



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년06월24일

(11) 등록번호 10-1992272

(24) 등록일자 2019년06월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 489/02 (2006.01) *A61K 31/485* (2006.01)
C07D 489/10 (2006.01) *C07D 489/12* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7015829
- (22) 출원일자(국제) 2009년12월04일
 심사청구일자 2014년11월27일
- (85) 번역문제출일자 2011년07월08일
- (65) 공개번호 10-2011-0098801
- (43) 공개일자 2011년09월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2009/051655
- (87) 국제공개번호 WO 2010/067101
 국제공개일자 2010년06월17일
- (30) 우선권주장
 0822342.2 2008년12월08일 영국(GB)
 0920699.6 2009년11월26일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌
 Journal of American Chemical Society. 1967.
 89:13, pp. 3281-3292*
 Journal of American Chemical Society. 1967.
 89:13, pp. 3273-3280*
 Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006. Vol. 16, pp.
 3609-3613*
 Journal of American Chemical Society. 1967.
 89:13, pp. 3267-3273*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 유로-셀피코 소시에떼 아노님
 룩셈부르크 엘-2350 룩셈부르크 뤼 장 피레 1
- (72) 발명자
 화이트락 스티브
 영국 캠프리지 캠프리지셔 씨비4 0취더블유 밀튼
 로드 캠프리지 사이언스 파크 191 먼디파마 리서
 치 리미티드
 하딩 데보라 필리스
 영국 캠프리지 캠프리지셔 씨비4 0취더블유 밀튼
 로드 캠프리지 사이언스 파크 191 먼디파마 리서
 치 리미티드
 터너 칼 데이비드
 영국 맨체스터 엠9 8제트에스 들라우네이즈 로드
 헉사곤 타워 컬러 신세스 솔루션스 리미티드
- (74) 대리인
 리엔목록특허법인

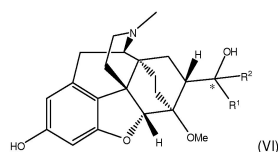
전체 청구항 수 : 총 35 항

심사관 : 김범수

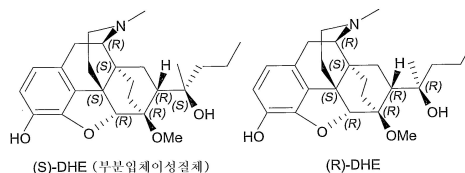
(54) 발명의 명칭 디히드로에토프린 및 그의 제조

(57) 요약

본 발명은 R¹ 및 R²가 독립적으로 C₁₋₈ 알킬이고, *는 입체중심(stereocentre)을 나타내는 것인, 하기 화학식 (VI)의 화합물, 또는 그의 염 또는 유도체의 제조 방법을 제공한다.



대표도 - 도10

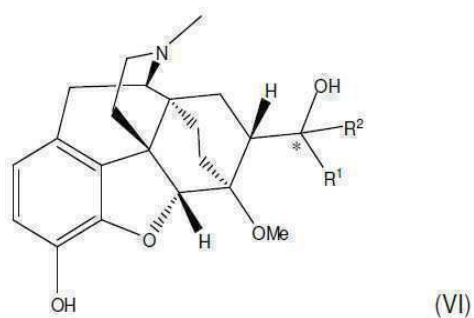


명세서

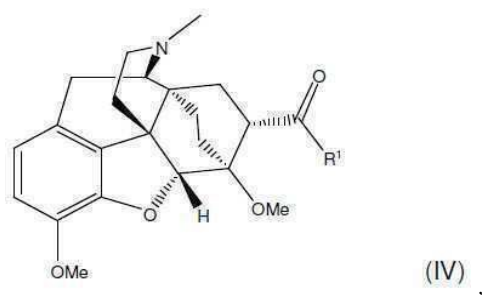
청구범위

청구항 1

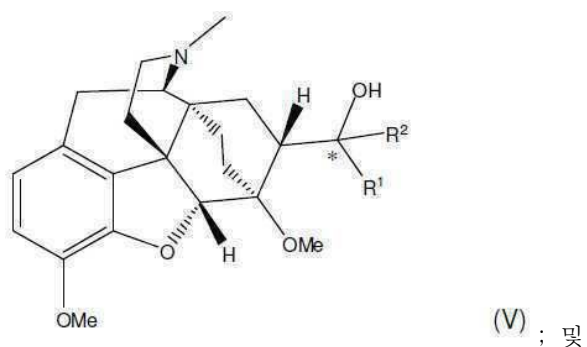
R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-8} 직쇄 알킬이고 *은 (S) 입체중심(stereocentre)을 나타내는 것인 하기 식 (VI)의 화합물, 또는 그의 염을 제조하는 방법으로서,



R^1 이 앞서 정의된 바와 같은 것인 하기 식 (IV)의 화합물과



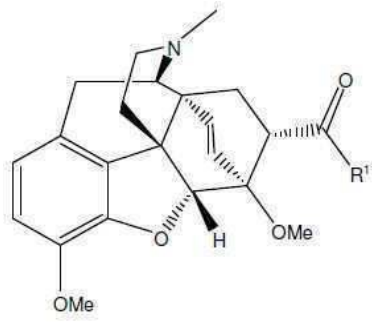
R^2 는 C_{1-8} 직쇄 알킬이고, M은 금속이고, X는 할라이드이며, p는 1 또는 0인 것인 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물을 반응시켜 R^1 , R^2 및 *가 상기 정의된 바와 같은 것인 하기 식 (V)의 화합물을 생성시키는 단계



상기 식 (V)의 화합물을 가수분해하여 상기 식 (VI)의 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 것인 방법.

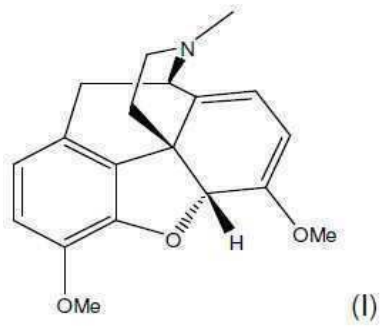
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식 (IV)의 화합물은 R^1 이 앞서 정의된 바와 같은 것인 하기 식 (III)의 화합물을 환원시킴으로써 제조되는 것인 방법

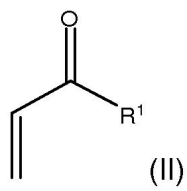


청구항 3

제2항에 있어서, 상기 식 (III)의 화합물은 하기 식 (I)의 화합물과

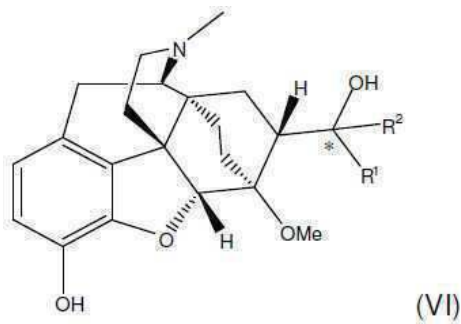


R¹이 C₁₋₈ 직쇄 알킬인 것인 하기 식 (II)의 화합물을 반응시킴으로써 제조되는 것인 방법

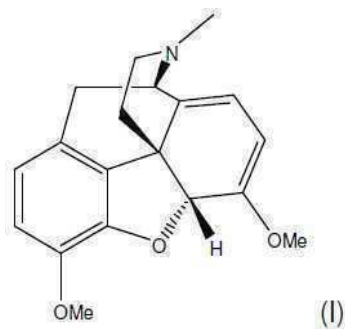


청구항 4

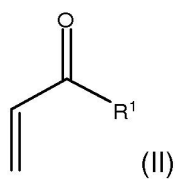
R¹ 및 R²는 독립적으로 C₁₋₈ 직쇄 알킬이고 *은 (S) 입체중심을 나타내는 것인 하기 식 (VI)의 화합물, 또는 그
의 염을 제조하는 방법으로서,



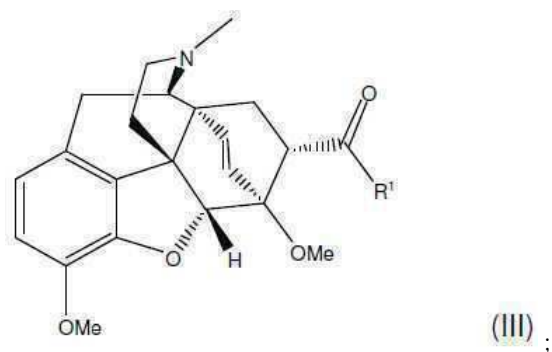
하기 식 (I)의 화합물과



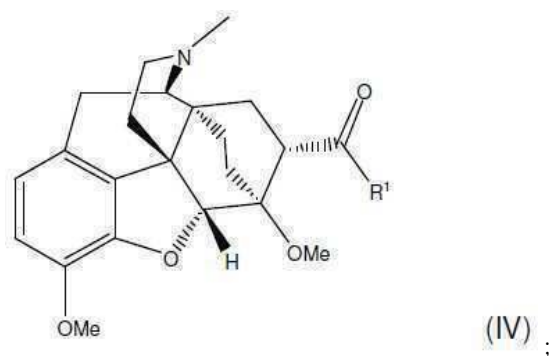
R^1 이 C_{1-8} 직쇄 알킬인 것인 하기 식 (II)의 화합물을 반응시켜



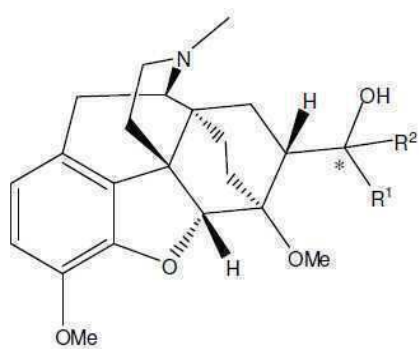
R^1 이 앞서 정의된 바와 같은 것인 하기 식 (III)의 화합물을 제공하는 단계



상기 식 (III)의 화합물을 환원시켜 R^1 이 앞서 정의된 바와 같은 것인 하기 식 (IV)의 화합물을 생성시키는 단계



상기 식 (IV)의 화합물과, R^2 는 C_{1-8} 직쇄 알킬이고, M은 금속이며, X는 할라이드이고, p는 1 또는 0인 것인 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물을 반응시켜, R^1 , R^2 및 *이 앞서 정의된 바와 같은 것인 하기 식 (V)의 화합물을 제조하는 단계



(V) ; 및

상기 식 (V)의 화합물을 가수분해시켜 상기 식 (VI)의 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 M은 마그네슘 또는 리튬인 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 $R^2M(X)_p$ 은 R^2MgCl , R^2MgBr , R^2MgI 또는 R^2Li 인 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식 (VI)의 화합물을 결정화시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^1 은 C_{3-5} 직쇄 알킬인 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^1 은 n-프로필인 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^2 는 C_{1-2} 알킬인 것인 방법.

청구항 11

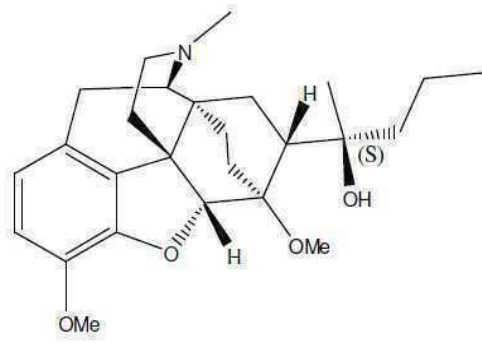
제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^2 는 메틸인 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식 (V)의 화합물은 90% 이상의 부분입체이성질체 초과량으로 생성되는 것인 방법.

청구항 13

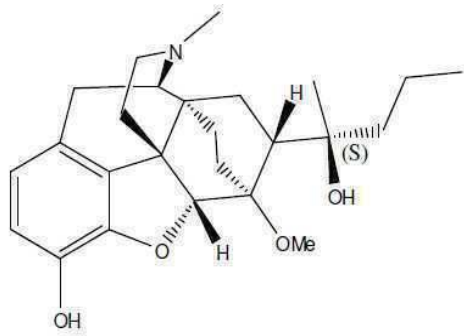
제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식 (V)의 화합물은 하기 화합물인 것인 방법:



(V-a)

청구항 14

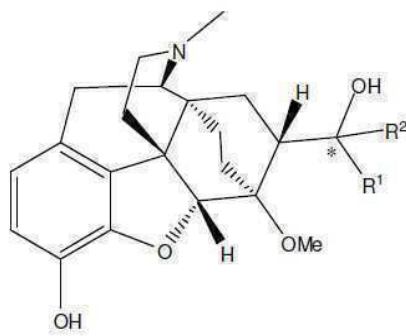
제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식 (VI)의 화합물은 하기 화합물인 것인 방법:



(VI-a)

청구항 15

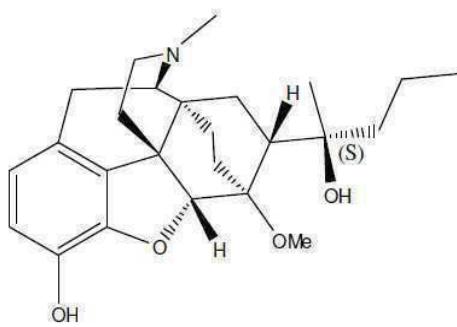
R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-8} 직쇄 알킬이고, *은 (S) 입체중심을 나타내는 것인 하기 식 (VI)의 화합물, 그의 염



(VI)

청구항 16

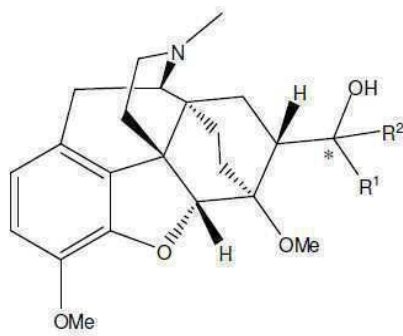
제15항에 있어서, 하기 식 (VIa)인 것인 화합물, 또는 그의 염인 것인 화합물



(VIa)

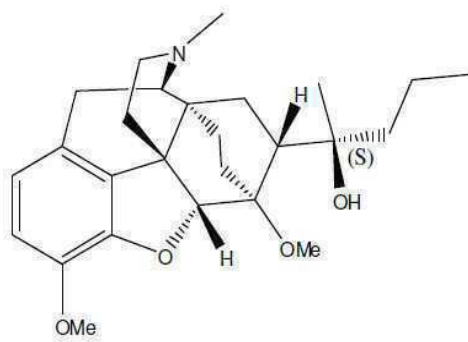
청구항 17

R^1 및 R^2 는 독립적으로 C_{1-8} 직쇄 알킬이고, *은 (S) 입체중심을 나타내는 것인 하기 식 (V)의 화합물, 그의 염



청구항 18

제17항에 있어서, 하기 식 (Va)인 것인 화합물, 또는 그의 염인 것인 화합물



청구항 19

유리 염기 형태의 제15항 내지 제18항 중 어느 한 항의 화합물.

청구항 20

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 염인 것인 화합물.

청구항 21

제20항에 있어서, 염산 염인 것인 화합물.

청구항 22

삭제

청구항 23

통증의 치료를 위한 것으로서, 제15항 또는 제16항의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, 경피 투여에 적합한 투여 제형인 것인 약제학적 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 경피 투여에 적합한 투여 제형은 리저버 형(reservoir type) 패취인 약제학적 조성물.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 경피 투여에 적합한 투여 제형은 매트릭스 형(matrix type) 패취인 약제학적 조성물.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 경피 투여에 적합한 투여 제형은 물, 아세톤, 에탄올, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 부탄-1,3-디올, 이소프로필 미리스테이트(myristate), 이소프로필 팔미테이트(palmitate), 미네랄 오일, 및 이들의 혼합물로부터 선택된 적합한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29

제25항에 있어서, 상기 경피 투여에 적합한 투여 제형은 보습제(moisturizer) 또는 습윤제(humectant)를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 30

제25항에 있어서, 상기 경피 투여에 적합한 투여 제형은 투과 촉진제(penetration enhancer)를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 투과 촉진제(penetration enhancer)는 아세톤; 에탄올, 올레일 및 테트라히드로퓨릴과 같은 알코올; 디메틸 술폰과 같은 알킬 술폰; 디메틸 아세트아미드; 디메틸 포름아미드; 폴리에틸렌 글리콜; 폴리비닐피롤리돈과 같은 피롤리돈; 콜리돈 등급(Kollidon grade) (포비돈(Povidone), 폴리비돈(Polyvidone)); 요소(urea); 및 트윈 80(Tween 80) (폴리소르베이트 80) 및 스펠 60(Span 60) (소르비탄 모노스테아레이트)와 같은 수용성 또는 불용성 당 에스테르(sugar ester)로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 32

제23항에 있어서, 상기 조성물은 비경구 투여에 적합한 투여 제형으로 제조되는 약제학적 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 투여 제형은 정맥내 투여에 적합하고 용액, 에멀전(emulsion) 또는 현탁액(suspension)인 약제학적 조성물.

청구항 34

의약으로 사용하기 위한, 제15항 또는 제16항의 화합물.

청구항 35

진통제(analgesic)로 사용하기 위한, 제15항 또는 제16항의 화합물.

청구항 36

제15항 또는 제16항에서 청구된 화합물의 치료적 유효량을 비인간 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 통증 완화를 필요로 하는 비인간 개체를 치료하는 방법.

발명의 설명

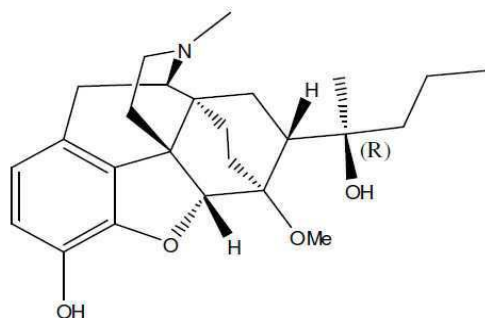
기술 분야

본 발명은 디히드로에토르핀(dihydroetorphine)을 제조하기 위한 신규한 방법, (S)-디히드로에토르핀 자체 및 그의 합성 중에 제조되는 중간체(intermediate)에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

[0002] (하기 제시된) (R)-디히드로에토르핀은 강력한 진통 약물이다.

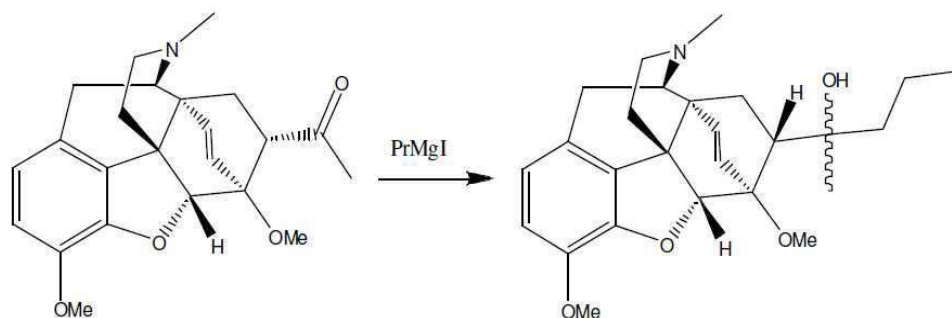


[0003]

[0004] (R)-디히드로에토르핀은 중국에서 20 내지 180 μg 의 투여량으로, 설하 제형(sublingual form)으로 주로 사용된다. 다른 진통제들과 비교하여, (R)-디히드로에토르핀은 강력한 진통(analgesia) 및 비교적 경미한 부작용을 야기하는 것으로 보고되어 있다. 경피 패취(transdermal patch)로서의 (R)-디히드로에토르핀의 사용이 또한 JP 제 10-231248호에 개시되어 있다. 그러나, 본 출원인이 아는 범위에서는, 그와 같은 패취는 시판되고 있지 않다.

[0005]

디히드로에토르핀은 에토르핀의 변이형(variant)이다. (R)-에토르핀을 동물, 예를 들면 코끼리의 마취에 사용하는 매우 강력한 오피오이드(opioid)이다. 이는 1960년대에 개발되었으며, 그의 제조를 위한 합성 경로가 잘 알려져 있다. 예를 들면, GB 제925,723호의 실시예 12는, 하기 제시된 바와 같이, 테바인(thebaine) 유도체에 그리냐르 시약(Grignard reagent) (프로필 마그네슘 요오다이드)을 첨가하는, 에토르핀의 합성을 개시한다:



[0006]

[0007] 상기 실시예 12에서 제시된 결과는, 조 반응 생성물을 메탄올을 사용하여 배산(trituration)시키면 α -이성질체가 생성되며, 메탄올 액(methanolic liquor)을 물로 희석시키고 액체를 제거(decant)하면 상기 메탄올 액으로부터 β -이성질체가 결정화될 수 있는 것으로 명시한다. 따라서, 본 출원인은 GB 제925,723호에 개시된 합성 경로가 디히드로에토르핀에 적용될 수 있으며, (R) 및 (S) 부분입체이성질체(diastereomer) 모두가 생성될 것으로 예상했다. 그러나, 실제로는 그렇지 않은 것으로 확인되었다. 오히려 디히드로 테바인 유도체로의 프로필 마그네슘 할라이드의 첨가는 예상치 않게 높은 입체선택성(stereoselectivity)으로 일어났으며, 오직 (R) 부분입체이성질체만이 수득되었다.

[0008]

본 발명자들이 인식하는 범위에서는, 디히드로에토르핀의 (S) 이성질체는 제조된 바 없다. 따라서, (S)-디히드로에토르핀을 제공하는 대안적 합성 경로, 및 특히, (S)-디히드로에토르핀을 높은 부분입체이성질체 초과량(diastereomeric excess)으로 생산하는 방법에 대한 요구가 있다. 이 이성질체는 공지된 입체이성질체의 입체화학을 확인하기 위해 요구된다.

[0009]

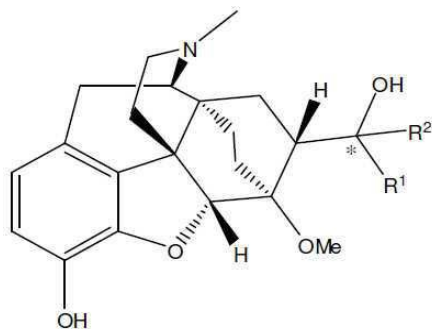
본 출원인은 이제, 이러한 요구를 충족시키는 방법을 발견하였다. 또한, 출원인은 디히드로에토르핀의 (S) 이성질체가 유용한 약리학적 성질, 및 특히 진통 효과를 보유한다는 것을 발견하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

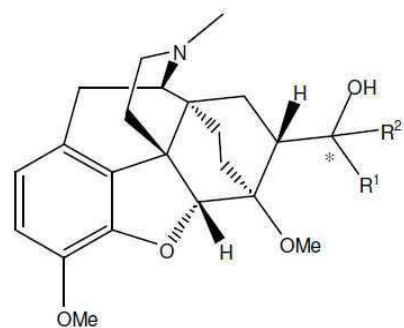
과제의 해결 수단

[0010] 따라서 일 양태에서, 본 발명은 하기 식 (VI)의 화합물, 또는 그의 염 또는 유도체의 제조 방법으로서,



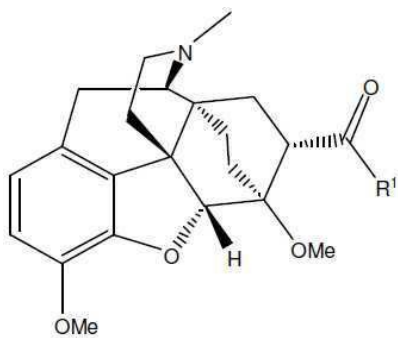
[0011]

[0012] (식 중, R¹ 및 R² 는 독립적으로 C₁₋₈ 알킬이고 *은 입체중심(stereocentre), 바람직하게는 S 입체중심을 나타낸다), R¹, R² 및 *가 상기 정의된 바와 같은 것인 하기 식 (V)의 화합물을 가수분해시키는 단계를 포함하는 것인, 제조 방법에 관한 것이다.



[0013]

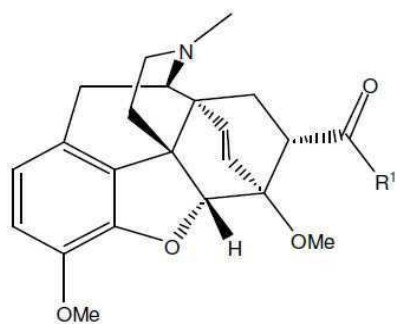
[0014] 본 발명의 바람직한 방법에서, 상기 식 (V)의 화합물은, (R¹이 상기 정의된 바와 같은 것인) 하기 식 (IV)의 화합물과,



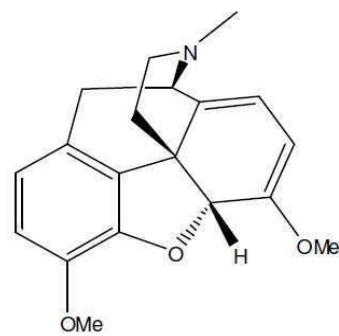
[0015]

[0016] R²는 C₁₋₈ 알킬이고, M은 금속이고, X는 할라이드이고, 및 p는 1 또는 0인 것인, 식 R²M(X)_p의 화합물을 반응시키는 것에 의해 제조된다.

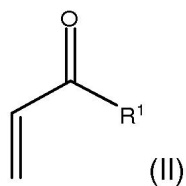
[0017] 본 발명의 추가적인 바람직한 방법에서, 상기 식 (IV)의 화합물은, (R¹이 상기 정의된 바와 같은 것인) 하기 식 (III)의 화합물을 환원시키는 것에 의해 제조된다.



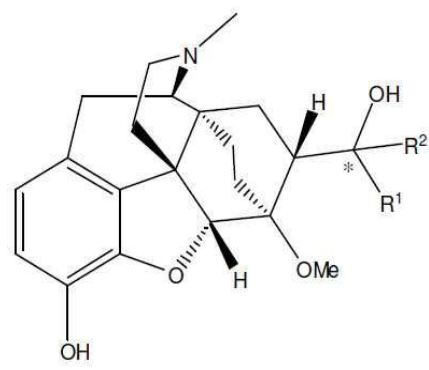
또한, 본 발명의 추가적인 바람직한 방법에서, 상기 식 (III)의 화합물은 하기 식 (I)의 화합물과



(R¹이 C₁₋₈ 알킬인 것인) 하기 식 (II)의 화합물을 반응시키는 것에 의해 제조된다.

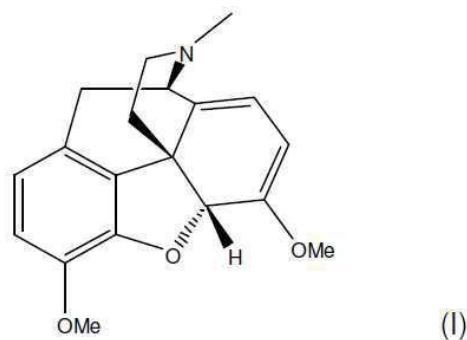


따라서, 또다른 양태에서, 본 발명은 하기 식 (VI)의 화합물, 또는 그의 염 또는 유도체의 제조 방법으로서,



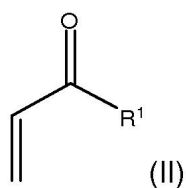
(식 중, R¹ 및 R²는 독립적으로 C₁₋₈ 알킬이고, *은 입체중심, 바람직하게는 S 입체중심을 나타낸다)

[0026] 하기 식 (I)의 화합물과



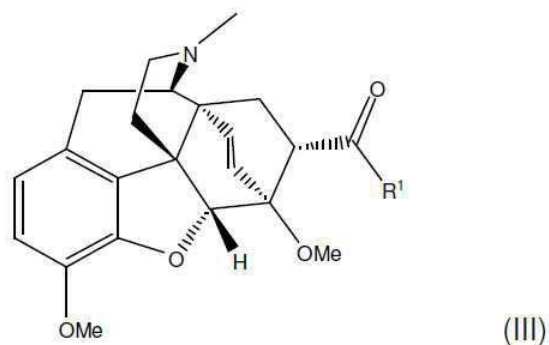
[0027]

[0028] (R^1 이 C_{1-8} 알킬인 것인) 하기 식 (II)의 화합물을 반응시켜



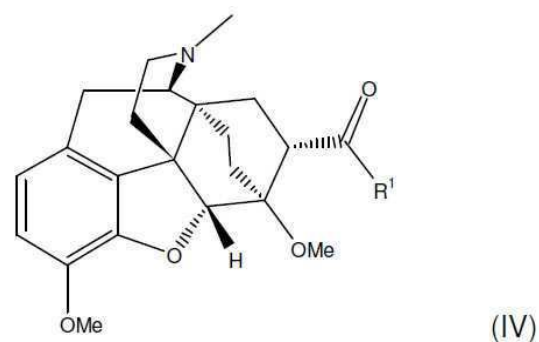
[0029]

[0030] (R^1 이 상기 정의된 바와 같은 것인) 하기 식 (III)의 화합물을 제공하는 단계;



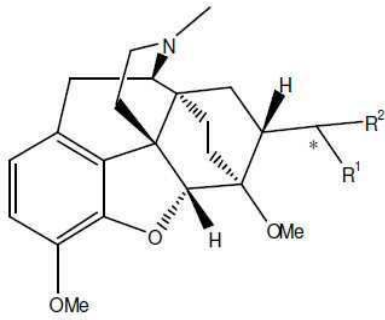
[0031]

[0032] 상기 식 (III)의 화합물을 환원시켜 (R^1 이 상기 정의된 바와 같은 것인) 하기 식 (IV)의 화합물을 생성시키는 단계;



[0033]

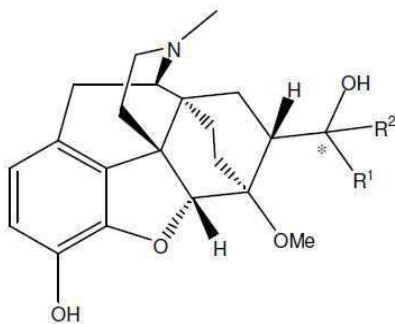
[0034] 상기 식 (IV)의 화합물과, R^2 는 C_{1-8} 알킬이고, M은 금속이고, X는 할라이드이고, 및 p는 1 또는 0인 것인 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물을 반응시켜, (R^1 , R^2 및 *이 상기 정의된 바와 같은 것인) 하기 식 (V)의 화합물을 제공하는 단계;



(V)

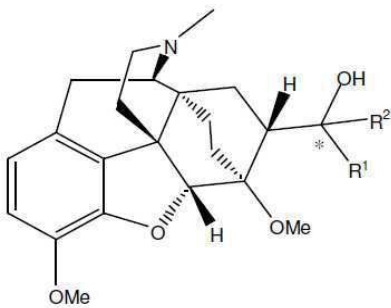
(iv) 상기 식 (V)의 화합물을 가수분해시켜 식 (VI)의 화합물을 생성하는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.

추가적인 양태에서, 본 발명은 R¹ 및 R²는 독립적으로 C₁₋₈ 알킬이고, *은 (S) 입체중심인 것인 하기 식 (VI)의 화합물, 또는 그의 염 또는 유도체에 관한 것이다.



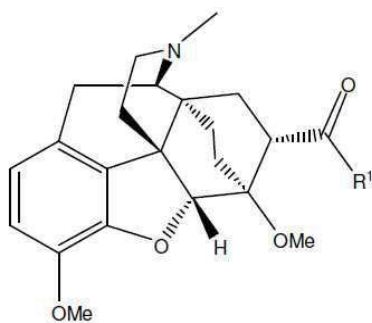
(VI)

또다른 추가적인 양태에서, 본 발명은 전술된 방법에서 중간체인 화합물들, 즉, 하기 제시된 바와 같은, 식 (V), (IV) 및 (III)의 화합물, 또는 적용가능한 경우, 그의 염 또는 유도체에 관한 것이다:



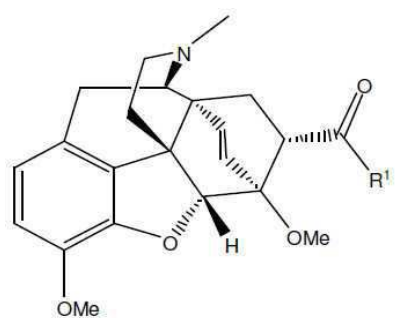
(V)

식 중, R¹ 및 R²는 독립적으로 C₁₋₈ 알킬이고, *은 (S) 또는 (R) 입체중심, 바람직하게는 (S) 입체중심을 나타낸다.



