



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0100661
(43) 공개일자 2015년09월02일

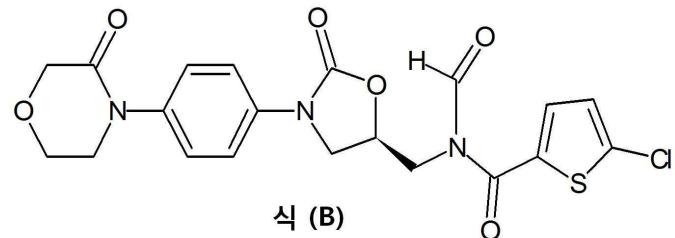
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 413/14 (2006.01) *C07D 263/20* (2006.01)
- (52) CPC특허분류(Coo. Cl.)
C07D 413/14 (2013.01)
A61K 31/5377 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7015903
- (22) 출원일자(국제) 2013년12월24일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년06월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/IN2013/000801
- (87) 국제공개번호 WO 2014/102822
국제공개일자 2014년07월03일
- (30) 우선권주장
3359/MUM/2012 2012년12월26일 인도(IN)
- (71) 출원인
완버리 엘티디.
인도 마하라슈트라 나비 룸바이 400703 오피피.
바시 레일웨이 스테이션 바시 섹터 30에이 비에스
이엘 테크 파크 비 왕 10층
- (72) 발명자
니턴 샤라드찬드라 프라드한
인도 마하라슈트라 나비 룸바이 400703 오피피.
바시 레일웨이 스테이션 바시 섹터 30에이 비에스
이엘 테크 파크 비 왕 10층
- 닐레쉬 수디르 파틸
인도 마하라슈트라 나비 룸바이 400703 오피피.
바시 레일웨이 스테이션 바시 섹터 30에이 비에스
이엘 테크 파크 비 왕 10층
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
리앤톡특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 치환된 옥사졸리디논의 알데히드 유도체

(57) 요 약

본 발명은, 그 자체로 리바록사반인, 5-클로로-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-oxo-모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일}메틸)티오펜-2-카르복사미드의 전구 약물; 이의 제조를 위한 방법, 및 질병, 특히 혈전 색전성 질환의 치료 및/또는 예방에 적용에 관한 것이다. 상기 화합물 식 (B)의 전구 약물은 5-클로로-N-포르밀-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일}메틸)티오펜-2-카르복사미드로서 화학적으로 명명된다.



(52) CPC특허분류(Coo. Cl.)

C07D 263/20 (2013.01)

(72) 발명자

라제쉬 람찬드라 왈라발카르

인도 마하라슈트라 나비 룸바이 400703 오피피. 바
시 레일웨이 스테이션 바시 섹터 30에이 비에스이
엘 테크 파크 비 왕 10층

닐레쉬 수바스 쿨카르니

인도 마하라슈트라 나비 룸바이 400703 오피피. 바
시 레일웨이 스테이션 바시 섹터 30에이 비에스이
엘 테크 파크 비 왕 10층

산답 바반라오 파와르

인도 마하라슈트라 나비 룸바이 400703 오피피. 바
시 레일웨이 스테이션 바시 섹터 30에이 비에스이
엘 테크 파크 비 왕 10층

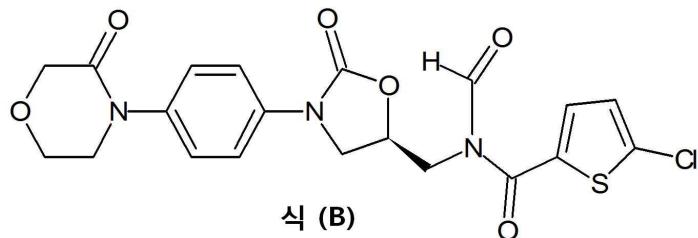
타락 삼브하지 파와르

인도 마하라슈트라 나비 룸바이 400703 오피피. 바
시 레일웨이 스테이션 바시 섹터 30에이 비에스이
엘 테크 파크 비 왕 10층

특허청구의 범위

청구항 1

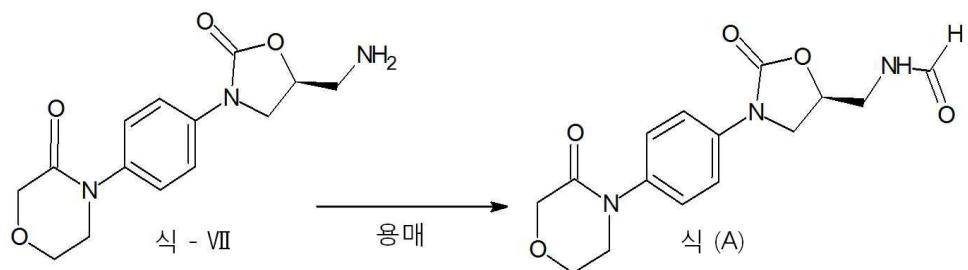
식 (B)의 화합물;



