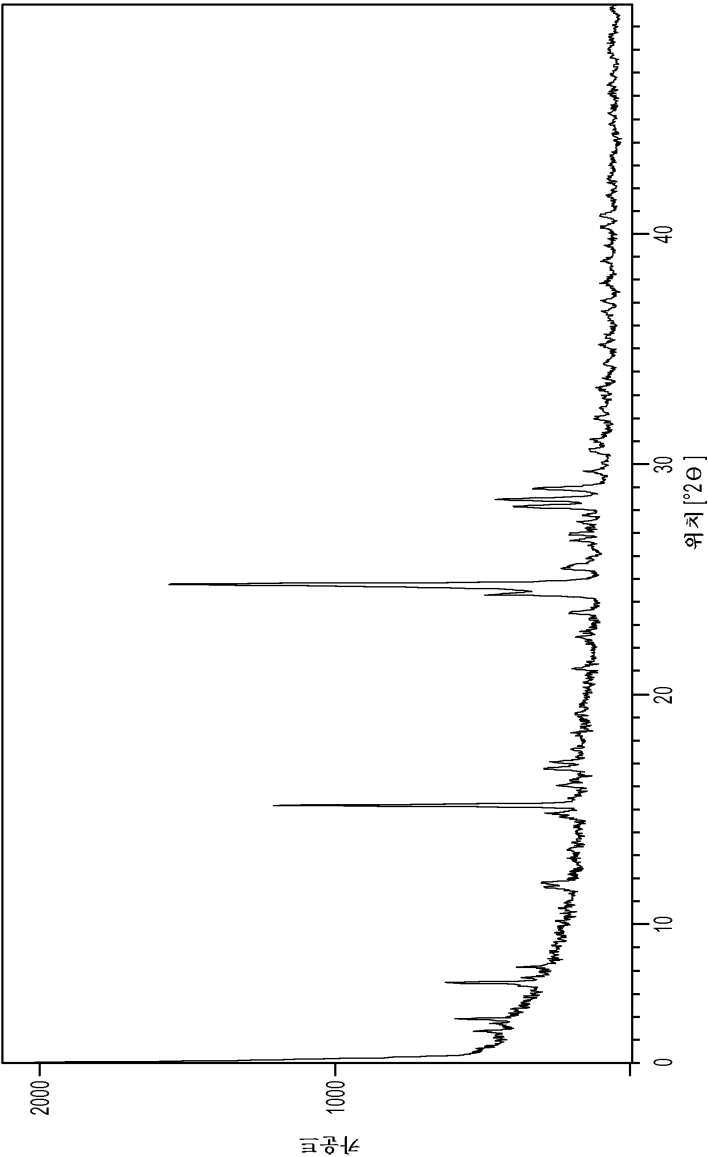
[0277]

[0278]

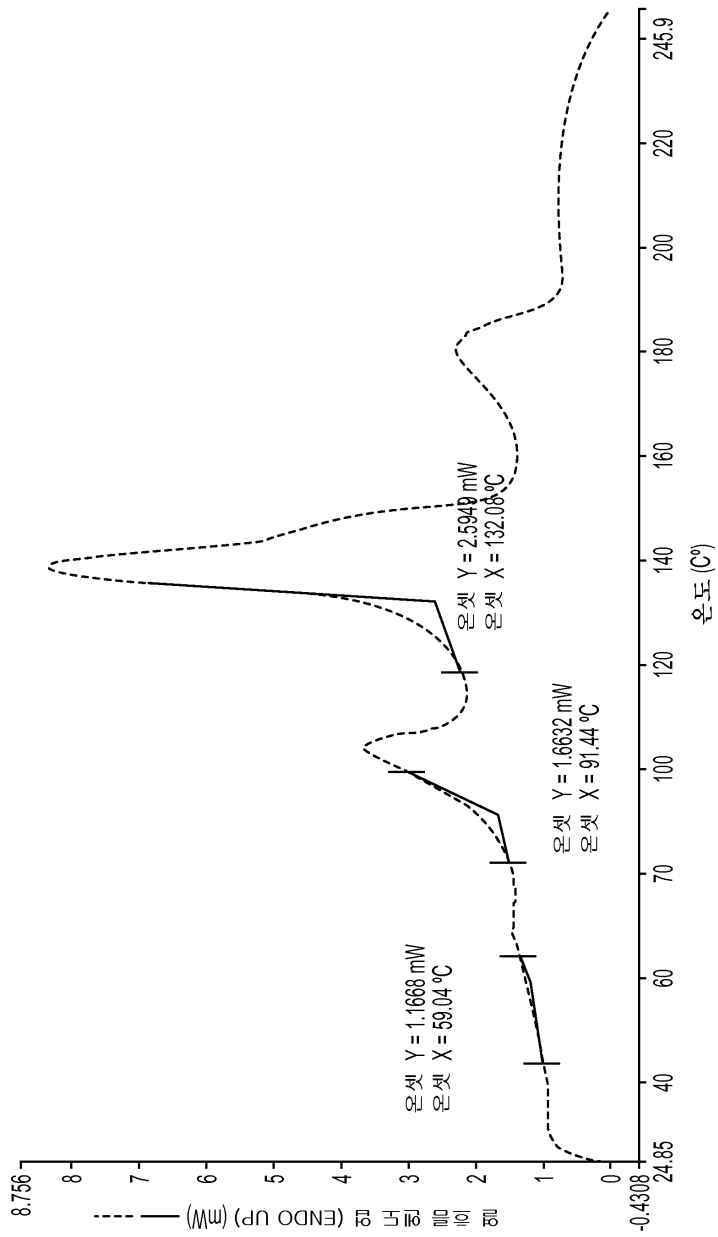
TA 인스트루먼트 (Instruments) 2950 열중량 분석기를 사용하여 결정성 제니스테인 일수화물의 열중량 분석 (TGA)을 수행하였다. 도 39는 결정성 제니스테인 일수화물 샘플의 TGA 추적 기록을 보여준다. 열중량 분석은 샘플이 6 중량%의 휘발성 성분을 함유하는 것을 나타냈고, 이는 일수화물에 상당한다.