(IV)

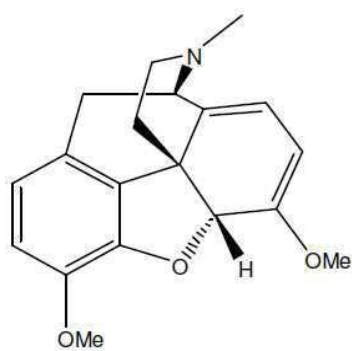
[0043] 식 중, R^1 은 C_{1-8} 알킬이다.



[0044]

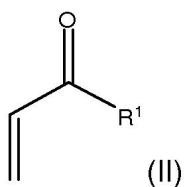
[0045] 식 중, R^1 은 C_{1-8} 알킬이다.

[0046] 또다른 추가적인 양태에 있어서, 본 발명은 하기 식(I)의 화합물과



[0047]

[0048] (식 중 R^1 은 C_{1-8} 알킬인 것인) 하기 식 (II)의 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는, 식 (III)의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.



[0049]

[0050] 또다른 양태에서, 본 발명은 전술된 신규한 화합물을 포함하는 조성물, 바람직하게는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0051] 또다른 양태에서, 본 발명은 의약에 (예를 들면, 진통제로서) 사용하기 위한, 전술된 바와 같은 화합물에 관한 것이다.

[0052] 또다른 양태에서, 본 발명은 통증 치료용 의약의 제조를 위한, 전술된 바와 같은 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 용어 "알킬(alkyl)"은 직쇄형(straight chained), 고리형(cyclic) 또는 분지형(branched), 포화 지방족 탄화수소를 지칭하는 것으로 사용된다. 화합물 (II)-(VI) 중에 존재하는 알킬 기는 직쇄형 알킬 기이다. 바람직한 알킬 기는 n 이 1 내지 8인, 식 C_nH_{2n+1} 을 갖는다. 일반적인 알킬 기는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸 및 옥틸을 포함한다. 상기 화합물 (II)-(VI) 중의 바람직한 알킬 기는 비치환 형태이다.

[0054] 식 (I)의 화합물은 테바인(thebaine)이며, 예를 들면, Tasmanian Alkaloids, Pty로부터 상업적으로 구입가능하다. 대안적으로 상기 식 (I)의 화합물은 문헌에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0055] 본 발명의 바람직한 방법에서, 식 (II)의 화합물 중 R^1 은 바람직하게는, C_{2-7} 알킬, 보다 바람직하게는 C_{3-5} 알킬,

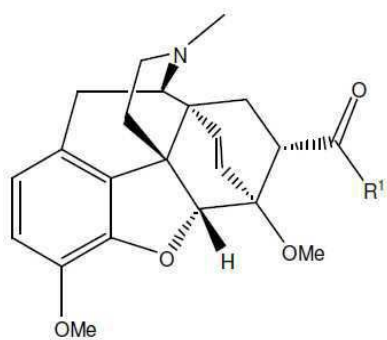
특히 C₃ 알킬 (예를 들면, n-프로필)이다. 특히 바람직한 식 (II)의 화합물은 헥센-3-온이다. 상기 화합물은 예를 들면, Sigma-Aldrich로부터 상업적으로 구입가능하다.

[0056] 식 (III)의 화합물을 생성시키기 위해, 식 (I)의 화합물을 식 (II)의 화합물과 반응시킨다. 이 화합물들이 거치는 반응은 일반적으로 디엘스-알더 반응(Diels-Alder reaction)으로 지칭된다. 디엘스-알더 반응은 당해 기술분야에 공지된 통상적인 조건 하에서 수행될 수 있다. 식 (I) 및 (II)의 화합물들의 반응은, 예를 들면, 임의의 통상적인 용매 중에서 수행될 수 있다. 60 °C를 초과하는 끓는점을 갖는 용매들 (예를 들면, 메탄올 및 에탄올)이 바람직하다. 에탄올이 특히 바람직한 용매이다.

[0057] 식 (I) 및 (II)의 화합물들 간의 통상적인 반응에서, 상기 화합물들을 예를 들면 10-24 시간 동안, 과량의 용매 중에서 가열하여 환류시킨다. 반응 과정은 예를 들면 TLC 및/또는 ¹H NMR을 사용하여 모니터링할 수 있다. 바람직한 반응에서, 식 (I)의 화합물에 대하여 1.2-15 몰 당량, 더욱 바람직하게는 1.5-10 몰 당량 또는 2-8 몰 당량의 식 (II)의 화합물이 사용된다. 특히 바람직한 반응에서, 상기 식 (I)의 화합물에 대해, 약 1.2-2 몰 당량, 더욱 바람직하게는 1.3-1.8 몰 당량, 예를 들면 약 1.5 몰 당량의 상기 식 (II)의 화합물이 사용된다.

[0058] 그 다음, 반응 혼합물을 냉각시키고 농축시킨다. 그로부터 얻어지는 생성물, 식 (III)의 화합물은 통상적인 워크업(work up) 과정을 통해 수득될 수 있으며, 선택적으로는 정제될 수 있다. 정제는, 예를 들면, 메탄올 또는 이소프로필 알코올로부터의 결정화에 의해 수행될 수 있다. 보다 바람직하게, 상기 식(III)의 화합물은 반응 용매로부터 직접적으로 결정화한다. 식 (III)의 화합물은 선택적으로, 재결정시킬 수 있다. 반응의 수율은 바람직하게는 60% 이상, 보다 바람직하게는 65% 이상, 예를 들면 80% 이상이다. 최대 수율은 100%이다. 식 (III)의 화합물의 순도(purity)는 바람직하게는 95% 이상이고, 보다 바람직하게는 97% 이상, 그보다 더욱 바람직하게는 99% 이상, 예를 들면 99.5% 이상이다. 최대 순도는 100%이다. 순도는 바람직하게는 HPLC를 사용하여 결정한다.

[0059] 본 발명의 바람직한 방법에서, 식 (III)의 화합물은 하기 식을 가지며:



[0060]

[0061] 식 중 R¹은 앞서 정의된 바와 같으며, 예를 들면, R¹은 C₂₋₇ 알킬이고, 보다 바람직하게는 C₃₋₅ 알킬이며, 특별하게는 C₃ 알킬 (예를 들면, n-프로필)이다.

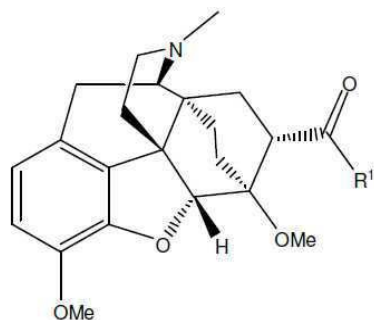
[0062] 상기 식 (III)의 화합물은 임의의 적절한 공지의 환원 반응에 의해 환원될 수 있으나, 바람직하게는 (예를 들면, Parr 관(Parr vessel) 내의 H₂, 또는 수소 이동(hydrogen transfer)을 사용한) 수소화(hydrogenation) 반응을 이용하여 환원된다. 식 (III)의 화합물은, 예를 들면, 수소 압력 하에서 (예를 들면 최대 50 psi H₂) 촉매 (예를 들면, 탄소상 팔라듐)를 포함한 용매 (예를 들면, 에탄올) 중에서 수소화할 수 있다. 반응 부피는 바람직하게는, 5-80 L의 범위이며, 바람직하게는 10-20 L, 예를 들면 약 12 L이다. 사용되는 촉매의 양은 바람직하게는 10-60 %wt 범위이며, 보다 바람직하게는 30-55 %wt, 예를 들면 약 50 %wt이다. 상기 반응은 30-100 °C의 온도, 바람직하게는 40-60 °C의 온도, 예를 들면 50 °C 또는 65 °C에서 수행될 수 있다.

[0063] 반응의 종결시에, 반응에 사용된 임의의 촉매 (예를 들면, 팔라듐)를 여과에 의해 제거할 수 있다. 생성물, 식 (IV)의 화합물은 통상적인 워크업 과정에 의해 분리시킬 수 있다. 상기 식 (IV)의 화합물을 선택적으로 정제시킨다.

[0064] 예를 들면, 헵탄과 같은, C₁₋₈ 알칸으로 세척하여 에탄올을 제거한다. 수소화 반응의 장점은, 그러나, 식 (IV)의 화합물이 크로마토그래피 및/또는 결정화에 의한 정제 없이도 사용될 수 있다는 것이다. 반응의 수율은 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 65% 이상, 그보다 더욱 바람직하게는 85% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 90%

이상이다. 최대 수율은 100%이다. 식 (IV)의 화합물은 바람직하게는 95% 이상의 순도, 보다 바람직하게는 99% 이상, 예를 들면 99.5% 이상의 순도로 수득된다. 최대 순도는 100%이다. 순도는 바람직하게는, HPLC를 사용하여 결정된다.

[0065] 본 발명의 바람직한 방법에서, 식(IV)의 화합물은 하기 식을 가지며:



(IV)

[0066]

[0067] 식 중, R^1 은 앞서 정의된 바와 같으며, 예를 들면, R^1 은 C_{2-7} 알킬이고, 보다 바람직하게는 C_{3-5} 알킬이며, 특별하게는 C_3 알킬 (예를 들면, n-프로필)이다.

[0068] 상기 식 (IV)의 화합물을 R^2 가 C_{1-8} 알킬이고, M이 금속이고 (예를 들면, 알칼리금속 또는 알칼리토금속), X는 할라이드이고, 및 p는 1 또는 0인 것인 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물과 반응시켜, 식 (V)의 화합물을 생성시킨다. 바람직한 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물에서, R^2 는 C_{1-3} 알킬이고, 보다 바람직하게는 C_{1-2} 알킬이며, 예를 들면 메틸이다.

[0069] 추가적인 바람직한 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물에서, M은 마그네슘 또는 리튬이고, 바람직하게는 마그네슘이다. M이 Mg인 경우, p는 바람직하게는 1이다. M이 리튬인 경우, p는 바람직하게는 0이다. 존재하는 경우, X는 바람직하게는 Cl, Br, 또는 I이다. 메틸 마그네슘 할라이드, 특히 메틸 마그네슘 브로마이드 및 메틸 마그네슘 요오다이드가 바람직한 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물이고, 특히 메틸 마그네슘 브로마이드가 바람직하다.

[0070] 상기 식 (IV)의 화합물과 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물의 반응은 일반적으로 친핵성 첨가 반응(nucleophilic addition reaction)으로 지칭된다. M이 Mg이고 X가 할라이드인 경우, 상기 반응은 흔히 그리냐르 첨가반응(Grignard addition)으로 지칭된다. 상기 첨가 반응은 임의의 통상적인 용매에서 수행될 수 있다. 바람직한 용매는 비수성(non-aqueous)이다 (예를 들면, 무수 용매). 바람직한 용매의 예는 에테르, 예를 들면 MTBE, THF 또는 디에틸 에테르이다. MTBE 또는 디에틸 에테르가 바람직하다. 디에틸 에테르가 특히 바람직한 용매이다. THF는 M이 Mg이고, X는 Cl이고, p가 2인 것인 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물이 사용되는 경우에 특히 바람직하다.

[0071] 첨가 반응은 바람직하게는 20 내지 60 °C 범위의 온도, 보다 바람직하게는 30 내지 45 °C, 예를 들면, 약 35 °C의 온도에서 수행된다. 바람직하게는 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물의 과량이 사용된다. 특히, 식 (IV)의 화합물에 대해 1.2-4 당량, 보다 바람직하게는 1.5-3 당량의 식 $R^2M(X)_p$ 의 화합물이 사용된다.

[0072] 식 (V)의 화합물은 통상적인 기법을 사용하여 분리될 수 있다. 상기 화합물은 선택적으로, 예를 들면 메탄올을 사용하여, 배산될 수 있다. 추가적으로, 또는 대안적으로, 상기 식 (V)의 화합물은 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 식 (V)의 화합물은 또한 결정화될 수 있다. 바람직하게는, 식 (V)의 화합물은 메탄올을 사용하여 결정화된다. 반응의 수율은 바람직하게는 20% 이상이고, 보다 바람직하게는 30% 이상, 예를 들면 20-60%, 그보다 더욱 바람직하게는 65% 이상이다. 최대 수율은 100%이다. 식 (V)의 화합물의 순도는 바람직하게는 95% 이상이고, 보다 바람직하게는 99% 이상, 예를 들면 99.5% 이상이다. 최대 순도는 100%이다. 순도는 바람직하게는 HPLC를 사용하여 결정된다.

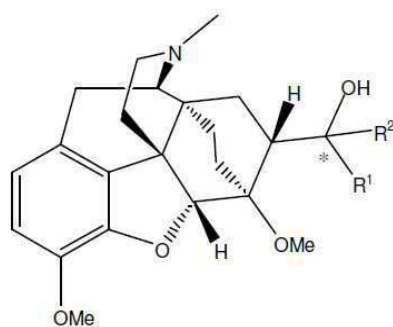
[0073] 첨가 반응은 식 (V)의 화합물 중 19번 탄소에서 새로운 입체중심을 생성시킨다. 이 입체중심의 입체배치(configuration)는 적어도 부분적으로는, R^1 및 R^2 의 속성에 의존한다. 따라서, (R) 및(S) 입체중심 모두가 생

성될 수 있다. 본 발명의 방법은 따라서, 식 (V)의 화합물들의 라세미 혼합물(racemic mixture)을 제공할 수 있다. 이에 상응하여, 본 발명은 식 (VI)의 화합물들의 라세미 혼합물, 예를 들면, 19-(R) 및 (S)-디히드로에토르핀의 라세미 혼합물을 제공한다.

[0074] 본 발명의 바람직한 방법에서, 19번 탄소에서는 (S) 입체중심이 생성된다. 특히 바람직한 방법에서, (S) 입체중심은 19번 탄소에서 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 예를 들면 95% 이상 또는 99% 이상의 부분입체이성질체 초과량(diastereomeric excess)으로 생성된다. 따라서 바람직한 방법에서, 식 (V)의 화합물은 (R)-이성질체가 부재하는 상태, 또는 실질적으로 부재하는 상태로 제공된다. 바람직하게는, 식 (V)의 화합물은 1 %wt, 훨씬 더 바람직하게는 0.5 %wt 미만의 (R)-이성질체를 포함하여 제공된다.

[0075] 본 발명의 특히 바람직한 방법에서, R^1 은 C_{3-6} 알킬 (예를 들면, 프로필)이고, R^2 는 C_{1-2} 알킬 (예를 들면, 메틸)이고, 및 (S) 입체중심은 첨가 반응 중에 19번 탄소에서 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 예를 들면, 95% 이상 또는 99% 이상의 부분입체이성질체 초과량으로 생성된다.

[0076] 따라서, 본 발명의 바람직한 방법에서, 식 (V)의 화합물은 하기 식을 가지며:

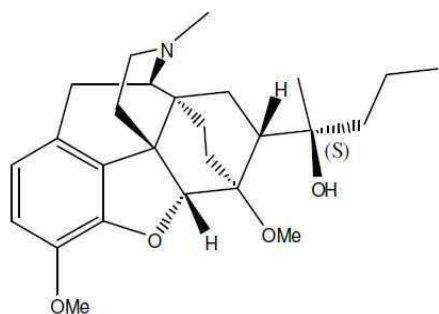


(V)

[0077]

[0078] 식 중 R^1 및 R^2 는 전술된 바와 같으며, 예를 들면, R^1 은 C_{2-7} 알킬이고, 보다 바람직하게는 C_{3-5} 알킬, 특히 C_3 알킬 (예를 들면, n-프로필)이고, R^2 는 C_{1-3} 알킬이고, 보다 바람직하게는 C_{1-2} 알킬, 예를 들면 메틸이고, (*)는 입체 중심을 나타내며, 바람직하게는 S 입체중심을 나타낸다.

[0079] 본 발명의 특히 바람직한 방법에서, 식 (V)의 화합물은 하기와 같다:



(Va)

[0080]

[0081] 상기 언급한 바와 같이, 식 (V)의 화합물은 선택적으로 결정화될 수 있다. 본 발명의 바람직한 방법에서는, 상기 식 (V)의 화합물을 결정화시킨다. 결정화 과정을 위해 임의의 통상적인 용매, 예를 들면, C_{1-4} 알코올, 물, 아세톤, 아세토니트릴, DCM 및 MTBE를 사용할 수 있다. 메탄올, 에탄올, 물 및 이들의 혼합물들이 바람직한 결정화 용매이며, 특히 에탄올/물 및 에탄올이 바람직하다. 일반적인 결정화 과정에서, 첨가 반응으로부터 수득된 식 (V)의 화합물의 일정량, 바람직하게는 그의 최소량을 선택된 용매 중에 용해시키고, 용액을 예를 들면 3-4일 동안 정치시킨다. 바람직하게는, 결정화는 -5 내지 5 °C에서, 예를 들면 0-4 °C에서 수행된다.

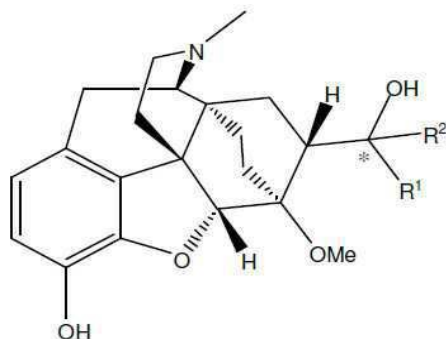
[0082] 상기 식 (V)의 화합물을 바람직하게는 알칼리 금속 수산화물로 가수분해시켜 식 (VI)의 화합물을 생성시킨다. 바람직한 알칼리 금속 수산화물은 KOH이다. 상기 가수분해 반응에, 바람직하게는 과량의 알칼리 금속 수산화물, 예를 들면 식 (V)의 화합물에 대하여 10-40 당량의 과량을 사용한다. 반응은 임의의 통상적인 용매 중에서 수행될 수 있다. 디에틸렌 글리콜이 바람직한 용매이다.

[0083] 가수분해 반응은 바람직하게는 150 내지 220 °C 범위의 온도, 예를 들면 약 180-200 °C의 온도에서 수행한다. 반응의 진행을 통상적인 기법, 예를 들면 TLC에 의해 모니터링할 수 있으나, 일반적으로 10-20 시간, 예를 들면 12-18 시간이 소요될 것이다. 반응이 완료된 후에, 식 (VI)의 화합물을 통상의 기법을 사용하여 분리시킬 수 있다. 상기 식 (VI)의 화합물을 배산시킬 수 있다. 반응의 수율은 바람직하게는 40% 이상이며, 보다 바람직하게는 45% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 85% 이상, 그보다 더 바람직하게는 90% 이상이다. 최대 수율은 100%이다. 식 (VI)의 화합물의 순도는 바람직하게는 90% 이상이며, 그보다 더 바람직하게는 95% 이상이다. 최대 순도는 100%이다. 순도는 바람직하게는 HPLC를 사용하여 결정한다.

[0084] 식 (VI)의 화합물도 결정화시킬 수 있다. 결정화에 사용하기에 바람직한 용매는 AcCN 및 MTBE이다. 보다 바람직하게는, 식 (VI)의 화합물을 C₁₋₄ 알코올 및/또는 물, 예를 들면 에탄올 및/또는 에탄올/물로부터 결정화한다.

[0085] 바람직한 가수분해 반응에서, 식 (V)의 화합물 중에 존재하는 각각의 입체 중심의 입체화학은 유지된다. 바람직하게는 식 (VI)의 화합물, 예를 들면 19-S-디히드로에토르핀은 (R)-이성질체가 부재하는 상태 또는 실질적으로 부재하는 상태로 제공된다. 바람직하게는 1 %wt 미만, 보다 바람직하게는 0.5 %wt 미만, 훨씬 더 바람직하게는 0.01 %wt 미만의 (R)-이성질체가 존재한다.

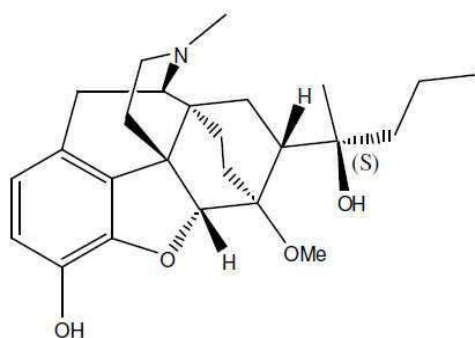
[0086] 따라서, 바람직한 방법에서 상기 식 (VI)의 화합물은 하기와 같으며:



[0087]

[0088] 식 중, R¹ 및 R²는 전술된 바와 같고, 예를 들면 R¹은 C₂₋₇ 알킬이며, 보다 바람직하게는 C₃₋₅ 알킬, 특히 C₃ 알킬 (n-프로필)이고, R²는 C₁₋₃ 알킬이고, 보다 바람직하게는 C₁₋₂ 알킬, 예를 들면 메틸이고, 및 (*)은 입체중심을 나타내며, 바람직하게는 S 입체중심을 나타낸다. 바람직하게는, 식 (VI)의 화합물은 예를 들면 HPLC에 의해 결정된, 99% 이상의 순도를 갖는다.

[0089] 특히 바람직한 방법에서, 식 (VI)의 화합물은 하기와 같다:



(VIa)

[0090]

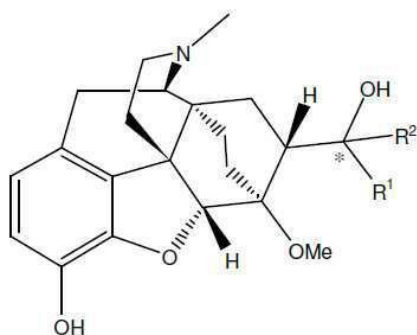
[0091] 전술된 화합물 (V) 및 (VI)은 당해 기술분야에 잘 알려진 기법에 의해 그의 염 및 유도체로 전환될 수 있다. 바람직한 염은 약제학적으로 허용가능한 염이다. 바람직한 유도체는 약제학적으로 허용가능한 유도체이다. 때때로 소량으로 (예를 들면, < 5 %wt) 발생하는 유도체는 6-히드록시 화합물이다. 이 유도체는 가수분해 반응이 추가적으로 6-메톡시 기를 가수분해시킬 경우에 생성된다. 상기 6-히드록시 유도체는 재결정에 의해 분리될 수 있다.

[0092] 바람직한 염은, 본 발명의 화합물들의 생물학적 효능(effectiveness) 및 특성을 유지하는 염이고, 적절한 무독성의 유기산 또는 무기산으로부터 형성된다. 산 부가 염(acid addition salt)이 바람직하다. 대표적인 염의 예

들은 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 술폰산(sulfamic acid), 인산 및 질산과 같은 무기산으로부터 유래된 염, 및 p-톨루엔설폰산(p-toluenesulfonic acid), 살리실산, 메탄설폰산, 옥살산, 숙신산, 시트르산, 말산(malic acid), 젖산(lactic acid), 푸마르산(fumaric acid), 트리플루오로 아세트산 등과 같은 유기산으로부터 유도된 염들을 포함한다. 화합물의 개선된 물리적 및 화학적 안정성, 흡습성(hygroscopicity), 유동성(flowability) 및 용해성을 얻기 위해 화합물을 염으로 변형시키는 것은 화학자들에게 주지된 기법이다.

[0093] 본 발명의 바람직한 화합물은 R^1 이 바람직하게는 C_{2-7} 알킬, 보다 바람직하게는 C_{3-5} 알킬, 특히 C_3 알킬 (예를 들면, n-프로필)인 것인, 전술된 식 (VI), (V), (IV) 및 (III)의 화합물들이다. 바람직한 식 (VI) 및 (V)의 화합물에서, R^2 는 C_{1-3} 알킬이고, 보다 바람직하게는 C_{1-2} 알킬, 예를 들면 메틸이다. 본 발명의 화합물 (VI) 및 (V)에서, 19번 탄소의 입체중심은 (S)이다.

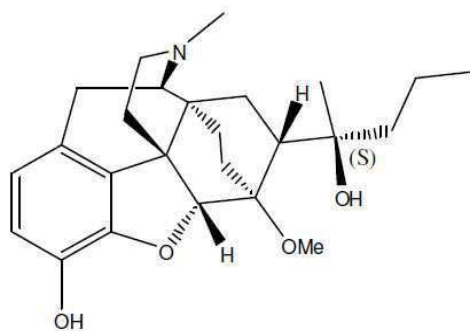
[0094] 바람직한 식 (VI)의 화합물은 하기 식을 갖는 화합물로서:



[0095]

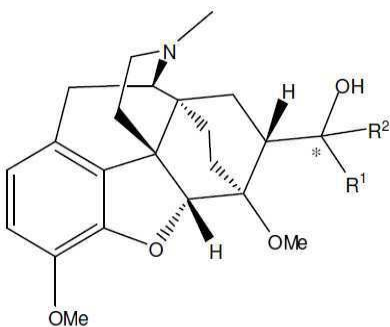
[0096] 식 중, R^1 및 R^2 는 전술된 바와 같고 (예를 들면, R^1 은 C_{2-7} 알킬, 보다 바람직하게는 C_{3-5} 알킬, 특히 C_3 알킬 (예를 들면, n-프로필)이고, R^2 는 C_{1-3} 알킬, 보다 바람직하게는 C_{1-2} 알킬이다), (*)은 (S) 입체중심을 나타낸다.

[0097] 특히 바람직한 식 (VI)의 화합물은 하기 식을 갖는 화합물이다:



[0098]

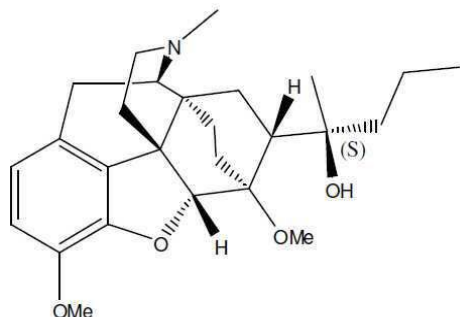
[0099] 본 발명의 추가적인 바람직한 화합물은 식 (VI)의 화합물의 제조에서 중간체인 화합물들이다. 따라서, 본 발명의 다른 바람직한 화합물들은 하기 식 (V-S)의 화합물로서:



[0100]

[0101] 식 중, R^1 및 R^2 는 전술된 바와 같고 (예를 들면, R^1 은 C_{2-7} 알킬, 보다 바람직하게는 C_{3-5} 알킬, 특히 C_3 알킬 (예를 들면, n-프로필)이고, R^2 는 C_{1-3} 알킬, 보다 바람직하게는 C_{1-2} 알킬이다), (*)은 (S) 또는 (R) 입체중심, 바람직하게는 (S) 입체중심을 나타낸다.

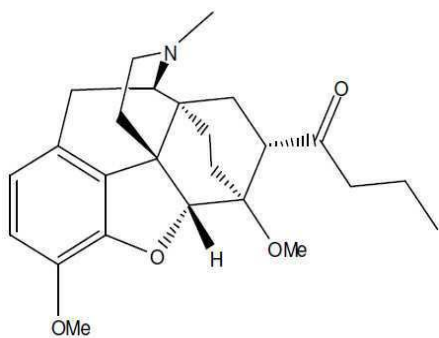
[0102] 특히 바람직한 식 (V)의 화합물은 하기와 같다:



(Va)

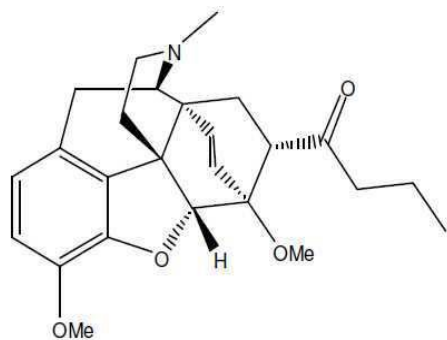
[0103]

[0104] 추가적인 바람직한 중간체는 하기 제시된, 식 (IVa) 및 (IIIa)의 화합물들이다:



(IVa)

[0105]



(IIIa)

[0106]

[0107] 전술된 바와 같이, 상기 (IIIa)와 같은, 식 (III)의 화합물은 식 (II)의 화합물과의 디엘스-알더 반응(Diels-Alder reaction)에 의해 생성될 수 있다. 이 반응은 본 발명의 추가적인 양태를 형성한다. 바람직한 R^1 은 전술된 바와 같다.

[0108] 본 발명의 화합물들은 다양한 용도를 갖는다. 화합물 (VI-S)는 예를 들면, 공지된 디히드로에토르핀 생성물의 (R) 키랄성(chirality)을 확인하는데 사용될 수 있다. 이와 같은 본 발명의 화합물의 용도는 본 명세서에서 후술되는 실시예에 예시되어 있다. 본 발명의 화합물 (III) 및 (IV)는 또한, 유용한 약제학적 특성을 갖는 것으로 알려진, (R)-디히드로에토르핀의 제조에 유용하다.

[0109] 또한, 식 (VI-S), (V-S), (V-R), (IV) 및 (III)의 화합물, 특히 식 (VI-S)의 화합물은 조성물, 바람직하게는 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한, 전술된 본 발명의 화합물 (예를 들면, 식 (VI-S), (V-S), (V-R), (IV) 및 (III)의 화합물, 특히 식 (VI-S)의 화합물) 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 본 발명의 화합물, 예를 들면 식 (VI-S)의 화합물은 조성물 중에 단독으로 또는 또다른 활성 성분과 조합된 상태로 존재할 수 있다.