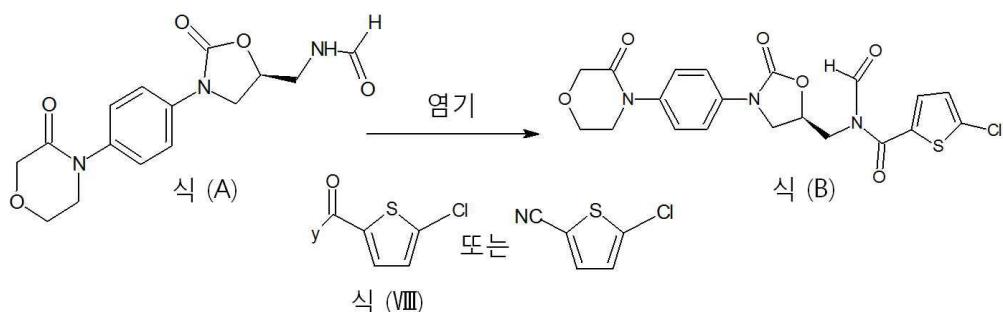
청구항 2

청구항 1의 화합물 식 (B)의 제조를 위한 방법으로서, 하기와 포함하는 방법:

a) 적절한 용매 내에서 식 (VII)의 화합물을, 유기산으로 처리하여 신규한 중간체 식 (A)인, $N\{((5S)-2-\text{옥소}-3-[4-(3-\text{옥소}-\text{모르폴린}-4-\text{일})\text{페닐}]-1,3-\text{옥시}-\text{솔리碇}-5-\text{일})\text{메틸}\}\text{포름아미드}$ 를 얻는 단계;



b) 메틸렌 디클로리드, 아세톤, 톨루엔 및 에테르 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 적절한 용매 내에서, 염기의 존재하에 화합물 식 (A)를, 화합물 식 (VIII) 또는 5-클로로티오펜-2-카르보니트릴로 처리하여 화합물 식 (B)를 얻는 단계로서.



상기;

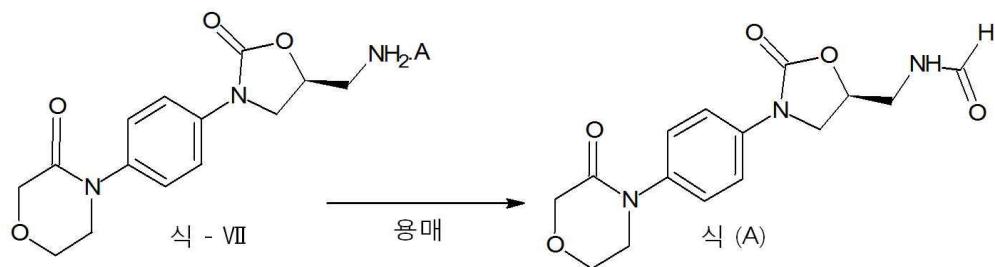
Y는 술포닐옥시, 이미다졸, 트리아졸, 테트라졸, 알콕시, 치환된 알콕시, 트리-할로메톡시, N-히드록시숙신아미드, 히드록시, 에스테르, 1차 아민, 2차 아민, p-니트로페놀, N-히드록시탈아미드, N-히드록시벤조트리아졸, 클로린, 플루오린, 브로민 및 이오딘인 단계인 것인 방법.

청구항 3

청구항 1의 화합물 식 (B)의 제조를 위한 방법으로서, 하기를 포함하는 방법:

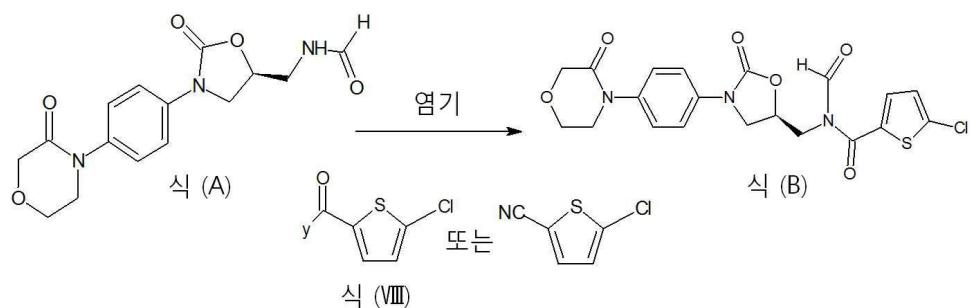
a) 적절한 용매 내에서 식 (VII)의 화합물의 산 부가 염에 염기를 처리하여 화합물 식 (VII)의 염기를 얻고, 적절한 것 내에서 유기산을 더 처리하여 신규한 중간체 식(A)인, $N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페$

닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일}메틸)포름아미드를 얻는 단계;



A는 산 부가 염이고;

b) 메틸렌 디클로리드, 아세톤, 툴루엔 및 에테르 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 적절한 용매 내에서, 염기의 존재하에 화합물 식 (A)를 화합물 식 (VIII) 또는 5-클로로티오펜-2-카르보니트릴로 처리하여 화합물 식 (B)를 얻는 단계로서,



상기;

Y는 술포닐옥시, 이미다졸, 트리아졸, 테트라졸, 알콕시, 치환된 알콕시, 트리-할로메톡시, N-히드록시숙신아미드, 히드록시, 에스테르, 1차 아민, 2차 아민, p-니트로페놀, N-히드록시탈아미드, N-히드록시벤조트리아졸, 클로린, 플루오린, 브로민 및 이오딘인 것인 단계인 방법.