도면

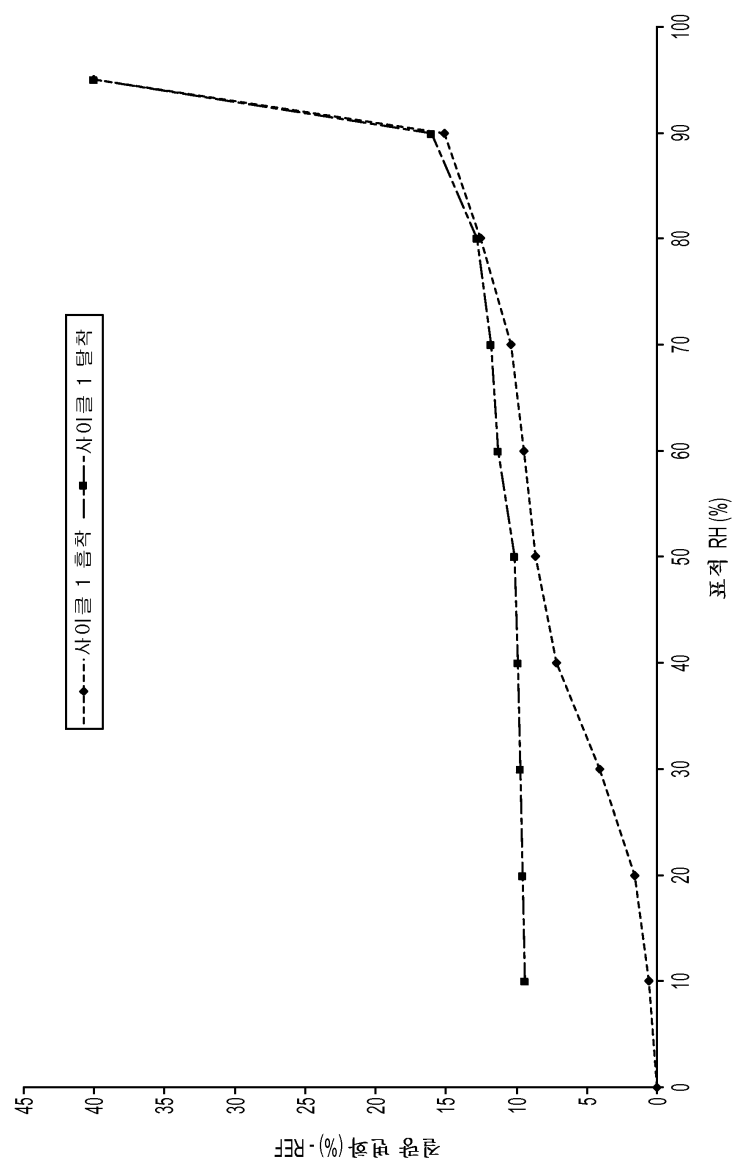
도면1



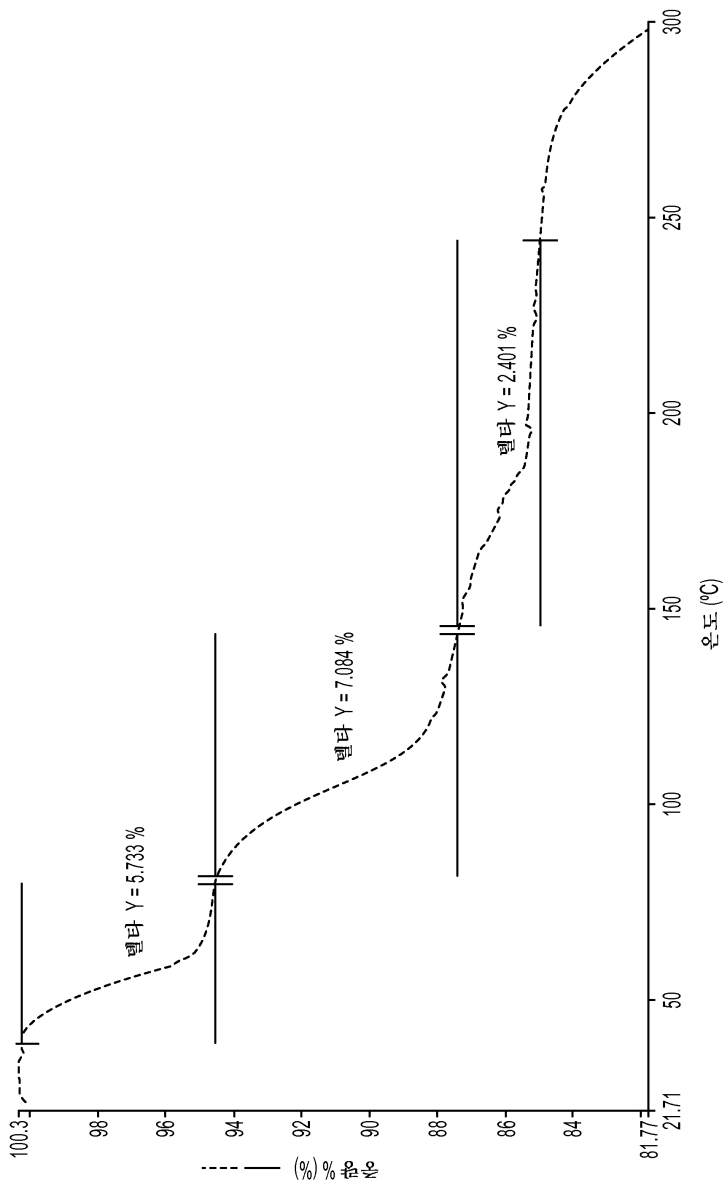
도면2



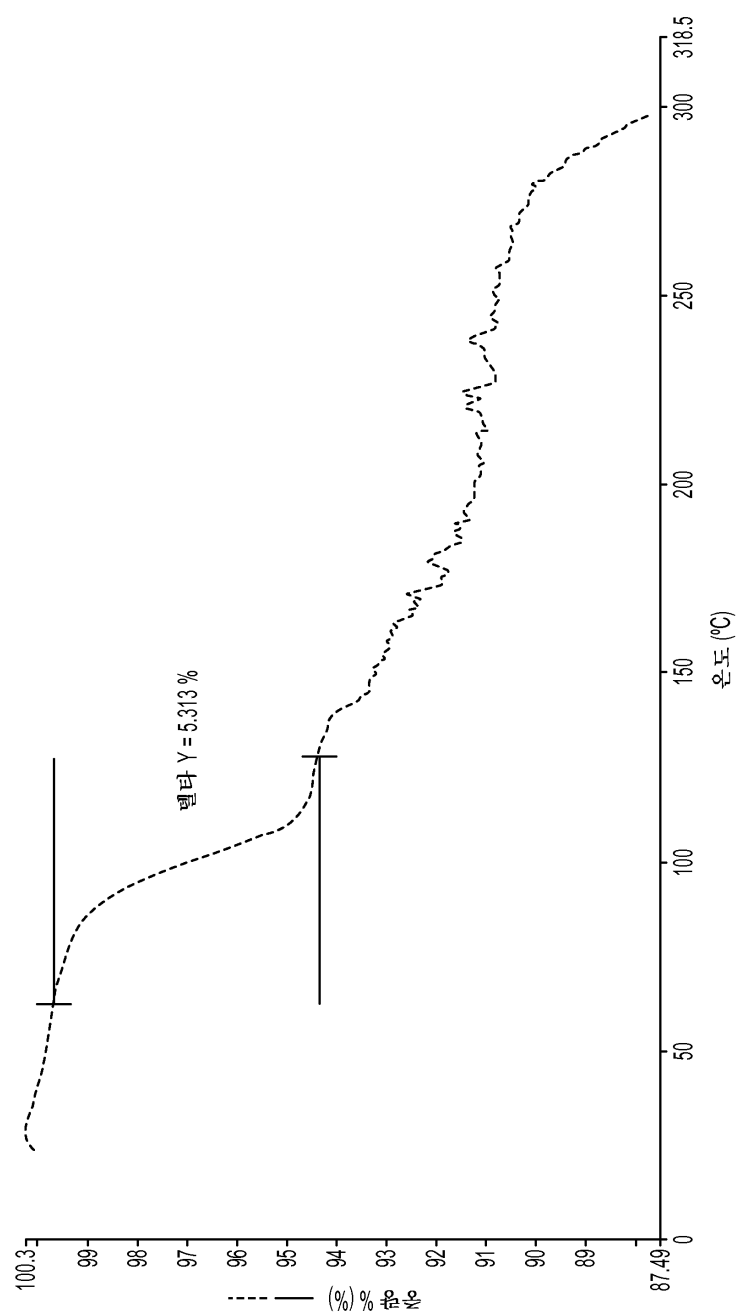
도면3



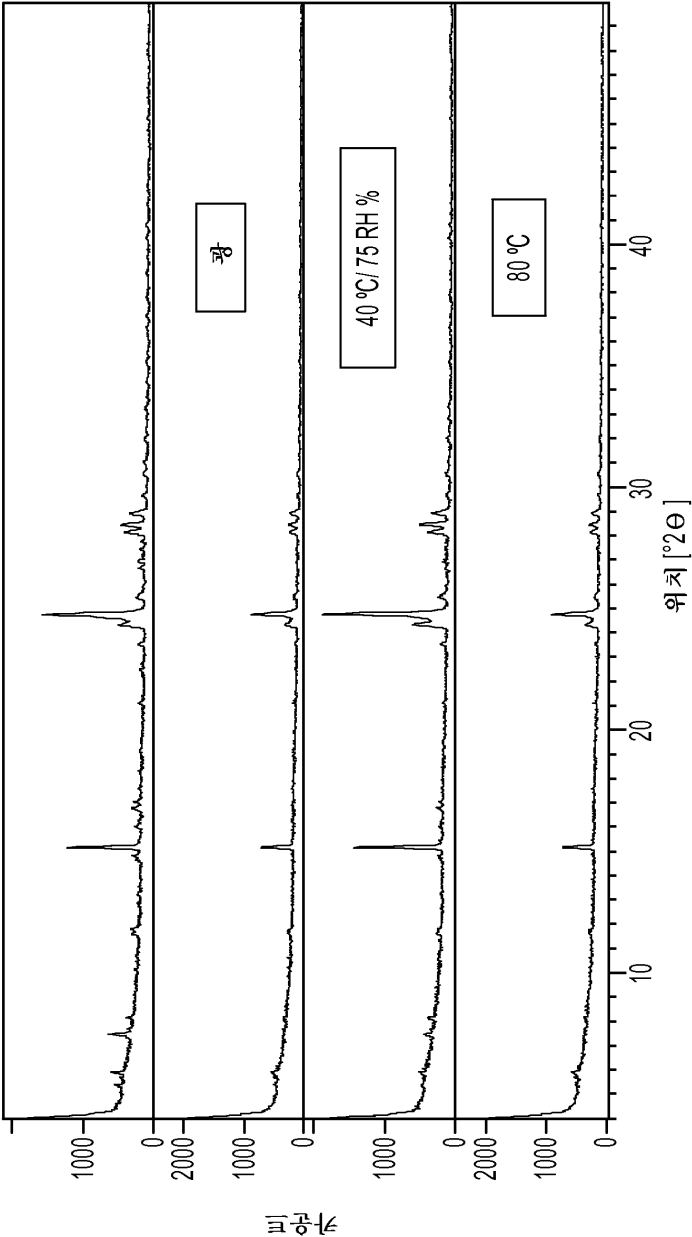
도면4



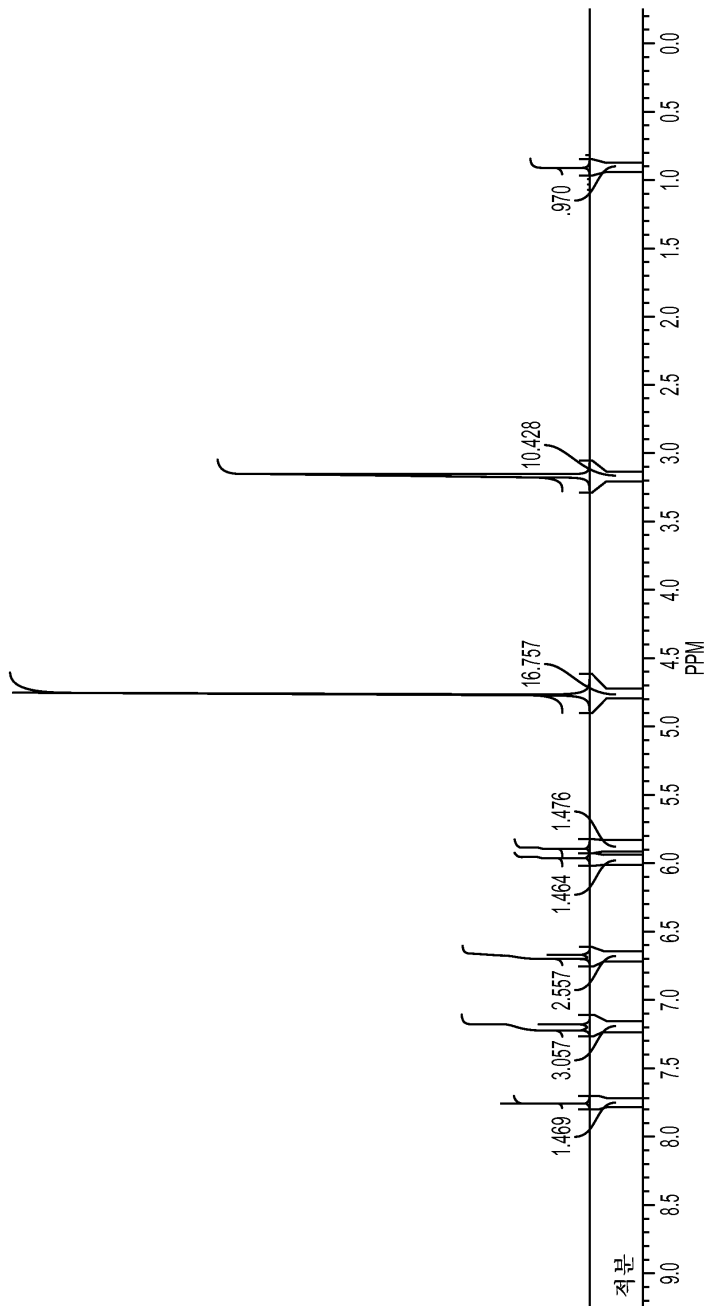
도면5