- [0110] 본 발명의 조성물, 예를 들면 약제학적 조성물은 임의의 통상적인 제형(form)을 취할 수 있다. 그러나 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 경피 투여(transdermal administration)에 적합한 투여 제형(dosage form)으로 제조될 수 있다. 본 발명의 대안적인 바람직한 조성물은 비경구 투여, 예를 들면 정맥내 투여에 적합한 투여 제형으로 제조될 수 있다.
- [0111] "경피(transdermal)" 전달은 본 명세서에서 전술된 화합물들을 개체의 피부 표면에 투여하여, 피부 조직을 통해 개체의 혈류 내로 통과하도록 한 투여를 의미한다. 용어 "경피(transdermal)"는 경점막(transmucosal) 투여, 즉 개체의 점막(예를 들면, 설하(sublingual), 구강(buccal), 질(vaginal), 직장(rectal)) 표면에 화합물을 투여하여 점막 조직을 통해 개체의 혈류 내로 통과하도록 한 투여를 포함하도록 의도된다.
- [0112] 본 발명의 경피 투여 제형은 당의정(mouth pastille), 스프레이(spray), 에어로졸(aerosol), 크림, 로션, 연고, 겔(gel), 용액, 에멀전(emulsion), 현탁액(suspension), 또는 당업자에게 공지된 다른 제형들을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 구강(oral cavity) 내의 점막 조직의 치료에 적합한 투여 제형은 구강세척제(mouthwash) 또는 구강 겔(oral gel)로서 제제화될 수 있다. 또한, 경피 투여 제형은 "리저버 형(reservoir type)" 또는 "매트릭스 형(matrix type)" 패취(patch)를 포함하며, 이는 원하는 양의 활성 성분을 투과시키기 위해, 특정한 기간 동안 피부에 적용하고 사용할 수 있다.
- [0113] 본 발명에 포함되는 경피 투여 제형의 제공에 사용될 수 있는 적절한 부형제(예를 들면, 담체(carrier) 및 희석제) 및 기타 물질들은 약제학 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있으며, 특정한 약제학적 조성물 또는 투여 제형이 적용될 구체적인 조직에 따라 달라진다. 이 사실을 고려할 때, 통상적인 부형제는 무독성이고 약제학적으로 허용가능한, 로션, 팅크제(tincture), 크림, 에멀전, 겔 또는 연고를 형성하기 위한, 물, 아세톤, 에탄올, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 부탄-1,3-디올, 이소프로필 미리스테이트(myristate), 이소프로필 팔미테이트(palmitate), 미네랄 오일, 및 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 경우, 보습제(moisturizer) 또는 습윤제(humectant)가 또한 약제학적 조성물 및 투여 제형에 첨가될 수 있다. 그와 같은 추가적인 성분들의 예는 당해 기술분야에 잘 알려져 있다.
- [0114] 치료되어야 할 구체적인 조직에 따라, 본 발명의 화합물을 사용한 치료 전, 치료와 동시에 또는 상기 치료에 후속적으로 추가적 성분들이 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 화합물의 조직 내로의 전달을 보조하기 위해 투과 촉진제(penetration enhancer)가 사용될 수 있다. 적절한 투과 촉진제는 아세톤; 에탄올, 올레일 및 테트라히드로퓨릴과 같은 다양한 알코올; 디메틸 술폭시드와 같은, 알킬 술폭시드; 디메틸 아세트아미드; 디메틸 포름아미드; 폴리에틸렌 글리콜; 폴리비닐피롤리돈과 같은, 피롤리돈; 콜리돈 등급(Kollidon grade) (포비돈(Povidone), 폴리비돈(Polyvidone)); 요소(urea); 및 트윈 80(Tween 80) (폴리소르베이트 80) 및 스펠 60(Span 60) (소르비탄 모노스테아레이트)와 같은, 다양한 수용성 또는 불용성 당 에스테르(sugar ester)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0115] 약제학적 조성물 또는 투여 제형, 또는 상기 약제학적 조성물 또는 투여 제형이 적용되는 조직의 pH는 하나 이상의 활성 성분들의 전달을 개선시키기 위해 조정될 수 있다. 마찬가지로, 전달을 개선시키기 위해 용매 담체(solvent carrier)의 극성, 그의 이온 강도(ionic strength), 또는 긴장성(tonicity)이 조정될 수 있다. 유용하게 하나 이상의 활성 성분의 친수성 또는 친유성(lipophilicity)을 변화시켜 전달을 개선시키기 위해 스테아레이트(stearate)와 같은 화합물이 약제학적 조성물 또는 투여 제형에 첨가될 수 있다. 이와 관련하여, 스테아레이트는 제제(formulation)의 지질 비히클(lipid vehicle)로서, 유화제(emulsifying agent) 또는 계면활성제로서, 및 전달-촉진제(delivery-enhancing agent) 또는 투과 촉진제(penetrating-enhancing agent)로서 작용할 수 있다. 얻어진 조성물의 특성을 추가적으로 조절하기 위해, 활성 성분들의 다른 염, 수화물, 또는 용매화물이 사용될 수 있다.
- [0116] 본 발명의 화합물(예를 들면, 식(VI-S)의 화합물)의 설하 투여를 위한 경구용 겔(oral gel)은, 상기 화합물을 향미제(flavoring agent)를 포함한 하나 이상의 적절한 부형제와 혼합하는 것에 의해 제조할 수 있다. 본 발명의 화합물(예를 들면 식(VI-S)의 화합물)의 직장 투여를 위한 좌제(suppository)는, 상기 화합물을 코코아 버터, 살리실레이트, 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적절한 부형제와 혼합하는 것에 의해 제조할 수 있다. 질내 투여를 위한 제제는 활성 성분 및 당업계에 공지된 적절한 담체를 함유하는, 페서리(pessary), 탐폰(tampon), 크림, 겔, 페이스트, 폼(foam), 또는 스프레이제의 제형일 수 있다.
- [0117] 국소(topical) 투여를 위해, 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 피부, 눈, 귀 또는 코로의 투여에 적합한, 크림, 연고, 리니먼트(liniment), 로션, 에멀전, 현탁액, 겔, 용액, 페이스트, 분말, 스프레이 및 점적 약제(drop)의 형태일 수 있다. 또한 국소 투여는 경피용 패취와 같은 수단에 의한, 경피 투여를 포함할 수

있다. 이 제형의 전달이 특히 바람직하다.

- [0118] 정맥내 투여는 액체 제형의 본 명세서에서 기술된 화합물들의 정맥 내로의 직접적인 투여를 의미한다. 정맥내 투여에 적합한 투여 제형은, 용액, 에멀전 및 현탁액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0119] 따라서, 추가적인 양태에서, 본 발명은 정맥내로 투여되는 것인, 진통제로서 사용하기 위한 앞서 정의된 바와 같은 화합물, 및 특히 식 (VI-S)의 화합물을 제공한다.
- [0120] 일반적으로, 정맥내 투여를 위한 조성물은 멸균된 등장성 수성 완충액(sterile isotonic aqueous buffer)을 포함한다. 필요한 경우, 상기 조성물은 또한 가용화제(solubilizing agent)를 포함할 수 있다. 성분들은 개별적으로, 또는 단위 투여 제형 내에 함께 혼합되어 제공될 수 있다. 예를 들면, 상기 성분들은 밀봉(hermetically sealed) 용기, 예를 들면 활성제의 양이 표시된 앰폴(ampoule) 또는 사체트(sachette) 내에 동결건조된(lyophilized) 건조 분말 또는 무수 농축물(water free concentrate)로서, 및 투여 전 혼합하기 위한 멸균수 또는 완충액의 앰폴로서 개별적으로 제공될 수 있다. 대안적으로, 상기 조성물은 사전-혼합된(pre-mixed) 형태로서 제공될 수 있다.
- [0121] 본 발명의 화합물 (예를 들면, 식 (VI-S)의 화합물)은 예를 들면, 진통효과 (analgesia)를 제공하기 위한, 의약으로서 사용될 수 있다. 필요한 화합물의 투여량은 예를 들면, 치료 대상 객체, 치료되어야 할 통증의 중증도, 사용되는 화합물, 투여 방식 등에 따라 달라질 것이나, 당업자에 의해 용이하게 결정될 것이다.
- [0122] 따라서, 추가적인 양태에서, 본 발명은 개체에게 본 명세서에서 기술된 화합물 (예를 들면, 식 (VI-S)의 화합물)의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 통증 완화를 필요로 하는 개체(예를 들면, 포유동물)의 치료 방법을 제공한다. 또한 놀랍게도, 흰담비(ferret)에서의 오심 및 구토에 대한 표준 시험에서, R-DHE 및 S-DHE는 하기 기술되는 시험에서 사용된 것과 유사한 투여량 범위에서 오심 또는 구토를 유발하지 않는 것으로 밝혀졌다.
- [0123] 본 발명의 화합물은 침해수용성(nociceptive) 및 신경병증성(neuropathic) 통증의 치료에 특히 유용하다.

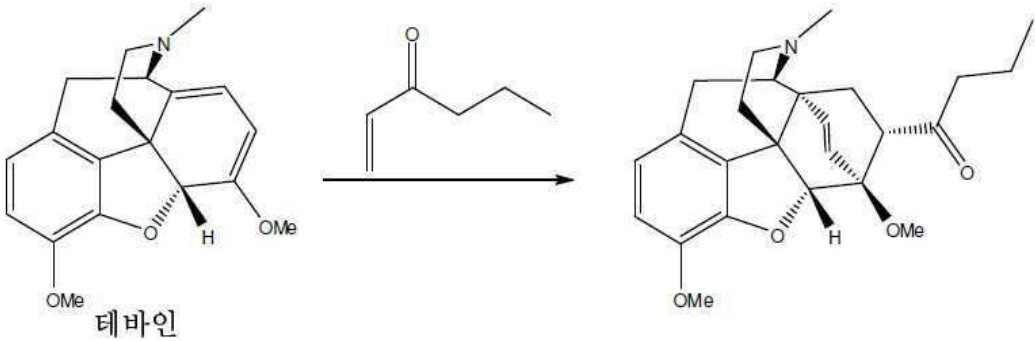
도면의 간단한 설명

- [0124] 본 발명은 이제 후술되는 비제한적인 실시예 및 도면들을 참조하여 설명될 것이다.
- 도 1은 (R) 및 (S)-19 프로필디히드로테비놀에 대한 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 2 및 3은 (R)-19 프로필디히드로테비놀의 X선 구조를 나타낸다.
- 도 4 및 5는 (S)-19 프로필디히드로테비놀의 X선 구조를 나타낸다.
- 도 6 및 7은 (R)-디히드로에토르핀의 X선 구조를 나타낸다.
- 도 8 및 9는 (S)-디히드로에토르핀의 X선 구조를 나타낸다.
- 도 10은 (R) 및 (S)-디히드로에토르핀에 존재하는 모든 키랄 탄소의 입체화학을 나타낸다.
- 도 11은 (R) 또는 (S) DHE 또는 표준물질 또는 비교물질의 정맥내 투여 후의 시간 추이(time-course) 곡선을 보여준다.
- 도 14 내지 도 17은 (R) 또는 (S) DHE 또는 표준물질 또는 비교물질의 정맥내 투여 후 투여량 반응 곡선을 보여준다.
- 도 18 내지 도 23은 신경병증성 통증의 척수 신경 결찰 모델에서, (R) 또는 (S) DHE 또는 표준물질 또는 비교물질의 정맥내 투여 효과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0125] 실시예
- [0126] (S)-디히드로에토르핀의 제조
- [0127] 단계 1 - 디엘스 알더 반응

[0128] 반응식



[0129]

[0130] 방법

[0131] 테바인을 하기 표에 특정된 용매 중에 헥센-3-온으로 처리하고, 가열하여 환류시켰다. 적절한 시간 (하룻밤) 경과 후에, 반응물을 냉각시키고, 혼합물을 증발시켰다. 그로부터 얻은 오일을 이소프로필아세테이트(IPAc) 중에 용해시키고, 1 M 염산 용액으로 세척하였다. 산성층(acidic layer)을 모으고, IPAc로 세척한 다음, 소듐 비카르보네이트 용액으로 염기성화하고, 최종적으로 디클로로메탄(DCM)으로 추출하였다. DCM 층을 증발시켜 황색 고체를 얻었다.

표 1

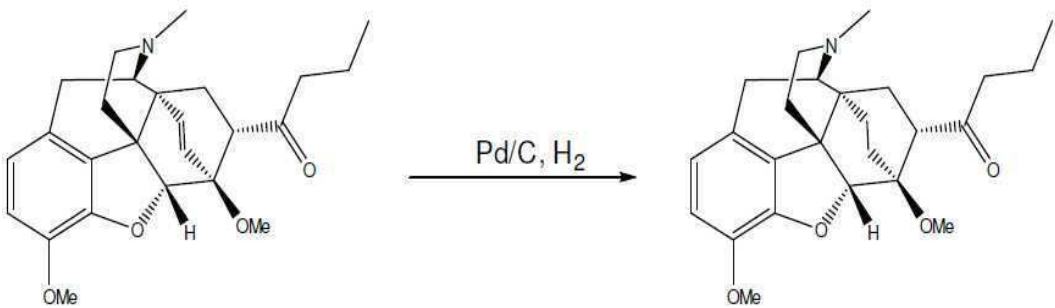
[0132] 실험의 개요, 단계 1

| 규모(scale) | 조건 | 온도(℃) | 코멘트 |
|-----------|----------------------------------|-------|--------------------------------|
| 500 mg | 벤젠 (20 부피) 헥센-3-온 (2.0 몰 당량) | 환류 | 밤새 환류시켜 약 40% 완료됨 |
| 4.5 g | 에탄올 (10 부피) 헥센-3-온 (2.0 몰 당량) | 환류 | NMR에 의해 68% 완료 |
| 4.5 g | 에탄올 (10 부피) 헥센-3-온 (7.5 몰 당량) | 환류 | NMR에 의해 > 95% 완료, 분리 수율 70% |

[0133] 에탄올을 용매로 사용하여, 생성물의 최종 분리 수율은, 워크업(work-up) 후에 얻은 황색 고체로서 70% 였으며, ¹H NMR에 의한 품질은 매우 양호한 것으로 관찰되었다.

[0134] 단계 2 - 수소화 반응

[0135] 반응식



[0136]

[0137] 방법

[0138] 단계 1에서 얻은 19-프로필테바논 (4.1 g) 중간체를 최대 50 psi의 수소 압력 하에서 탄소상 팔라듐(palladium on carbon) (1 g; 10%)을 사용하여 에탄올 (60 mL) 중에서 수소화시켰다. 용기(vessel)의 온도를 ~50 ℃로 유지하였고, 압력은 더 이상의 수소 흡수(uptake)가 관찰되지 않을 때까지 50 psi로 유지하였다. 촉매를 여과시키

고, 용매를 진공 하에서 증류시켜 제거하였다. 분리 수율은 총 91% 였으며, 3.8 g의 생성물을 얻었다.

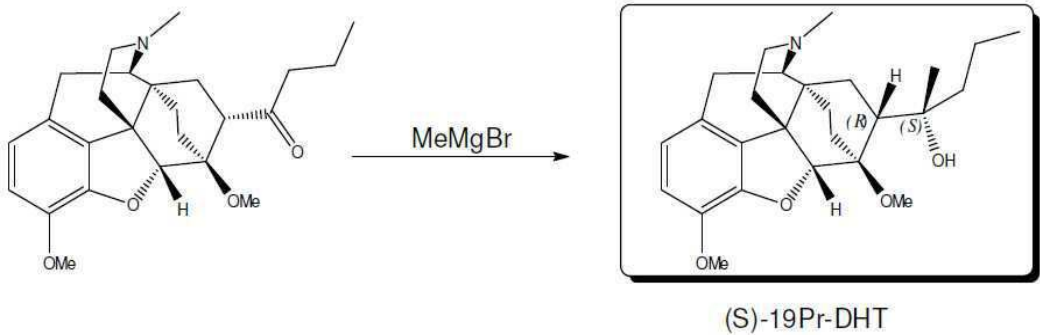
표 2

실험의 개요, 단계 2

| 규모 | 조건 | 온도(℃) | 코멘트 |
|-------|---|-------|-----------|
| 4.1 g | 에탄올 (60 mL) 1 g Pd/C (10%) 수소 (50psi) | 50 ℃ | 91% 분리 수율 |

단계 3 - 그리나르 첨가반응

반응식



방법

19-프로필디히드로테비논 (단계 2 생성물)을 디에틸 에테르 (35 부피) 중에 용해시켰다. 20-25 ℃에서 이 용액에 메틸 마그네슘 브로마이드 (92.6 몰 당량)를 5분에 걸쳐서 첨가하였다 (소량의 발열). 그 다음, 생성된 혼합물을 내부 온도(internal temperature) ~40 ℃까지 ~2 시간 동안 가열한 후에, 냉각시키고, 암모늄 클로라이드 용액으로 반응을 종료시켰다(quench). 상기 혼합물을 2-메틸 THF로 추출하고, 유기층을 진공에서 증발시켜 점성의 오일을 얻었다.

표 3

실험의 개요, 단계 3

| 규모 | 조건 | 온도(℃) | 코멘트 |
|--------|--|-------|---|
| 0.13 g | 2-디에틸 에테르 (25 부피) 3 M MeMgBr (1.5 당량) | 40 ℃ | 양호한 품질의 물질이 생성됨 |
| 0.79 g | 2-디에틸 에테르 (25 부피) 3 M MeMgBr (1.5 당량) | 35 ℃ | 밤새 교반함. 워크업 후 순도 93%. 조 생성물을 메탄올 중에 배산시켜 0.32 g의 순수한 물질 및 0.5 g의 잔여 불순물을 얻음. |
| 2.2 g | 2-디에틸 에테르 (25 부피) 3 M MeMgBr (1.5 당량) | 35 ℃ | 2.6 g의 조물질(순도 ~90%)을 분리 함. 메탄올 중에 배산시켜 1.6g의 순수한 물질을 얻음. |

그리나르 첨가반응의 유일한 생성물은 (S)-거울상이성질체(enantiomer)이다. (R)-거울상이성질체는 검출되지 않았다.

단계 4 - (R) 및 (S)-19-프로필디히드로테비놀의 결정화

[0148] X선 결정학(crystallography)상 높은 품질의 단일 결정을 제조하기 위해, 다수의 용매 중에서 일련을 실험들을 수행하여 19-프로필디히드로테비놀의 단일 결정을 성장시키기 위한 최적의 용매 시스템을 결정하였다. 상기 실험들을 하기 표 4에 요약하였다. R-거울상이성질체를 대안적 방법을 사용하여 제조하였다.

[0149] 일반적으로 사용된 결정화 방법은 다음과 같았다: 소량의 (단계 3에서 수득한) 고체 19-프로필디히드로테비놀을 용매의 최소량만을 사용하여 용해시켰다. 용액을 최대 3-4일 동안 정치시키고, 단일 결정을 분리하기 위해 용매를 여과에 의해, 또는 경사분리(decant)에 의해 제거하였다.

표 4

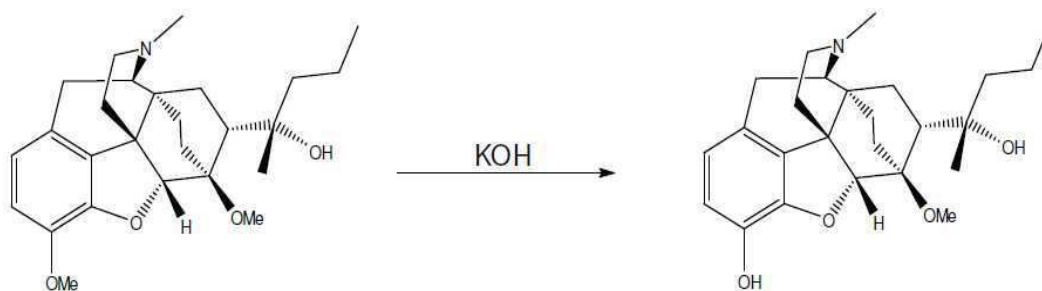
[0150] 재결정화(re-crystallization)의 개요

| 용매 | 공용매 | 부분입체이성질체 | 온도 | 결정 | 코멘트 |
|------|---------|----------|-------------------------|----|---------------|
| MTBE | 사용하지 않음 | (S) | RT | 있음 | 높은 품질 - X선 분석 |
| AcCN | 사용하지 않음 | (S) | RT | 있음 | 높은 품질 |
| DCM | 사용하지 않음 | (R) | 고온에서 용해 (dissolved hot) | 있음 | 높은 품질 - X선 분석 |
| 아세톤 | 사용하지 않음 | (R) | 고온에서 용해 | 있음 | 높은 품질 - X선 분석 |
| 에탄올 | 사용하지 않음 | (R) | 고온에서 용해 | 있음 | 높은 품질 - X선 분석 |

[0151] 각각의 부분입체이성질체에 대한 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼이 도 1에 제시된다.

[0152] 단계 5 - (S)-19-프로필디히드로테비놀의 가수분해

[0153] 반응식



[0154] 방법

[0155] (단계 3에서 얻은) (S)-19-프로필디히드로테비놀을 디에틸렌 글리콜 (17부피) 중에 용해시키고, 수산화칼륨 (~20 당량)으로 처리하고, 12-18시간 동안 ~195 °C로 가열하였다. 상기 시간이 경과한 후에, 반응 혼합물을 실온까지 냉각시키고, 물(40 부피)에 넣어 반응을 종료시켰다(quenched). 생성된 용액을 고체 암모늄 클로라이드를 사용하여 pH 9-10으로 산성화시키고, 혼합물을 DCM (3 x 50 부피)을 사용하여 추출하였다. 모든 유기 추출물을 진공에서 증발시켜 조 오일 (약 40% 순도)을 얻었다. 황색 고체가 생성되어 우수한 순도 (> 95%)로 분리될 때까지, 메탄올 중에서의 배산을 반복하여 순도를 증가시켰다.

[0157] 생성물을 여러 용매로부터 재결정화시키고, 아세토니트릴로부터 결정을 수득하였다. 이를 X선 결정학 연구에 사용하였다.

[0158] 유사한(analogous) 반응을 이용하여 R-거울상이성질체를 수득하였다.

[0159] X선 결정학 연구

[0160] 모든 X선 결정학 실험은 Oxford Xcalibur 단결정 회절계(single crystal diffractometer) 또는 Nonius Kappa 회절계에서 수행하였다. 두 장치 모두 Molybdenum K 알파 X선 공급원(source) 및 CCD 검출기를 사용하였다.

[0161] (R) 및 (S) 19-프로필디히드로테비놀

[0162] (R) 및 (S) 19-프로필디히드로테비놀의 여러 가지 배치(batch)들을 X선 결정학에 사용하였다.

[0163] X선 구조가 도 2 내지 5에 제시되어 있다.

[0164] 도 2 및 3은 (R)-19 프로필디히드로테비놀의 X선 구조를 보여준다. X선으로부터, (R)-19 프로필디히드로테비놀 이 19번 탄소에 (R)-입체배치(configuration)를 갖는다는 것을 분명히 확인할 수 있다. 이는 키랄 메틸 에테르를 사용하여 분류(assign)될 수 있으며, 테바인 출발 물질로부터의 (R)-입체배치를 유지한다.

[0165] 또한 수소 원자가 표시된 도 3으로부터, 7번 위치의 수소가 (퓨란 고리 옆의) 5번 위치의 수소와 동일면 상에 존재하여, (R) 입체배치가 얻어진 것을 확인할 수 있다.

[0166] 이러한 방법으로 모든 키랄 탄소들을 분리하였으며, 도 10에 도시하였다.

[0167]

표 6

[0168] 기타 정보 (R)-19-프로필디히드로테비놀

| 특성 | 값 |
|---|------------------------|
| 대칭 셀 구조(symmetry cell setting) | 단사정계 |
| 대칭 공간군 명(symmetry space group name) | H-M P2(1) |
| xyz로서 고리 대칭 등가 위치 (loop symmetry equiv pos as xyz) | 'x,y,z' '-x, y+1/2,-z' |
| 셀 길이 a | 11.0464(6) |
| 셀 길이 b | 12.4554(7) |
| 셀 길이 c | 16.2271(7) |
| 셀 각 알파 | 90.00 |
| 셀 각 베타 | 98.481(5) |
| 셀 각 감마 | 90.00 |
| 셀 체적 | 2208.2(2) |

[0169] 도 4 및 5는 (S)-19-프로필디히드로테비놀의 X선 구조를 보여준다.

[0170] 도 4로부터, 상기 화합물이 도 3에 제시된 결정과 반대의 입체화학인, 19번 탄소에서 (S)-입체배치를 갖는다는 것을 분명하게 확인할 수 있다. 이를 테바인 출발 물질로부터 (R)-입체배치를 유지하는, 키랄 메틸 에테르를 사용하여 분류할 수 있다.

[0171] 또한 첫번째 부분입체이성질체에서와 마찬가지로, 7번 탄소 수소 (도 5에 표시됨)는 상기 탄소에서의 입체배치 도 (R)이라는 것을 보여준다.

[0172] 따라서, 본 발명자들은 이제 X선 결정학에 의한 상기 두 화합물들의 유일한 차이는 19번 탄소에서의 입체배치라는 것을 확실하게 결론지을 수 있다.

표 7

[0173] 기타 정보 (S) 19-프로필디히드로테비놀

| 특성 | 값 |
|---|------------------------|
| 대칭 셀 구조(symmetry cell setting) | 단사정계 |
| 대칭 공간군 명(symmetry space group name) | H-M P2(1) |
| xyz로서 고리 대칭 등가 위치 (loop symmetry equiv pos as xyz) | 'x,y,z' '-x, y+1/2,-z' |

| | |
|--------|------------|
| 셀 길이 a | 13.8650(3) |
| 셀 길이 b | 10.8560(2) |
| 셀 길이 c | 15.4030(4) |
| 셀 각 알파 | 90.00 |
| 셀 각 베타 | 99.7500(8) |
| 셀 각 감마 | 90.00 |
| 셀 체적 | 2284.95(9) |

[0174] (R)-및 (S)-디히드로에토르핀

[0175] X선 구조가 도 6 내지 9에 제시되어 있다.

[0176] 도 6 및 7은 (R)-디히드로에토르핀의 X선 구조를 보여준다. 상기 도면들로부터, 이 화합물이 19번 탄소에서 (R) 입체배치를 갖는다는 것을 분명하게 확인할 수 있다. (R)-디히드로에토르핀을 본래의 출발물질인, 테바인으로부터 (R)-입체배치를 유지하는, 키랄 메틸 에테르를 사용하여 분류할 수 있다.

표 8

[0177] 기타 정보 (R)-디히드로에토르핀

| 특성 | 값 |
|---|-----------------------------------|
| 대칭 공간군 명(symmetry space group name) | P 2 ₁ 2 ₁ 2 |
| xyz로서 고리 대칭 등가 위치 (loop symmetry equiv pos as xyz) | 'x,y,z', '-x, 1/2+y, -z' |
| 셀 길이 a | 16.3405(7) |
| 셀 길이 b | 35.605(2) |
| 셀 길이 c | 7.5209(3) |
| 셀 각 알파 | 90.00 |
| 셀 각 베타 | 90.00 |
| 셀 각 감마 | 90.00 |
| 셀 체적 | 4375.69 |

[0178] 도 8 및 9는 (S)-디히드로에토르핀의 X선 구조를 보여준다. 상기 도면들로부터, 이 화합물이 19번 탄소에서 (S) 입체배치를 갖는다는 것을 분명하게 확인할 수 있다. (R)-디히드로에토르핀을 본래의 출발물질인, 테바인으로부터 (R)-입체배치를 유지하는, 키랄 메틸 에테르를 사용하여 분류할 수 있다.

[0179] 또한, (도 9에 표시된) 7번 탄소 수소는 상기 탄소에서의 입체배치도 첫번째 부분입체이성질체와 마찬가지로 (R)이라는 것을 보여준다.

[0180] 따라서, X선 결정학에 의한 상기 두 화합물 간의 유일한 차이는 19번 탄소에서의 입체배치인 것으로 결론지을 수 있다.

표 9

[0181] 기타 정보 (S)-디히드로에토르핀

| 특성 | 값 |
|-------------------|---|
| 대칭 공간군 명 | H-M P2(1) |
| xyz로서 고리 대칭 등가 위치 | 'x,y,z', 회전축 (2배): '-x, -y, z' 스크류축(screw axis)(2배): '1/2-x, 1/2+y, -z' 스크류축(2배): '1/2+x, 1/2-y, -z' |
| 셀 길이 a | 7.2310(3) |
| 셀 길이 b | 14.0795(6) |
| 셀 길이 c | 10.6984(5) |

| | |
|--------|-----------|
| 셀 각 알파 | 90.00 |
| 셀 각 베타 | 96.226(4) |
| 셀 각 감마 | 90.00 |
| 셀 체적 | 1082.77 |

[0182] **방법의 최적화**

[0183] 하기 방법 및 기기들이 사용되었다:

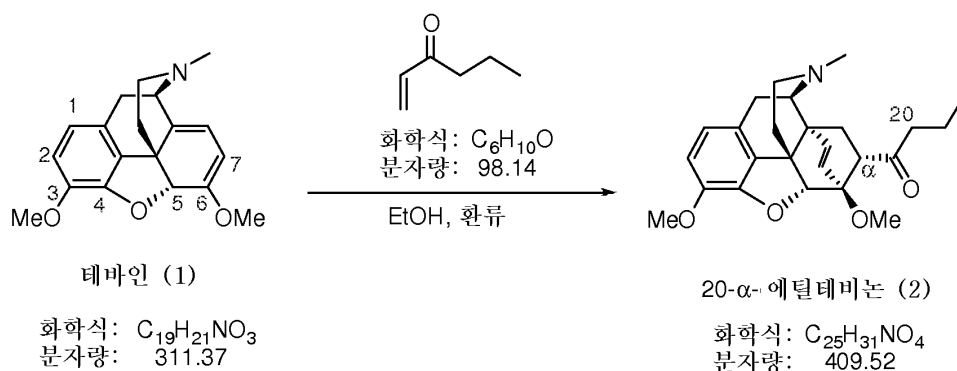
[0184] 방법 38XB 및 UFC-LC-MUN-1은 Xbridge C18 컬럼, 및 아세토니트릴과 0.01 M 암모늄 아세테이트 pH 9.2로 구성된 이동상을 사용하는, 역상 구배 HPLC 과정(gradient HPLC procedure)이다.

[0185] Bruker Avance 400 MHz 분광계를 사용하여 NMR을 수행하였다.

[0186] ZMD Micromass 질량분석계(mass spectrometer)를 사용하여 MS를 수행하였다.

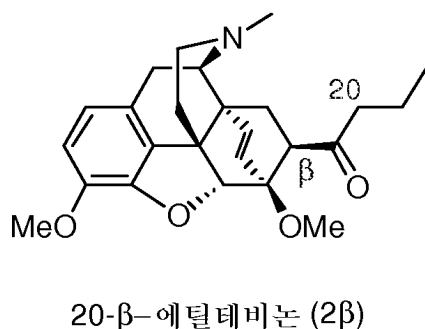
[0187] Agilent 1100 HPLC 시스템을 사용하여 LC를 수행하였다.

[0188] 단계 1: 디엘스-알더 반응



[0189]

[0190] 사용한 초기 방법은 전술된 바와 같다. 주된 오염물(contaminant)은 하기 제시된 7 β -이성질체인 것으로 확인되었다.



[0191]

[0192] 뒤이어, 20- α -에틸테비논의 순도 및 회수율(recovery)은 1-헥센-3-온 첨가량(charge)을 2.8 당량에서 1.8 당량으로 감소시키는 것에 의해 개선될 수 있는 것으로 밝혀졌다 (표 10). 상기 순도 및 회수율은 1.5 당량의 1-헥센-3-온을 사용하고 (1.4 당량 및 0.1 당량의 2회분으로 나누어 첨가함), 반응 완료 후에 증류에 의해 용매 0.5 부피를 제거함으로써 더욱 개선되었다. 생성된 용액을 냉각시킨 후, 생성물이 고체로서 침전되었으며 (1시간 동안 정치함), 이를 여과시켰다.

[0193] 방법: 오버헤드 교반기(overhead stirrer) 및 환류 응축기(reflux condenser)가 장착된 1L (3-목) 플라스크에,

테바인 (0.32 M, 100 g, 1 당량), EtOH (250 mL) 및 1-헥센-3-온 (90%, 0.45 M, 58 mL, 1.4 당량)을 적재하였다. 혼합물을 13시간 동안 가열하여 환류시키고, ^1H NMR로 분석하여 출발 물질(~ 4.5 몰%)을 함유하는 것을 확인하였다. 추가적인 0.1 당량의 1-헥센-3-온을 첨가하고, 혼합물을 2시간 동안 더 가열한 후에, 실온에서 밤새 교반하였다. 분석결과 출발 물질 (~2.8 몰%)을 확인하였다. 물질을 둥근 바닥 플라스크 (500 mL)로 옮겼다 (플라스크를 EtOH 20mL로 세척함). EtOH (~ 65 mL)을 50 °C에서 진공 중에서 제거하고, 생성된 고체 침전물을 5 °C에서 1시간 동안 교반한 후에 여과시켰다. 상기 고체를 얼음처럼 찬(ice-cold) EtOH (4 x 20 mL)을 사용하여 세척하고, 필터 상에서 ~1.5 시간 동안 건조시켰다(pull dry). 백색 고체(105.4g, 80 %)를 수득하였다.

표 10

[0194]

| 규모 | 조건 | 온도(°C) | 코멘트 |
|-------|---|----------------------|--|
| 10 g | 테바인 1 eq 1-헥센-3-온 2.8 eq EtOH 2.5 vol | 환류 (배스 온도 94 °C) | 수율 69%, 9.03 g, 7β-이성질체 6% 함유 - 순도 92% |
| 2 g | 테바인 1 eq 1-헥센-3-온 1.8 eq EtOH 2.5 vol | 환류 (배스 온도 94 °C) | 수율 55%, 1.44 g. 냉각시 물질이 침전됨 - 순도 > 99.5% |
| 100 g | 테바인 1 eq 1-헥센-3-온 1.5 eq EtOH 2.5 vol | 환류 (배스 온도 101 °C) | 수율 80%, 105.4 g. 물질 침전됨 - 순도 > 99.5% |

[0195]

분석 방법 및 공정 중 점검(In-Process-Checks, IPCs)

[0196]

실험실 작업 중에 IPCs 부가(plus) HPLC법 38XB에 ^1H NMR (400 MHz)을 사용하였다.

[0197]

^1H NMR에 의해 δ 5.05 ppm 및 5.3 ppm (CDCl_3)에서의 신호를 기준으로 5 몰% 미만의 출발 물질이 남아 있는 경우, 반응이 완료된 것으로 간주하였다.

[0198]

순도의 확인 및 LC-MS 작업을 위해, 분석 실험실에서는 UFC-LC-MUN-1 방법을 사용하였다.

[0199]

TLC (5% MeOH / 95% DCM) 로도플라티네이트 염색(Iodoplatinate stain): R_f = 0.25 테바인, R_f = 0.66 (7α)-20-에틸테비논.