청구항 4

청구항 2 및 3의 식 B의 화합물로서, 상기 유기산은 포름산, 옥살산, 숙신산으로 구성된 군으로부터의 하나 이상의 카르복시산인 것인 화합물.

청구항 5

청구항 2, 3 및 4의 식 B의 화합물로서, 세척, 침전, 여과, 건조 및/또는 증류의 방법 중 하나 이상의 조합에 의해 정제된 것인 화합물.

청구항 6

적절한 약학적으로 허용가능한 부형제와 조합된 청구항 1 또는 5의 화합물 식 (B)를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1 내지 5 중 어느 하나에 청구된 화합물 식 (B)로서, 인간 및 동물의 혈전 색전성 질환의 치료 또는 예방을 위한 약제에 포함된 것인 화합물.

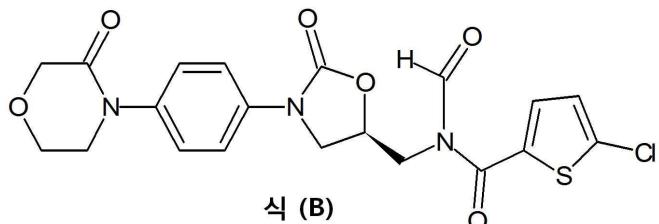
청구항 8

청구항 1 내지 5 중 어느 하나에 청구된 화합물 식 (B)로서, 상기 화합물 식 (B)는 항-응고제로서 사용되는 것인 화합물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 치환된 옥사졸리디논의 알데히드 유도체 및 보다 구체적으로는 5-클로로-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드(5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide)의 전구 약물(prodrug), 및 전구 약물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 식 (B)의 전구 약물은; 5-클로로-N-포르밀-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드(5-chloro-N-formyl-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide), 또는 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물 형태 또는 수화물 형태로 화학적으로 명명(designed)되었다. 더욱이 이 발명은 질병, 폐색전증 및 심부 정맥 혈전증의 예방의 치료에 대한 전구 약물의 사용에 관한 것이고, 보다 구체적으로는 혈전 색전성 장애에 관한 것이다.



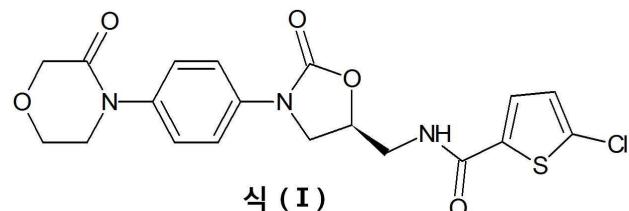
[0002]

배경기술

[0003] 매우 많은 수의 약제가, 예를 들면, 물리 화학적 프로필, 특히 용해성, 능동적 또는 수동적 흡수 특성 또는 조직-특이적 분포의 향상에 의한, 기본적인 활성 성분과 비교하여 향상된 생체 이용율(bioavailability)을 나타내는 전구 약물로서 투여된다. 효과의 최적의 프로필을 달성하기 위해, 각각의 활성 성분, 적응증(indication), 작용 위치(site of action) 및 투여 경로를 매우 정확하게 따르는 것이 유리(liberation)의 바람직한 메커니즘뿐만 아니라 전구 약물 잔기(residue)의 명명에 필요하다. 전구 약물의 중요성은, 주요 성분(moiety)이 용해도, 안정성 및 경구 생체 이용율에 대한 우려를 제기할 때 더욱 커진다.

[0004] 리바록사반(rivaroxaban)은 경구적으로 활성인 직접적인 인자 Xa (FXa) 저해 약물이고, 다양한 혈전 색전성(thromboembolic) 질병, 특히 폐색전증, 심부 정맥 혈전증, 심근 경색, 협심증, 혈관 성형술 또는 대동맥-관상동맥 우회 수술(aortocoronary bypass) 후의 재 폐색 및 협착, 뇌졸증, 일시적 혀혈성 발작, 및 말초 동맥 폐색질환의 예방 및 치료에 사용된다.

[0005] 리바록사반, 즉 5-클로로-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드는 366789-02-8의 CAS 번호, C₁₉H₁₈C1N₃O₅S의 문자식, 및 하기의 구조를 갖는다:

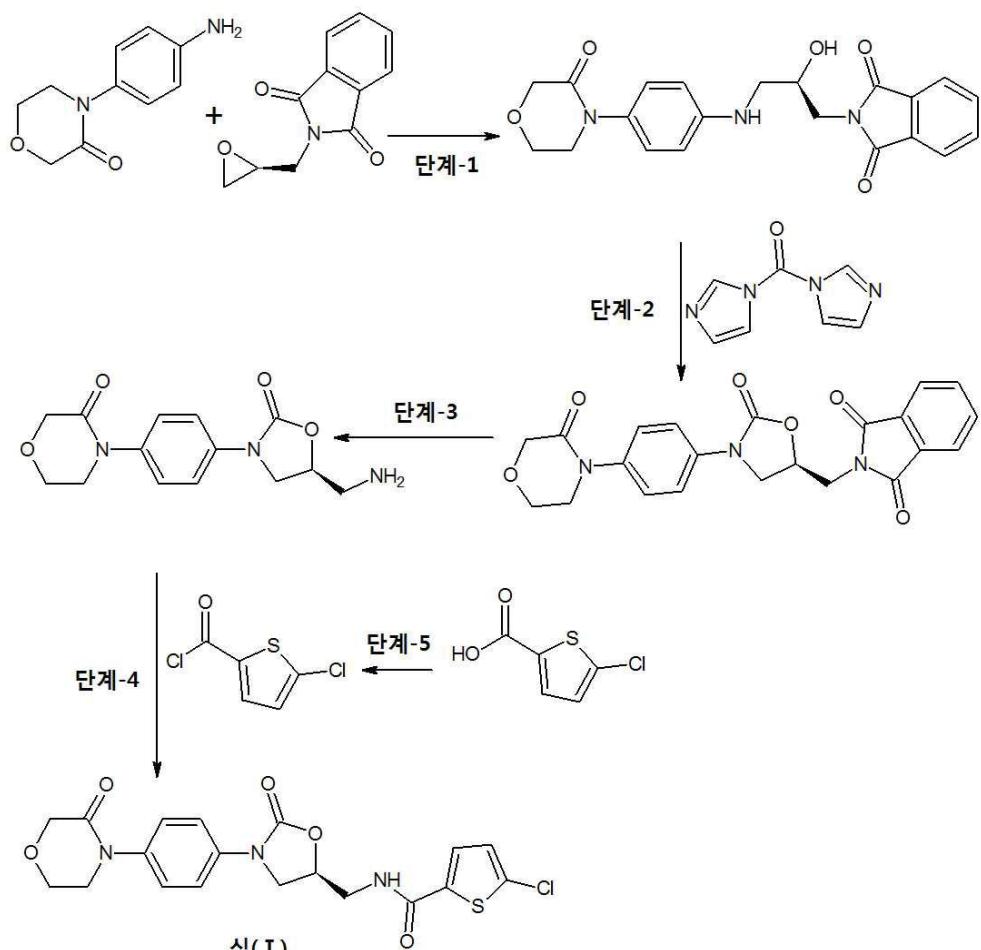


[0006]

[0007] 비록 다양한 혈전 색전성 질병의 예방 및 치료에 효과적이지만, 리바록사반은 종종 용량(dosage) 및 상대적인 생체 이용율의 문제를 일으킨다.

[0008] WO 01/47919, 출원은 리바록사반을 다양한 혈전 색전성 질병의 예방 및 치료에 대한 적용과 함께 개시했다. 더욱이 이 특허는, 용매의 존재하에서, 4-(4-아미노페닐)모르폴린-3-온을 2-[(2S)-옥시란-2-일메틸]-1H-이소인돌-1,3(2H)-디온과 반응시켜, 2-[(2R)-2-히드록시-3-{4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐}아미노]프로필]-1H-이소인돌-1,3(2H)-디온을 얻고, 이후 포스겐 균등물(phosgene equivalent)에 의해 2-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)-1H-이소인돌-1,3(2H)-디온으로 더 변환되는 것인 식 (I)의 리바록사

반을 제조하는 방법을 설명한다. 프탈아미드(phthalimide)기로 시작하여 4-{4-[$(5S)$ -5-(아미노메틸)-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]페닐}모르폴린-3-온을 얻고, 이는 최종적으로 5-클로로로티오펜-2-카르보닐 클로리드와 결합되어 5-클로로- N -($(5S)$ -2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드, 즉 반응식-1에서 보여지는 식 (I)의 리비록사반이 생성된다.



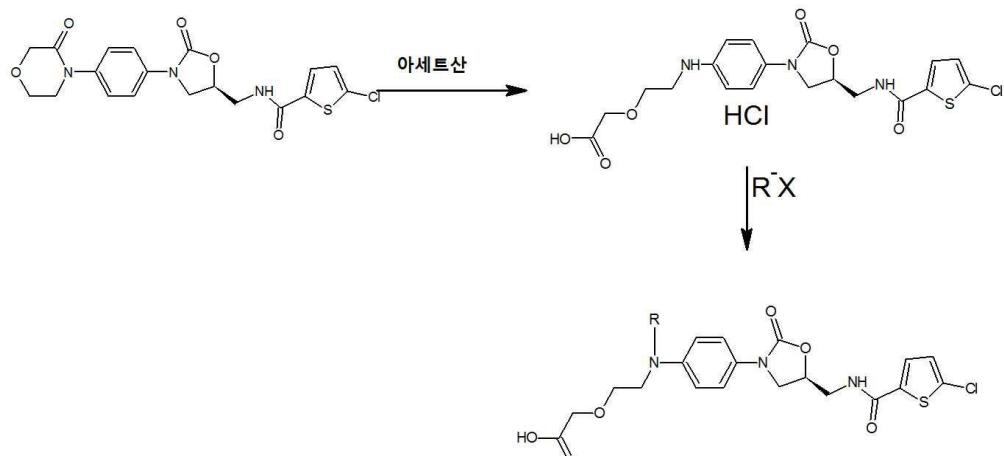
[0009]

반응식- I

[0011] 상기 개시된 방법은, 긴 반응 시간, 반응물 및 시약의 과량의 물비, 메탄올 및 메틸렌 디클로리드와 같은 안전하지 않은 용매의 사용을 포함한다. 더욱이 표제의 화합물은 상업적 규모로는 가능하지 않은 칼럼 크로마토그래피에 의해 분리된다.