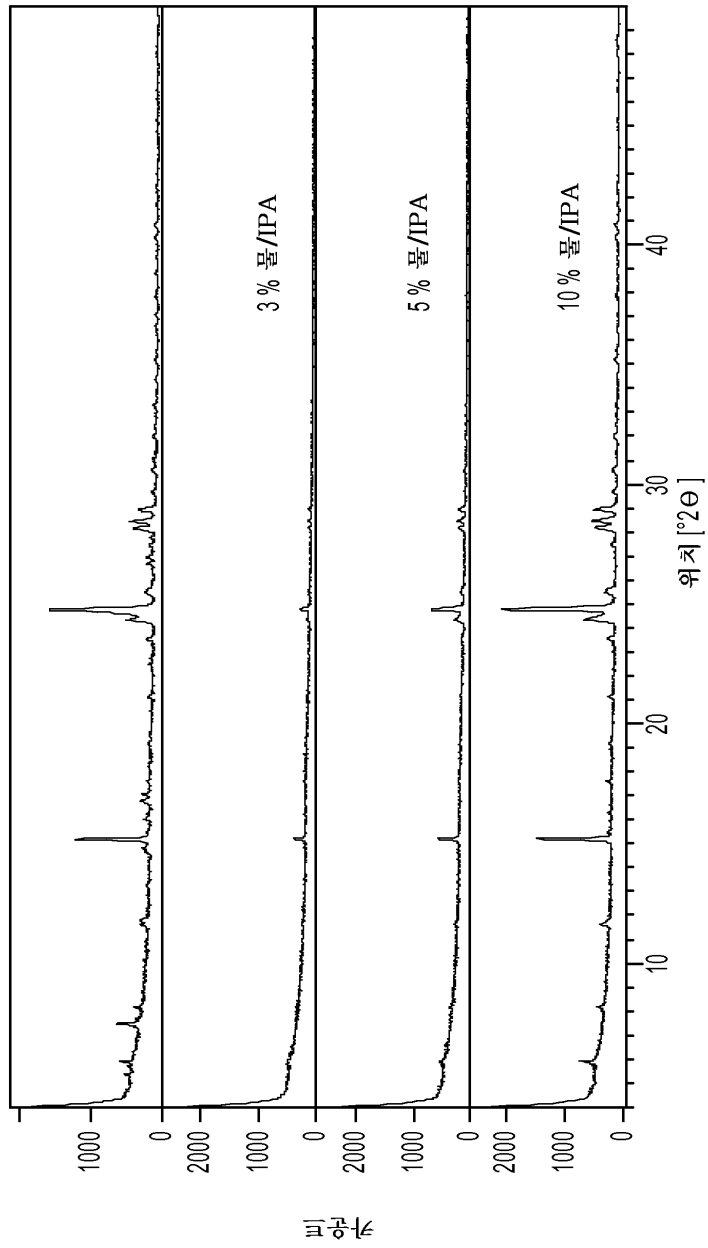
도면6



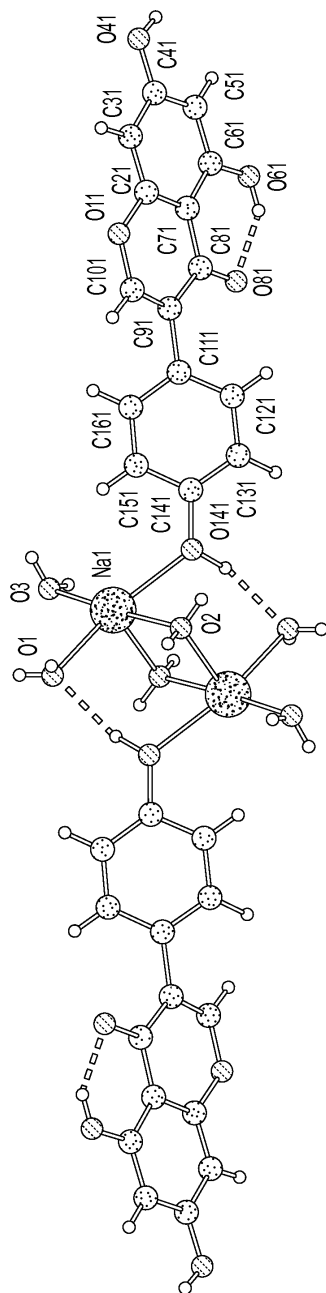
도면7



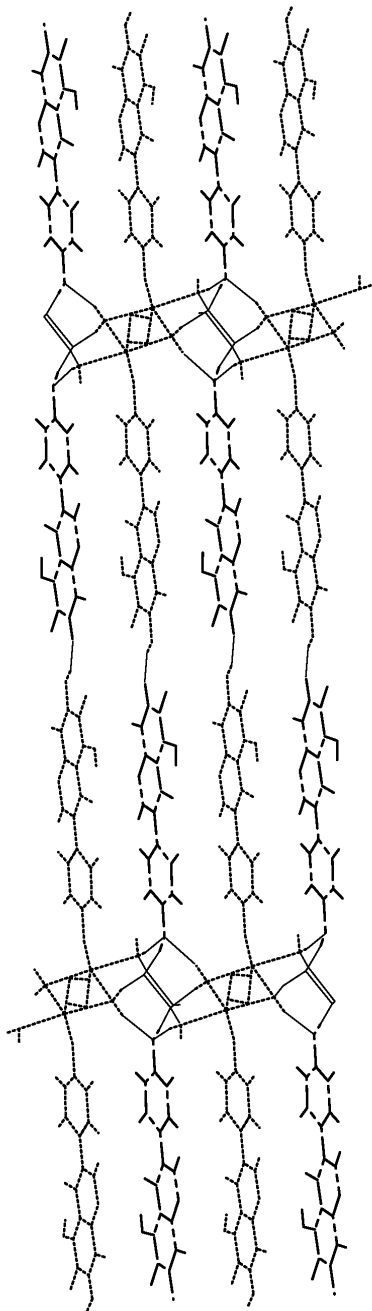
도면8



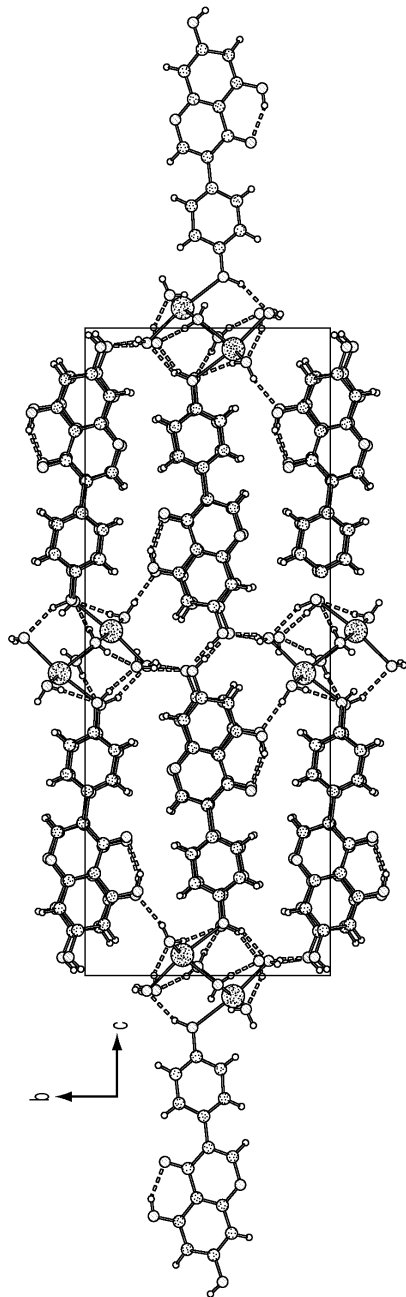
도면9



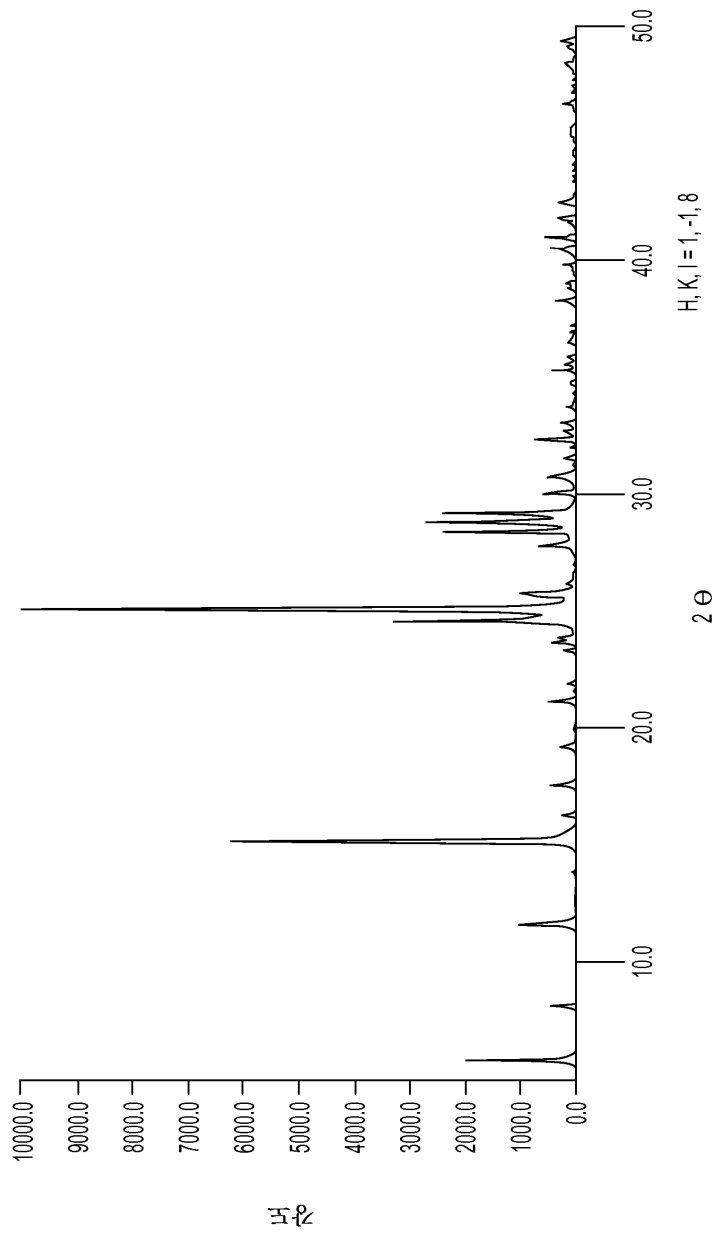
도면10



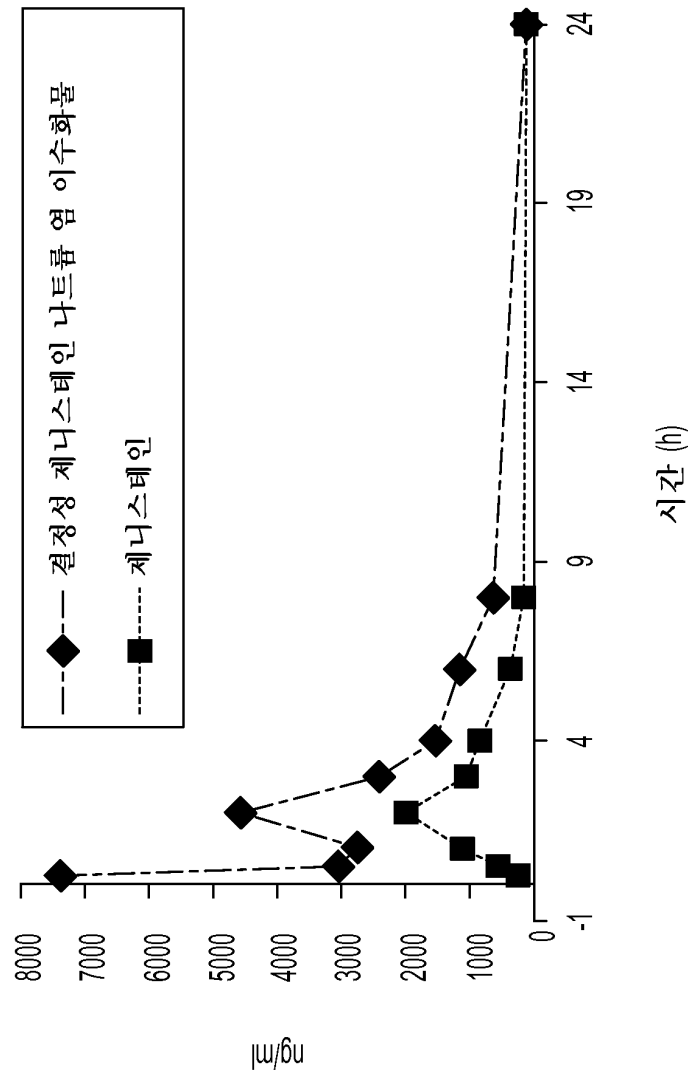