[0200]

분석 요약

| 외관 | HPLC(%a/a) | | |
|--------|-------------|-------------|--------------|
| | 7α 20-에틸테비논 | 테바인 | 7β 20-에틸테비논 |
| RT/RRT | 10.69 / 1.0 | 5.82 / 0.54 | 11.67 / 1.09 |
| 백색 고체 | > 99.5 | 없음 | 없음 |

[0201]

[0202]

^1H NMR (CDCl_3 ; 400 MHz); δ = 0.80 (3H, t), 1.4 (1H, m), 1.6 (3H, sext.), 1.9 (1H, d), 2.0 (1H, br), 2.4- 2.6 (8H, m), 2.9 (2H, br), 3.35 (2H, d), 3.6 (3H, s), 3.85 (3H, s), 4.6 (1H, s), 5.6 (1H, d), 6.0 (1H, d), 6.55 (1 H, d), 6.7 (1H, d)

[0203]

^{13}C NMR (CDCl_3 ; 75 MHz); δ = 13.71, 16.89, 22.49, 30.25, 43.26, 43.51, 45.57, 45.72, 47.40, 49.94, 53.78, 56.68, 60.06, 81.52, 95.84, 113.61, 119.36, 125.89, 134.07, 135.53, 141.87, 148.07

[0204]

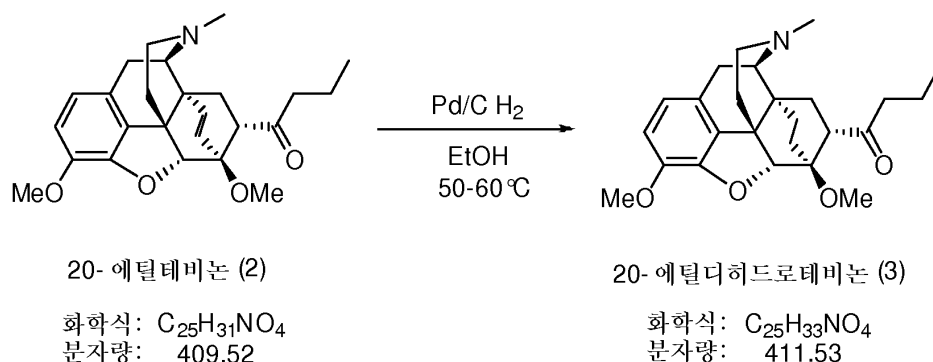
MS; $[\text{M}+\text{H}]^+ = 410.3$

- [0205] LC; 순도 > 99.5%
- [0206] TLC; 5:95; MeOH:DCM; 단일 스팟(single spot) rf = 0.66

[0207] 최적화 방법의 장점

- [0208] 수율이 80 %로 증가함.
- [0209] 전환 또는 수율의 감소 없이 1-헥센-3-온의 양이 1.5 당량으로 감소함
- [0210] 1-헥센-3-온 당량의 감소로 분리율이 개선되어 (반응 용매로부터의 직접 결정화), 매우 높은 순도의 물질이 수득됨.
- [0211] 부피 효율(volume efficiency)이 매우 높음 (최대 총 ~4 부피)
- [0212] 순도가 > 99% (HPLC에 의함)로 개선됨.
- [0213] IPC는 ^1H NMR에 의해 > 97%의 전환을 나타냄 (테바인 < 3%).

[0214] 단계 2: 수소화



- [0215]
- [0216] 수소화 단계에 대한 진행 작업의 결과가 하기 표 11에 요약되어 있다. 반응을 촉매 적재(loading) 및 반응 온도의 두 가지 측면에서 '강화(stress)'시켰다. 또한, 반응 부피를 17 부피에서 12 부피로 감소시켜, 생성물의 품질 및 생성물의 분리를 개선시켰다.
- [0217] 흥미롭게도 출발 물질 및 생성물은 모두 1-2시간에 걸쳐 ~80 °C까지 열적으로 안정하여 보다 높은 반응 온도를 가능하게 하였으며, 반응 동안 출발 물질 및 생성물 모두의 용해도를 향상시켰다. 이러한 경우 용해도는 우수한 반응성에 핵심적인 것으로 밝혀졌으며, 반응의 완료를 달성하기 위해 스케일 업(scale-up) 동안 보다 높은 온도를 이용하였다.
- [0218] 마지막 스케일 업 반응에서, 반응 용기(reaction vessel)의 초기 가열 중에 온도는 "정상(normal)" 범위 밖으로 증가하였으며, 빠른 반응이 관찰되었다 (수소 흡수). 온도를 55 °C로 감소시켰을 때 반응은 현저하게 감소하였으며, 촉매를 추가적으로 첨가하고 온도를 ~65 °C로 증가시킨 경우에만 반응이 완료되었다.
- [0219] 생성물의 분리는 반응 혼합물을 77 °C로 가온시켜 환류 온도 미만(sub-reflux temperature)에 도달하게 하고, 반응 혼합물로부터 촉매를 여과시킴으로써 단순화시켰다. 생성된 용액을 처음에는 증류시켜 부피를 감소시켰으나, 상기 용액을 아이스 베스(ice bath) 중에서 냉각시킬 수 있다는 것을 확인했고, 결정화된 고체를 여과시킴으로써 고순도 물질을 우수한 수율 (72 %)로 분리하였다.
- [0220] 방법: 20-에틸테비논 (0.244 M, 100 g)을 2 L Parr 수소화 용기(hydrogenation vessel)에 적재하였다. 10% Pd/C (50% 습윤, 10 g)을 EtOH (200 mL) 중에 슬러리화하고, 상기 수소화 용기에 적재하였다. EtOH (1 L)을 상기 용기에 적재하고, 용기를 밀봉하고 아르곤(x 4)으로 불활성화시켰다(inert). 용기를 수소로 50 psi (x 2)까지 재충전시키고, 최종적으로 50 psi로 유지하였다. 온도를 35 °C로 설정하였다. 내부 온도는 최대 82 °C까지

상승하였으며, 밤새 실온으로 다시 냉각시켰다 (포트 발열(pot exotherm)). 용기를 H₂로 재충전시키고, 샘플링 하고, LC에 의해 분석하여 완료되지 않은 것을 확인하였다. 용기를 내부 온도 55-65 °C까지 가열하고, 반응 진행을 LC에 의해 모니터링하였다 - 수소 압력을 주기적인 재충전에 의해 전 과정에 걸쳐 50 psi로 유지시켰다. 24시간 후에, 추가적인 촉매 (5 g)를 적재시키고, 반응을 지속시켰다. 16시간이 더 경과한 후에, LC 및 ¹H NMR에 의하면 반응이 완료되었다. 내부 온도를 68 °C까지 상승시켰으며, 혼합물을 진공 하에서 3 L 둥근 바닥 플라스크(rbf)로 옮겼다. Parr 관을 뜨거운 EtOH (200mL)로 플러싱(flush)하고, 세척물(wash)을 둥근 바닥 플라스크로 옮겼다. 혼합물을 77 °C로 가열한 후, 여과시켰다 (GF/F지). 촉매층(catalyst bed)을 뜨거운 EtOH (1 x 300 mL)로 세척하고 실온까지 냉각시켰다. 여과물을 50분 동안 얼음물 베스에서 냉각시킨 후 여과시켰다. 수집된 고체를 얼음처럼 찬 EtOH (1 x 100 mL), 헵탄 (1 x 300 mL)으로 세척하고, 1.5 시간 동안 건조시켰다(pull dry). 백색 고체 (72 g, 72%)를 수득하였다.

표 11

[0221]

| 규모 | 조건 | 온도(°C) | 코멘트 |
|---------|--|---|--|
| 4.5 g | 1eq 20-에틸테비논, Pd/C (50% 습윤, 2.71g), 14vol EtOH, 25psi H ₂ | 포트 온도 55 °C | 16시간 후, 1g 샘플(0.7% SM 남음)을 제거함. 반응이 완료될 때까지 진행시킴. 수율 90%, 3.4g |
| 0.680 g | 1eq 20-에틸테비논, Pd/C (50% 습윤, 0.034g), 70vol EtOH, 50psi H ₂ | 포트 온도 55 °C | 수율 85%, 0.585g |
| 2.32 g | 1eq 20-에틸테비논(547-089-1), Pd/C (50% 습윤, 0.232g), 17vol EtOH, 50psi H ₂ | 포트 온도 55 °C | 16시간 후 반응이 완료됨. 반응물을 여과시키고, ~1/3 부피까지 농축시키고 ppt를 수집함. 수율 64%, 1.494g |
| 0.6 g | 1eq 20-에틸테비논(547-090-1), Pd/C (50% 습윤, 0.60g), 17vol EtOH, 50psi H ₂ | 포트 온도 55 °C | 16시간 후 반응이 완료됨. 워크업은 완료되지 않음. |
| 100 g | 1eq 20-에틸테비논, Pd/C (50% 습윤, 15g), 12vol MeOH, 50psi H ₂ | 최대 포트 온도 82 °C 최적 온도 ~60 °C | 촉매를 제거한 후, 반응 혼합물로부터 생성물을 결정화함. 수율 72%, 순도 >99% |

[0222]

분석 방법 및 공정-중-점검

[0223]

실험실 작업 동안 IPC 부가(plus) HPLC법 38XB을 위해 ¹H NMR (400 MHz)을 사용하였다.

[0224]

반응 진행을 LC 분석에 의해 모니터링 하였다: 100 g 규모로 수행된 반응에서 20-에틸테비논은 관찰되지 않았으며, 96%의 20-에틸디히드로테비논이 관찰되었다.

[0225]

순도의 확인 및 LC-MS 작업을 위해, 분석 실험실에서는 100 g 규모 반응에서 얻은 생성물을 사용하였다.

[0226] 분석 결과

| 외관 | HPLC(a/a%) | 코멘트 |
|-------|------------|--|
| 백색 고체 | > 99 | 20-에틸테비논이 남아있지 않음. 다른 불순물은 검출되지 않음. |

[0227]

[0228] 분석

[0229] ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz); δ = 0.75 (1H, t,t), 0.9 (1H, t), 1.35 (1H, t,d), 1.5-1.75 (7H, m), 2.1 (1H, t,d), 2.3 (5H, m), 2.5 (2H, q), 2.6-2.7 (3H, m), 3.0 (1H,q, t), 3.1 (1H,d), 3.5 (3H,s), 3.9 (3H, s), 4.5 (1H, d), 6.6 (1H, d), 6.7 (1H, d).

[0230] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75MHz); δ = 13.73, 16.99, 17.31, 21.98, 28.67, 30.70, 35.17, 35.66, 43.51, 45.24, 45.78, 48.28, 48.91, 52.26, 56.76, 61.35, 94.96, 114.01, 119.16, 128.71, 132.47, 141.76, 146.80

[0231] LC; > 99%

[0232] 잔여 용매 (^1H NMR에 의해 측정); 잔여 에탄올 없음.

[0233] 최적화된 방법의 장점

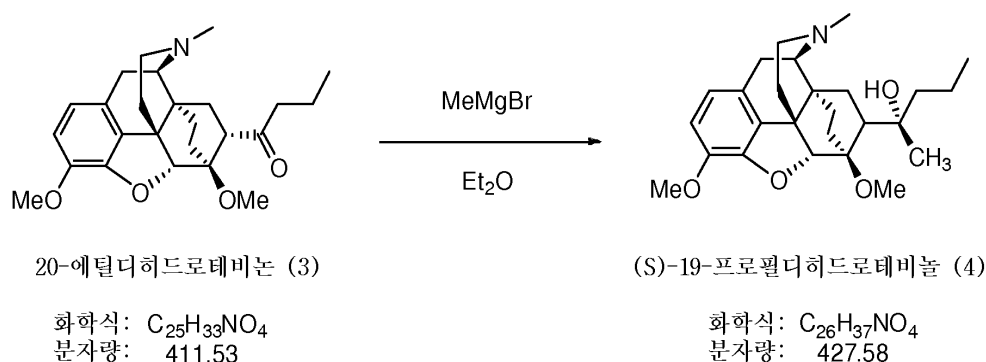
[0234] 반응 부피를 17 부피에서 12 부피로 감소시킴으로써 생성물의 직접적 결정화가 가능하다.

[0235] 생성물이 > 99%의 순도로, 수율 72%로 분리된다.

[0236] 약 65 °C의 온도가 용해도 및 반응성에 최적인 것으로 나타났다.

[0237] 여과층(filter bed) 상에서 고체를 건조시키고, 헵탄으로 세척하여 에탄올 잔량(trace)을 다음 단계를 위해 허용가능한 수준까지 제거한다.

[0238] 단계 3 및 4: 그리냐르 반응 및 결정화

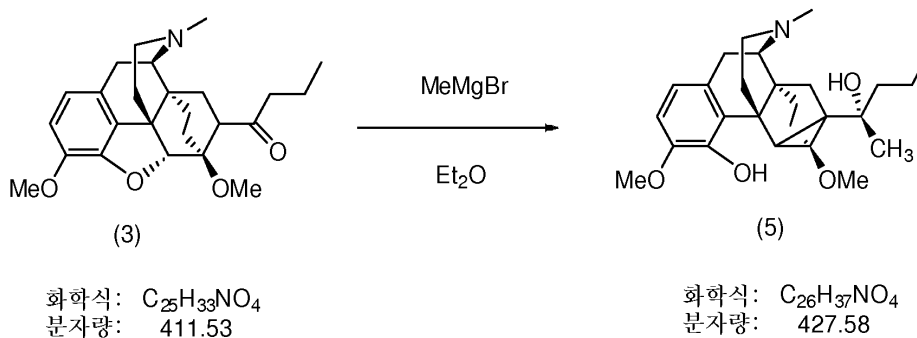


[0239]

[0240] 작업의 결과가 하기 표 12에 요약되어 있다. 다른 종류의 에테르성 용매(ethereal solvent)를 조사하였으며, 디에틸 에테르가 최고 품질의 물질을 제공하였으나, 디에틸 에테르와 MTBE 간의 차이는 비교적 근소한 것으로 밝혀졌다.

[0241] 일반적으로, 그리냐르 반응으로부터 수득된 조 물질은 2가지 주요 불순물 (각각 ~10 %, LC-MS)을 함유하였다. 두 가지 불순물 모두 생성물로서 동일한 질량 ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 428.4$)을 나타냈다. 두 불순물 중 하나는, 20-에틸디히드로테비논에 대한과량의 그리냐르 시약의 폐환 및 개환 반응(ring-closure ring-opening reaction)으로부터 생

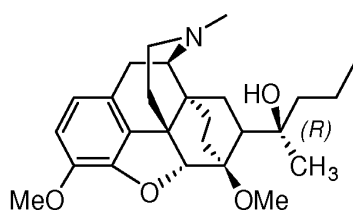
성된, 구조 이성질체(constitutional isomer)로 잠정적으로 분류하였다.



[0242]

[0243]

생성물과 유사한 체류 시간(retention time) (LC-MS)을 갖는 두번째 불순물은 부분입체이성질체 (R)-19-프로필 디히드로테비놀인 것으로 생각된다.



화학식: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_4$
 분자량: 427.58

[0244]

[0245]

두 불순물은 모두 메탄올 재결정화에 의해 효율적으로 제거된다.

[0246]

디에틸 에테르를 사용하여 반응 온도의 역할을 조사하였으며, 반응 진행 및 불순물 (LC 분석) 측면 모두에 있어서 반응 프로파일은 실온 및 환류 온도에서 비슷한 것으로 확인되었다.

[0247]

따라서, 상기 반응들에서 관찰된 순도의 차이는 서로 다른 정제 과정 (오일 배스(oil bath) 및 자석 교반기 (magnetic stirrer)를 구비한 환류 응축기를 사용한 재결정화, 또는 메탄올을 사용한 회전식 증발기에서의 회전에 의한 배산)으로부터 야기된 것으로 생각된다.

[0248]

메틸마그네슘요오다이드를 또한 사용하였으며, 브로마이드에서와 비슷한 결과를 얻었다.

[0249]

방법: 20-에틸 디히드로테비논 (0.073 M, 30 g)을 무수 디에틸 에테르 (1050 mL; 35 부피) 중에 용해시켰다 (뿌연(cloudy) 용액). 내부 온도를 28 °C 미만으로 유지하면서, 메틸마그네슘 브로마이드 (0.189 M, 63 mL)를 1시간에 걸쳐 적가하였다. 그로부터 생성된 백색 현탁액을 5시간 동안 가열하여 환류시키고, 실온까지 냉각시키고, 질소 대기(nitrogen atmosphere) 하에서 밤새 교반하였다. 분액(aliquot) (~ 0.3 mL)을 제거하고, 포화 NH_4Cl (~1.0 mL)을 사용하여 반응을 종료시킨 후, LC에 의해 분석하였다 (분액으로부터 얻은 상층을 MeCN (~1 mL)으로 희석시킴). 반응을 출발 물질의 수준이 5% 미만일 때까지 지속시켰다. 내부 온도를 30 °C 미만으로 유지하면서, 포화 NH_4Cl (138 mL)을 반응 혼합물에 첨가하여 반응을 종료시켰다. 혼합물을 상 분리시키고, 수상을 디에틸 에테르 (1 x 200 mL)로 추출하고, 모은 유기상(organic phase)을 건조시켰다 (MgSO_4). 용액을 진공 중에서 농축시켜 점성의 오일 (33.4g)을 수득하였다. MeOH (100 mL)를 첨가하고, 혼합물을 배스 온도 60 °C로 가열한 후에, 실온까지 냉각시켰다. 고체를 여과하고, 얼음처럼 찬 MeOH (3 x 25 mL)로 세척하고, 헵탄 (1 x 25 mL)으로 세척하고, 건조시켰다. 백색 고체 (21 g, 68%)를 수득하였다.

표 12

[0250]

| 규모 | 조건 | 온도(℃) | 코멘트 |
|--------|--|--------------------------|---|
| 1.0 g | 1eq 20-EtDHT, 1.2eq MeMgBr 6.1vol 2-MeTHF | 60 ℃ | 컬럼 크로마토그래피에 의해 조물질을 정제하여 2개의 주 분획을 수득함: 180mg의 불순물 및 미확인 물질(140 mg) |
| 0.5 g | 1eq 20-EtDHT, 2.6eq MeMgBr 35vol Et ₂ O | 환류 | ¹ H NMR에 의해 양호해 보이는 0.44g 유질의 검(oil gum). MeOH로 배산시켜 2가지 샘플을 수득함: 160mg (96%) 및 150mg (90%) |
| 0.6 g | 1eq 20-EtDHT, 2.6eq MeMgI 35vol Et ₂ O | 환류 | 0.45g의 유질의 검. 순도 = 77%(LC에의함). 배산시켜 순도 94.1%의 물질 110mg을 얻음. |
| 30.0 g | 1eq 20-EtDHT, 2.6eq MeMgBr 35vol Et ₂ O | 환류 | <2% SM 및 81% 생성물. 워크업 및 MeOH로부터의 재결정 후: 수율 68%, 21g, 순도 >99% |
| 1 g | 1eq 20-EtDHT, 2.6eq MeMgBr 35vol TBME | 빠른 첨가 후 가열 45℃/4h | 워크업 및 MeOH로 배산 후: 수율 54%, 0.56g, 순도 96% |
| 1 g | 1eq 20-EtDHT, 2.6eq MeMgBr 35vol CPME | 빠른 첨가 후 가열 45℃/4h | 워크업 및 MeOH로 배산 후: 수율 52%, 0.54g, 순도 95.7% |
| 10 g | 1eq 20-EtDHT, 2.6eq MeMgBr 35vol TBME | 빠른 첨가 후 가열 35℃/4h | MeMgBr 첨가 완료 후: 1.2% 20-EtDHT, 85% 생성물(HPLC). 가열, 워크업 및 MeOH로 배산 후: 수율 75%, 7.79g, 순도 96.4% |
| 1 g | 1eq 20-EtDHT, 2.6eq MeMgBr 35vol Et ₂ O | 빠른 첨가, 가열 없이 4h 교반 | MeMgBr 첨가 완료 후: 0.3% 20-EtDHT, 84% 생성물(HPLC). 워크업 및 MeOH로 배산 후: 수율 58%, 0.60g, 순도 94.8% |

[0251]

분석 방법 및 공정-중-점검

[0252]

실험실 작업 동안 HPLC법 38XB에 추가하여 ¹H NMR (400 MHz)을 사용하였다. 반응을 종료시킨 (포화 NH₄Cl) 반응 분액의 LC 분석에 의해 반응을 모니터링 하였다: <2.0% 20-에틸디히드로테비놀 및 71% (S)-19-프로필디히드로테비놀.

[0253]

순도의 확인 및 LC-MS 작업을 위해, 분석 실험실에서는 방법 UFC-LC-MUN-1을 사용하였다.

[0254]

분석 결과

| 외관 | HPLC (a/a%) | 코멘트 |
|-------|-------------|---|
| 백색 고체 | 94.1 | MeMgI로부터 얻음 |
| 백색 고체 | > 99 | 조 물질은 81%의 전체 순도를 가지며, 출발 물질 < 2%를 함유함 |

[0255]

[0256]

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz); δ = 0.75 (1H, m), 0.85 (3H, t), 0.95-1.1 (6H, m), 1.3 (1H, m), 1.5-1.7 (7H, m), 1.8 (1H, t), 2.0 (1H, t, d), 2.1-2.4 (6H, m), 2.6 (1H, d), 2.7 (1H, t, d), 3.0 (1H, d), 3.5 (3H, s), 3.8 (3H, s), 4.3 (1H, s), 4.7 (1H, s), 6.5 (1H, d), 6.7 (1H, d)

[0257] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 15.12, 16.96, 18.04, 21.91, 25.55, 29.88, 31.99, 35.53, 36.05, 38.97, 43.53, 45.17, 46.19, 49.09, 50.77, 52.72, 56.93, 61.32, 80.34, 97.05, 114.21, 119.06, 128.84, 132.48, 141.63, 146.97

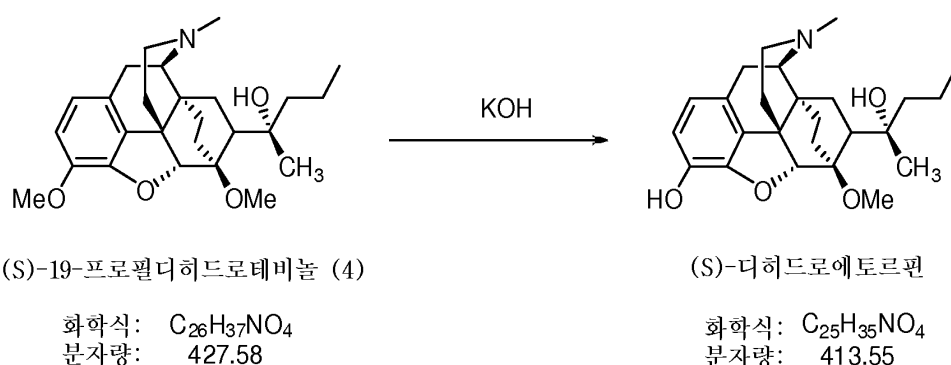
[0258] LC; > 99%

[0259] 최적화된 방법의 장점

[0260] 반응은 다양한 에테르성 용매 중에서 실시되지만, 디에틸 에테르가 가장 깨끗한 조 생성물을 생성시키는 것으로 나타났다. 메탄올로부터 재결정화시킨 후에 우수한 순도의 물질이 수득된다.

[0261]

[0262] 단계 5: 가수분해 반응



[0263]

[0264] 유의한 변화 없이 상기 반응을 실시하였다 (표 13). 재결정화는 에탄올/물 혼합물, 및 뒤이어 에탄올로부터 수행하였다.

[0265] 방법: (S)-DHE (10 g)를 EtOH (60 mL)에 첨가하고, 용해될 때까지 가열 환류시켰다. 물 (32 mL)을 첨가하여 뿌연(hazy) 용액을 형성시켰으며, 이를 ~2시간에 걸쳐 실온까지 냉각시켰다. 여과에 의해 백색 고체를 수집하였다 (4.26 g, 회수율 42 wt%). 순도 98%. 전체 wt% 수율 = 45%.

13

| 규모 | 조건 | 온도 (℃) | 코멘트 |
|------|---|-----------|---|
| 15 g | (S)-19 프로필디히드로테비놀(1 eq), KOH(20.85 eq), 디에틸렌 글리콜(16.6vol) | 185 | 반응물을 185 ℃에서 ~18시간 동안 공기 존재 하에 가열함. 조 물질의 수율 107%, 순도 95% |

[0267] 분석 방법 및 공정-중-점검

[0268] IPC를 위해 실험실 작업 동안 HPLC법 38XB에 부가하여 ¹H NMR (400 MHz)을 사용하였다. 반응을 LC 분석에 의해 모니터링하였으며, (S)-19-프로필디히드로테비놀이 남아있지 않을 때 반응을 종료시켰다. 반응은 92% 완료되었다.

[0269] 순도의 확인 및 LC-MS 작업을 위해, 분석 실험실에서는 방법 UFC-LC-MUN-1을 사용하였다.

[0270] 분석 결과

| 외관 | HPLC (a/a%) |
|-------------|-------------|
| 황갈색(tan) 고체 | 95.0 |

[0271]

[0272] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz); δ = 0.7 (1H, m), 0.8 (3H, t), 1.0-1.1 (5H, m), 1.3 (1H, m), 1.5-1.8 (6H, m), 1.85 (1H, t), 1.95 (1H, t, d), 2.1-2.3 (5H, m), 2.6 (1H, d), 2.7 (1H, t), 3.0 (1H, d), 3.5 (3H, s), 4.3 (1H, s), 4.8 (1H, s), 6.0 (1H, br), 6.4 (1H, d), 6.7 (1H, d)

[0273] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz); δ = 15.10, 16.95, 18.00, 21.99, 25.37, 29.82, 31.96, 35.43, 36.15, 38.93, 43.51, 45.22, 46.50, 49.04, 52.72, 61.33, 80.42, 97.38, 116.61, 119.46, 127.92, 132.07, 137.56, 145.67

[0274] LC; 98.8%

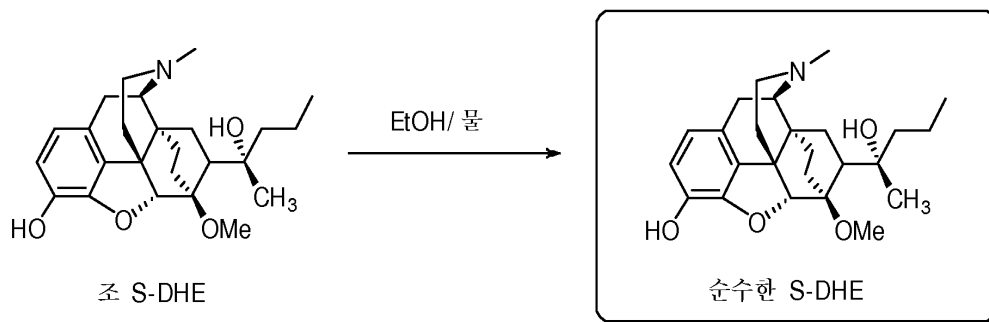
[0275] 키랄 LC; 99.44% (S)-DHE, 0.554 (R)-DHE

[0276] 최적화된 방법의 장점

[0277] 반응으로부터 수득되는 조 물질의 순도가 95% 까지 현저하게 개선된다.

[0278] 메탄올 배산물(methanol trituration)의 제거 - 에탄올/물 및 에탄올로부터 물질을 재결정화시킨다.

[0279] 단계 6: 재결정화



[0280]

[0281] 수분 함량을 ~35 %로 증가시킴으로써 (총 부피 9.2 부피) 백색 고체가 생성되었다. 에탄올 및 에탄올/물 혼합물로부터 추가적으로 재결정화시켜 물질의 순도를 개선시켰다 (표 14).

[0282] 방법:

[0283] (1) EtOH (10 mL)에 (S)-DHE (3.0 g)를 첨가하고, 현탁액을 가열 환류시켜 오렌지색 용액을 생성시켰다. 상기 용액을 16시간에 걸쳐 실온까지 냉각시켰다. 생성된 백색 고체를 여과에 의해 수집하였다 (2.1 g, 70 wt%). 순도 > 99%.

[0284] (2) EtOH (7 mL)에 (S)-DHE (1.8 g)를 첨가하고, 혼합물을 용액 상태가 될 때까지 가열 환류시켰다. 물 (2 mL)을 첨가하고, 뿌연 용액을 2시간에 걸쳐 실온까지 냉각시켰다. 생성된 백색 고체를 여과에 의해 수집하였다 (1.29 g, 72 wt%).

[0285]

표 14

[0286]

| 규모 | 조건 | 온도(℃) | 코멘트 |
|-------|-------------------------|-------|---|
| 10 g | 9.2vol ~65/35 EtOH/물 | 환류 | 물질을 EtOH 중에 가열한 후, 물을 첨가함. 백색 고체, 42wt% 회수, 순도 98% |
| 3.0 g | 3.3vol (EtOH) | 환류 | 백색 고체, 70wt% 회수, 순도 >99% |
| 1.8 g | 4.5vol (20%물/80%EtOH) | 환류 | 물을 첨가하면서 환류시킨 후, 냉각시킴. 72wt% 회수, >99% |

[0287]

분석 방법 및 공정-중-점검

[0288]

IPC를 위해 실험실 작업 동안 HPLC법 38XB에 추가하여 ¹H NMR (400 MHz)을 사용하였다.

[0289]

순도의 확인 및 LC-MS 작업을 위해, 분석 실험실에서 방법 UFC-LC-MUN-1을 사용하였다. 키랄 순도를 확인하기 위해서, 분석 실험실에서 방법 UFC-LC-MUN-2를 사용하였다.

[0290]

분석 결과

| 외관 | HPLC (a/a%) | 키랄%순도 (HPLC) |
|-------|-------------|--------------|
| 백색 고체 | >99% | 99.98 |

[0291]

[0292]

최적화된 방법의 장점

[0293]

에탄올/물 또는 에탄올로부터 재결정화시키면 우수한 전반적 순도 및 < 0.02%의 (R)-DHE를 갖는 물질이 생성된다.

[0294]

통증 치료에서 (R) 및 (S) 디히드로에토르핀의 용도

[0295]

랫트의 꼬리 회피 침해수용 시험(Tail Flick Test of Nociception)에서 (R) 및 (S)-디히드로에토르핀의 효과

[0296]

사용된 시험 모델을 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, J. Pharmacol Exp Ther, 1941, 72, 74-79 (D'Amour 등, A method for determining loss of pain sensation)에 기술되어 있다.

[0297]

본 연구의 목적은 랫트(rat)에서 침해수용에 대한 효과를 검출하기 위해 고안된 꼬리 회피 시험(tail flick test)에서, 0.1, 0.3 및 0.5 µg/kg (R-DHE) 및 3, 10 및 30 µg/kg (S-DHE)의 투여량에서 디히드로에토르핀의 R- 및 S-이성질체 (R-DHE 및 S-DHE)의 잠재적 진통 효과를 평가하는 것이었다. 모르핀 염산염을 표준 물질(reference substance)로 사용하였고, 펜타닐 시트레이트(fentanyl citrate)를 비교 물질(comparator substance)로서 사용하였다.

[0298]

시험 물질 및 재료

[0299]

시험 물질, 표준 물질 및 비히클

[0300]

시험 물질: 디히드로에토르핀 (R-DHE 무색의 액체, 유리 염기로서 사용됨) 및 디히드로에토르핀 (S-DHE 액체; 유리 염기로서 사용됨)

[0301]

시험 물질용 비히클(vehicle): 시트레이트 완충액 (0.03:0.10:0.86:90.01 (g:g:g:mL)의 비율로, 시트르산 일수화물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:관류용수(water for irrigation)) [시트르산 일수화물 (백색 분말, Sigma, UK), 소듐 시트레이트 (Sigma, UK), 소듐 클로라이드 (백색 고체; Merck), 멸균 관류용수 (투명한 액체; Baxter Healthcare, UK)]

[0302] 표준 물질: 모르핀 염산염 (백색 분말; Macfarlan Smith, Edinburgh, UK)

[0303] 비교 물질: 펜타닐 시트레이트 (백색 분말; Sigma, UK)

[0304] 시험물질, 표준물질 및 비교물질의 보관

[0305] 시험 물질은 차광시켜 실온에서 보관하였으며, 표준 물질 및 비교 물질은 실온에서 보관하였다.