[0012]

US 7,932,278 B2는, 하기의 합성 반응식에 의한 화합물 리바록사반의 제조를 개시한다:



[0013]

[0014]

본 발명에 따른 화합물은 인간 및 동물의 질병의 치료 및/또는 예방적 활동(prophylaxis)을 위한 약제로서 사용하기에 적합하다.

[0015]

WO 2009/023233은 치환된 옥사졸리디논 유도체인 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개시한다. 보다 구체적으로, 이 발명은 리바록사반의 유도체인 신규한 옥사졸리디논 화합물에 관한 것이다. 상기 발명은 또한 하나 이상의 상기 발명의 화합물 및 담체를 포함하는 무발열성(pyrogen-free) 조성물, 및 상기 개시된 화합물 및 조성물의, 리바록사반과 같은 인자 Xa의 선택적 저해제의 투여에 의해 유익하게 치료될 수 있는 질병 및 상태를 치료하는 방법에서의 사용을 제공한다.

[0016]

본 발명은 리바록사반의 전구 약물에 관한 것이다. 우리의 현 발명에 따른 화합물은 혈전 색전성 장애의 치료제와 같은 치료학적 적용에서 이점이 있는, 유리한 물리 화학적 특성과 함께, 특히 항응고제로서 작용하는 혈액응고 인자 Xa의 선택적 저해제이다; 인자 Xa 및/또는 혈전 색전성 합병증의 저해제.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017]

그의 주요한 측면에서, 본 발명은 5-클로로-N-포르밀-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드로 화학적으로 명명된 식 (B)의 화합물을 개시한다.

[0018]

본 발명의 다른 측면에서, 혈전 색전성 장애와 같은 장애의 치료 및/또는 예방을 위한 식 (B)의 화합물의 사용을 개시한다; 인자 Xa 및/또는 혈전 색전성 합병증의 저해제. 상기 "혈전 색전성 장애(thromboembolic disorder)"는 본 발명의 문맥에서, ST 분절 상승(STEMI)이 있거나, ST 분절 상승이 없는(non-STEMI) 심근 경색, 안정 협심증, 불안정 협심증, 혈관 성형술 또는 대동맥-관상동맥 우회 수술 후의 재 폐색 및 협착, 말초 동맥 폐색 질환, 폐 색전증, 심부 정맥 혈전증 및 신장 정맥 혈정증, 일시적 허혈성 발작, 및 혈전성 및 혈전 색전성 뇌졸증과 같은 장애를 포함한다.

[0019]

또 다른 측면에서, 본 발명은 화합물 식 (B)의, 같은 급성, 간헐적 또는 지속적인, 예를 들면, 심방 세동과 같은 심장 부정맥 환자, 및 심율동전환을 받은 자들, 또한 심장 판막 질병 또는 인공 심장 판막 환자에서, 심인성 혈전 색전증, 예를 들면, 뇌 허혈증, 뇌졸중 및 전신성 혈전 색전증 및 허혈증과 같은 심인성 혈전 색전증의 예방 및 치료를 위한 사용을 개시한다. 본 발명에 따른 화합물은 추가적으로 다발성 혈관 내 응고(DIC)의 치료에 적합하다.

[0020]

본 발명의 다른 측면은 실질적으로 불순물이 없는 화합물 식 (B)를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

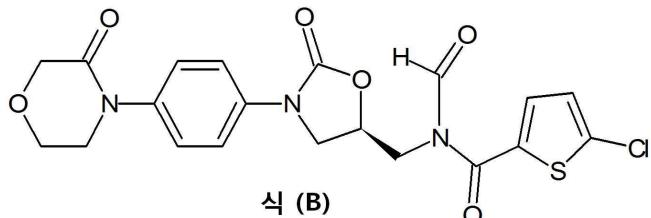
[0021]

본 발명의 또 다른 측면은 결정체 또는 무정형(amorphous form)의 화합물 식 (B)를 제공하는 것이다.

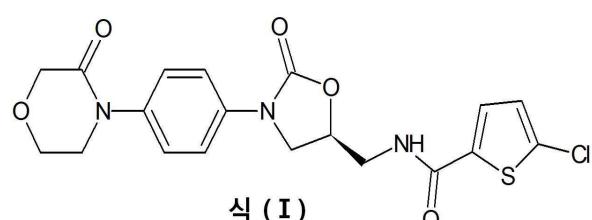
[0022] 본 발명의 또 다른 측면은 약학적으로 허용되는 염 또는 수화물 형태 또는 용매화물 형태의 화합물 식 (B)를 개시한다.

과제의 해결 수단

[0023] 이의 주요 구체예에서, 본 발명은 하기의 구조를 갖는 5-클로로-N-포르밀-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드로 화학적으로 명명된 화합물 식 (B)를 포함한다:



[0024] 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 형태 또는 수화물 형태를 포함하고, 이는 하기의 구조를 갖는 5-클로로-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드로 화학적으로 명명된 화합물 식 (I)의 전구 약물로서 작용한다.