도면11



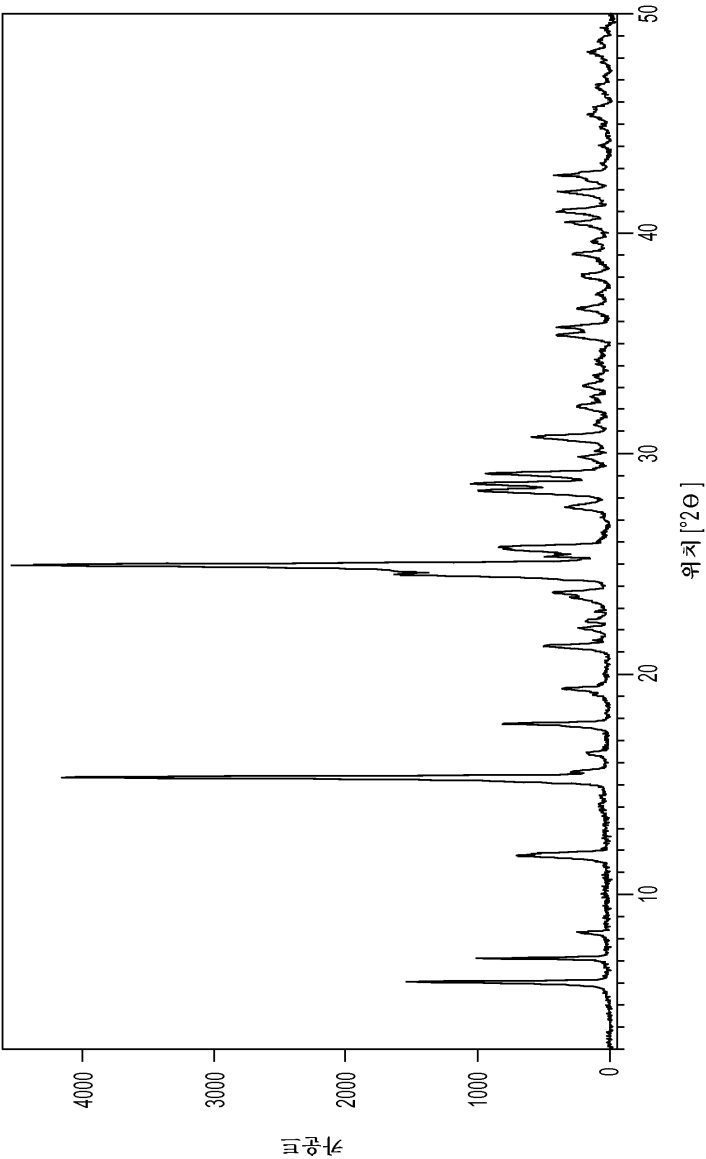
도면12



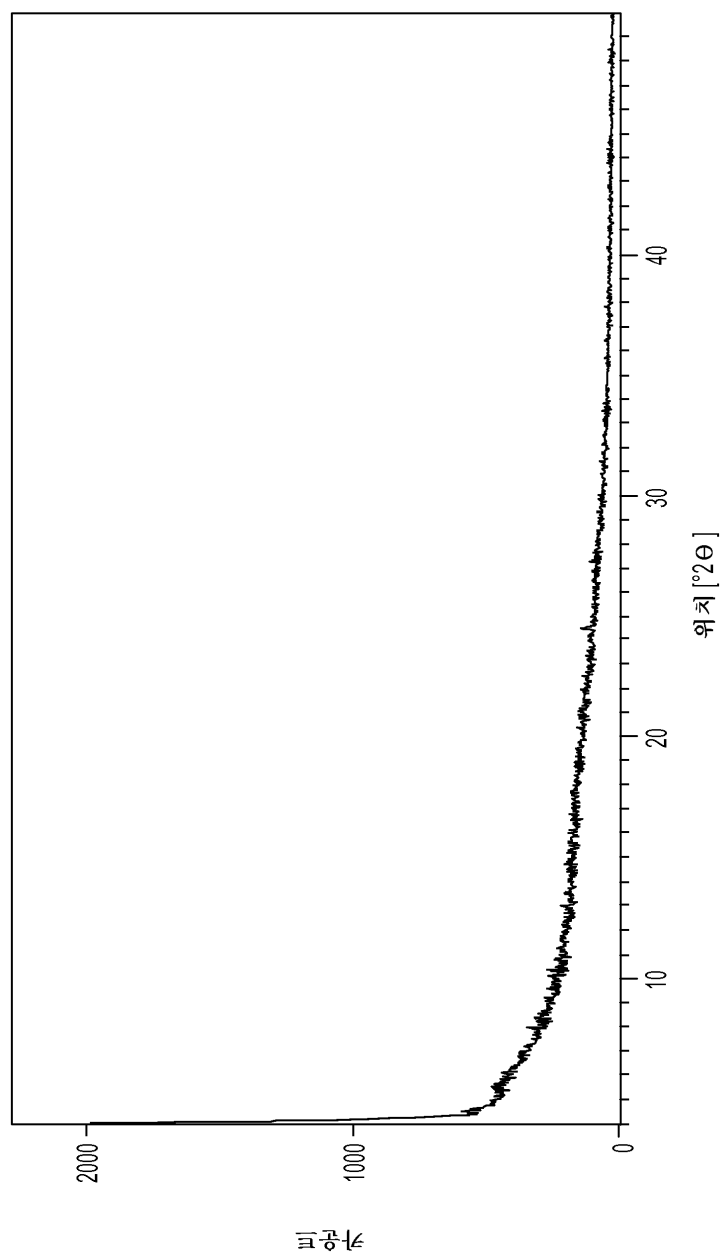
도면13



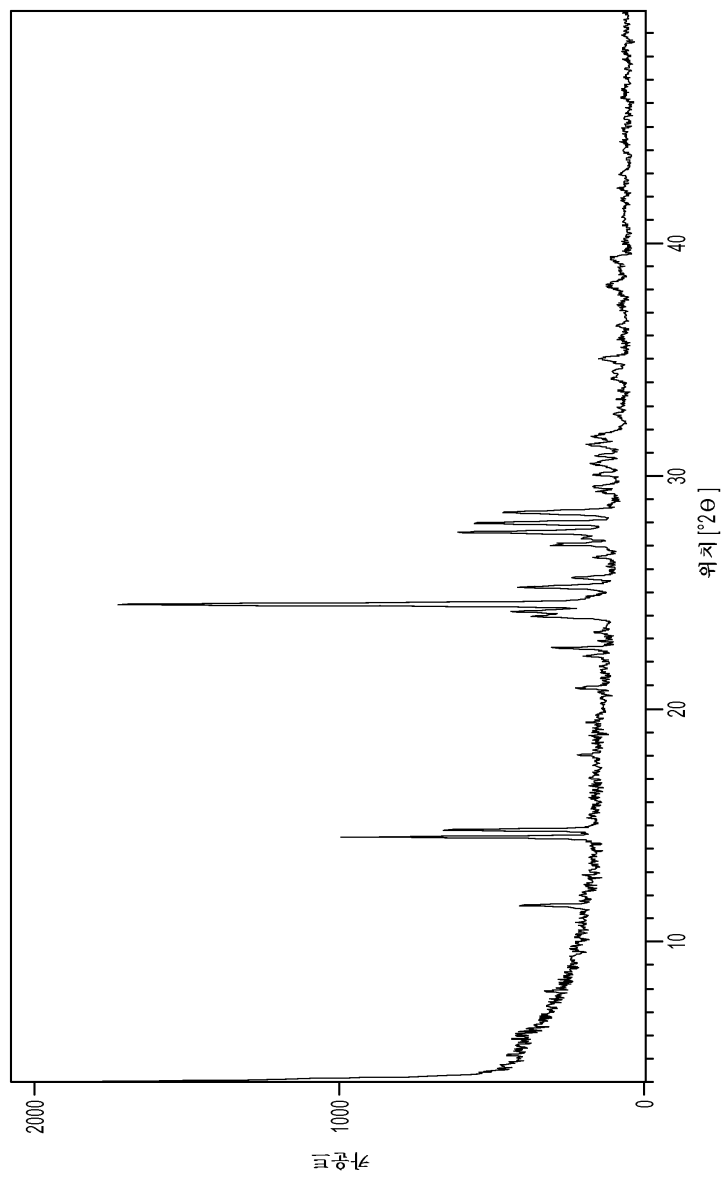
도면14



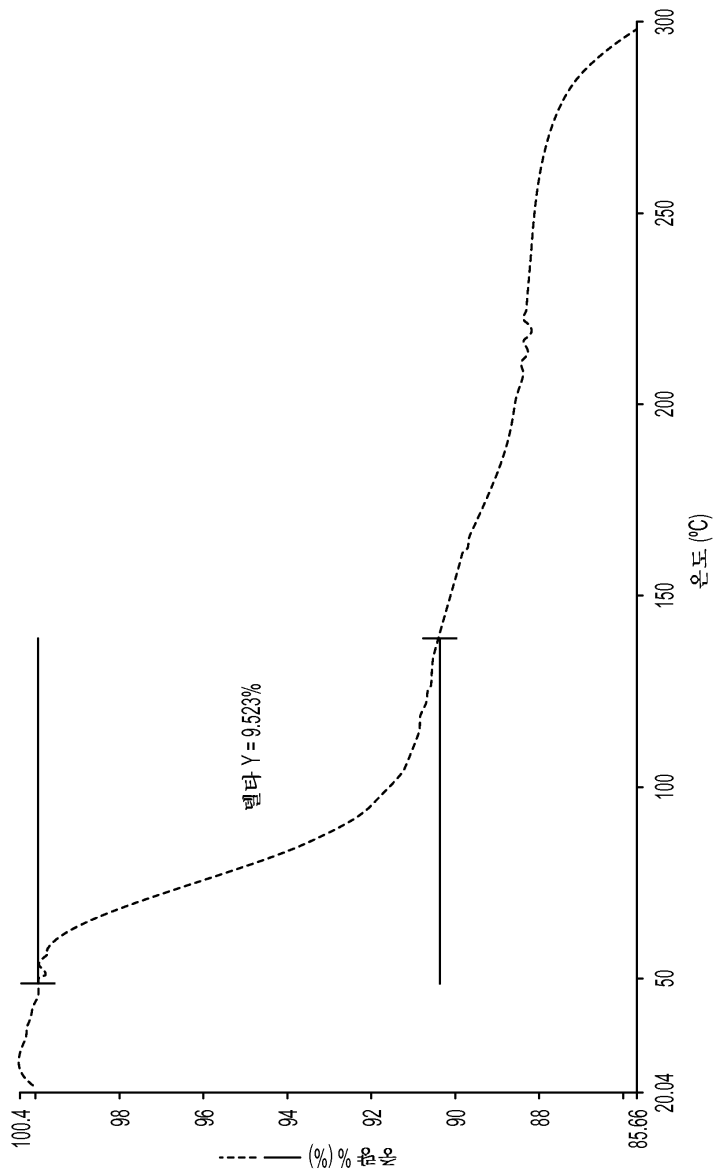
도면15



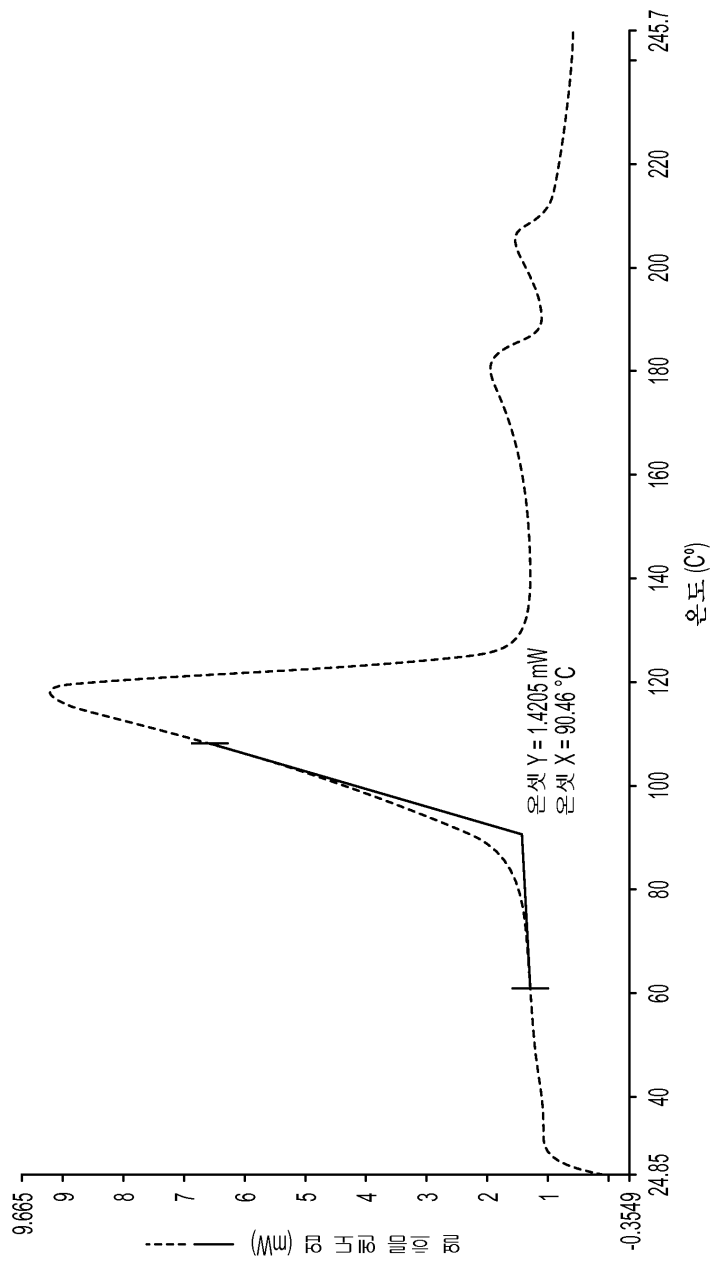