[0306] **투여 경로 및 투여량 수준**

[0307] DHE의 R- 및 S-이성질체 및 비히클의 투여 경로는 정맥내 투여였다. 사람에서 가능성있는 투여 경로는 정맥내 투여이다. R-DHE의 투여량은 0.1, 0.3 및 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. S-DHE의 투여량은 3, 10 및 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다.

[0308] 모르핀의 투여량은 5 mg/kg 이었다. 모르핀의 투여 경로는 정맥내 투여였다.

[0309] 펜타닐의 투여량은 0.5, 2 및 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 펜타닐의 투여 경로는 정맥내 투여였다.

[0310] **동물**

[0311] 종(species): 랫트

[0312] 계통(strain): Sprague-Dawley

[0313] 성별: 수컷

[0314] 실험동물 수: 연구에 111마리의 동물이 할당됨; 나머지 9마리는 스톡으로 돌려보냄.

[0315] 연령 범위: 9 내지 11 주 (평균 체중 기준으로)

[0316] 체중 범위: 198 내지 258 g

[0317] 환경순응: 전달 후 연구 조사 시작 전, 6일

[0318] 공급처: Harlan UK Ltd

[0319] 동물 식별화(identification) 및 무작위화(randomisation)

[0320] 각각의 동물에 무작위로 고유 식별 번호를 부여하였으며, 이를 데이터 시트 및 케이지 카드(cage card)에 표시하였다. 동물들을 방수성(waterproof) 꼬리 표식에 의해 식별화하였다.

[0321] 동물 건강 및 복지

[0322] 모든 연구는 1986년 동물(과학적 방법)법(Animals(Scientific Procedures) Act 1986)에 의거한 제정법, 상기 법의 시행에 관한 영국 내무성 지침(UK Home Office Guidance) 및 모든 적용가능한, 실험 동물의 관리 및 사육을 위한 규약(Codes of Practice for the care and housing of laboratory animals)에 따라 수행되었다. 본 연구에서 사용한 방법은, 중증도의 중증도 한계(moderate severity limit)를 갖는 제213N호 방법에 포함된다.

[0323] 사육시설(Housing) 및 환경

[0324] 동물을 톱밥으로 채운 고체-바닥 케이지(solid-bottom cage)에서 최대 5마리로 이루어진 군으로 나누어 사육하였다. 환경순응기간(acclimatisation) 동안, 위생을 유지하기 위해 주기적으로 사육실 및 케이지를 청소하였다. 사육실을 내무성 동물 (과학적 방법) 법 (1986)에서 권장된 바와 같이, 12시간 명-암 주기 (07.00 켜짐, 19.00 꺼짐)를 제공하도록 설정된 형광빛으로 조명하였다. 사육실에 에어컨을 가동하고, 대기 온도 및 상대 습도를 측정하였다. 환경순응 기간 동안, 실온을 유지하였으며 (19 °C 내지 22 °C), 습도 수준은 22% 내지 44%였다. 과정

중에 실온을 유지하였으며 (20 °C 내지 21 °C 범위) 습도 수준은 22% 내지 26% 범위 내였다.

[0325] 사료 및 음수

[0326] RM1(E) SQC (Special Diets Services, Witham, UK) 사료 및 본 수도물(mains tap water)을 무제한으로 공급했다. 각각의 사료 배치(batch of diet)는 영양 조성 및 특정 오염물 (예를 들면, 중금속, 아플라톡신 및 살충제) 수준을 상세하게 기재한 분석 증명서와 함께 전달받았다. 음수는 불순물 및 오염물 준부를 주기적으로 분석하였다. 스톡 사료(stock diet) 및 음수 공급 중 허용가능한 오염물 수준의 기준은 사료 제조자 및 음수 분석 서비스에 의해 각각 정립된 분석 명세서(analytical specification)의 범위 내였다.

[0327] 건강 상태

[0328] 동물들을 도착 후 및 연구 전에 검사하였다; 모든 동물들은 건강하였으며 실험에 사용하기에 적합한 것으로 간주되었다.

[0329] 실험 설계

[0330] 시험 물질, 표준 물질 및 비교 물질의 제제화

[0331] 각각의 구성 성분의 적절한 양을 정밀하게 칭량하고, 이들을 멸균 관류용수(sterile water for irrigation)에 용해시켜 시트레이트 완충액을 제조하였다. 상기 구성 성분들이 완전히 용해되었을 때, 용액의 오스몰농도 및 pH를 측정하였다. 비히클은 pH가 pH 4.8 내지 5.2의 범위 내인 5.01이고, 오스몰농도가 280 내지 300 mOsmol/kg 범위인 296 mOsmol/kg로서, 허용가능한 것으로 간주하였다. 그 다음, 비히클을 무균(aseptic) 조건 하에서 Millex GV stericup을 통해 여과시키고, 사용 전에 2 °C 내지 8 °C에서 저장하였다.

[0332] 시험 물질, DHE (R- 및 S-이성질체)를 시트레이트 완충액 중의 용액으로서 투여용으로 제제화하였다. 약 20 µg/mL의 농도로 제공된 적절한 스톡 용액을 연속적으로 희석하여 투여에 바람직한 농도 (R-DHE의 경우 0.02, 0.06 및 0.10 µg/mL, S-DHE의 경우 0.6, 2 및 6 µg/mL)를 준비하였다. 스톡 용액을 Millex GV 0.22 µm Durapore 멸균 필터 유닛(unit)을 통해 통과시켜 유리 바이알에 담고, 멸균 시트레이트 완충액을 사용한 각각의 후속 희석을 멸균 조작에 의해 실시하였다. (R) DHE에 대해 공지된 안정성 기간(stability period) 이내에 제제를 제조하고, 투여에 필요할 때까지 약 4 °C에서 냉장상태로 보관하였다.

[0333] 표준 물질, 모르핀 염산염을 1 mg/mL 용액을 제공하기 위해 알려진 양을 시트레이트 완충액 중에 용해시켜 투여용으로 제제화하였다. 모르핀의 투여량이 유기 염기로서 표시되도록, 1.32의 보정 인자(correction factor)를 적용하였다. 용액을 신선하게 제조하고, 차광시켰다.

[0334] 비교 물질, 펜타닐 시트레이트를, 0.36 mg/mL의 스톡 용액 농도를 제공하기 위해 알려진 양을 시트레이트 완충액 중에 용해시켜 투여용으로 제제화하였다. 그 다음, 이 스톡 용액을 시트레이트 완충액으로 연속적으로 희석시켜 최종 농도 0.1, 0.4 및 1.2 µg/mL을 제조하였다. 펜타닐의 투여량이 유기 염기로서 표시되도록, 1.57의 보정 인자를 적용하였다. 용액을 신선한 상태로 제조하고, 차광시켰다.

[0335] 군 크기, 투여량 및 식별 번호

[0336] 군당 최대 10마리의 랫트를 포함하는, 11개의 처리군(treatment group)이 존재하였다. 각각의 처리군에 마크 (A 내지 K)를 부여하였다. 랫트를 꼬리 회피 시험(tail flick test)을 위한 투여-전 기준치(baseline value)에 기초하여, 투여 전날 무작위로 상기 처리군들에 분배시켰다 (하기를 참조한다).

[0337] D 비히클 5 mL/kg

[0338] F R-DHE 0.1 µg/kg

[0339] E R-DHE 0.3 µg/kg

| | | | |
|--------|---|-------|----------------------|
| [0340] | K | R-DHE | 0.5 $\mu\text{g/kg}$ |
| [0341] | I | S-DHE | 3 $\mu\text{g/kg}$ |
| [0342] | H | S-DHE | 10 $\mu\text{g/kg}$ |
| [0343] | G | S-DHE | 30 $\mu\text{g/kg}$ |
| [0344] | J | 펜타닐 | 0.5 $\mu\text{g/kg}$ |
| [0345] | C | 펜타닐 | 2 $\mu\text{g/kg}$ |
| [0346] | B | 펜타닐 | 6 $\mu\text{g/kg}$ |
| [0347] | A | 모르핀 | 5 mg/kg |

[0348] 비히클은 시트레이트 완충액이었다. 동물들에 5 mL/kg의 투여 용량 및 Becton Dickinson 25G (0.5 x 16 mm) 바늘을 구비한 폴리프로필렌 시린지(syringe)를 사용하여 미정맥(tail vein) 내로 정맥내 투여하였다. 총 용량 5 mL/kg을, 2분 \pm 10초의 간격에 걸쳐 가능한 한 일정한 속도로 전달하였다. 느린 볼루스(slow bolus)의 시작 및 중단 시간을 기록하였다. 투여 시간을 미가공 데이터(raw data)로서 기록하였다.

[0349] 맹검 처리(Treatment blinding)

[0350] 투여 용액에 코드를 부여하여 (A 내지 K) 관찰자가 처리군의 신원을 알 수 없도록 하였다.

[0351] 체중

[0352] 시험 전에 동물들의 체중을 측정하였으며, 물질의 투여와 동일한 날에 체중을 기록하였다.

[0353] 실험방법

[0354] 1. 환경순응

[0355] 행동 시험(behavioural testing) 전에 미리, 각각의 동물을 일상적 조작(routine handling)을 거치게 하고, 행동 시험 환경에 순응시켰다.

[0356] 2. 기준 행동 시험(Baseline behavioral testing)

[0357] 랫트를 실험 1일 전에 조작실(procedure room)로 이동시켰다. 그 다음, 랫트를 조작실에 수용시키고, 투여하고, 관찰하였다. 기준치를 정립하기 위해, 모든 랫트에 대해, 투여 전에 꼬리 회피 시험 (하기를 참조한다)을 3회 (on 3 separate occasions) 실시하였다. 마지막 시험 측정결과로서 투여-전 기준치를 얻었다 (첫번째 및 두번째 시험으로부터 얻은 데이터는 포함시키지 않았으나, 환경순응의 일부분으로서 분류하였다).

[0358] 꼬리 회피 시험(Tail flick test): 각각의 랫트를 꼬리가 적외선원(infrared source) 바로 위에 위치하도록 꼬리 자극 장치(tail flick apparatus) (Ugo Basile, Italy)에 가볍게 고정시켰다. 그 다음, 적외선원을 꼬리의 복측면(ventral surface) 상의 좁은 면적에 적용시켰다. 적외선원의 활성화는 동시에 타이머(timer)를 작동시키며, 이는 꼬리를 빼내는 (회피하는 또는 휘두르는) 데까지 소요된 시간을 자동적으로 기록한다. 각각의 동물에 대해 꼬리 회피 잠복시간(tail flick latency)을 기록하였다. 적외선 강도를 IR₅₀로 설정하고, IR 광원에의 최대 노출 시간은 10s 였다. 따라서, 무반응 동물은 회피 잠복기간 10 s로 분류되었다.

[0359] 3. 군 배치 및 제외 기준

[0360] 동물을 꼬리 회피 시험을 위한 투여-전 기준치에 기초하여, 투여 전날 무작위로 치료군(A 내지 K)에

배치하였다.

[0361] 4. 투여 및 행동 시험

[0362] 본 연구를 위해 동물들을 절식시키지 않았다. 처리 효과를 조사하기 위해, 꼬리 회피 시험을 (투여 시작 기준) 투여 후 약 5, 10, 20, 30, 60 및 120 분 경과시 실시하였다.

[0363] 5. 종료

[0364] 치료군에 배치되지 않은 모든 동물들을 연구 종료시에 경추 탈골에 의해 처사시켰다. 나머지 동물들은 최종 시험 기간 종료시 스톱으로 반환시켰다.

[0365] 통계학적 분석

[0366] 모수적(parametric) 또는 비모수적(non-parametric) 통계학적 방법을 사용하여, DHE (R- 및 S-이성질체), 모르핀, 펜타닐 군과 비히클 군 사이에 통계학적 비교를 수행하였다. 모수적 (일원분산 분석법 (ANOVA), Dunnett t-검정) 또는 비모수적 (Kruskal-Wallis 통계법(statistic), Dunn 검정 및 Mann-Whitney U-검정) 통계학적 방법의 선택은 비교될 군들이 (F-검정의 Levene Mean 검정에 의해 평가되는) 분산의 동일성 기준(homogeneity of variance criterion)을 충족시키는지 여부를 근거로 하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 추정하였다.

[0367] 또한, 데이터를 $100 \times (\text{시험군}-\text{대조군})/(\text{컷오프}-\text{대조군})$ 으로 정의되는, % MPE (최대 가능 효과(Maximum Possible Effect))로 변환시켰으며, 상기에서 '대조군(control)'은 비히클 군 관찰결과이고, '시험군(test)'은 투여 후 관찰결과이며, '컷-오프(cut-off)'는 허용되는 최대 자극 지속기간 (꼬리 회피의 경우 10초)이다. 최초 4회의 관찰 시점에 대하여, 각각의 DHE 이성질체 (R- 및 S-이성질체) 및 펜타닐에 대한 투여량-반응 곡선(dose-response curve)을 작성하고, ED_{50} (50% MPE 투여량)을 계산하였다. 분석은 비선형 회귀 (최적의 직선), S자형 투여량-반응을 사용하여, $\log_{10} (\text{투여량} \times 10^3)$ 에 대해 실시하였다. 투여-후 데이터는 60분 및 120분 시점에서 기준으로 복귀하였으므로, 이 데이터에 대해서는 계산이 불필요하였다.

[0368] 결과

[0369] 꼬리 회피 잠복시간에 대한 군의 평균 \pm s.e. 평균 데이터가 표 15에 요약되어 있다. R-DHE, S-DHE 및 펜타닐에 대해 계산된 ED_{50} 값을 이들의 상대적 효능(potency)을 평가하기 위해 비교하였다 (표 11). 시간-추이 그래프 플롯(time-course graph plot)을 도 11 내지 도 13에 제시하였으며, ED_{50} (50% MPE 투여량) 투여량 반응 곡선 및 데이터를 도 14 내지 도 17에 제시하였다.

표 15

랫트에서 꼬리 회피 잠복시간에 대한 디히드로에토르핀(R-및 S-이성질체), 펜타닐 및 모르핀의 효과

| 처리 | 투여-전 | 투여후 시점(min)에서의 꼬리 회피 잠복시간(s) | | | | | |
|-----------------------------------|-----------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------|---------------|
| | | 5 | 10 | 20 | 30 | 60 | 120 |
| 비히클 5 mL/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 5.2 ± 0.6 | 5.0 ± 0.2 | 5.1 ± 0.2 | 4.9 ± 0.4 | 5.6 ± 0.4 | 5.1 ± 0.6 (9) |
| DHE (R-이성질체) 0.1 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 7.9 ± 0.7* | 6.1 ± 0.6 | 6.3 ± 0.9 | 4.7 ± 0.4 | 4.6 ± 0.5 | 4.8 ± 0.3 |
| DHE (R-이성질체) 0.3 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 9.2 ± 0.5** | 7.7 ± 0.7 ^s | 7.6 ± 0.8 | 6.1 ± 0.9 | 5.2 ± 0.4 | 4.6 ± 0.6 |
| DHE (R-이성질체) | 4.4 ± 0.3 | 9.4 ± 0.6** | 9.7 ± 0.3 ^{ss} | 8.8 ± 0.5 ^{ss} | 8.2 ± 0.8 ^s | 3.6 ± 0.4** | 4.8 ± 0.6 (8) |

[0370]

| | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|---------------|
| 0.5 µg/kg i.v. | | | | | | | |
| DHE (S-이성질체) 3 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 8.3 ± 0.8 | 7.0 ± 0.9 | 7.0 ± 0.7 | 5.7 ± 0.5 | 5.8 ± 0.6 | 4.9 ± 0.4 (9) |
| DHE (S-이성질체) 10 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 9.7 ± 0.3 ^{ss} | 9.3 ± 0.3 ^{ss} | 7.3 ± 0.8 | 5.8 ± 0.5 | 4.0 ± 0.4* | 3.9 ± 0.4 |
| DHE (S-이성질체) 30 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 10.0 ± 0.0 ^{sss} | 9.2 ± 0.8 ^{ss} | 9.1 ± 0.6 ^{sss} | 8.3 ± 0.7** | 4.9 ± 0.3 | 3.5 ± 0.5 (8) |
| 펜타닐 0.5 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 5.8 ± 0.6 | 5.3 ± 0.6 | 5.2 ± 0.6 | 4.6 ± 0.4 | 4.8 ± 0.4 | 4.6 ± 0.4 (9) |
| 펜타닐 2 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 9.0 ± 0.7 ^{ss} | 9.1 ± 0.4 ^{sss} | 7.5 ± 0.9 | 7.1 ± 0.7 | 4.9 ± 0.7 | 4.2 ± 0.8 |
| 펜타닐 6 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 10.0 ± 0.0 ^{sss} | 8.4 ± 0.7 ^{ss} | 8.1 ± 0.7 ^s | 6.5 ± 1.0 | 6.0 ± 1.0 | 6.3 ± 0.7 |
| 모르핀 5 µg/kg i.v. | 4.2 ± 0.3 | 10.0 ± 0.0 ^{###} | 10.0 ± 0.0 ^{###} | 10.0 ± 0.0 ^{###} | 10.0 ± 0.0 ^{###} | 8.7 ± 0.9 ^f | 6.2 ± 0.9 (8) |

[0371]

[0372] 비히클은 시트레이트 완충액이었다 [시트르산 무수물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:관류용수 0.03:0.10:0.86:99.01 (g:g:g:mL) 비율]

[0373] 데이터는 평균 ± SEM으로 표시되었다.

[0374] 괄호로 달리 명시되지 않은 경우, 군당 동물수 N = 10 마리.

[0375] 비히클과 비교시, *P<0.05 및 **P<0.01 (ANOVA, Dunnett t-검정).

[0376] 비히클과 비교시, ^sP<0.05, ^{ss}P<0.01 및 ^{sss}P<0.001 (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정).

- [0377] 비히클과 비교시, [#]P<0.05 및 ^{###}P<0.001 (Mann-Whitney U-검정).
- [0378] 꼬리 회피 잠복시간(tail flick withdrawal latency)에 대한 디히드로에토르핀 (R-DHE)의 효과 (도 11)
- [0379] 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 투여량에서 R-DHE의 정맥내 투여는, 투여 후 5분 경과시, 비히클 군 데이터 (5.2 ± 0.6 s)와 비교했을 때 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 증가 (7.9 ± 0.7 s; $P < 0.05$; ANOVA 및 Dunnett t-검정)를 야기했다. R-DHE 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 의 정맥내 투여는 투여 후 5분 및 10분 경과시 비히클 군 데이터 (각각, 5.2 ± 0.6 및 5.0 ± 0.2 s)와 비교했을 때, 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 증가 (각각, 9.2 ± 0.5 s; $P < 0.01$; ANOVA 및 Dunnett t-검정; 7.7 ± 0.7 s; $P < 0.05$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)를 야기했으나, 다른 시점에서는 효과를 나타내지 않았다. 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 투여량의 R-DHE의 정맥내 투여는 투여 후 5, 10, 20, 및 30분 경과시 비히클 군 데이터 (각각 5.2 ± 0.6 , 5.0 ± 0.2 , 5.1 ± 0.2 및 4.9 ± 0.4 s) 대비 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 증가 (각각, 9.4 ± 0.6 s; $P < 0.01$;ANOVA 및 Dunnett t-검정; 9.7 ± 0.3 s; $P < 0.001$; 8.8 ± 0.5 s $P < 0.01$; 8.2 ± 0.8 s; $P < 0.05$; 모두 Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)를 야기했다. 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 군에서 투여후 60분에 관찰된 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 감소는 약리학적 상관성이 있는 것으로 간주되지 않는다. 투여 후 120분 시점에서는 효과가 관찰되지 않았다. 이 데이터는 즉각적인 진통효과 개시(immediate analgesic onset) 및 투여 후 약 5 및 10분에서의 최대 효과(peak effect), 투여 후 60분 시점에 도달시 (비히클 대조군과 비슷한) 기준치로의 복귀를 시사한다.
- [0380] R-DHE의 ED₅₀ 추정치, 즉, 50% MPE는 투여 후 5, 10, 20 및 30분 시점에 각각 0.08, 0.23, 0.25 및 0.42 $\mu\text{g/kg}$ 였다. 투여 후 60분 및 120분 시점에서는 투여량 반응이 없었다.
- [0381] 꼬리 회피 잠복시간에 대한 디히드로에토르핀 (S-DHE)의 효과 (도 12)
- [0382] 3 $\mu\text{g/kg}$ 투여량에서 S-DHE의 정맥내 투여는 시험된 모든 시점에서 비히클 군 데이터와 비교시 꼬리 회피 잠복시간에 유의한 영향을 미치지 않았다. 10 $\mu\text{g/kg}$ S-DHE의 정맥내 투여는 투여 후 5분 및 10분 경과시 비히클 군 (각각 5.2 ± 0.6 및 5.0 ± 0.2 s)과 비교했을 때 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 증가 (각각 9.7 ± 0.3 및 9.3 ± 0.3 s; 두 경우 모두 $P < 0.01$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)를 야기했다. 투여 후 60분 시점에 관찰된 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 감소는 약리학적 관련성이 있는 것으로 간주되지 않았다. 투여량 30 $\mu\text{g/kg}$ 의 S-DHE의 정맥내 투여는 투여 후 5, 10, 20 및 30분 시점에서 비히클 군 데이터 (각각 5.2 ± 0.6 , 5.0 ± 0.2 , 5.1 ± 0.2 및 4.9 ± 0.4 s)와 비교했을 때 꼬리 회피 잠복시간에 유의한 증가 (각각 10.0 ± 0.0 s; $P < 0.001$; 9.2 ± 0.8 s; $P < 0.01$; 9.1 ± 0.6 s; $P < 0.001$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정 및 8.3 ± 0.7 s; $P < 0.01$; ANOVA 및 Dunnett t-검정)를 야기했다. 이 데이터는 즉각적 진통효과 개시, 및 투여 후 5분 시점에서의 최대 효과, 투여 후 60분 시점에 도달시 (비히클 대조군과 비슷한) 기준치로의 복귀를 시사한다.
- [0383] DHE (S-이성질체)의 ED₅₀ 추정값, 즉 50% MPE는 투여 후 5, 10, 20 및 30분에 각각 2.17, 3.80, 7.52 및 20.95 $\mu\text{g/kg}$ 이었다. 투여 후 60분 및 120분 시점에서는 투여량 반응이 없었다.
- [0384] 꼬리 회피 잠복시간에 대한 펜타닐의 효과 (도 13)
- [0385] 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 투여량에서 펜타닐의 정맥내 투여는 시험된 모든 시점에서 비히클 군 데이터와 비교시 꼬리 회피 잠복시간에 유의한 영향을 미치지 않았다. 펜타닐 2 $\mu\text{g/kg}$ 의 정맥내 투여는 투여 후 5분 및 10분 시점에 비히클 군 데이터 (각각 5.2 ± 0.6 및 5.0 ± 0.2 s)와 비교했을 때 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 증가 (각각, 9.0 ± 0.7 s; $P < 0.01$ 및 9.1 ± 0.4 s; $P < 0.001$; 두 경우 모두 Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)를 야기했다. 투여량 6 $\mu\text{g/kg}$ 에서 펜타닐의 정맥내 투여는 투여 후 5, 10 및 20분 시점에 비히클 군 데이터 (각각, 5.2 ± 0.6 , 5.0 ± 0.2 및 5.1 ± 0.2 s)와 비교했을 때, 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 증가 (각각, 10.0 ± 0.0 s; $P < 0.001$; 8.4 ± 0.7 s; $P < 0.01$; 8.1 ± 0.7 s; $P < 0.05$; 모두 Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)를 야기했다. 이 데이터는 즉각적 진통효과 개시, 및 투여 후 5분 시점에서의 최대 효과, 투여 후 60분 시점에 도달시 (비히클 대조군과 비슷한) 기준치로의 복귀를 시사한다.
- [0386] 펜타닐의 ED₅₀ 추정값, 즉 50% MPE는 투여 후 5, 10, 20 및 30분에 각각 1.14, 1.25, 3.11 및 9.68

μg/kg이었다. 투여 후 60분 및 120분 시점에서는 투여량 반응이 없었다.

[0387] R-DHE, S-DHE 및 펜타닐의 비교 효과

[0388] R-DHE, S-DHE 및 펜타닐에 대해 계산된 ED₅₀ 값을 비교하여 이들의 상대적 효능을 추정하였다 (표 16). 상기 데이터는 수컷 랫트에 각각의 화합물을 1회 정맥내 투여한 후 최초 30분 동안, R-DHE는 펜타닐의 경우보다 5- 내지 23-배의 진통 효능을 갖고, S-DHE는 펜타닐에 비해 0.3- 내지 0.5-배의 진통 효능을 가지며, 및 R-DHE가 S-DHE에 비해 17- 내지 50-배의 진통 효능을 갖는다는 것을 시사한다.

표 16

R-DHE, S-DHE 및 펜타닐의 ED₅₀ 값 및 상대적 비율

| 투여-후 시간 (min) | ED ₅₀ R-DHE (μg/kg) | ED ₅₀ S-DHE (μg/kg) | ED ₅₀ 펜타닐 (μg/kg) | ED ₅₀ 비율 펜타닐/ R-DHE | ED ₅₀ 비율 펜타닐/ S-DHE | ED ₅₀ 비율 펜타닐/ S-DHE/ R-DHE |
|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| 5 | 0.08 | 2.17 | 1.14 | 14 | 0.5 | 28 |
| 10 | 0.23 | 3.80 | 1.24 | 5 | 0.3 | 17 |
| 20 | 0.25 | 7.52 | 3.11 | 12 | 0.4 | 30 |
| 30 | 0.42 | 20.95 | 9.68 | 23 | 0.5 | 50 |

[0389]

[0390] 꼬리 회피 잠복시간에 대한 모르핀의 효과

[0391] 모르핀 (5 mg/kg)의 정맥내 투여는 투여 후 5, 10, 20, 30 (4 시점 모두에 대해, 10.0 ± 0.0 s; P <0.001 ; Mann-Whitney U-검정) 및 60분 (8.7 ± 0.9 s; P <0.05; Mann-Whitney U-검정)에 비히클 군 데이터 (각각, 5.2 ± 0.6, 5.0 ± 0.2, 5.1 ± 0.2, 4.9 ± 0.4 및 5.6 ± 0.4 s)와 비교했을 때 꼬리 회피 잠복시간의 유의한 증가를 야기했다.

[0392] 결론

[0393] 0.1, 0.3 및 0.5 μg/kg 투여량에서 R-DHE, 및 10 및 30 μg/kg 투여량에서 S-DHE의 단회 정맥내 투여는, 투여 후 최대 30분까지, 수컷 랫트의 꼬리 회피 잠복시간에 있어서 유의한 투여량-의존적 증가를 야기했다. 투여량 2 및 6 μg/kg에서 펜타닐의 정맥내 투여는 투여 후 최대 30분까지 꼬리 회피 잠복시간에 있어서 유의한 투여량-의존적 증가를 야기했다.

[0394] R-DHE, S-DHE 및 펜타닐에 대해 계산된 ED₅₀ 값을 비교하여 이들의 상대적 효능을 추정하였다 (표 16). 데이터는 수컷 랫트에 각각의 화합물을 단회 정맥내 투여한 후 최초 30분 동안; R-DHE는 펜타닐에 비해 5- 내지 23-배의 진통 효능을 갖고, S-DHE는 펜타닐에 비해 0.3- 내지 0.5-배의 진통 효능을 가지며, 및 R-DHE가 S-DHE에 비해 17- 내지 50-배의 진통 효능을 갖는다는 것을 시사한다.

[0395] 정맥 내 투여 후 R-DHE 및 S-DHE의 오피오이드 진통 활성의 지속시간은 급성 통증의 치료에서 이 화합물들의 잠재적 이점 및 치료적 가능성을 두드러지게 한다.

[0396] 모르핀 투여 후 관찰된 효과는 그의 공지된 약리학적 활성과 일치했으며, 따라서 본 시험 시스템은 침해수용성 효과의 검출에 민감하다.

- [0397] 신경병증성 통증의 척수 신경 결찰 모델에서 (R) 및 (S)-디히드로에토르핀의 효과
- [0398] 사용된 시험 모델은 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, Pain 1992; 50: 355- 363 (Kim SH, Chung JM., An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat)에 개시되어 있다.
- [0399] 신경병증성 통증의 척수 신경 결찰 모델에서, 단회 정맥 투여량 0.1, 0.3 및 0.5 $\mu\text{g/kg}$ (R 이성질체) 및 단회 정맥 투여량 3, 10 및 30 $\mu\text{g/kg}$ (S-이성질체)에 따른 디히드로에토르핀의 잠재적 진통 효과를 조사하였다. L5 및 L6 척수신경의 단단한(tight) 결찰에 의해 랫트의 좌측 하지에 말초 단발신경병증(peripheral mononeuropathy)을 유발시켰다. 기계적 이질통(mechanical allodynia) 및 열 통각과민(thermal hyperalgesia)의 발생을 정립된 행동 시험 (각각, Von Frey 시험 및 Hargreaves Plantar 시험)을 이용하여 모니터링하였다. 모르핀을 표준 물질로서 사용하였고, 프레가발린(Pregabalin)을 비교 물질로서 사용하였다.
- [0400] **시험 물질 및 재료**
- [0401] 시험 물질, 표준 물질, 비교 물질 및 비히클
- [0402] 시험 물질: 디히드로에토르핀 (R-이성질체) 및 디히드로에토르핀 (S-이성질체)
- [0403] 시험 물질 및 표준 물질용 비히클:
- [0404] 시트레이트 완충액 (0.03:0.10:0.86:90.01 (g:g:g:mL)의 비율로, 시트르산 일수화물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:멸균수) [시트르산 일수화물 (백색 분말, Sigma, UK), 소듐 시트레이트 (Sigma, UK), 소듐 클로라이드 (백색 고체; Merck), 멸균수 (투명한 액체; Baxter Healthcare, UK)]
- [0405] 표준 물질: 모르핀 염산염 (백색 분말; Macfarlan Smith, Edinburgh, UK)
- [0406] 비교 물질: 프레가발린 (상품명 Lyrica[®]; 백색 캡슐; Pfizer에 의해 제조되고 Lindsay & Gilmour Chemist, Juniper Green, Edinburgh에 의해 공급됨)
- [0407] 비교 물질용 비히클: 1% w/v 카르복시 메틸셀룰로오스 (CMC, 분말; Sigma, UK)
- [0408] 시험물질, 표준물질 및 비교물질의 보관
- [0409] 시험 물질은 차광시켜 실온에서 보관하였으며, 표준 물질 및 비교 물질은 실온에서 보관하였다.
- [0410] **투여 경로 및 투여량 수준**
- [0411] 디히드로에토르핀의 R- 및 S-이성질체 형태 및 비히클(시트레이트 완충액)의 투여 경로는 정맥내 투여였다. 이는 사람에서의 잠재적인 투여 경로이다. R-DHE의 투여량은 0.1, 0.3 및 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 이었고, S-DHE의 투여량은 3, 10 및 30 $\mu\text{g/kg}$ 이었다.
- [0412] 모르핀의 투여 경로는 정맥내 투여였다. 모르핀의 투여량은 5 mg/kg이었다.
- [0413] 비교 물질 프레가발린의 투여 경로는 경구 투여였다. 제2상 연구에서, 프레가발린의 투여량은 30 mg/kg이었다. 제3상에서, 비교 물질, 프레가발린의 투여량 수준은 30, 50 및 100 mg/kg이었다.
- [0414] **동물**
- [0415] 종: 랫트
- [0416] 계통: Sprague-Dawley
- [0417] 성별: 수컷

- [0418] 실험동물 수: 75마리의 동물을 수술에 의해 준비함.
- [0419] 연령 범위: 6 내지 7주 (수술용); 8 내지 9주 (제1상 투여); 9 내지 10주 (제2상 투여); 11주 내지 12주 (제3상 투여).
- [0420] 체중 범위: 139 내지 183 g (수술용); 190 내지 257 g (제1상 투여); 210 내지 284 g (제2상 투여); 243 내지 341 g (제3상 투여)
- [0421] 환경순응: 전달 후 행동 시험 시작 전, 3일
- [0422] 공급처: Harlan UK Ltd
- [0423] 동물 식별화 및 무작위화
- [0424] 각각의 동물에 무작위로 고유 식별 번호를 부여하였으며, 이를 데이터 시트 및 케이지 카드에 표시하였다. 동물들을 방수성 꼬리 표식에 의해 식별화하였다.
- [0425] 동물 건강 및 복지
- [0426] 모든 연구는 1986년 동물(과학적 방법)법에 의거한 제정법, 상기 법의 시행에 관한 영국 내무성 지침 및 모든 적용가능한, 실험 동물의 관리 및 사육을 위한 규약에 따라 수행되었다.
- [0427] 사육시설 및 환경
- [0428] 동물을 톱밥으로 채운 고체-바닥 케이지에서 최대 5마리로 이루어진 군으로 사육하였다. 순응기간 동안, 위생을 유지하기 위해 주기적으로 사육실 및 케이지를 청소하였다. 사육실을 내무성 동물 (과학적 방법)법 (1986)에서 권장된 바와 같이, 12시간 명-암 주기 (07.00 켜짐, 19.00 꺼짐)를 제공하도록 설정된 형광으로 조명하였다. 사육실에 에어컨을 가동시켰으며, 대기 온도 및 상대 습도를 측정하였다. 환경순응 기간 동안, 실온을 유지하였으며 (20 °C 내지 22 °C), 습도 수준은 46% 내지 59%였다. 과정 중에 실온을 유지하였으며 (19 °C 내지 22 °C 범위) 습도 수준은 26% 내지 43% 범위 내였다.
- [0429] 사료 및 음수
- [0430] RM1(E) SQC (Special Diets Services, Witham, UK) 사료 및 수돗물을 무제한으로 공급하였다. 각각의 사료 배치는 영양 조성 및 특정 오염물 (예를 들면, 중금속, 아플라톡신 및 살충제) 수준을 상세하게 기재한 분석 증명서(C of A)와 함께 전달받았다. 음수를 불순물 및 오염물 준부를 주기적으로 분석하였다. 스톡 사료 및 공급수 중 오염물의 허용가능한 수준의 기준은 각각 사료 제조자 및 음수 분석 서비스에 의해 정립된 분석 사양 (analytical specification)의 범위 내였다.
- [0431] 건강 상태
- [0432] 동물들을 도착 후 및 연구 전에 검사하였다; 모든 동물들은 건강하였으며 실험에 사용하기에 적합한 것으로 간주되었다.
- [0433] 실험 설계
- [0434] 시험 물질, 표준 물질 및 비교 물질의 제제화
- [0435] 각각의 구성 성분의 적절한 양을 정밀하게 칭량하고, 이들을 멸균 주사용수(sterile water for injection)에 용해시켜 시트레이트 완충액을 제조하였다. 구성 성분들이 완전히 용해되었을 때, 용액의 오스몰농도 및 pH를 측정하였다. 비히클은 pH가 pH 4.8 내지 5.2의 범위 내인 5.03이고, 오스몰농도가 280 내지 300 mOsmol/kg 범위인 295 mOsmol/kg로서, 허용가능한 것으로 간주하였다. 그 다음, 비히클을 무균 조건 하에서 Millex GV

stericup (0.22 μm 필터)을 통해 여과시키고, 사용 전에 2 $^{\circ}\text{C}$ 내지 8 $^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다.