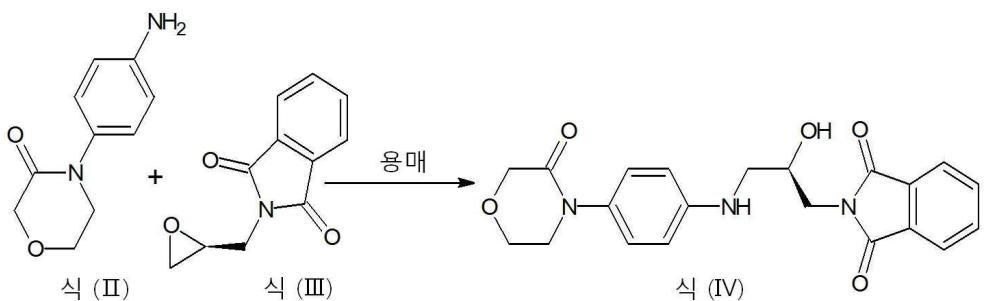
[0025] 단어 전구 약물(produrg)은 약리학적으로 활성 또는 비활성일 수 있지만 섭취한 경우 신체에 의해 효소적 또는 가수분해적으로 활성 화합물로 변화되는 화합물을 포함한다. 본 발명은 이러한 문제에 초점을 둔다. 식 (B)의 화합물은 인 비트로(*in vitro*) 및 인 비보(*in vivo*) 동물 연구에서 명시적으로 실시예에 반영되어 있는 바와 같이 뛰어난 용해도와 안정성을 나타내는 것으로 개시된 바 있고, 그러므로 임상 시험을 권장한다.

[0026] 본 화합물 식 (B)는, 입체 이성질체 형태(거울상 이성질체, 부분 입체 이성질체)로 존재한다. 따라서, 본 발명은 상기 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체 및 이를 각각의 혼합물을 포함한다. 이러한 거울상 이성질체 및 부분 입체 이성질체의 혼합물로부터, 입체 이성질체적으로 균일한 성분을 알려진 방법으로 분리하는 것이 가능하다. 만약 본 발명에 따른 상기 화합물이 토토며 형태로 존재할 수 있다면, 본 발명은 모든 토토며 형태를 포함한다.

[0027] 본 발명에서는 상기 발명된 화합물(화합물 식 B)의 용해도, 안정성 및 유리 거동(liberation behavior)에 대한 상세한 연구를 수행하였다. 더욱이 화합물 식 (B)에 대하여, 인 비트로 간 미소체 안정성 분석(*In Vitro Liver Microsomal Stability Assay*), 마우스 내 인 비트로 안정성 분석(*In Vitro Stability in Rat*), 마우스 및 인간 혈장, CYP 억제 분석(CYP Inhibition Assay), Wistar 쥐 내 혈장 단백질 결합 정맥 및 구강 약동학, 정맥 투여를 위한 혼탁액 및 구강 투여를 위한 용액 같은 선택적 활성, 항 응고 활성 및 항 혈전 활성을 확립하기 위한 인 비트로 및 인 비보 연구가 수행되었고, 이러한 연구들은 실시예 부분/실시예(B)에서 최선의 형태로 잘 예시되거나 또는 설명되어 있다.

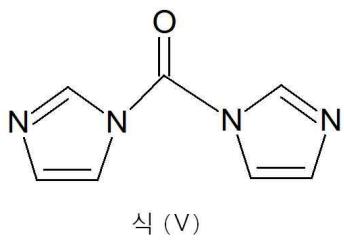
[0028] 중요한 구체예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 화합물 식 (B)의 제조를 위한 방법을 제공한다:

[0029] a) 식 (II)의 4-(4-아미노페닐)모르폴린-3-온을 식 (III)의 2-[(2S)-옥시란-2-일메틸]-1H-이소인돌-1,3(2H)-디온과 적절한 용매 내에서 반응시켜 식 (IV)의 2-[(2R)-2-히드록시-3-{[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]아미노}프로필]-1H-이소인돌-1,3(2H)-디온을 얻는 단계;



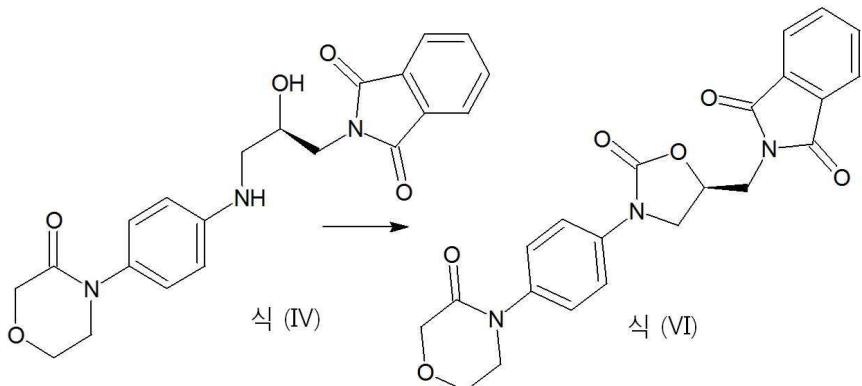
[0032]

b) 식 (IV)의 화합물을 식 (V)의 디-1H-이미다졸-1-일메타논과 반응시켜 식 (VI)의 화합물을 제조하는 단계;