도면16



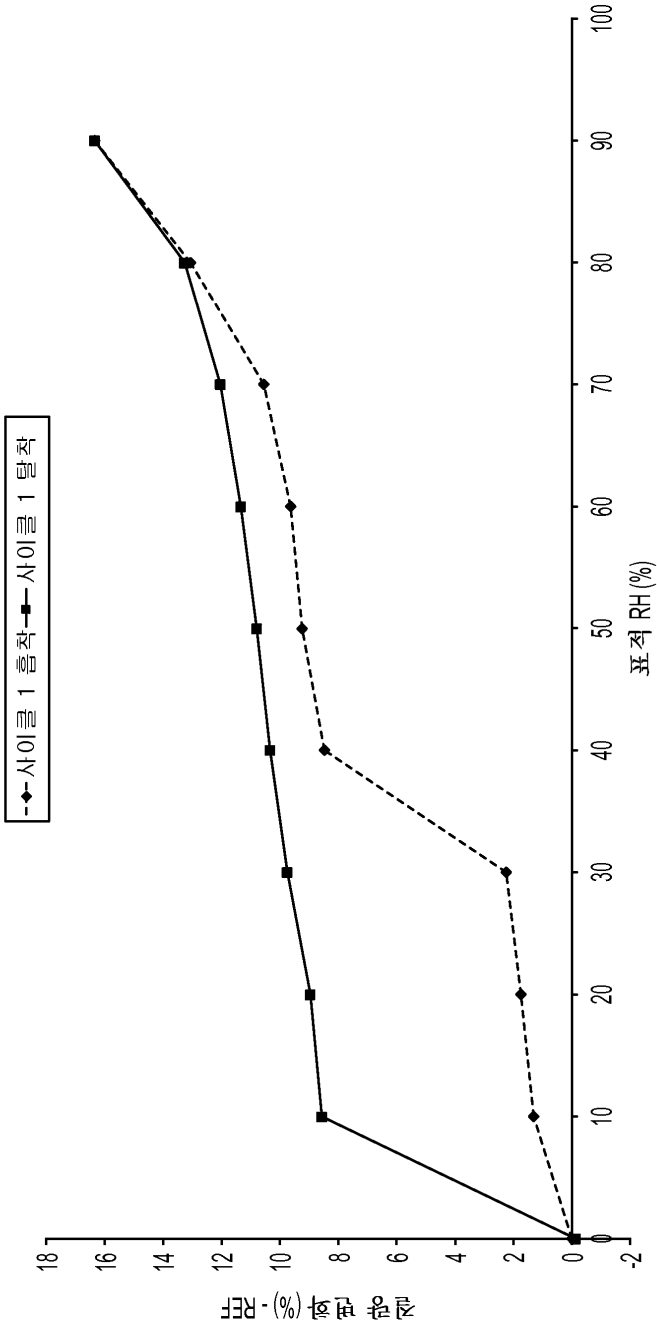
도면17



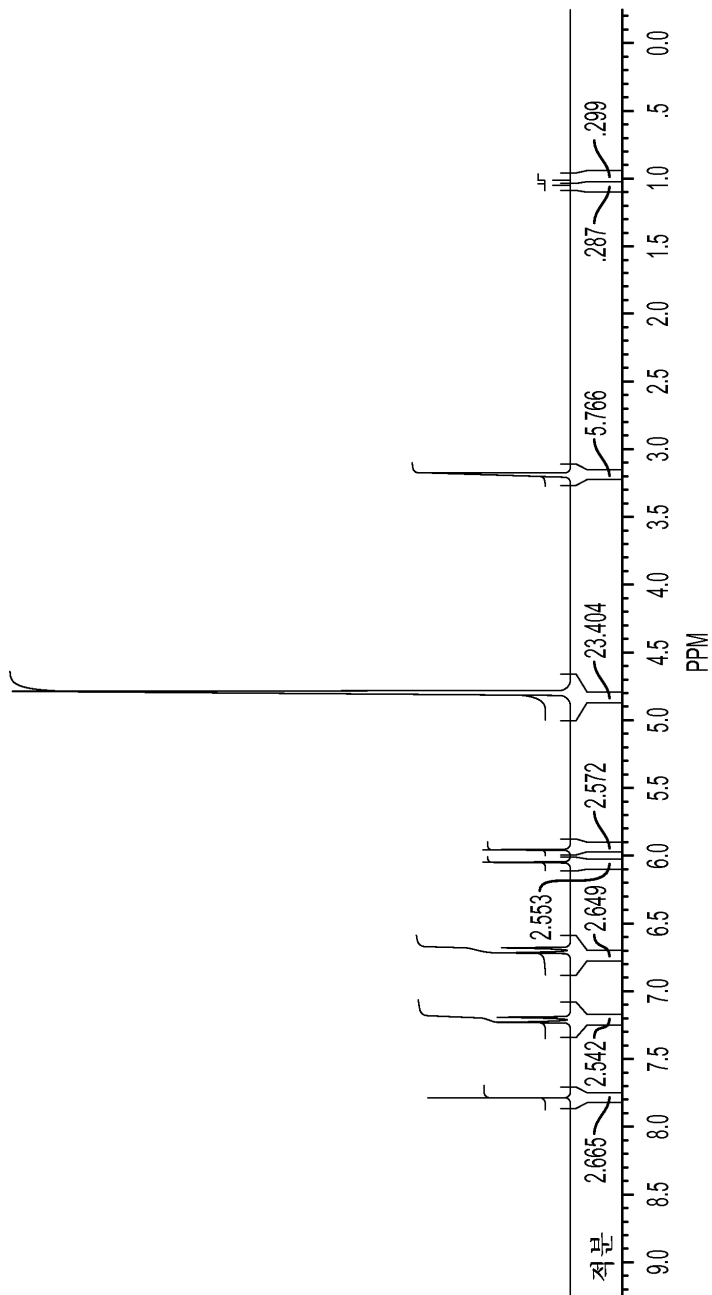
도면18



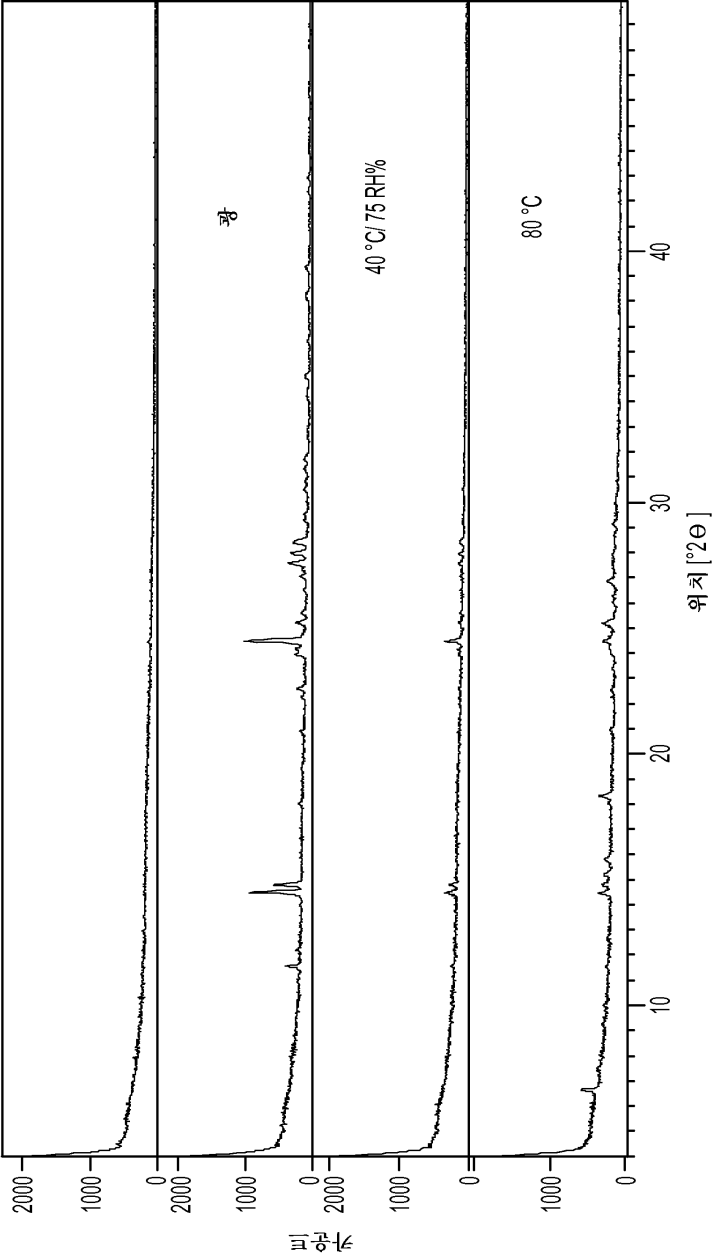
도면19



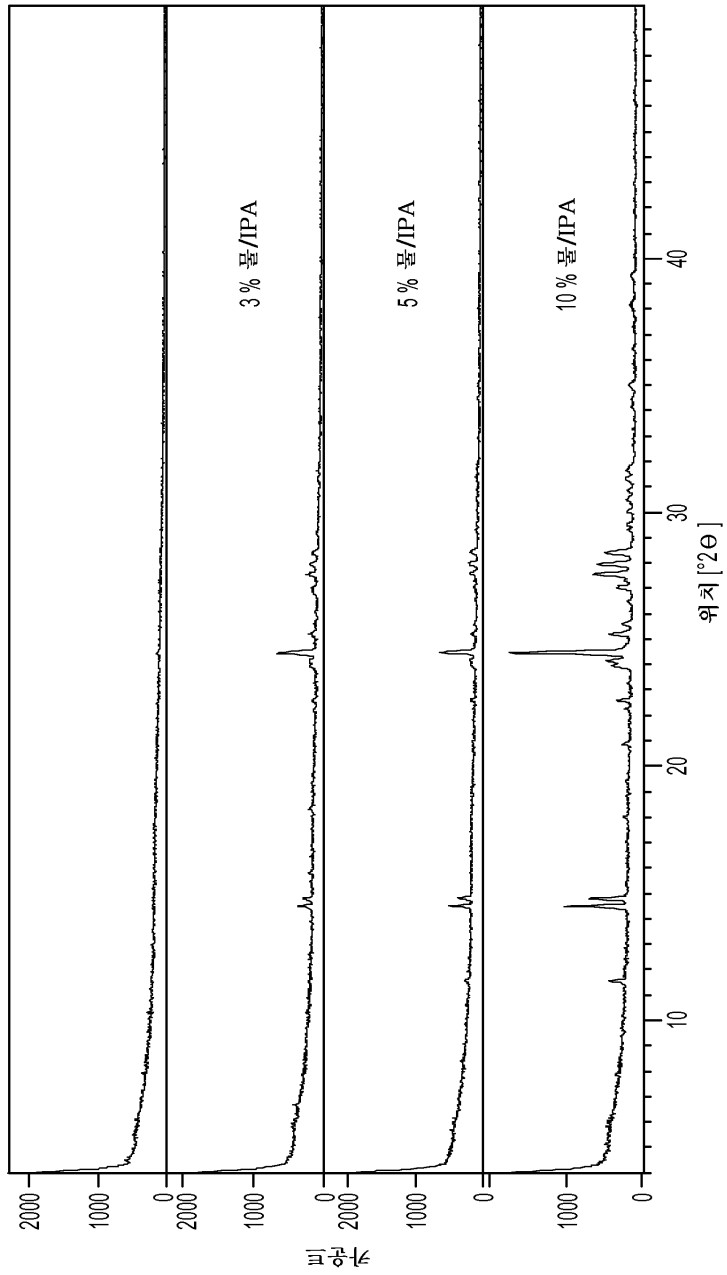
도면20



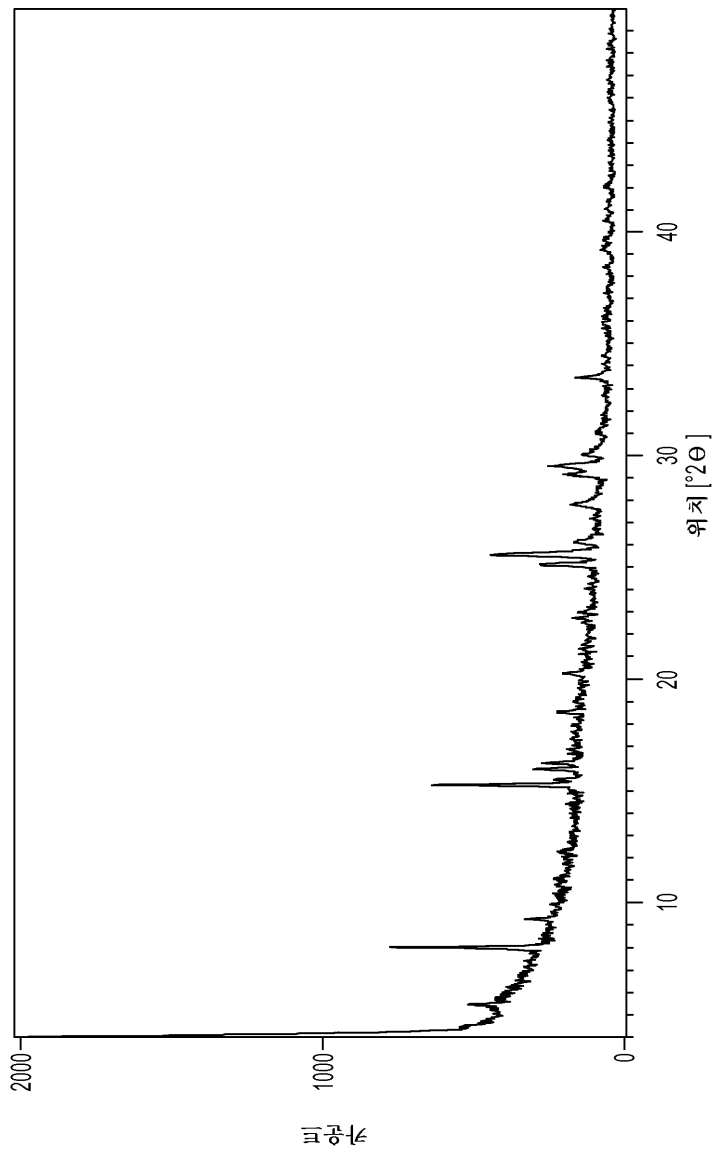