[0436] 시험 물질, 디히드로에토프린 (R- 및 S-이성질체)을 시트레이트 완충액 중의 용액으로서 투여용으로 제제화하였다. 약 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 제공된 적절한 스톡 용액을 연속적으로 희석하여 투여에 바람직한 농도 (R-이성질체의 경우 0.02, 0.06 및 0.10 $\mu\text{g/mL}$, S-이성질체의 경우 0.6, 2 및 6 $\mu\text{g/mL}$)를 준비하였다. 스톡 용액의 실제 농도를 미가공 데이터에 표시하였다. 연속적 희석 전에, 스톡 용액을 Millex GV 0.22 μm Durapore 멸균 필터 유닛을 통해 통과시켜 유리 바이알에 담고, 멸균 시트레이트 완충액을 사용한 각각의 후속적 희석을 멸균 조작에 의해 실시하였다. 보정 인자를 적용하지 않았으며, 제제들은 유리 염기로서 제조되었다. 제제들을 연구 투여일 전에 제조하였고, R-DHE에 대해 공지된 안정성 기간인 11일 이내에 (제조 1-2일 후) 사용하였다.

[0437] 표준 물질, 모르핀 염산염을, 알려진 양을 시트레이트 완충액 중에 용해시켜 투여용으로 제제화하여 1 mg/mL 용액을 얻었다. 모르핀의 투여량이 유기 염기로서 표시되도록, 1.32의 보정 인자를 적용하였다. 용액을 신선한 상태로 제조하고, 차광시켰다.

[0438] 비교 물질, 프레가발린을, 알려진 양을 1 %w/v CMC 중에 현탁시켜 투여용으로 제제화하여, 제2상을 위한 3 mg/mL 현탁액을 제공하고, 및 제3상을 위한 3, 5 및 10 mg/mL 현탁액을 제조하였다. 보정 인자가 필요하지 않았으므로, 프레가발린을 유리-염기 상태로 투여하였다. 현탁액을 신선한 상태로 제조하고, 차광시켰다.

[0439] 군 크기, 투여량 및 식별 번호

[0440] 군당 최대 10마리의 랫트를 포함하는, 5개의 처리군이 존재하였다. 각각의 처리군에 문자 (제1상: A 내지 E, 제2상: F 내지 J 및 제3상: K 내지 O)를 부여하였다. 랫트를 열 통각과민 시험에 대한 투여-전 기준치 (하기를 참조한다)에 기초하여, 투여 전날 무작위로 상기 처리군들에 분배시켰다.

[0441] 제1상:

| | | | |
|--------|---|-------|-----------------------------|
| [0442] | C | 비히클 | 5 mL/kg, i.v. |
| [0443] | B | R-DHE | 0.1 $\mu\text{g/kg}$, i.v. |
| [0444] | A | R-DHE | 0.3 $\mu\text{g/kg}$, i.v. |
| [0445] | E | R-DHE | 0.5 $\mu\text{g/kg}$, i.v. |
| [0446] | D | 모르핀 | 5 mg/kg, i.v. |

[0447] 제2상:

| | | | |
|--------|---|-------|----------------------------|
| [0448] | I | 비히클 | 5 mL/kg, i.v. |
| [0449] | F | S-DHE | 3 $\mu\text{g/kg}$, i.v. |
| [0450] | G | S-DHE | 10 $\mu\text{g/kg}$, i.v. |
| [0451] | J | S-DHE | 30 $\mu\text{g/kg}$, i.v. |
| [0452] | H | 프레가발린 | 30 mg/kg, p.o. |

[0453] 제3상:

| | | | |
|--------|---|-------|-----------------|
| [0454] | N | 비히클 | 10 mL/kg, p.o. |
| [0455] | M | 프레가발린 | 30 mg/kg, p.o. |
| [0456] | L | 프레가발린 | 50 mg/kg, p.o. |
| [0457] | K | 프레가발린 | 100 mg/kg, p.o. |
| [0458] | O | 모르핀 | 5 mg/kg, i.v. |

[0459] 제1항 및 제2상에 정맥내 비히클, 시트레이트 완충액을 사용했으며, 제3상에 경구용 비히클, 1 % w/v CMC를 사용하였다. 정맥내 처리군으로 배치된 동물들에 5 mL/kg의 투여 용량 및 Becton Dickinson 25G (0.5 x 16 mm)

바늘을 구비한 폴리프로필렌 시린지를 사용하여 미정맥 내로 투여했다. 총 정맥내 용량(intravenous volume) 5 mL/kg를, 2분 ± 10초의 간격에 걸쳐 가능한 한 일정한 속도로 전달하였다. 느린 정맥내 볼투스의 시작 및 중단 시간을 기록하였다. 경구 처리군으로 배치된 동물들을, 10 mL/kg의 투여 부피를 경구 삽입관(oral gavage)에 의해 투여시켰다. 투여 시간을 미가공 데이터로서 기록하였다.

[0460] 맹검 처리

[0461] 관찰자가 처리군의 신원을 알 수 없도록 투여 용액에 코드를 부여하였다 (제1상: A 내지 E, 제2상: F 내지 J 및 제3상: K 내지 O). 본 연구 제2상의 비교 물질은 다른 투여 경로에 의해 투여되었으므로, 이 군은 투여를 실시하는 사람에게 맹검처리되지 않았으며, H로 코딩되었다. 또한, 제3상의 모르핀 대조물질은 정맥내 투여되었으며 이는 비히클 군 및 비교물질 군 (경구 투여)과는 다른 경로이므로, 상기 모르핀 군은 맹검처리되지 않았고, 따라서 O로 코딩되었다.

[0462] 체중

[0463] 수술 전, 수술후(post-operatively, PO) 1일차, 및 물질 투여 전 각각의 투여일에 동물들의 체중을 측정하였으며, 체중을 기록하였다.

[0464] 일별 관찰

[0465] PO 0일차부터 매일 모든 동물에 대해 전반적 관찰을 수행하였으며, 동물의 좌측 및 우측 뒷발의 상태에 특히 주의하여 관찰하였다.

[0466] 실험방법

[0467] 1. 환경순응

[0468] 행동 시험 전에, 동물들을 일상적 조작을 거치게 하고, 행동 시험 환경에 순응시켰다.

[0469] 2. 기준치(baseline) 행동 시험

[0470] 랫트를 실험 하루 전에 조작실로 이동시켰다. 그 다음, 랫트를 상기 조작실에 수용시키고, 투여하고, 관찰하였다. 기준치를 정립하기 위해, 수술 전, 모든 랫트에 대해 행동 시험(하기를 참조한다)을 2회 실시하였다. 시험 마지막(두 번째) 날로부터 얻은 데이터로서 수술-전 기준치를 얻었다 (시험 첫번째 날로부터 얻은 데이터는 환경순응의 일부로서 분류되었다). 시험의 순서는 기계적 이질통(mechanical allodynia) 후에 열 통각과민(thermal hyperalgesia)이었으며, 상기 시험들 간에 최소 5분의 시간을 두었다.

[0471] 기계적 이질통 (Von Frey 시험): 각각의 동물을 철망 케이지에 위치시키고, 일련의 Von Frey 필라멘트를 아래에서부터, 뒷발의 발바닥 면에 적용시켰다. 필라멘트를 오름 순서대로(ascending order) 적용시켰으며 (가장 약한 힘부터 시작함), 좌측 및 우측 뒷발 모두에 대한 회피 역치를 평가하였다. 각각의 필라멘트를, 구부러지기 시작하는 지점까지 발바닥 중앙 면에 밀었다(indent); 이를 약 1 Hz의 주파수에서, 필라멘트 당 약 8 내지 10회 반복하였다. 회피 역치를, 반사 회피 반응(relex withdrawal response) (즉, 짧은 발 움츠림(brief paw flick))을 유발하는 2개 이상의 연속적인 Von Frey 필라멘트의 최저 힘으로 정의하였다.

[0472] 열 통각과민 (Hargreaves Plantar 시험): 각각의 랫트를 유리 바닥을 갖는 깨끗한 플라스틱 챔버(chamber)에 위치시키고, 시험 전에 그의 환경에 순응시키도록 단기간(약 1분)을 부여하였다. 그 다음, 동물들을 밑에서부터 그의 뒷발 발바닥 면을 향한, 방사 적외선(IR) 열원(radiant infrared (IR) heat source)으로 켈린지를 가하였으며, 회피 잠복시간을 좌측 및 우측 뒷발 모두에 대해 계산하였다. 적외선 강도를 IR₅₀ (250 mW cm³의 열류량(heat flux) 관독을 전달하도록 고안된 설정)으로 설정하였고, IR 광원에의 최대 노출 시간은 18초였다. 따라서, 미반응 동물은 회피 잠복시간 18초로 분류되었다.

- [0473] 3. 수술 과정
- [0474] 동물들을 3일에 걸쳐 수술에 의해 준비하였다. 각각의 랫트를 1 % 내지 3 % 산소 중에서 이소플루오란(isofluorane)으로 필요한 만큼 마취시켰다. 각각의 랫트를 복와위(prone position)로 위치시키고, 절제 부위 주변의 표면을 제모시키고, 외과용 알코올(surgical spirit)로 멸균시켰다. 무균 조건하에서, 좌측 부척추근(paraspinal muscle)을 L4 S2 수준에서 극돌기(spinous process)로부터 분리시켰다. 그 다음, L6 횡돌기(transverse process)를 작은 론저(rongeur)를 사용하여 조심스럽게 제거하고, L4 L6 척수 신경을 확인하였다. 좌측의 L5 및 L6 척수 신경을 분리시키고, 6-0 명주사(silk thread)를 사용하여 단단히 결찰시켰다 (x 40 배율 하에서 관찰). 그 위를 덮는 근육 및 피부들을 적절한 봉합 물질을 사용하여 층상으로 봉합시켰으며, 일단 완료 되면, 마취를 중단시켰다. 마취로부터 회복된 후, 상기 랫트를 초기에는 감염 위험을 감소시키기 위해 부드럽고 폭신한 잠자리에, 및 그 다음 완전히 회복된 후에는 톱밥 잠자리에, 케이지-메이트(cage-mate)와 함께 재수용(rehouse)시켰다. 동물들을 행동 시험이 재개되기 전에 최소 4일 동안 회복시켰다.
- [0475] 4. 발병 시험(Developmental testing)
- [0476] 수술 후에, 이질통/통각과민의 발병을 모니터링하기 위해 행동 시험을 투여일 전에 2회 수행하였다. 각각의 투여 상(phase) 전에 충분한 수의 동물들이 이질통/통각과민을 발병했다는 것을 보장하기 위하여, 추가적인 재량(discretionary) 시험일도 포함시켰다.
- [0477] 5. 군 배치 및 제외 기준
- [0478] 동물들을 열 통각과민 시험을 위한 투여 전 기준치를 기초로 하여, 투여 전날에 무작위로 처리군에 배치시켰다. 기계적 이질통 및 열 통각과민 모두가 발병한 동물만을 본 연구에 포함시켰다. 동물들은 Von Frey 필라멘트에 대한 좌측 발 회피 역치가 ≤ 5 g의 힘 (모노필라멘트 번호 4.56(monofilament number 4.56) 또는 그 미만에 해당한다)인 경우에 기계적 이질통이 발병한 것으로 간주되었다. 동물들은 투여 전, 열 발바닥 장치(thermal plantar device)에 대한 좌측 발 회피 잠복시간이 좌측 발 수술-전 값으로부터 ≥ 30 %의 차이를 나타내는 경우에 열 통각과민이 발병한 것으로 간주되었다.
- [0479] 6. 투여 및 행동 시험
- [0480] 본 연구를 위해서는 동물들을 절식시키지 않았다. 각각의 투여일에, 배치된 동물들 각각은 시험 물질, 표준 물질 또는 비히클의 단회 정맥내 투여량; 또는 비교 물질 또는 비히클의 경구 투여량을 제공받았다. 본 연구에는 3개의 상이 존재하였다. 각각의 상의 투여를 2일에 걸쳐 분할시켰으며, 각각의 투여일에는 최소 3개의 치료군으로부터의 동물들에게 투여하였다. 각 상의 완료 후에는, 연구의 다음 상을 시작하기 전에 동물들이 1주일의 최소 워시아웃(washout) 기간을 거치도록 하였다.
- [0481] 본 연구의 제1상 및 제2상에서, 투여 후 (투여 시작으로부터 약 5분) 및 투여 후 약 25, 50 및 120분 시점에, 각각의 랫트의 좌측 및 우측 뒷발을 Von Frey 시험을 이용하여 기계적 이질통에 대해 평가하였다. 투여 후 약 15, 35, 60 및 130분 시점에, 치료 효과를 검사하기 위해 각각의 랫트의 좌측 및 우측 뒷발을 Hargreaves Plantar 시험을 이용하여 열 통각과민에 대해 평가하였다. 모든 시점은 투여의 시작을 기준으로 하였다. 본 연구의 제3상에서는, 투여 후 약 60, 120, 180 및 240분 시점에, 각각의 랫트의 좌측 및 우측 후지(hind limb)를 Von Frey 시험을 이용하여 기계적 이질통에 대해 평가하였다. 투여 후 약 70, 130, 190 및 250 분 시점에는, 치료 효과를 검사하기 위해 각 랫트의 좌측 및 우측 후지를 Hargreaves Plantar 시험을 이용하여 열 통각과민에 대해 평가하였다.
- [0482] 7. 치사
- [0483] 최종 시험 기간이 종료된 후에, 모든 실험 동물들을 경추 탈골에 의해 치사시켰다.

[0484] 통계적 분석

[0485] 치료군들 간의 통계학적 비교는 모수적 (예를 들면, 일원분산 분석, Dunnett t-검정, Student t-검정) 또는 비모수적 (예를 들면, Kruskal-Wallis 통계, Dunn 검정, Mann-Whitney U-검정) 통계학적 방법에 의해 이루어졌다. 모수적 및 비모수적 검정의 선택은 비교되는 군들이 (Levene 평균값 검정(Levene Mean test) 또는 F-검정(F-test)에 의해 평가되는) 분산의 동일성 기준을 충족시키는지 여부를 기초로 하였다. Von Frey 데이터는 분석 전에 로그값으로 변환시켰다 ((그램 단위의 힘 x 10000)의 log10). 본 연구의 제2상에서는, 비교 물질로서 프레가발린을 상이한 투여 경로로 투여하고, 프레가발린에 대한 데이터를 쌍체(paired) Student t-검정을 사용하여 투여-전 값과 비교하였다. 본 연구의 제3상에서는, 표준 물질로서 모르핀을 비히클 및 시험물질과 다른 투여 경로에 의해 투여하고, 모르핀 데이터를 쌍체 Student t-검정을 사용하여 투여-전 값과 비교하였다. 모든 시험에 있어서, $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 추정하였다. Von Frey 시험에 대한 통계적 유의성은, 로그값으로 변환된 데이터에 대해 수행되었으나, 설명을 위해 결과 부분에서는 그램 힘(gram force)으로 표시하였다. 분석의 전체 세부사항은 미가공 데이터로 제공된다.

[0486] 결과

[0487] 회피 역치 및 회피 잠복시간에 대한 군 평균 \pm s.e. 평균 데이터를 하기 표 17 내지 표 22에 요약하였다.

[0488] 신경병증성 통증 상태의 발병

[0489] 정립된 행동 시험, 즉 기계적 이질통의 존재를 시험하기 위한 Von Frey 필라멘트, 및 열 통각과민의 존재를 시험하기 위한 Hargreaves Plantar 시험을 이용하여, 신경병증성 통증의 두 가지 다른 구성요소들을 연구하였다. 척수 신경 결찰을 거친 동물들의 대부분이, 손상-후(post-injury)에 상기 두 행동 시험에서 말초 단발신경병증(peripheral mononeuropathy)의 발병 징후인, 좌측 뒷발의 민감성의 현저한 증가를 나타냈다. 우측 뒷발은 수술 후 민감성의 증가를 보이지 않았다. 상기 연구의 각각의 상에서, 투여받은 모든 동물들은 투여 전날 정립된 행동 시험을 이용하여 평가된 바에 따라, 좌측 뒷발에 신경병증을 갖는 것으로 간주되었다.

[0490] 행동 시험 반응에 대한 R-DHE의 효과 (제1상)

[0491] 기계적 이질통: 제1상에서, 0.1 및 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 에서 R-DHE의 정맥내 투여는 Von Frey 필라멘트에 대한 좌측 또는 우측 발 회피 역치의 유의한 변화를 발생시키지 않았다. 그러나, R-DHE 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 의 정맥내 투여는 투여 후 약 5분 시점에, 비히클 군 값인 5.43 ± 2.58 g과 비교하여 좌측 발 회피 역치의 유의한 증가 (21.97 ± 2.30 g; $P < 0.01$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)를 야기했으며, 및 투여 후 약 25분 시점에 비히클 군 값 2.25 ± 0.75 g과 비교했을 때 유의한 증가 (13.12 ± 3.41 g; $P < 0.05$; ANOVA 및 Dunnett t-검정)를 야기했다 (표 17, 도 18).

[0492] 열 통각과민: R-DHE의 정맥내 투여는 비히클과 비교했을 때 좌측 발 회피 잠복시간에 대한 유의한 효과를 갖지 않았다. 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 투여량에서 R-DHE의 정맥내 투여는 투여 후 약 35분 시점에, 비히클 값 (10.3 ± 0.9 s)과 비교하여 우측 발 회피 잠복시간의 유의한 증가 (14.5 ± 0.7 s; $P < 0.05$; ANOVA 및 Dunnett t-검정)를 야기했다; 그러나, 우측 발의 회피 역치가 우측 발에 대한 투여전 값(14.3 ± 0.6 s)과 유사했기 때문에, 이는 생리학적인 관련성이 없다 (표 18, 도 19).

[0493] 행동 시험 반응에 대한 S-DHE의 효과 (제2상)

[0494] 기계적 이질통: 제2상에서, 3 및 10 $\mu\text{g/kg}$ S-DHE의 정맥내 투여는 Von-Frey 필라멘트에 대한 좌측 또는 우측 발 회피 역치에 유의한 변화를 발생시키지 않았다. 그러나, 30 $\mu\text{g/kg}$ S-DHE의 정맥내 투여는 투여 후 약 5분 시점에, 비히클 군 값인 6.11 ± 2.39 g과 비교하여 좌측 발 회피 역치에 유의한 증가 (24.56 ± 0.33 g; $P \leq 0.001$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)를 야기했고, 투여 후 약 25분 시점에, 비히클 군 값인 1.66 ± 0.47 g과 비교했을 때, 좌측 발 회피 역치에 유의한 증가 (21.92 ± 1.70 g; $P < 0.001$; Kruskal Wallis 및 Dunn 검정)를 야기했다 (표 19, 도 20).

- [0495] 열 통각과민: S-DHE의 정맥내 투여는 3 및 10 $\mu\text{g/kg}$ 의 투여량에서, 비히클 군 값과 비교했을 때 좌측 및 우측 발 회피 잠복시간에 유의한 효과를 갖지 않았다. 그러나, 30 $\mu\text{g/kg}$ 투여량에서 S-DHE의 정맥내 투여는, 투여 후 약 15분 시점에서 비히클 값인 $10.3 \pm 0.8 \text{ s}$ 및 $13.4 \pm 0.8 \text{ s}$ 각각과 비교했을 때, 좌측 ($17.6 \pm 0.4 \text{ s}$; $P < 0.01$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정) 및 우측 ($17.5 \pm 0.4 \text{ s}$; $P < 0.01$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정) 뒷발 모두에서 발 회피 잠복시간의 유의한 증가를 나타냈다. 우측 발 잠복시간의 증가는 30 $\mu\text{g/kg}$ 투여량 수준에서 디히드로에토프린 (S-이성질체)의 중추 효과를 시사하는 것일 수 있다 (표 20 및 도 21).
- [0496] 행동 시험 반응에 대한 모르핀의 효과 (제1상 및 제3상)
- [0497] 제1상에서는, 모두 경구로 투여되었기 때문에, 모르핀 표준물질과 비히클을 비교하였다. 제3상에서는, 모르핀 표준물질과 투여전을 비교하였으며, 이는 상기 물질을 경구 비히클과 비교하는 것은 적절하지 않기 때문이었다.
- [0498] 기계적 이질통: 5 mg/kg의 모르핀을 정맥내 투여한 후에 (1상), 좌측 발 회피 역치가 비히클 값인 2.25 ± 0.75 및 $2.11 \pm 0.82 \text{ g}$ 과 비교했을 때, 투여 후 약 25분 시점 ($19.23 \pm 2.73 \text{ g}$; $P < 0.001$; 비쌍체(unpaired) 2-꼬리 Student t-검정) 및 투여 후 약 50분 시점 ($21.55 \pm 2.40 \text{ g}$; $P < 0.001$; 비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)에 유의하게 증가하였다. 비히클 값 ($22.26 \pm 1.52 \text{ g}$)과 비교했을 때, 우측 발 투여전 데이터 ($16.37 \pm 2.20 \text{ g}$; $P < 0.05$; 비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)의 유의한 감소가 관찰되었다. 이는 처리군의 배치가 열 통각과민 시험으로부터 얻은 투여 전 값 (표 17, 도 18)에 기초한 것이므로, 불가피한 것이었다. 우측 뒷발에서 다른 유의한 효과는 관찰되지 않았다.
- [0499] 제3상에서, 모르핀 (5 mg/kg)의 정맥 내 투여는 투여 전 값 $1.46 \pm 0.37 \text{ g}$ 과 비교했을 때, 투여 후 약 60분 ($21.32 \pm 2.56 \text{ g}$; $P < 0.001$; 쌍체 2-꼬리 Student t-검정), 약 120분 ($11.08 \pm 2.85 \text{ g}$; $P < 0.01$; 쌍체 2-꼬리 Student t-검정), 및 약 180분 ($3.68 \pm 0.97 \text{ g}$; $P < 0.05$; 쌍체 2-꼬리 Student t-검정)시점에 좌측 발 회피 역치를 유의하게 증가시켰다 (표 21, 도 22).
- [0500] 열 통각과민: 제1상에서, 5 mg/kg 모르핀의 정맥 내 투여는 시험된 모든 시점에 걸쳐서 좌측 발에서 회피 잠복시간의 유의한 증가를 야기했으며, 투여 후 약 15, 35 및 60분 시점에 우측 발에서 유의한 증가를 야기했다. 비히클 값 (각각, 7.5 ± 0.5 , 12.8 ± 1.1 , 7.0 ± 1.2 , 10.3 ± 0.9 , 7.6 ± 0.9 , 12.4 ± 1.4 및 $7.4 \pm 0.9 \text{ s}$)과 비교하여, 투여 후 약 15분; (좌측; $12.0 \pm 1.5 \text{ s}$; $P < 0.05$; Mann-Whitney U-검정), (우측; $17.5 \pm 0.5 \text{ s}$; $P < 0.001$; Mann-Whitney U-검정), 투여 후 35분 (좌측; $16.4 \pm 0.9 \text{ s}$; $P < 0.001$; 비쌍체 2-꼬리 Student t-검정), (우측; $16.8 \pm 0.7 \text{ s}$; $P < 0.001$; 비쌍체 2-꼬리 Student t-검정) 및 투여 후 약 60분 (좌측; $12.8 \pm 1.3 \text{ s}$; $P < 0.01$; 비쌍체 2-꼬리 Student t-검정), (우측; $16.3 \pm 1.1 \text{ s}$; $P < 0.05$; 비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)에 양측 발, 및 투여 후 약 130분에 좌측 발 ($10.6 \pm 0.9 \text{ s}$; $P < 0.05$; 비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)의 회피 잠복시간의 유의한 증가를 보였다 (표 18, 도 19).
- [0501] 본 연구의 제3상에서, 모르핀의 정맥내 투여는 투여 후 약 70분 ($11.8 \pm 1.2 \text{ s}$; $P < 0.01$; 쌍체 2-꼬리 Student t-검정), 투여 후 약 190분 ($8.0 \pm 0.8 \text{ s}$; $P < 0.05$; 쌍체 2-꼬리 Student t-검정) 및 투여 후 약 250분 ($10.6 \pm 1.4 \text{ s}$; $P < 0.05$; 쌍체 2-꼬리 Student t-검정) 시점에, 투여 전 값 $6.0 \pm 0.5 \text{ s}$ 과 비교했을 때, 좌측 발 회피 잠복시간의 유의한 증가를 야기했다 (표 22, 도 23).
- [0502] 행동 시험 반응에 대한 프레가발린의 효과 (제2상 및 제3상)
- [0503] 프레가발린을 본 연구의 제2상에서 투여-전과 비교했으며, 제3상에서는 비히클과 비교하였다. 본 연구의 제2상에서는, 프레가발린을 비히클(iv)과 다른 경로(경구)로 투여하였으므로, 비히클과의 비교는 적절하지 않았다. 본 연구의 제3상에서, 3가지 투여량 수준을 사용한, 프레가발린에 대한 투여량 반응을, 투여전 보다는 비히클과 비교하였다.
- [0504] 기계적 이질통: 제2상에서, 프레가발린 (30 mg/kg)의 경구 투여는 투여 전 값인 $1.09 \pm 0.35 \text{ g}$ 과 비교하여, 투여 후 약 50분 ($10.35 \pm 2.51 \text{ g}$; $P < 0.001$; 쌍체 2-꼬리 Student t-검정) 및 투여 후 약 120분 ($13.90 \pm 3.00 \text{ g}$; $P < 0.001$; 쌍체 2-꼬리 Student t-검정) 시점에 좌측 발 회피 역치에 있어서 유의한 증가를 야기했다 (표 19 및 도 20).
- [0505] 제3상에서, 30 mg/kg 투여량으로 경구 투여된 프레가발린은, 비히클 값인 $5.00 \pm 2.34 \text{ g}$ 및 $2.57 \pm 0.92 \text{ g}$ 과 각각 비교했을 때, 투여 후 약 120분 ($17.06 \pm 2.88 \text{ g}$; $P < 0.01$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정) 및 투여 후

약 180분 (13.86 ± 3.21 g; $P < 0.01$; ANOVA 및 Dunnett 검정) 시점에 좌측 발 회피 역치에 유의한 증가를 야기했다. 50 mg/kg 투여량에서 프레가발린의 경구 투여는, 비히클 값인 2.57 ± 0.92 g 및 16.57 ± 1.75 g 각각과 비교하여, 투여 후 약 180분 시점 (좌측 발: 15.20 ± 3.31 g; $P < 0.01$; ANOVA 및 Dunnett 검정 및 우측 발: 24.20 ± 0.39 g; $P < 0.05$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)에 좌측 및 우측 발 회피 역치에 유의한 증가를 야기했으며, 비히클 값 (1.48 ± 0.30 g)과 비교했을 때 투여 후 약 240분 시점 (12.05 ± 3.41 g; $P < 0.05$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)에 좌측 발 회피 역치에 유의한 증가를 야기했다. 100 mg/kg 투여량에서 프레가발린의 경구 투여는 비히클 값인 2.57 ± 0.92 및 16.57 ± 1.75 g과 각각 비교했을 때, 투여 후 약 120분 (23.29 ± 1.19 g; $P < 0.01$; ANOVA 및 Dunnett 검정)에 좌측 발 회피 역치에 유의한 증가를 야기했고, 투여 후 약 180분 (좌측 발: 19.77 ± 2.70 g; $P < 0.01$; ANOVA 및 Dunnett 검정 및 우측 발: 23.70 ± 1.04 g; $P < 0.01$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)에 좌측 및 우측 발 회피 역치에 유의한 증가를 야기했으며, 및 비히클 값 (1.48 ± 0.30 g)과 비교했을 때 투여 후 약 240분 (15.91 ± 2.86 g; $P < 0.001$; Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)에 좌측 발 회피 역치에 유의한 증가를 야기했다. 프레가발린 50 및 100 mg/kg의 투여에 따른 우측 발 회피 역치의 증가는 상기 투여량 수준에서 프레가발린의 중추 효과를 시사했다. 이는 진정 임상 증상(sedative clinical symptom) 수준의 투여량-의존적 증가를 나타내는 동물의 결과와 일치했다 (표 21, 도 22).

[0506] 열 통각과민: 제2상에서, 프레가발린 (30 mg/kg)의 경구 투여는 투여 전 값인 6.2 ± 0.5 s과 비교했을 때, 투여 후 15, 35, 60 및 130분 시점 (8.3 ± 0.7 s $P < 0.05$; 8.6 ± 1.0 s $P < 0.05$; 8.8 ± 1.0 s $P < 0.05$; 9.6 ± 0.8 s $P < 0.001$; 모두 쌍체 2-꼬리 Student t-검정)에 좌측 발 회피 잠복시간에 유의한 증가를 야기했다. 이러한 유의한 증가는, 제2상에서 비히클 대조군 (iv 투여)의 회피 잠복시간의 값에서 유사한 증가가 있었고 (투여전 값인 6.2 ± 0.5 s과 비교하여, 투여 후 15, 35, 60 및 130분 (10.3 ± 0.8 s $P < 0.01$; 8.1 ± 0.5 s $P < 0.05$; 9.3 ± 0.7 s $P < 0.001$; 9.8 ± 1.0 s $P < 0.01$; 모두 쌍체 2-꼬리 Student t-검정) 시점), 본 연구의 제3상에서, 프레가발린의 경구 투여가 비히클 대조군과 비교하여, 시험된 모든 투여량 (30, 50 및 100 mg/kg) 및 모든 투여-후 시점 (60, 120, 180 및 240분)에서 좌측 및 우측 발 회피 잠복시간에 유의한 효과를 나타내지 않았기 때문에, 약리학적 관련성이 있는 것으로 간주되지 않았다 (표 20, 도 21 및 표 22, 도 23).