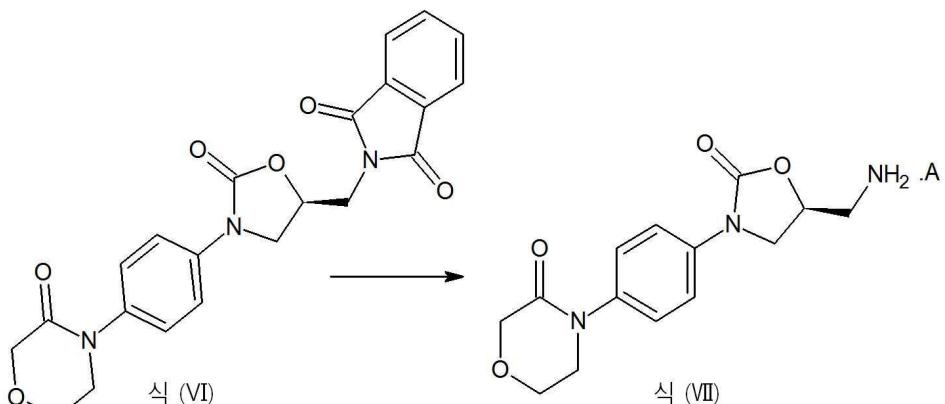
[0034]

대안적으로, 적절한 용매 내의 식 IV의 화합물은 염기의 존재 하에서 식 VI의 화합물로 변환된다.



[0036]

c) 적절한 탈-보호화제 및 산을 이용하여 적절한 용매 내에서 식 (VI)의 화합물로부터 프탈아미드기를 제거하고 식 (VII)의 4-[4-[(5S)-5-(아미노메틸)-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]페닐]모르폴린-3-온의 산 부가 염을 얻는 단계;

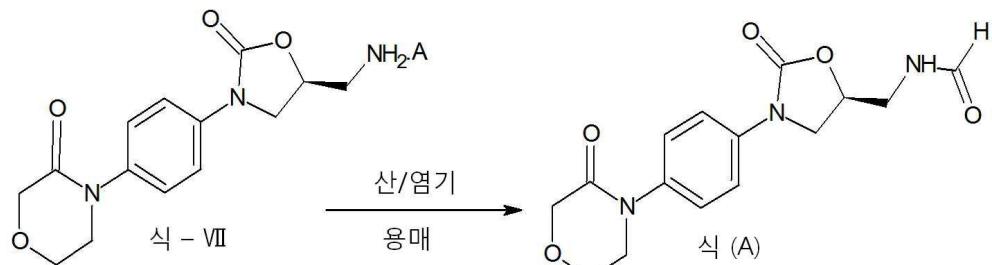


[0038]

상기 A는 산 부가 염이다; 대안적으로, 식 VII의 화합물은 또한 유리 염기(free base)로서 분리될 수 있다; 산 부가 염 또는 유리 염기 중 어느 하나로서의 식 VII의 화합물의 합성을 알려져 있고, 따라서 청구되지 않는다.

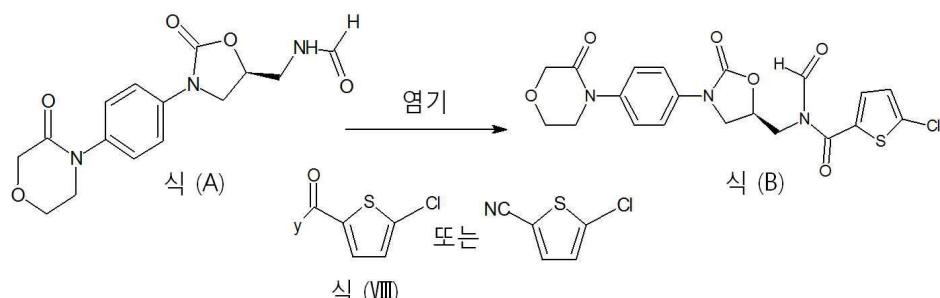
식 VII의 화합물은 임의의 알려진 방법에 의해 만들어질 수 있다.

[0040] d) 산 부가 염을 갖는 식 (VII)의 화합물을 염기의 존재 하에서 산과 반응시켜 신규한 중간체 식 (A), *N*-((5*S*)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)포름아미드를 얻는 단계;



[0041] 대안적으로, 식 VII의 화합물이 유리 염기인 경우 이는 산과 직접적으로 반응되어 신규한 중간체 식 (A) *N*-((5*S*)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)포름아미드를 생산한다;

[0043] e) 화합물 식 (A)를 화합물 식 (VIII) 또는 5-클로로티오펜-2-카르보니트릴과 적절한 용매 및 염기 내에서, 선택적으로 촉매 및/또는 활성화제의 존재하에서 반응시켜 화합물 식 (B)를 얻는 단계;

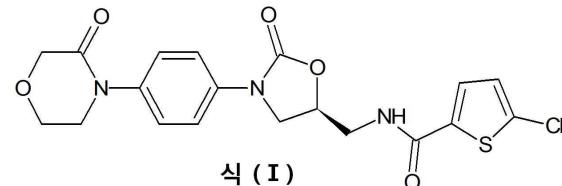


[0044]