도면21



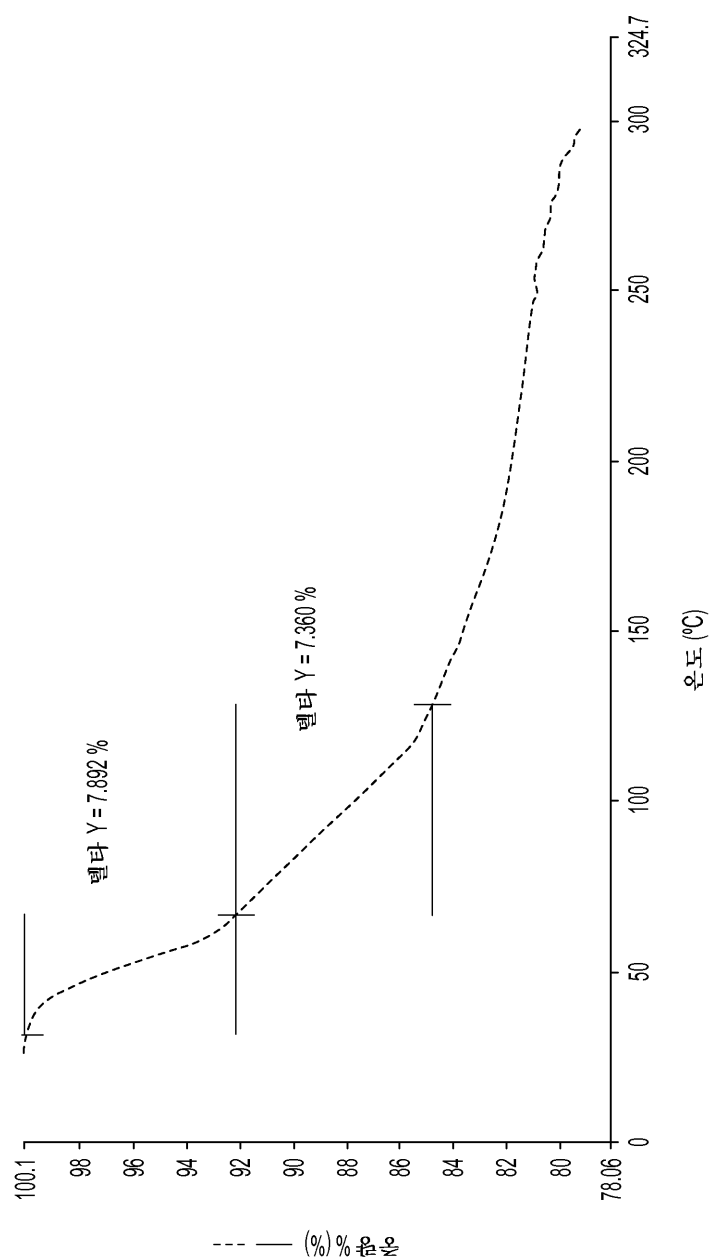
도면22



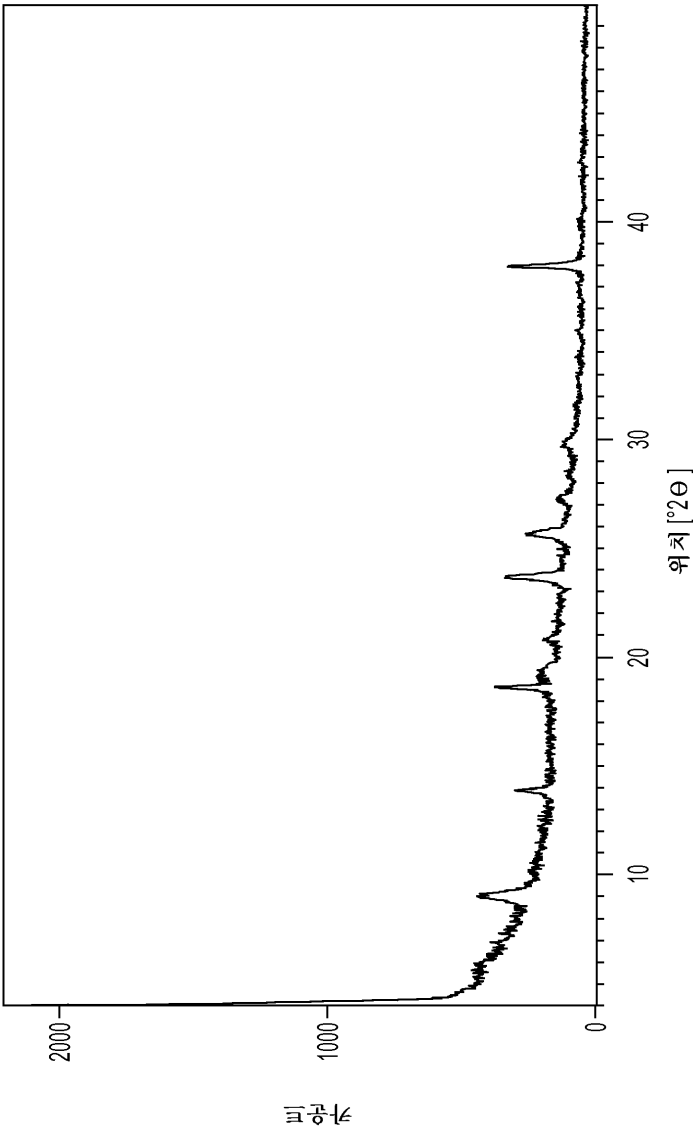
도면23



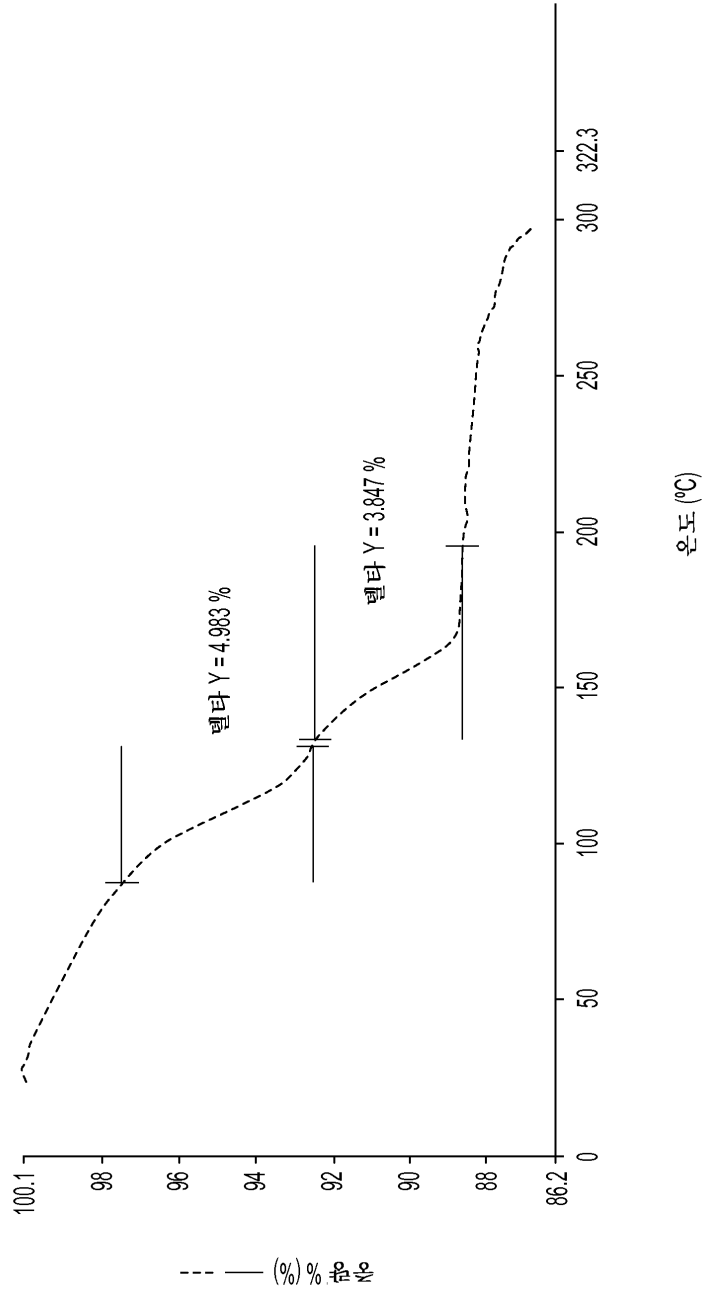
도면24



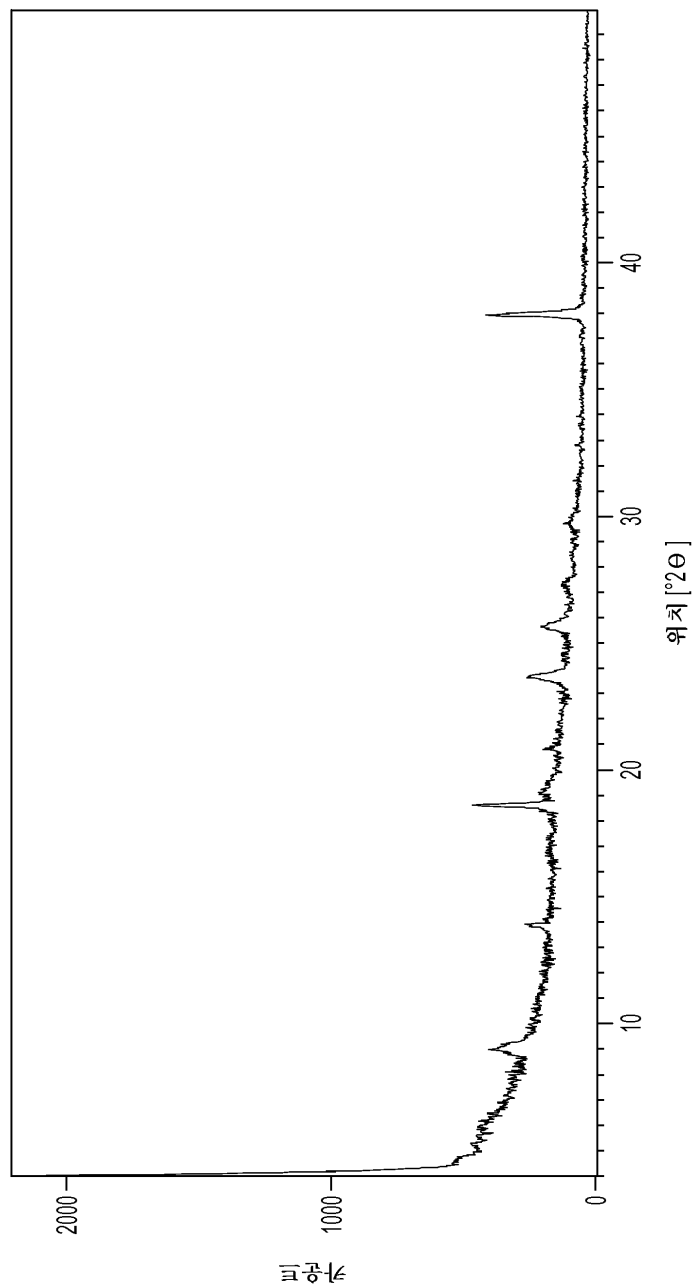
도면25



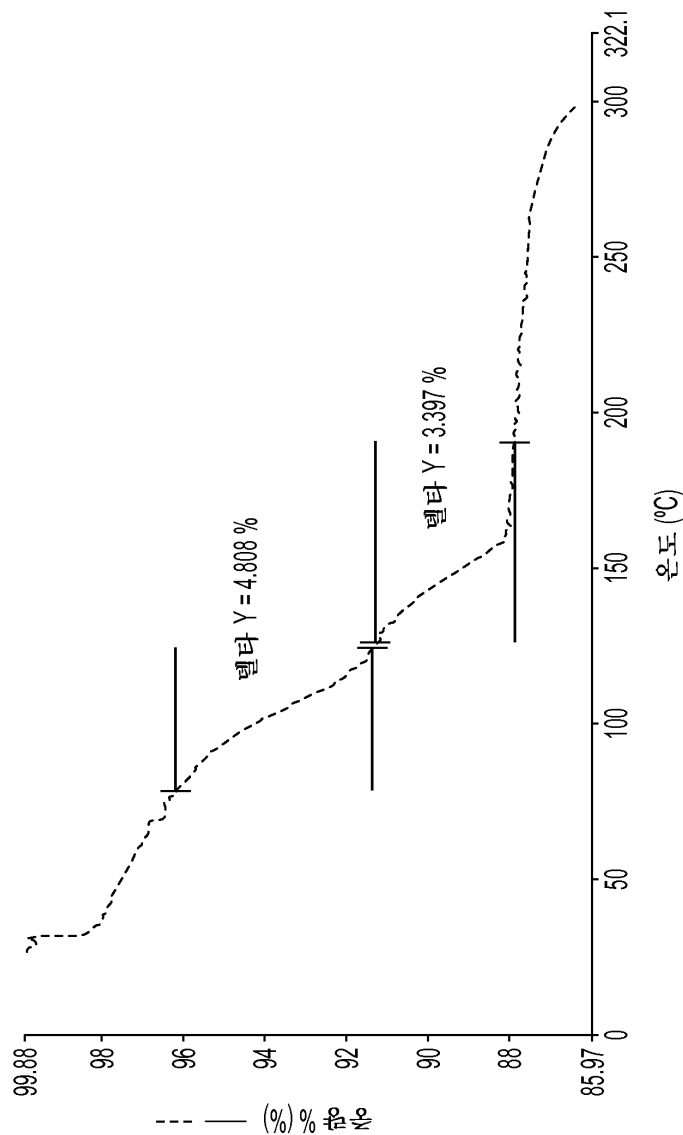
도면26