[0507] 결론

[0508] L5 및 L6 척수 신경을 단단히 결찰(tight ligation)시켜, 랫트의 좌측 후지에 말초 단발신경병증을 유발시켰다. 기계적 이질통 및 열 통각과민의 발병을 정립된 행동 시험 (각각, Von Frey 시험 및 Hargreaves Plantar 시험)을 사용하여 모니터링하였다. 반응 역치 및 잠복시간을 좌측(손상) 및 우측(비손상) 뒷발에 대해 평가하였다. 본 연구의 각각의 상에서, 투여받은 모든 동물들은 투여 전날 상기 정립된 행동 시험을 사용하여 평가한 바에 따라 좌측 뒷발에 신경병증을 갖는 것으로 간주되었다.

[0509] 0.5 μ g/kg R-DHE의 정맥내 투여는 투여 후 25분까지 회피 역치(기계적 이질통)의 증가, 및 투여 후 약 5분에서의 최대 효과(peak effect)를 야기했다. R-DHE 0.5 μ g/kg은 시험된 모든 시점에서 회피 잠복시간 (열 통각과민)에 효과를 미치지 않았다. 또한, 그보다 낮은 투여량인 0.1 및 0.3 μ g/kg의 R-DHE에서는 기계적 이질통 또는 열 통각과민에 대한 효과가 나타나지 않았다.

[0510] 30 μ g/kg 투여량에서 S-DHE의 정맥내 투여는, 투여-후 약 5 내지 25분에 최대 효과를 갖는, 회피 역치 (기계적 이질통), 및 투여후 약 15분에 최대 효과를 갖는, 회피 잠복시간 (열 통각과민)에서 유의한 진통 효과를 야기했다. S-DHE 3 및 10 μ g/kg에서는 기계적 이질통 또는 열 통각과민에 대한 효과가 관찰되지 않았다.

[0511] 오피오이드 화합물, R-DHE 및 S-DHE의 정맥내 투여는 랫트에서의 기계적 이질통 및 열 통각과민 시험 모두에서 진통 활성을 나타냈다. 이는 신경병증성 통증의 치료에서 상기 화합물들의 치료적 잠재성을 강조한다.

[0512] 최대 100 mg/kg 투여량의 프레가발린 투여 후에 (제3상), 투여-후 약 180 내지 240분에서 최대 효과를 나타내는, 투여량-의존적인 회피 역치의 증가가 있었다. 열 통각과민 시험에서는 프레가발린의 효과가 관찰되지 않았다. 프레가발린 투여 후에 관찰된 효과는, 기계적 이질통에 현저한 효과를 나타내나 열 통각과민에 대해서는 제한된 효과를 나타내는, (문헌 데이터에 기초한) 그의 공지된 약리학적 활성과 일치하였다.

[0513] 모르핀의 정맥내 투여 후에 관찰된 효과는 기계적 이질통 및 열 통각과민에 유의한 효과를 나타내어 그의 공지된 약리학적 활성과 일치하였다. 따라서, 이 시험 시스템은 랫트에서의 기계적 이질통 및 열 통각과민 시험 모두에서 침해수용 효과를 검출하는데 민감했다.

랫트에서 Von Frey 단일섬유 켈런지에 대한 좌측(L) 및 우측(R) 발 회피 역치에 미치는 정맥내 R-DMEM의 효과 (제1상) (a) 미가공 데이터

| 처리 | 투여 전 | | 투여 후 시점(분)의 회피 역치 | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | | | 제1상 | | | | | | | |
| | | | 5 | | 25 | | 50 | | 120 | |
| | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| 비히클 + 5 mL/kg, i.v. | 0.95 ± 0.09 (9) | 22.26 ± 1.52 (9) | 5.43 ± 2.58 (9) | 22.26 ± 1.52 (9) | 2.25 ± 0.75 (9) | 23.25 ± 1.16 (9) | 2.11 ± 0.82 (9) | 22.26 ± 1.52 (9) | 1.09 ± 0.23 (9) | 23.25 ± 1.16 (9) |
| 디히드로몬에 토르펜 (P) 0.1 µg/kg, i.v. | 1.37 ± 0.31 | 21.07 ± 1.99 | 5.35 ± 0.79 | 23.30 ± 1.00 | 6.55 ± 3.04 | 19.81 ± 1.97 | 1.35 ± 0.32 | 18.11 ± 2.52 | 1.07 ± 0.16 | 18.05 ± 1.94 |
| 디히드로몬에 토르펜 (P) 0.3 µg/kg, i.v. | 1.27 ± 0.33 | 17.45 ± 2.01 | 11.13 ± 3.54 | 22.20 ± 1.30 | 2.41 ± 0.59 | 22.37 ± 1.36 | 1.14 ± 0.31 | 18.55 ± 2.25 | 0.55 ± 0.10 | 18.25 ± 1.54 |
| 디히드로몬에 토르펜 (P) 0.5 µg/kg, i.v. | 1.05 ± 0.18 | 16.32 ± 1.99 | 21.97 ± 2.30 | 24.36 ± 0.34 | 13.12 ± 3.41 | 24.36 ± 0.34 | 6.17 ± 2.33 | 21.84 ± 1.77 | 1.80 ± 0.88 | 20.41 ± 1.63 |
| 모르핀 5 mg/kg, i.v. | 1.69 ± 0.53 | 16.37 ± 2.20 | 13.38 ± 3.14 | 23.50 ± 1.02 | 19.23 ± 2.73 | 23.30 ± 1.02 | 21.55 ± 2.40 | 24.56 ± 0.33 | 9.37 ± 3.60 | 23.46 ± 1.06 |

표 17

[0514]

[0515] 데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.

[0516] 괄호에 달리 명시되지 않은 경우, 군 당 동물수 n = 10.

[0517] 통계적 분석은 log 데이터에 대해서만 수행함.

[0518] †비히클 = 시트레이트 완충액 (0.03:0.10:0.86:99.01 (g:g:g:mL)의 비율로, 시트르산 일수화물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:주사용수).

표 17 (계속) (b) 로그 데이터

| 처리 | 투여 전 | | 투여 후 시점(분)의 회피 역치 (Log 10(평균(g)X10000)) | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | | 5 | | 25 | | 50 | | 120 | |
| | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| 비히클 + 5 mL/kg, i.v. | 3.96 ± 0.04 (9) | 5.34 ± 0.03 (9) | 4.48 ± 0.16 (9) § | 5.34 ± 0.03 (9) | 4.21 ± 0.12 (9) | 5.36 ± 0.03 (9) | 4.12 ± 0.14 (9) | 5.34 ± 0.03 (9) | 3.96 ± 0.08 (9) | 5.36 ± 0.03 (9) |
| 디히드로에 토르펜 (R) 0.1 µg/kg, i.v. | 4.06 ± 0.08 | 5.30 ± 0.05 | 4.65 ± 0.10 | 5.36 ± 0.02 | 4.42 ± 0.19 | 5.27 ± 0.05 | 4.05 ± 0.08 | 5.21 ± 0.07 | 3.99 ± 0.06 | 5.23 ± 0.05 |
| 디히드로에 토르펜 (R) 0.3 µg/kg, i.v. | 4.01 ± 0.09 | 5.21 ± 0.05 | 4.71 ± 0.20 | 5.34 ± 0.03 | 4.26 ± 0.10 | 5.34 ± 0.03 | 3.97 ± 0.08 | 5.23 ± 0.06 | 3.95 ± 0.05 | 5.25 ± 0.04 |
| 디히드로에 토르펜 (R) 0.5 µg/kg, i.v. | 3.96 ± 0.07 | 5.19 ± 0.05 | 5.26 ± 0.12 ## | 5.39 ± 0.01 | 4.89 ± 0.17 ‡ | 5.39 ± 0.01 | 4.50 ± 0.17 | 5.32 ± 0.05 | 4.03 ± 0.12 | 5.30 ± 0.03 |
| 포르펜 5 mg/kg, i.v. | 4.08 ± 0.11 | 5.17 ± 0.06 | 4.93 ± 0.16 | 5.37 ± 0.02 | 5.20 ± 0.11 ... | 5.37 ± 0.02 | 5.26 ± 0.11 ... | 5.39 ± 0.00 | 4.49 ± 0.23 | 5.36 ± 0.02 |

[0519]

[0520] 데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.

[0521] 괄호에 달리 명시되지 않은 경우, 군 당 동물수 n = 10.

[0522] †비히클 = 시트레이트 완충액 (0.03:0.10:0.86:99.01 (g:g:g:mL)의 비율로, 시트르산 일수화물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:주사용수).

[0523] 비히클 군 데이터와 비교시, * P < 0.05 (비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

[0524] 비히클 군 데이터와 비교시, *** P < 0.001 (비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

[0525] 비히클 군 데이터와 비교시, ## P < 0.01 (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)

[0526] 비히클 군 데이터와 비교시, † P < 0.05 (ANOVA 및 Dunnett t-검정)

[0527] 투여-전 데이터와 비교시, ^{\$}P < 0.05 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

표 18

| 처리 | 투여 전 | | 투여 후 시점(분)의 회피 잠복시간(s) | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------|--------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| | | | 15 | | 35 | | 60 | | 130 | |
| | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| 비히클 † 5 mL/kg, i.v. | 6.4±0.5 (9) | 13.9±1.2 (9) | 7.5±0.5 (9) | 12.8±1.1 (9) | 7.0±1.2 (9) | 10.3±0.9 (9) | 7.6±0.9 (9) | 12.4±1.4 (9) | 7.4±0.9 (9) | 14.1±1.3 (9) |
| 디히드로에도르펜 (R) 0.1 µg/kg, i.v. | 6.4±0.5 | 13.5±1.0 | 6.9±1.0 | 13.2±1.0 | 7.4±0.5 | 12.6±1.1 | 7.7±1.0 | 12.9±1.2 | 8.1±0.6 | 14.3±0.8 |
| 디히드로에도르펜 (R) 0.3 µg/kg, i.v. | 6.3±0.6 | 14.3±0.6 | 9.4±0.8 | 15.1±0.9 | 9.9±1.1 | 14.5±0.7 [‡] | 8.3±0.8 | 14.6±0.9 | 7.7±0.8 | 14.2±0.9 |
| 디히드로에도르펜 (R) 0.5 µg/kg, i.v. | 6.4±0.4 | 14.1±0.9 | 9.6±1.2 | 15.9±1.2 | 9.2±1.2 | 13.1±1.2 | 8.4±0.6 | 13.3±1.2 | 8.0±1.1 | 10.9±1.0 |
| 모르핀 5mg/kg, i.v. | 6.4±0.4 | 15.4±1.0 | 12.0±1.5 ^{\$} | 17.5±0.5 ^{SSS} | 16.4±0.9 ^{...} | 16.8±0.7 ^{...} | 12.8±1.3 ^{..} | 16.3±1.1 [.] | 10.6±0.9 [.] | 13.8±1.1 |

랫에서 열에 의한 발바닥 자극에 대한 좌측(L) 및 우측(R) 발 회피 잠복시간에 대한 정맥내 R-DHE의 효과 (제1상)

[0528]

[0529] 데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.

[0530] 괄호에 달리 명시되지 않은 경우, 군 당 동물수 n = 10.

[0531] †비히클 = 시트레이트 완충액 (0.03:0.10:0.86:99.01 (g:g:g:mL)의 비율로, 시트르산 일수화물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:주사용수).

- [0532] 비히클 군 데이터와 비교시, ^{\$}P < 0.05 (Mann-Whitney U-검정)
- [0533] 비히클 군 데이터와 비교시, ^{\$\$\$}P < 0.001 (Mann-Whitney U-검정)
- [0534] 비히클 군 데이터와 비교시, ^{*}P < 0.05 (비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)
- [0535] 비히클 군 데이터와 비교시, ^{**}P < 0.01 (비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)
- [0536] 비히클 군 데이터와 비교시, ^{***}P < 0.001 (비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)
- [0537] 비히클 군 데이터와 비교시, [†]P < 0.05 (ANOVA 및 Dunnett t-검정)

팻에서 Von Frey 단일점유 철펜지에 대한 좌측(L) 및 우측(R) 발 회피 역치에 대한 장매단 S-MEP의 효과 (제2상) (a) 미가공 데이터

| 처리 | 투여 전 | | 투여 후 시점(분)의 회피 역치(g) | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | 5 | | 25 | | 50 | | 120 | |
| | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| 비히쿨 [†] 5 mL/kg, i.v. | 1.37 ± 0.31 | 21.03 ± 1.84 | 6.11 ± 2.39 | 23.46 ± 1.06 | 1.66 ± 0.47 | 21.67 ± 1.61 | 1.11 ± 0.15 | 20.94 ± 1.90 | 1.35 ± 0.28 | 19.55 ± 1.69 |
| 디히드로에도르펜 (S) 3 µg/kg, i.v. | 0.94 ± 0.11 | 17.27 ± 2.12 | 8.89 ± 2.98 | 21.10 ± 1.46 | 8.28 ± 2.48 | 19.15 ± 1.55 | 0.99 ± 0.12 | 21.27 ± 1.53 | 1.19 ± 0.20 | 19.84 ± 1.64 |
| 디히드로에도르펜 (S) 10 µg/kg, i.v. | 1.19 ± 0.31 | 20.94 ± 1.90 | 12.15 ± 2.99 | 23.46 ± 1.06 | 3.09 ± 1.35 | 22.57 ± 1.39 | 1.48 ± 0.42 | 23.46 ± 1.06 | 0.83 ± 0.10 | 21.51 ± 1.55 |
| 디히드로에도르펜 (S) 30 µg/kg, i.v. | 0.84 ± 0.10 | 18.78 ± 1.89 | 24.56 ± 0.33 | 24.56 ± 0.33 | 21.92 ± 1.70 | 24.56 ± 0.33 | 7.34 ± 2.47 | 23.67 ± 1.07 | 1.20 ± 0.34 | 20.83 ± 1.99 |
| 프레가발린 30 mg/kg, p.o. | 1.09 ± 0.35 | 18.63 ± 2.21 | 2.83 ± 0.62 | 20.42 ± 2.14 | 3.27 ± 0.97 | 19.39 ± 1.61 | 10.35 ± 2.51 | 21.34 ± 1.49 | 13.90 ± 3.00 | 23.26 ± 1.04 |

표 19

[0538]

[0539] 데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.

[0540] 군 당 동물수 n = 10.

[0541] 통계적 분석은 log 데이터에 대해서만 수행함.

[0542] [†] 비히쿨 = 시트레이트 완충액 (0.03:0.10:0.86:99.01 (g:g:g:mL)의 비율로, 시트르산 일수화물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:주사용수).

표 19 (계속) (b) Log 데이터

| 처리 | 투여 후 시점(분)의 회피 역치(Log ₁₀ (g)(X10000)) | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|
| | 투여 전 | | 제2상 | | | | | | | |
| | L | R | 5 | | 25 | | 50 | | 120 | |
| | | | L | R | L | R | L | R | L | R |
| 비히클 [†] 5 mL/kg, i.v. | 4.07 ± 0.07 | 5.30 ± 0.05 | 4.50 ± 0.16 [§] | 5.36 ± 0.02 | 4.11 ± 0.10 | 5.32 ± 0.04 | 4.01 ± 0.05 | 5.30 ± 0.05 | 4.08 ± 0.06 | 5.28 ± 0.04 |
| 디히드로에토르펜 (S) 3 µg/kg, i.v. | 3.95 ± 0.05 | 5.20 ± 0.06 | 4.60 ± 0.20 | 5.31 ± 0.03 | 4.69 ± 0.17 | 5.27 ± 0.04 | 3.96 ± 0.05 | 5.32 ± 0.03 | 4.02 ± 0.07 | 5.27 ± 0.05 |
| 디히드로에토르펜 (S) 10 µg/kg, i.v. | 3.99 ± 0.06 | 5.30 ± 0.05 | 4.90 ± 0.16 | 5.36 ± 0.02 | 4.26 ± 0.13 | 5.34 ± 0.03 | 4.05 ± 0.10 | 5.36 ± 0.02 | 3.69 ± 0.05 | 5.32 ± 0.03 |
| 디히드로에토르펜 (S) 30 µg/kg, i.v. | 3.90 ± 0.05 | 5.25 ± 0.05 | 5.39 ± 0.00 ^{###} | 5.39 ± 0.00 | 5.32 ± 0.04 ^{###} | 5.39 ± 0.00 | 4.60 ± 0.17 | 5.37 ± 0.02 | 3.97 ± 0.09 | 5.29 ± 0.05 |
| 프레가발린 30 mg/kg, p.o. | 3.92 ± 0.09 | 5.24 ± 0.06 | 4.31 ± 0.13 | 5.28 ± 0.06 | 4.35 ± 0.13 | 5.27 ± 0.04 | 4.87 ± 0.14 ^{***} | 5.32 ± 0.03 | 5.03 ± 0.11 ^{***} | 5.36 ± 0.02 |

데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.

군 당 동물수 n = 10.

[†] 비히클 = 시트레이트 완충액 (0.03:0.10:0.86:99.01 (g:g:g:mL)의 비율로, 시트르산 일수화물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:주사용수).

투여-전 데이터와 비교시, ^{***} P < 0.001 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

비히클 군 데이터와 비교시, ^{###} P < 0.001 (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)

투여-전 데이터와 비교시, [§] P < 0.05 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

표 20

| 처리 | 투여 전 | | 투여 후 시점(분)의 회피 잠복시간(s) | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------|----------|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| | | | 15 | | 35 | | 60 | | 130 | |
| | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| 비히클 [†] 5 mL/kg, i.v. | 6.2±0.5 | 14.8±0.6 | 10.3±0.8 ^{ss} | 13.4±0.8 | 8.1±0.5 ^s | 11.7±0.7 ^s | 9.3±0.7 ^{ss} | 12.1±0.6 ^s | 9.8±1.0 ^{ss} | 13.1±1.0 |
| 디히드로에도르펜 (S) 3 µg/kg, i.v. | 6.2±0.6 | 12.6±0.7 | 9.8±0.9 | 15.0±0.7 | 10.0±0.7 | 12.1±0.9 | 9.1±0.9 | 13.5±0.8 | 10.4±1.3 | 14.3±0.8 |
| 디히드로에도르펜 (S) 10 µg/kg, i.v. | 6.2±0.6 | 13.8±0.8 | 10.4±1.3 | 14.5±0.9 | 10.8±1.1 | 12.5±0.9 | 11.3±1.1 | 12.7±0.6 | 11.3±1.6 | 13.0±0.8 |
| 디히드로에도르펜 (S) 30 µg/kg, i.v. | 6.2±0.5 | 13.5±0.9 | 17.6±0.4 ^{##} | 17.5±0.4 ^{##} | 10.1±1.4 | 11.8±1.1 | 8.3±1.0 | 14.3±1.1 | 8.7±0.9 | 14.2±1.3 |
| 포레카발렌 30 mg/kg, p.o. | 6.2±0.5 | 13.4±0.9 | 8.3±0.7 [.] | 13.4±0.5 | 8.6±1.0 [.] | 11.9±0.8 | 8.8±1.0 [.] | 12.9±0.6 | 9.6±0.8 ^{...} | 13.4±0.9 |

벡트에서 옆에 의한 발바닥 자극에 대한 좌측(L) 및 우측(R) 발 회피 잠복시간에 미치는 정맥내 S-DHE의 효과 (제2상)

[0551]

[0552] 데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.

[0553] 군 당 동물수 n = 10.

[0554] [†]비히클 = 시트레이트 완충액 (0.03:0.10:0.86:99.01 (g:g:g:mL)의 비율로, 시트르산 일수화물:소듐 시트레이트:소듐 클로라이드:주사용수).

[0555] 비히클 군 데이터와 비교시, ^{##}P < 0.01 (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)

[0556] 투여-전 데이터와 비교시, ^{*}P < 0.05 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

- [0557]투여-전 데이터와 비교시, ^{***} P < 0.001 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)
- [0558]투여-전 데이터와 비교시, ^{\$} P < 0.05, ^{\$\$} P < 0.01 및 ^{\$\$\$} P < 0.001 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

표 21

신경병증 펩트에서 Von Frey 단일점유-웹런지에 대한 좌측(L) 및 우측(R) 발 회피 역치에 미치는 경구 프테가발린 및 장맥내 모르핀의 효과 (제3상)
(a) 마가폰 데이터

| 처리 | 투여 전 | | 투여 후 시점(분)의 회피 역치 (g) | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| | | | 제3상 | | | | | | | |
| | L | R | 60 | | 120 | | 180 | | 240 | |
| 비히클 [†] 10 mL/kg, p.o. | 1.87 ± 0.38 | 22.53 ± 1.97 | 4.95 ± 0.95 | 20.30 ± 1.99 | 5.00 ± 2.34 | 18.36 ± 2.34 | 2.57 ± 0.92 | 16.57 ± 1.75 | 1.48 ± 0.30 | 20.54 ± 1.93 |
| 프테가발린 30 mg/kg, p.o. | 2.59 ± 0.63 | 23.25 ± 1.41 | 10.53 ± 3.25 | 23.26 ± 1.04 | 17.06 ± 2.88 | 23.02 ± 1.01 | 13.86 ± 3.21 | 22.74 ± 0.97 | 8.02 ± 2.65 | 23.99 ± 0.38 |
| 프테가발린 50 mg/kg, p.o. | 2.02 ± 0.35 | 20.61 ± 2.00 | 18.48 ± 3.27 | 22.67 ± 1.39 | 13.69 ± 3.68 | 21.67 ± 1.61 | 15.20 ± 3.31 | 24.20 ± 0.39 | 12.05 ± 3.41 | 22.74 ± 0.57 |
| 프테가발린 100 mg/kg, p.o. | 1.31 ± 0.18 | 21.67 ± 1.93 | 15.53 ± 2.78 | 22.24 ± 1.82 | 23.29 ± 1.19 | 24.28 ± 0.37 | 19.77 ± 2.70 | 23.70 ± 1.04 | 15.91 ± 2.86 | 23.18 ± 1.00 |
| 모르핀 5 mg/kg, i.v. | 1.46 ± 0.37 (9) | 21.26 ± 2.11 (9) | 21.32 ± 2.56 (9) | 24.02 ± 0.34 (9) | 11.08 ± 2.85 (9) | 20.04 ± 1.81 (9) | 3.68 ± 0.97 (9) | 19.57 ± 1.75 (9) | 1.29 ± 0.20 (9) | 18.71 ± 1.81 (9) |

- [0559]
- [0560]데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.
- [0561]괄호에 달리 명시되지 않은 경우, 군 당 동물수 n = 10.
- [0562]통계적 분석은 log 데이터에 대해서만 수행함.

[0563] [†]비히클 = 1 % 카르복시메틸셀룰로오스

| 처리 | 투여 후 시점(분)의 회피 역치 (Log10 (원(g)X10000)) | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--|-----------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|
| | 투여 전 | | 제3차 | | | | | | | |
| | | | 60 | | 120 | | 180 | | 240 | |
| | L | R | L | R | L | R | L | R | L | R |
| 비히클 [†] 10 mL/kg, p.o. | 4.20 ± 0.08 | 5.33 ± 0.05 | 4.57 ± 0.13 ^{ss} | 5.28 ± 0.05 | 4.43 ± 0.15 | 5.22 ± 0.07 | 4.23 ± 0.12 | 5.20 ± 0.05 | 4.11 ± 0.07 | 5.29 ± 0.05 |
| 프레가발린 30 mg/kg, p.o. | 4.29 ± 0.11 | 5.35 ± 0.03 | 4.70 ± 0.20 | 5.36 ± 0.02 | 5.13 ± 0.11 ^{##} | 5.36 ± 0.02 | 4.95 ± 0.16 ^{..} | 5.35 ± 0.02 | 4.68 ± 0.16 | 5.38 ± 0.01 |
| 프레가발린 50 mg/kg, p.o. | 4.25 ± 0.07 | 5.29 ± 0.05 | 5.10 ± 0.16 | 5.34 ± 0.03 | 4.65 ± 0.19 | 5.32 ± 0.04 | 5.00 ± 0.15 ^{..} | 5.38 ± 0.01 [#] | 4.83 ± 0.18 [#] | 5.35 ± 0.02 |
| 프레가발린 100 mg/kg, p.o. | 4.07 ± 0.06 | 5.31 ± 0.05 | 5.06 ± 0.12 | 5.33 ± 0.05 | 5.36 ± 0.03 ⁺ | 5.38 ± 0.01 | 5.23 ± 0.09 ^{..} | 5.37 ± 0.02 ^{##} | 5.11 ± 0.10 ^{##} | 5.36 ± 0.02 |
| 포도phen 5 mg/kg, i.v. | 4.08 ± 0.09 (9) | 5.30 ± 0.05 (9) | 5.22 ± 0.15 ^{***} (9) | 5.38 ± 0.01 (9) | 4.89 ± 0.14 ⁺⁺ (9) | 5.29 ± 0.04 (9) | 4.45 ± 0.11 ⁺ (9) | 5.28 ± 0.04 (9) | 4.07 ± 0.07 (9) | 5.26 ± 0.04 (9) |

표 21 (계속) (b) Log 데이터

[0564]

[0565] 데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.

[0566] 군 당 동물수 n = 10.

[0567] [†]비히클 = 1 % 카르복시메틸셀룰로오스

[0568] 투여-전 데이터와 비교시, [†]P < 0.05, ⁺⁺P < 0.01 및 ⁺⁺⁺P < 0.001 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

[0569] 비히클 군 데이터와 비교시, [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01 및 ^{###}P < 0.001 (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)

[0570] 비히클 군 데이터와 비교시, ^{**}P < 0.01 (ANOVA 및 Dunnett 검정)

[0571] 투여-전 데이터와 비교시, ^{\$\$}P < 0.01 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

표 22

| 치리 | 투여 전 | | 투여 후 시점(분)의 회피 잠복시간(s) | | | | | | | |
|--------------------------|---------|-------------|----------------------------|-------------|------------|-------------|--------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| | | | 제3상 | | | | 제3상 | | | |
| | L | R | 70 | | 130 | | 190 | | 250 | |
| 비히클 [†] | | | L | R | L | R | L | R | L | R |
| 10 mL/kg, p.o. | 6.5±0.5 | 12.4±0.8 | 9.2±1.0 | 12.2±0.5 | 9.0±1.0 | 10.7±0.7 | 9.3±1.2 | 12.2±1.0 | 9.5±0.8 ^{\$\$} | 11.4±0.6 |
| 프레가발린 30 mg/kg, p.o. | 6.5±0.5 | 13.1±0.6 | 9.9±0.8 | 13.4±1.0 | 9.3±0.8 | 13.7±0.9 | 8.3±1.1 | 12.2±0.4 | 10.9±0.8 | 14.0±0.8 |
| 프레가발린 50 mg/kg, p.o. | 6.5±0.6 | 11.4±0.8 | 10.6±0.6 | 12.9±0.9 | 9.7±1.1 | 13.6±1.1 | 11.2±1.1 | 12.7±0.5 | 9.0±0.7 | 11.9±0.7 |
| 프레가발린 100 mg/kg, p.o. | 6.6±0.7 | 11.6±0.5 | 11.5±0.8 | 12.6±0.9 | 9.9±0.9 | 13.4±1.3 | 7.6±0.5 | 13.7±0.7 | 9.7±0.8 | 13.7±1.1 |
| 모르핀 | 6.0±0.5 | 11.3±0.6(9) | 11.8±1.2 ⁺⁺ (9) | 14.0±1.2(9) | 7.3±0.9(9) | 13.1±1.0(9) | 8.0±0.8 ⁺ (9) | 14.3±1.0(9) | 10.6±1.4 ⁺ (9) | 14.1±0.9(9) |

신경병증 랩트에서 얻은 발파각 자극에 대한 좌측(L) 및 우측(R) 발 회피 잠복시간에 미치는 경구 프레가발린 및 정맥내 모르핀의 효과 (제3상).

[0572]

[0573] 데이터를 평균 ± SEM으로 표시함.

[0574] 괄호에 달리 명시되지 않는 경우, 군 당 동물수 n = 10.