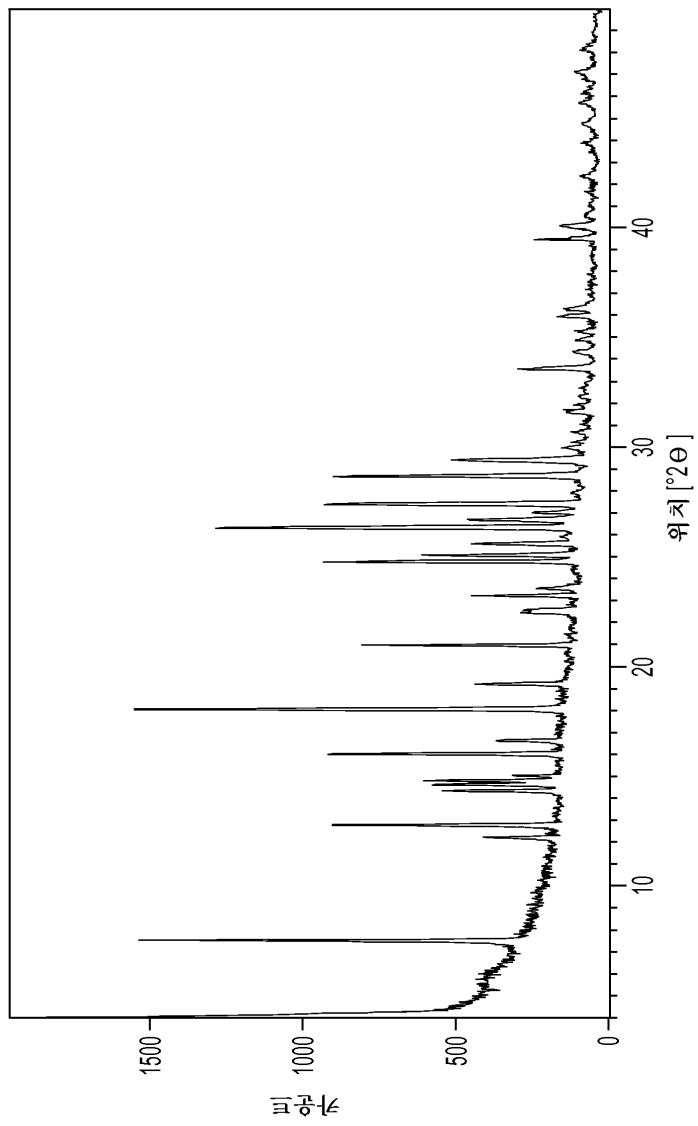
도면27



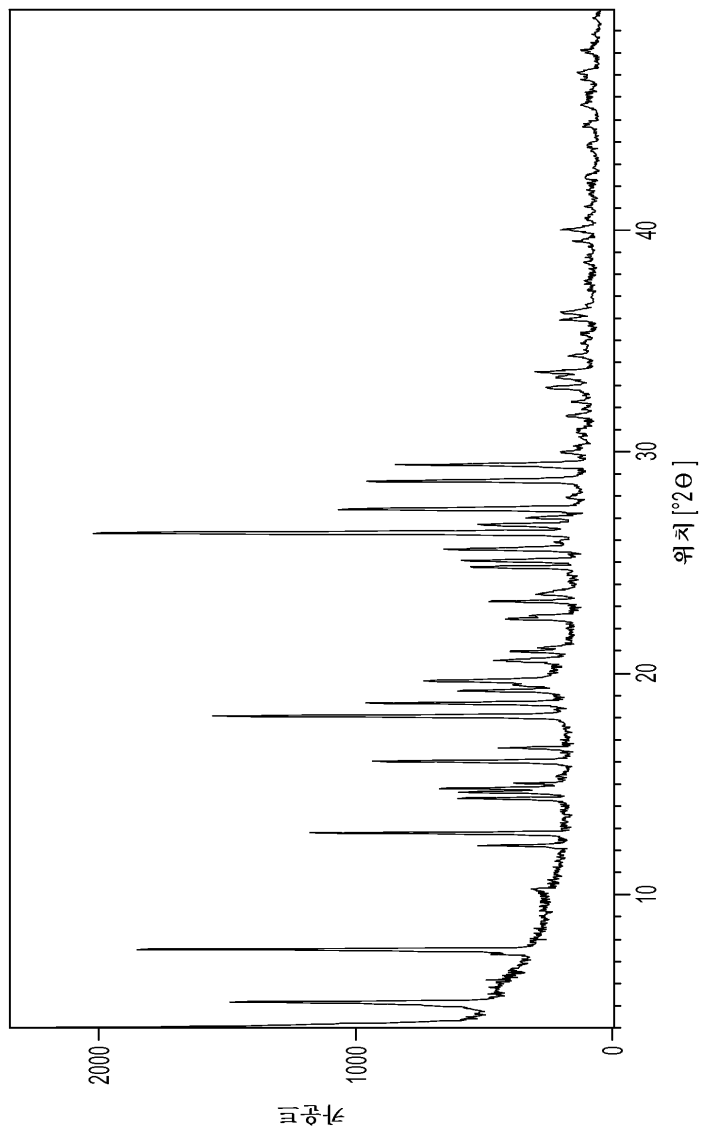
도면28



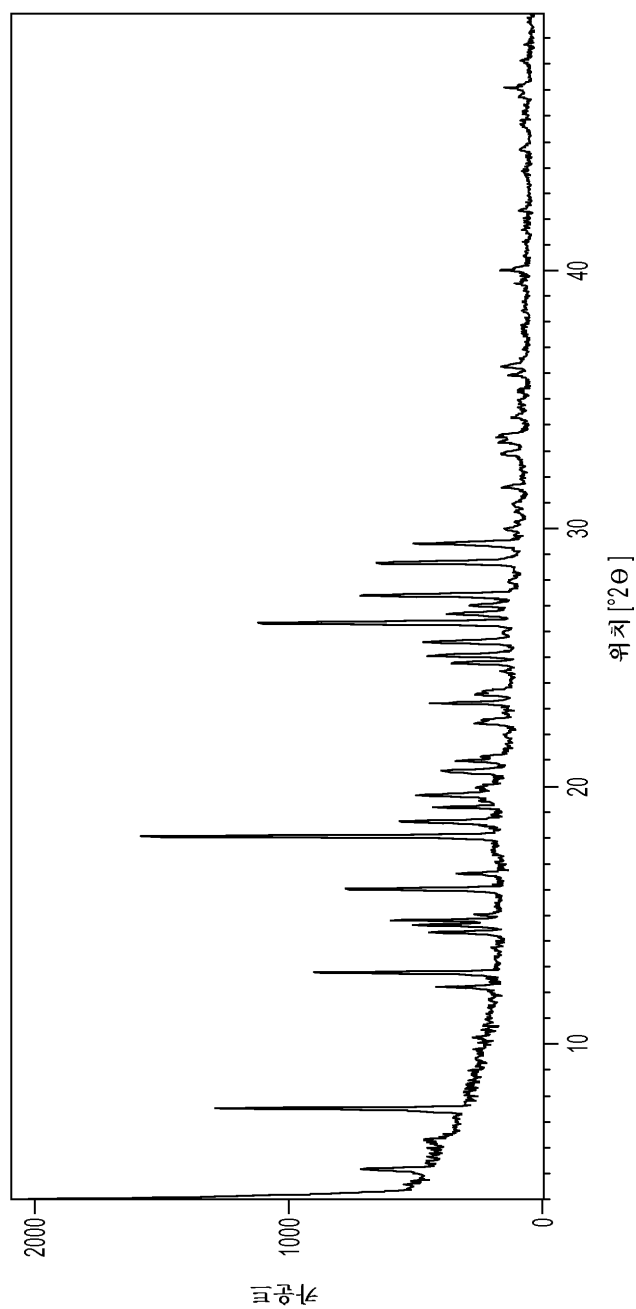
도면29



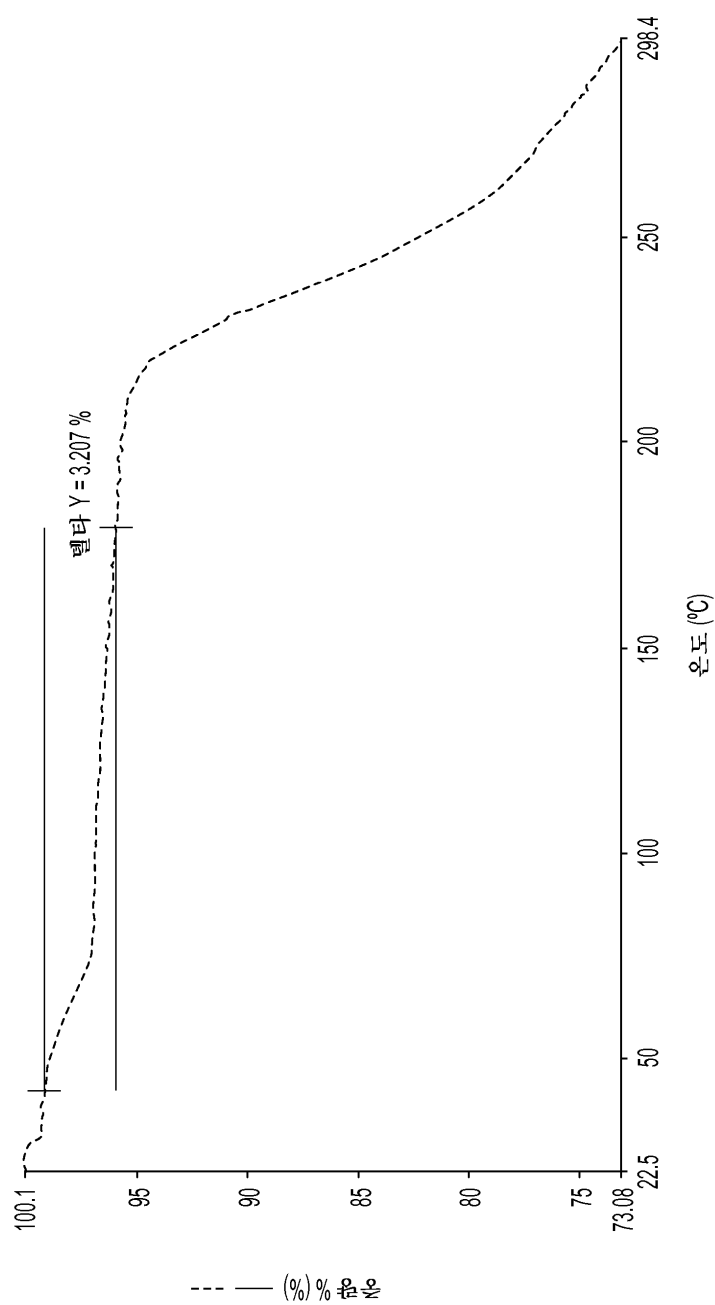
도면30



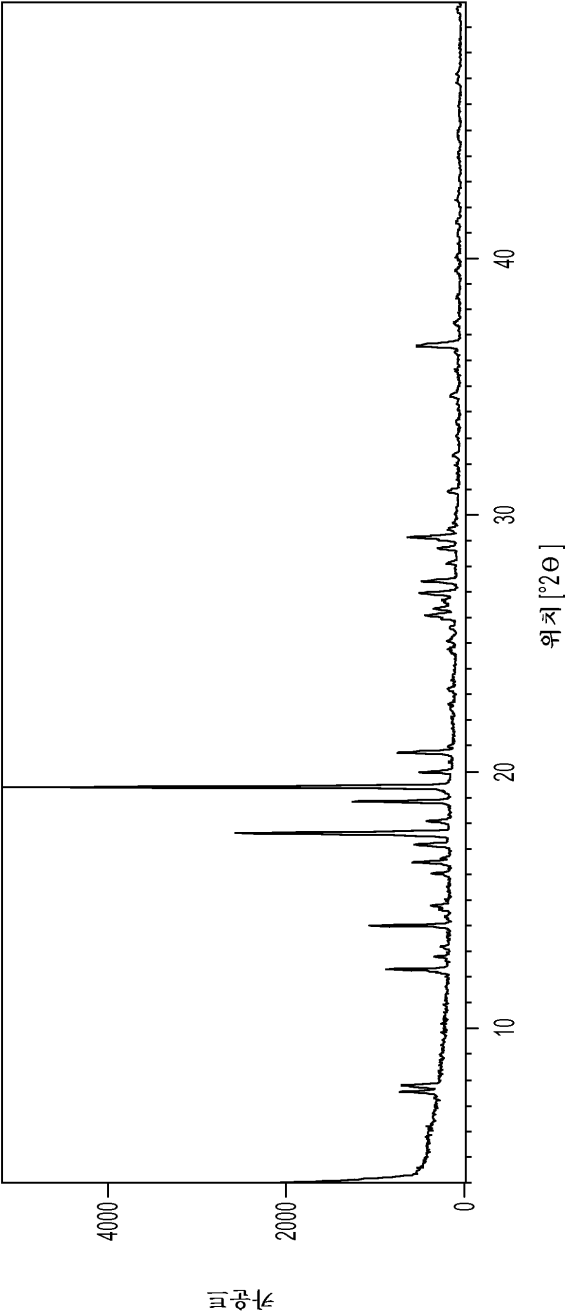
도면31



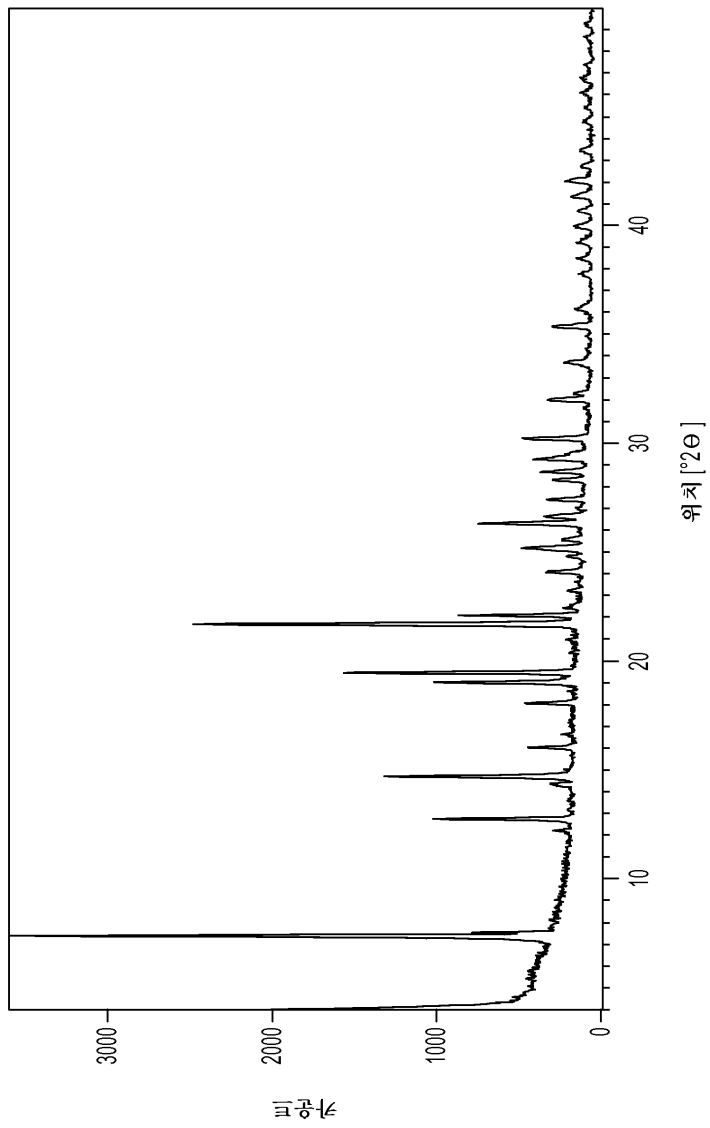
도면32



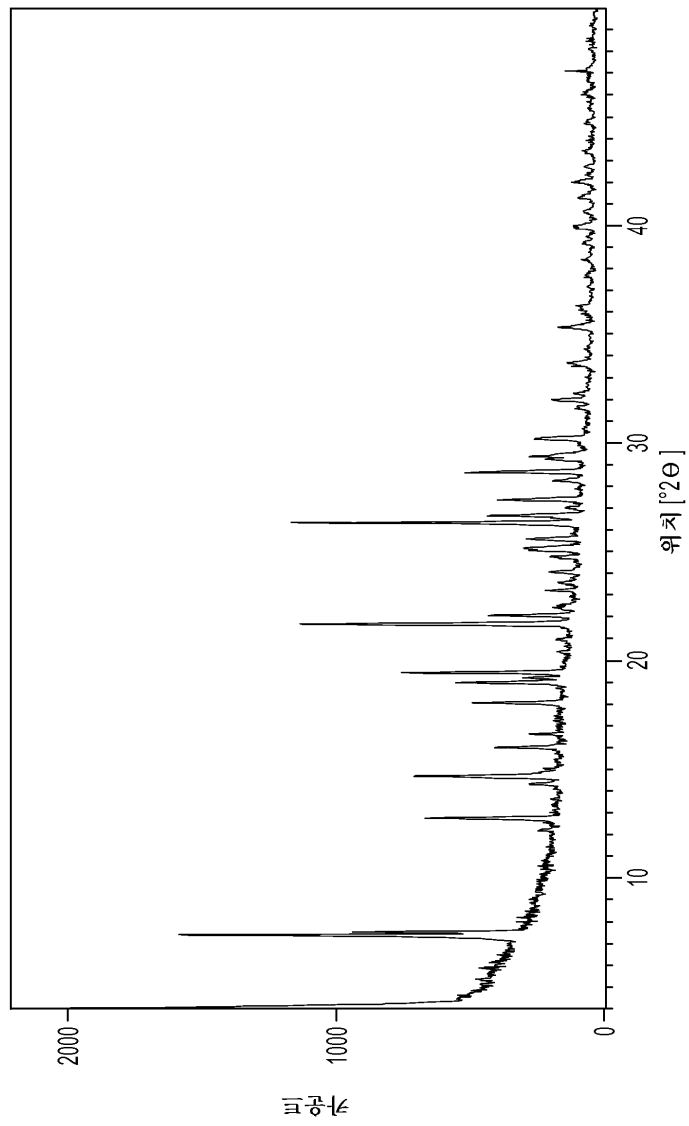
도면33



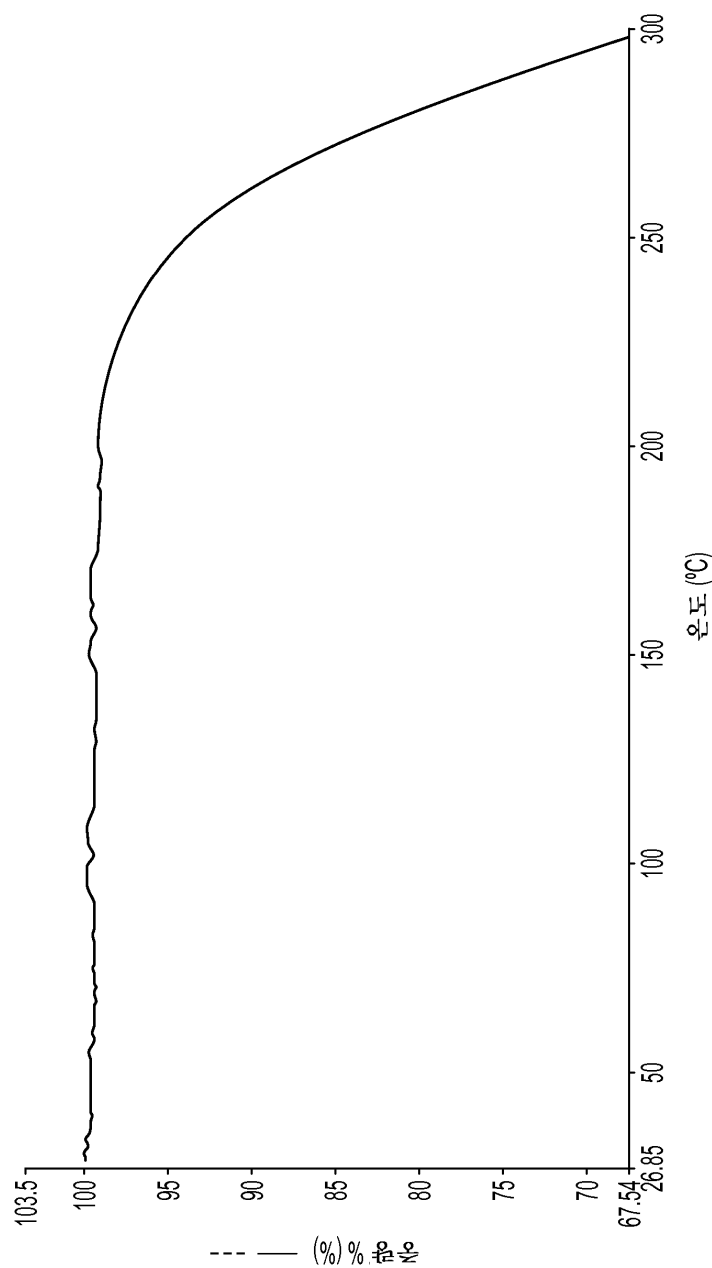
도면34



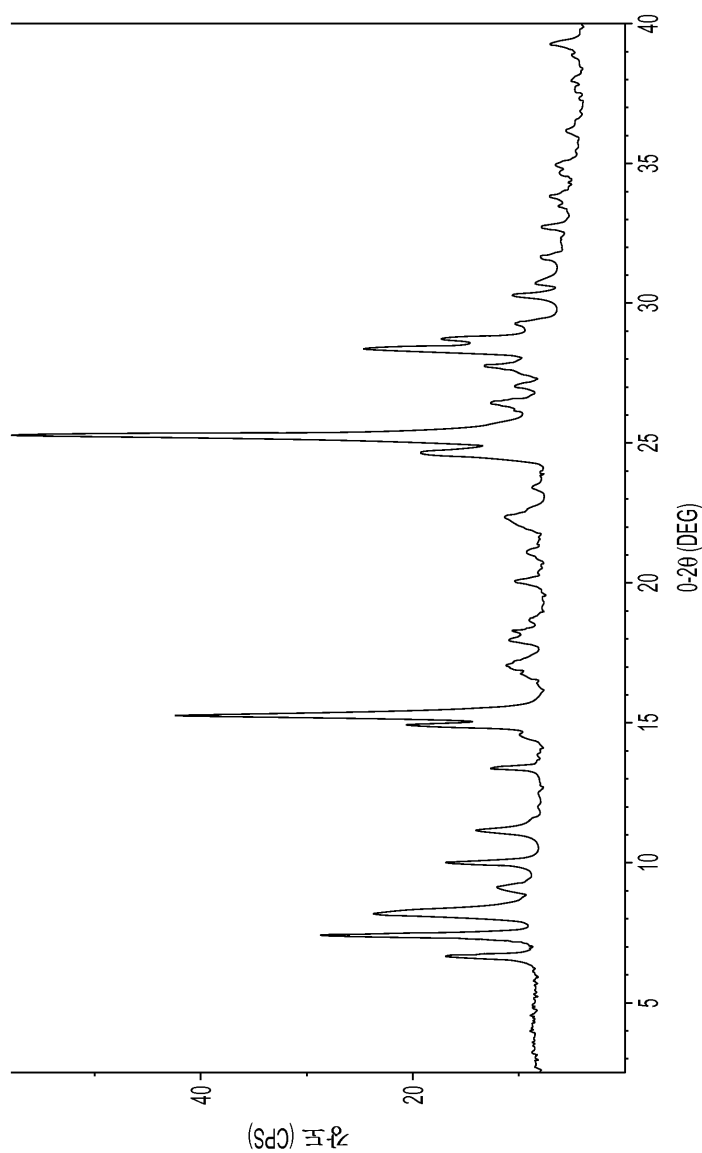
도면35



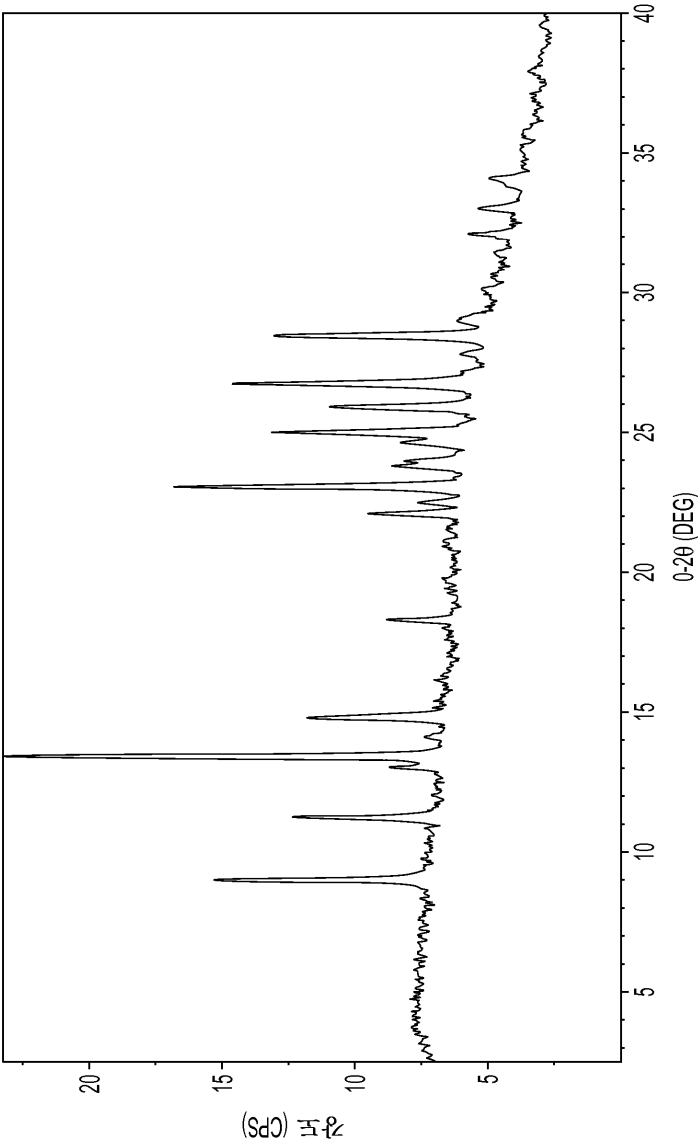
도면36



도면37



도면38



도면39