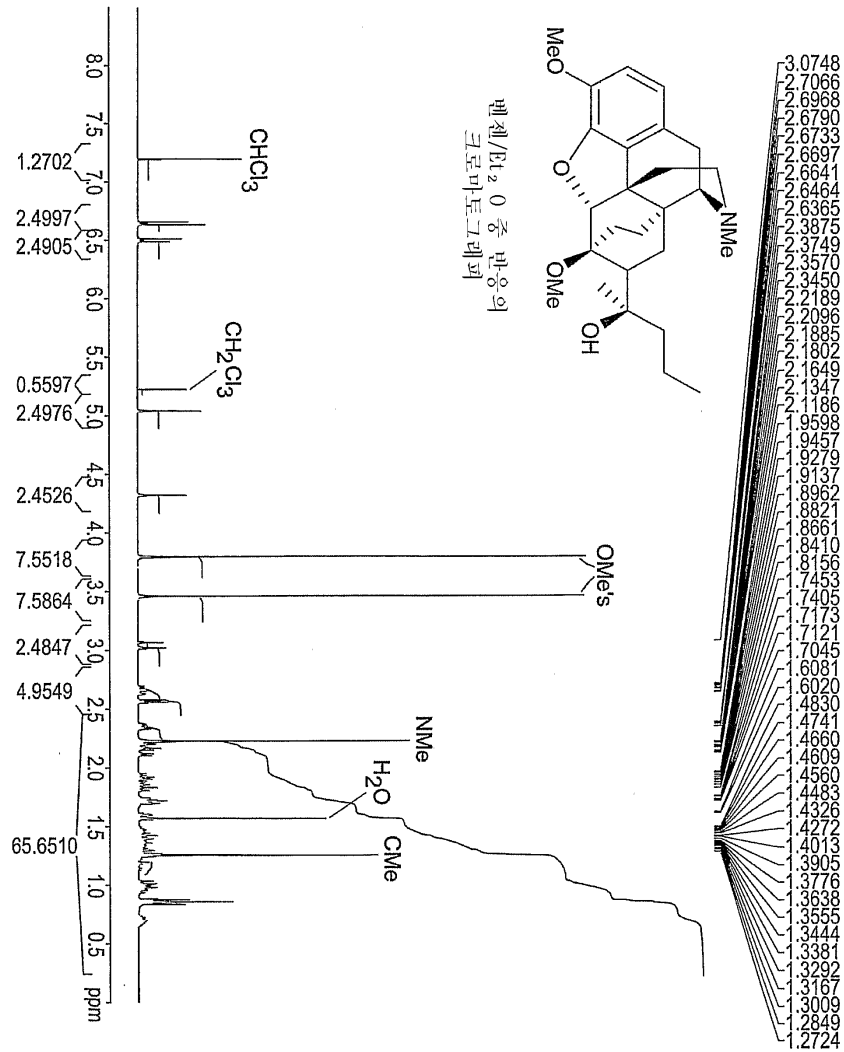
[0575] [†] 비히클 = 1 % 카르복시메틸셀룰로오스

[0576] 투여-전 데이터와 비교시, $^*P < 0.05$ 및 $^{**}P < 0.01$ (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

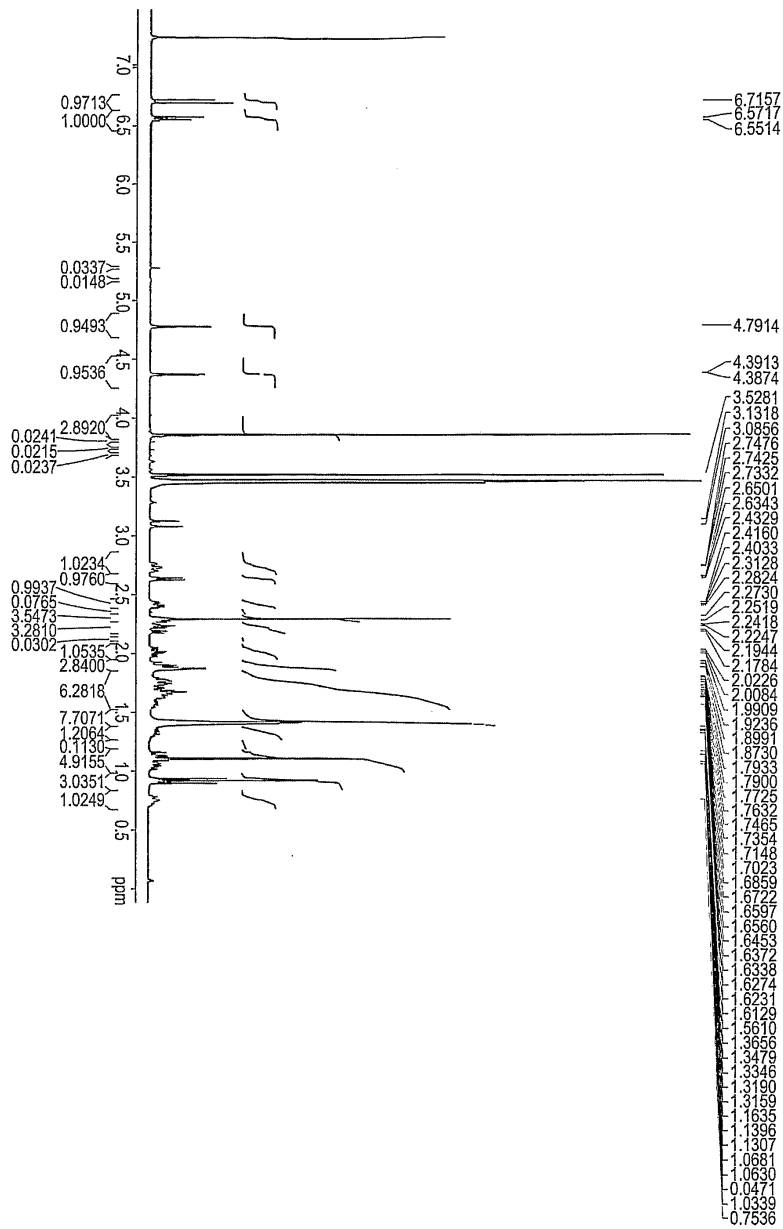
[0577] 투여-전 데이터와 비교시, $^{***}P < 0.01$ (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

도면

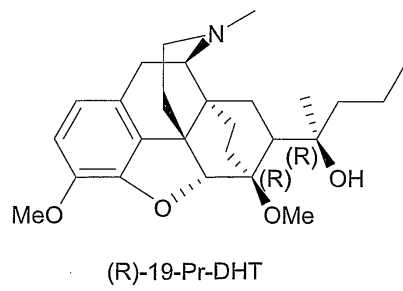
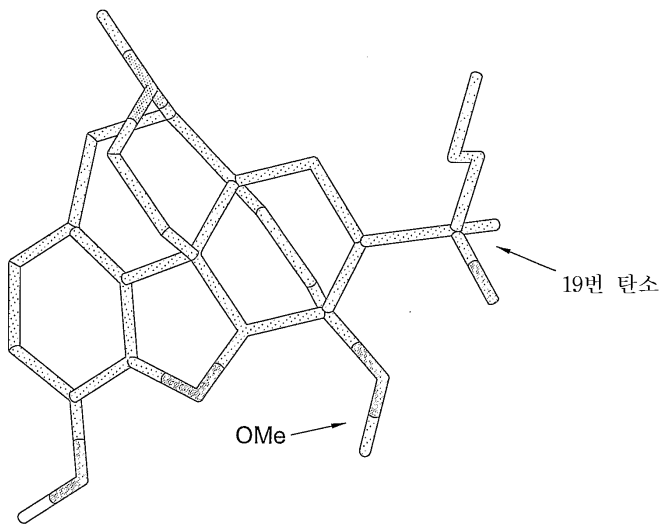
도면1a



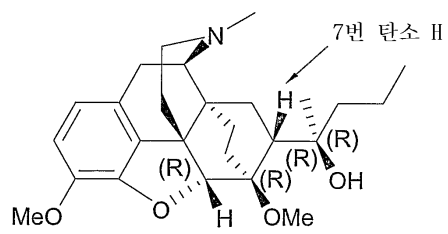
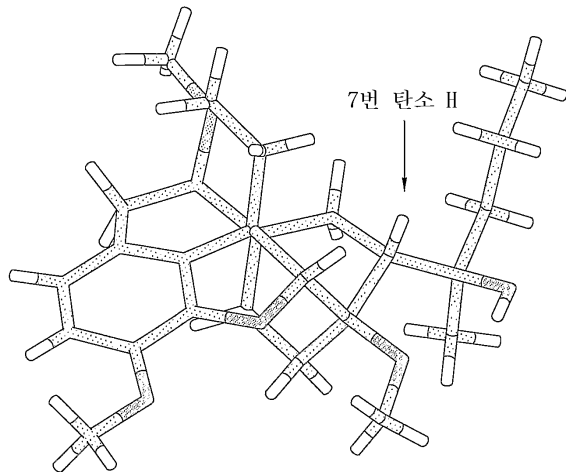
도면1b



도면2

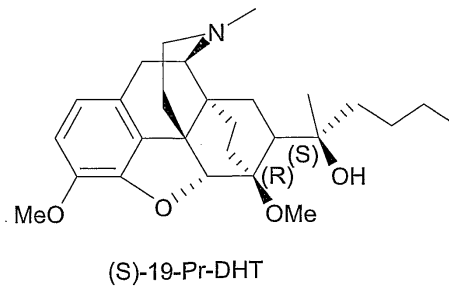
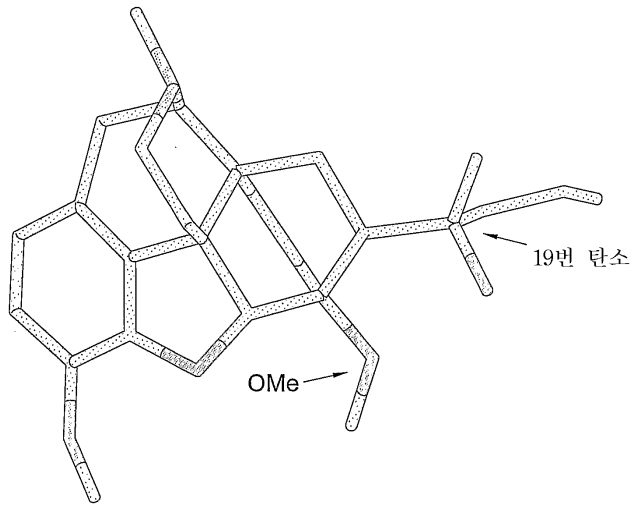


도면3

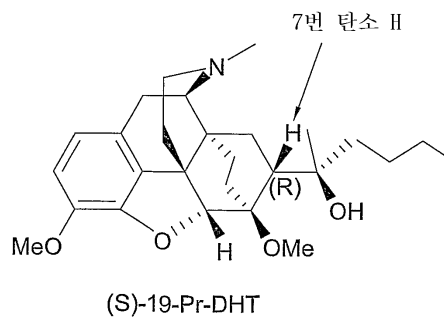
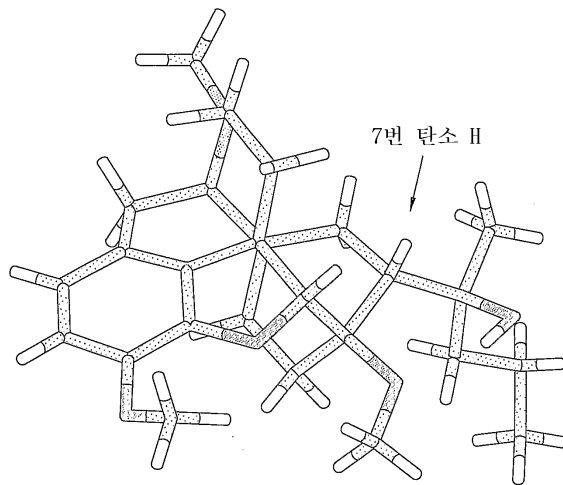


(R)-19-Pr-DHT

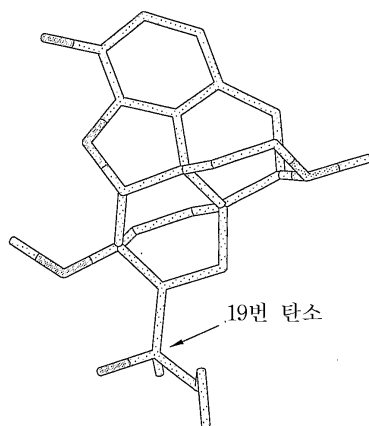
도면4



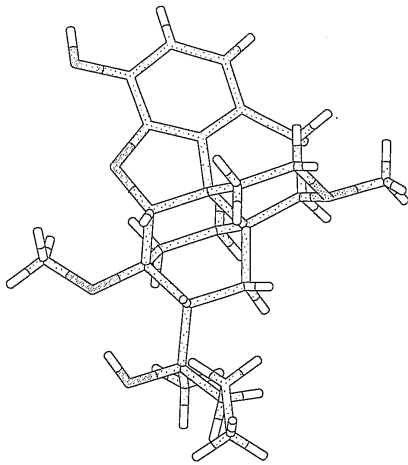
도면5



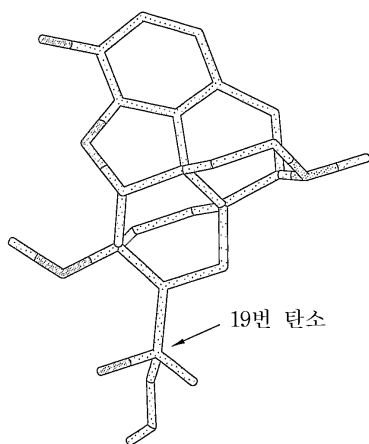
도면6



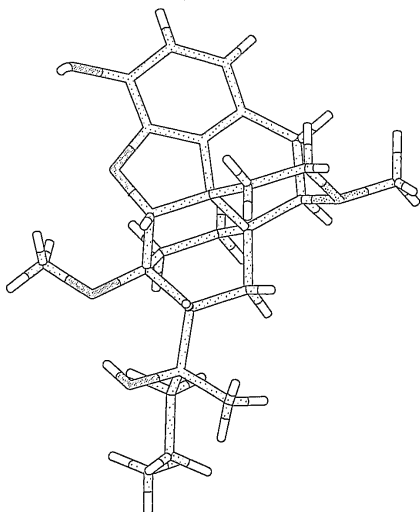
도면7



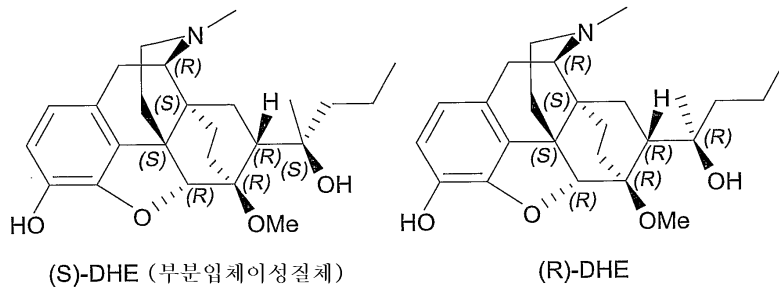
도면8



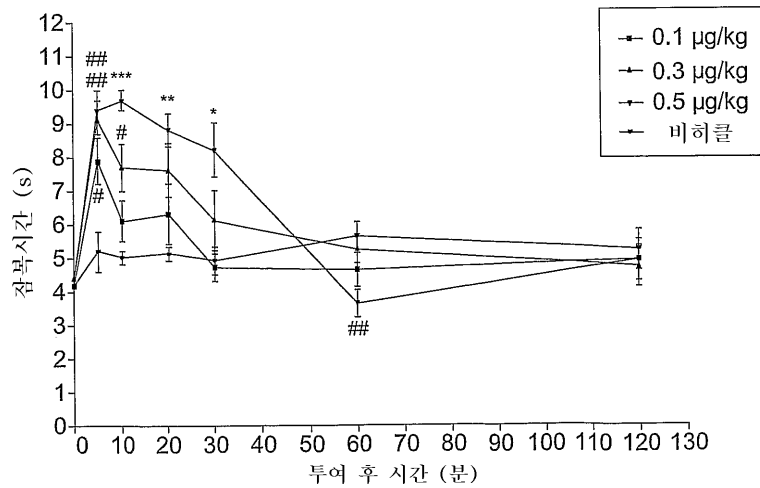
도면9



도면10

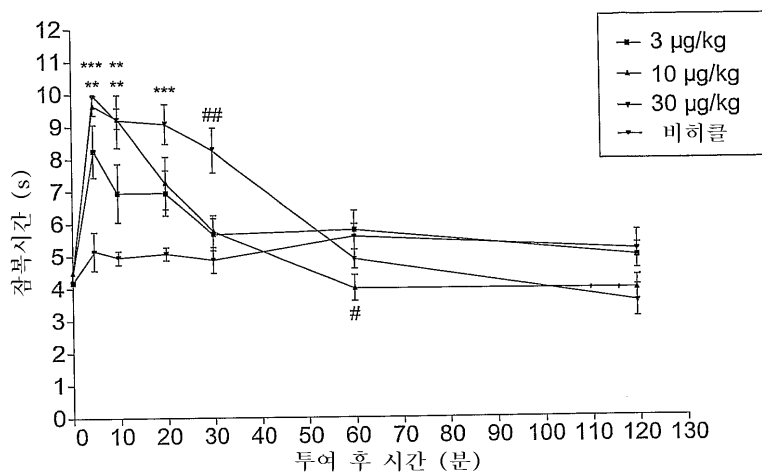


도면11



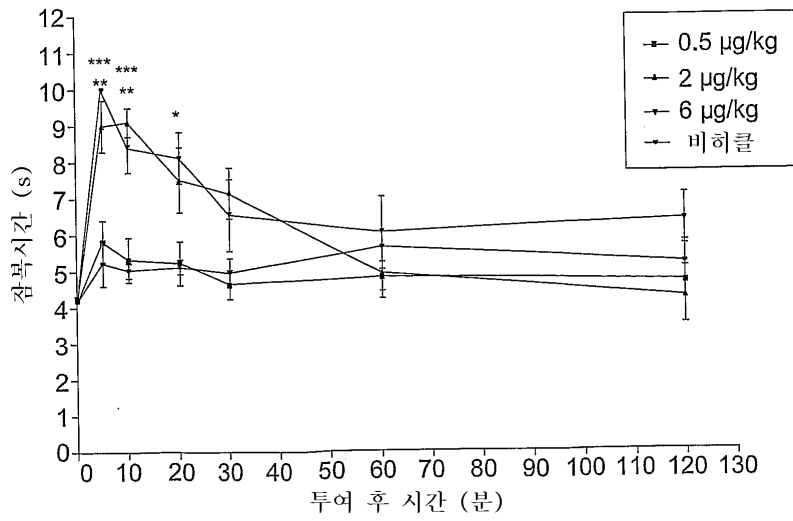
비히클과 비교한 경우 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (ANOVA 및 Dunnett t-검정)
비히클과 비교한 경우 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$ (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)

도면12



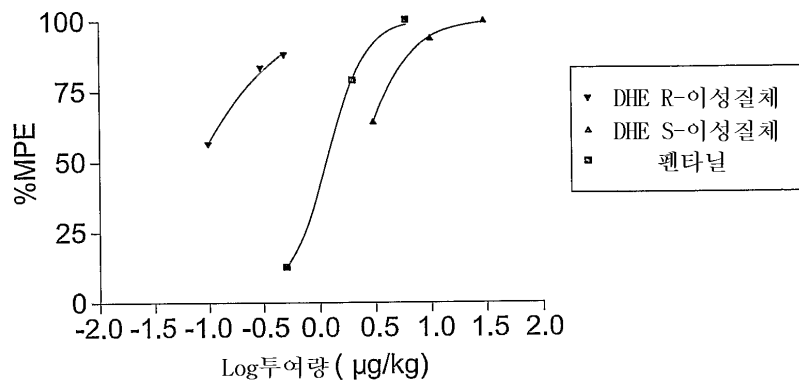
비히클과 비교한 경우 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (ANOVA 및 Dunnett t-검정)
비히클과 비교한 경우 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$ (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)

도면13



비히클과 비교시 *P<0.05 및 **P<0.01 및 ***P<0.001 (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)

도면14

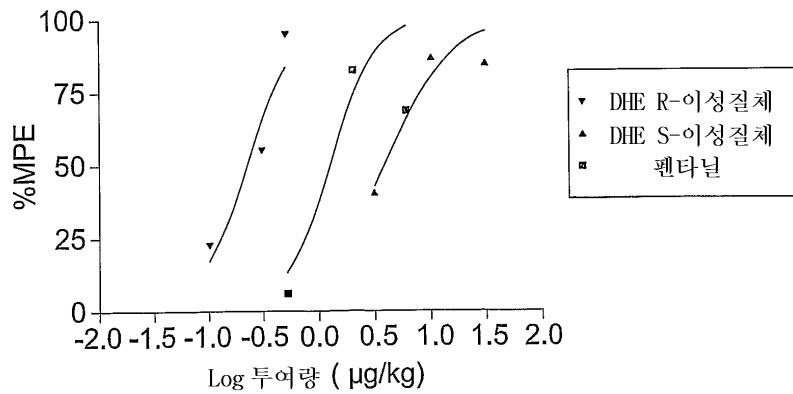


DHE R-이성질체 ED50=0.07914 µg/kg

DHE S-이성질체 ED50=2.165 µg/kg

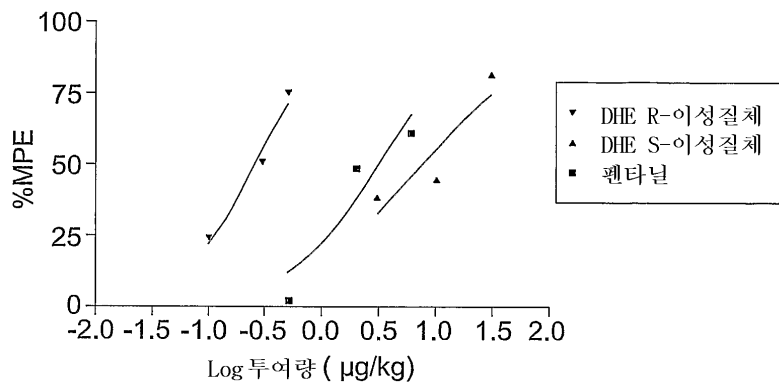
펜타닐 ED50=1.135 µg/kg

도면15



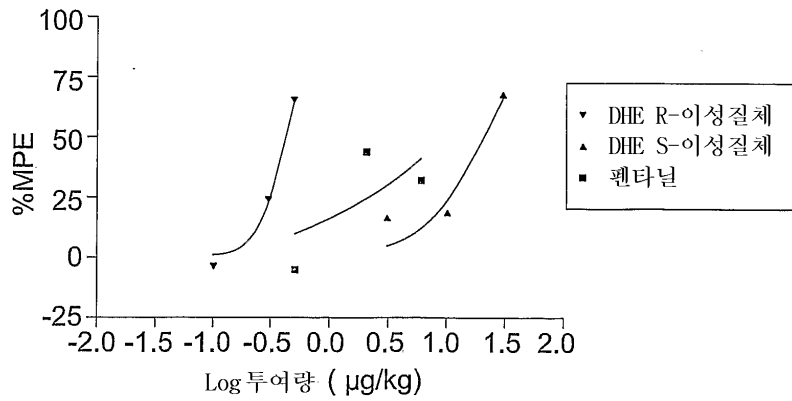
DHE R-이성질체 ED50=0.2253 μg/kg
DHE S-이성질체 ED50=3.795 μg/kg
펜타닐 ED50=1.239 μg/kg

도면16

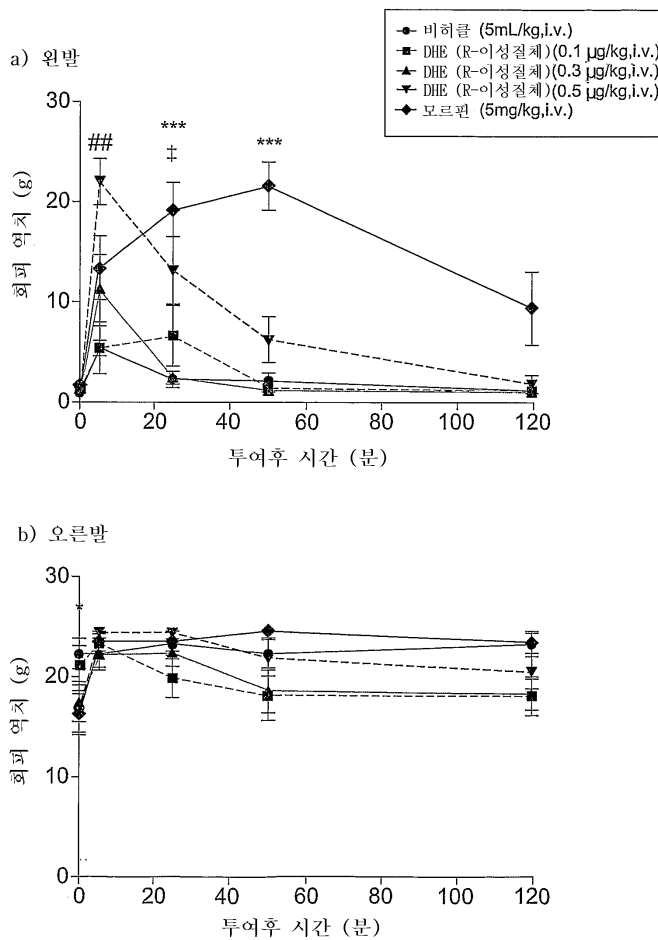


DHE R-이성질체 ED50=0.2532 μg/kg
DHE S-이성질체 ED50=7.516 μg/kg
펜타닐 ED50=3.111 μg/kg

도면17

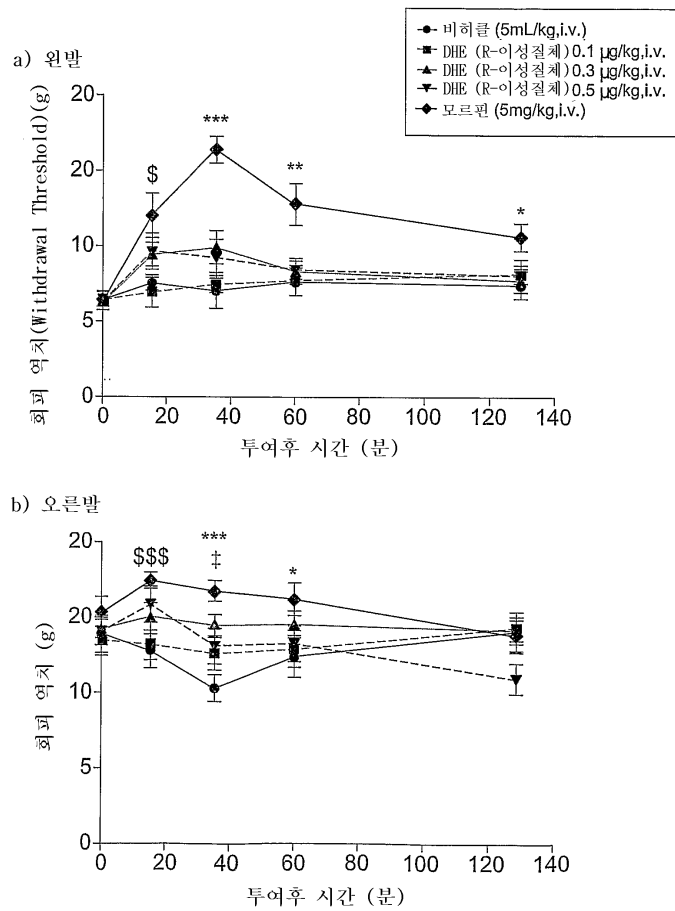


도면18



비히클 군 데이터와 비교시 ## $P < 0.01$ (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)
비히클 군 데이터와 비교시 ‡ $P < 0.05$ (ANOVA 및 Dunnett t-검정)
비히클 군 데이터와 비교시 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (비쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

도면19



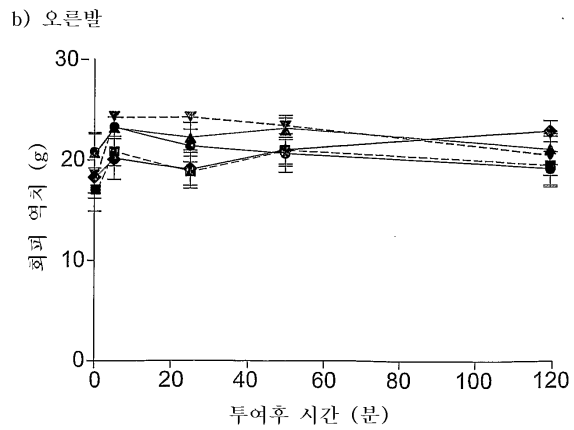
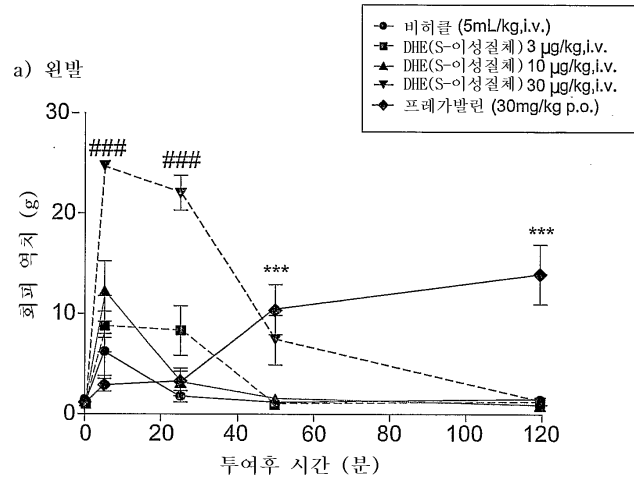
비히클 군 데이터와 비교시 (Mann-Whitney U-검정)

비히클 군 데이터와 비교시 (비쌍체 2-꼬리 스튜던트 t-검정) \$P < 0.05, \$\$\$ P < 0.001

비히클 군 데이터와 비교시 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (비쌍체 2-꼬리 스튜던트 t-검정)

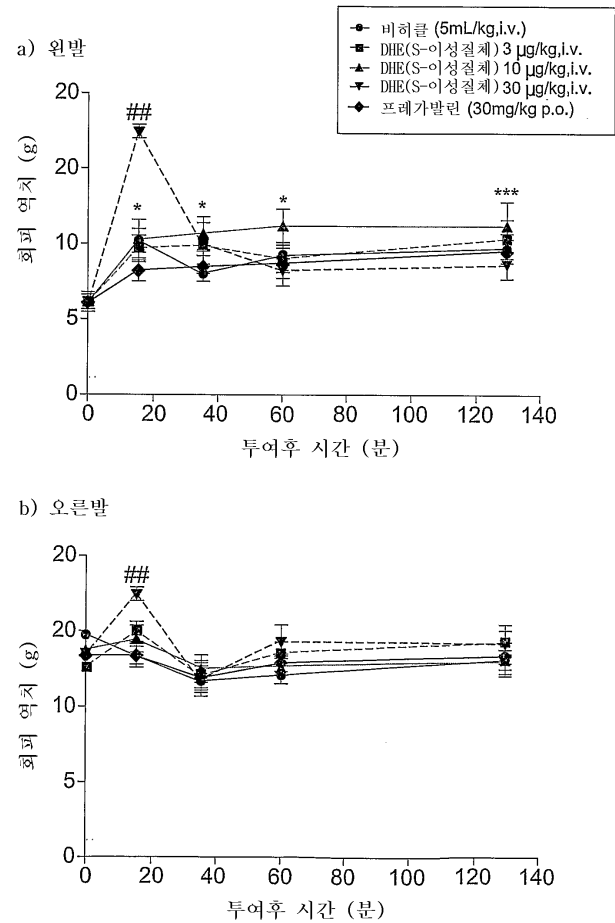
비히클 군 데이터와 비교시 ‡P < 0.05 (ANOVA 및 Dunnett t-검정)

도면20



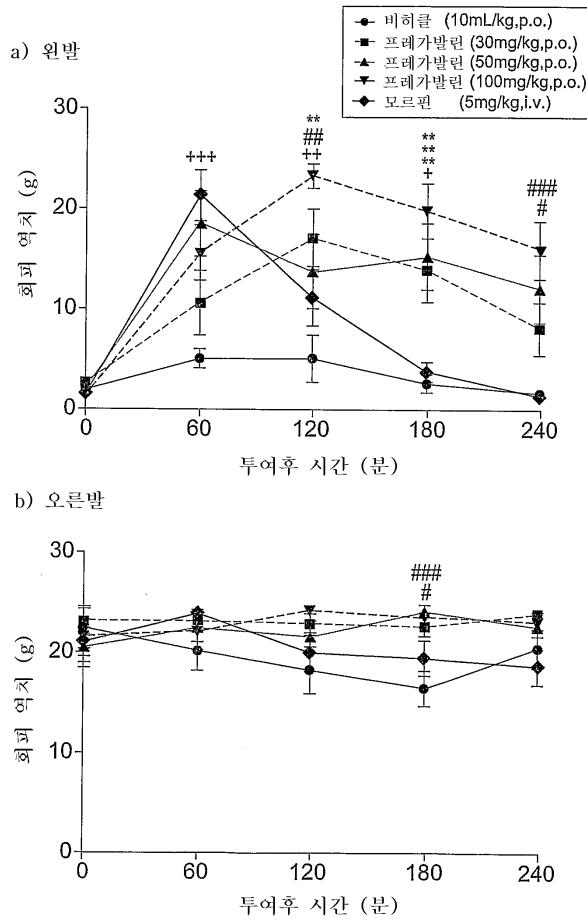
투여전 데이터와 비교시 *** $P < 0.001$ (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)
비히클 군 데이터와 비교시 ### $P < 0.001$ (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)

도면21



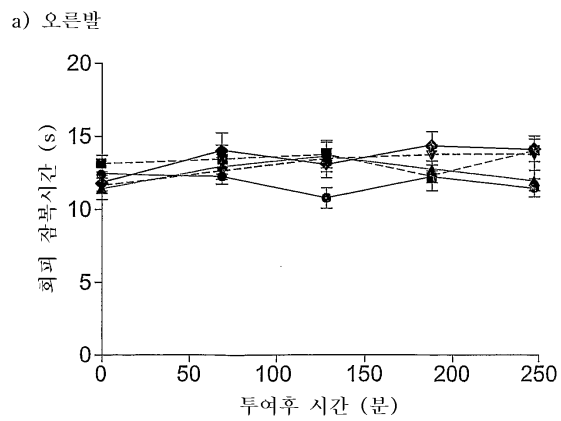
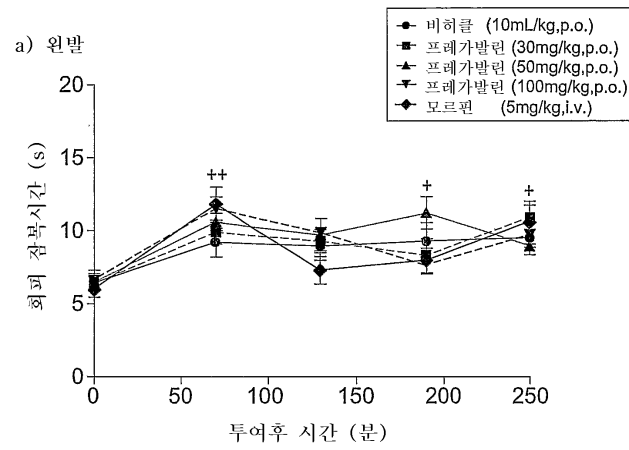
비히클 군 데이터와 비교시 ## $P < 0.01$ (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)
투여전 데이터와 비교시 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)

도면22



투여전 데이터와 비교시 $+P < 0.05$, $++P < 0.01$ 및 $+++P < 0.001$ (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)
 비허클 군 데이터와 비교시 $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$ 및 $\###P < 0.001$
 (Kruskal-Wallis 및 Dunn 검정)
 비허클 군 데이터와 비교시 $**P < 0.01$ (ANOVA 및 Dunnett 검정)

도면23



투여전 데이터와 비교시 +P < 0.05, ++ P < 0.01 (쌍체 2-꼬리 Student t-검정)