상기에서;

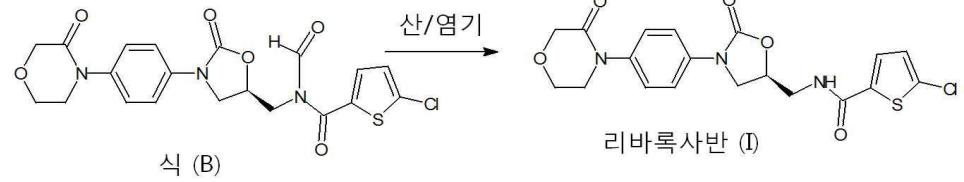
[0046] Y는 술포닐옥시, 이미다졸, 트리아졸, 테트라졸, 알콕시, 치환된 알콕시, 트리-할로메톡시, *N*-히드록시숙신아미드, 히드록시, 에스테르, 1차 아민, 2차 아민, *p*-니트로페놀, *N*-히드록시탈아미드, *N*-히드록시벤조트리아졸, 클로린, 플루오린, 브로민 및 이오딘일 수 있다. 사용되는 염기는 무기 또는 유기일 수 있다.

[0047] 식 B의 화합물은, 식-I의 구조를 갖는 리바록사반으로 널리 알려져 있는 식 I의 화합물의 전구 약물이다.



[0048]

[0049] 식 B의 화합물의 알데히드기가 산성 또는 염기성 환경에 노출되어 제거되는 때, 이는 활성 잔기(active moiety), 리바록사반으로 변환되고, 따라서 적절한 용매 내에서 산 또는 염기가 가해진 식 (B)의 화합물은 화합물 식 (B)로부터 알데히드기가 제거되어 표제의 화합물 리바록사반 식 (I)을 얻는다;



[0050]

[0051] 본 발명은 더욱이 화합물 식 (VII)의 산 부가 염의 제조로 확장되고, 산-염기 처리, 또는 용매 결정화에 의한 임

의의 추가적인 정제 없이 정제된 화합물을 얻는다.

단계 (a) 및 단계 (c)에서 사용된 용매는 같거나 또는 다를 수 있다; 상기 용매는 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소, 디알킬포름아미드, 에테르, 고리형 에테르, 치환된 고리형 에테르, 알콜, 케톤, 디알킬су 폭시드, 디알킬아세트아미드, 니트릴, 이온성 액체, 할로겐화 지방족 탄화수소 및 물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 군으로부터 선택된 유기 용매이지만, 반응물에 대해 중성이 용매가 바람직하다.

상기 단계 (a)는 0°C 내지 95°C의 온도에서 수행될 수 있다. 일반적으로 상기 반응은 상기 용매의 환류 온도 (reflux temperature)까지의 온도에서 수행될 수 있다.

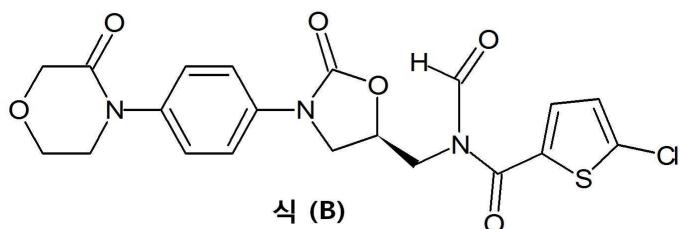
식 (VI)의 화합물의 제조를 위해 단계 (b)에서 사용되는 용매는 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소, 디알킬포름아미드, 에테르, 고리형 에테르, 치환된 고리형 에테르, 케톤, 디알킬솔록시드, 디알킬아세트아미드, 니트릴, 이온성 액체, 할로제화 지방족 탄화수소 또는 이들의 혼합물을 포함하는 군으로부터 선택된 유기 용매이다.

단계(c)에서 사용되는 용매는 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소, 디알킬포름아미드, 에테르, 고리형 에테르, 치환된 고리형 에테르, 디알킬су 폭시드, 디알킬아세트아미드, 니트릴, 이온성 액체, 할로겐화 지방족 탄화수소 및 물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 군으로부터 선택된 유기 용매이다. 더욱이 상기 화합물 식 (VII)은 무기 또는 유기산을 이용한 산 부가 혼으로서 제조될 수 있다.

단계 (d)에서 상기 식 (VII)의 화합물은 유리 염기의 형태 또는 이의 산 부가 염으로 사용될 수 있다. 상기 단계 (d) 내에서 사용된 용매는 유기 용매이고, 혼합물 또는 물 및 유기용매일 수 있다. 단계 (d)에서 사용되는 포름화제(formylating agent)는 포름산, 알킬 포르메이트 등일 수 있다. 상기 반응에서 사용되는 상기 용매는 방향족 탄화수소, 니트릴, 지방족 탄화수소, 에테르 바람직하게는 방향족 히드로카본 더 바람직하게는 툴루엔 및 크실렌(xylene)을 위해 선택될 것이다. 단계 (d)에서 사용되는 상기 염기는 유기 또는 무기 염기로부터 선택된다.

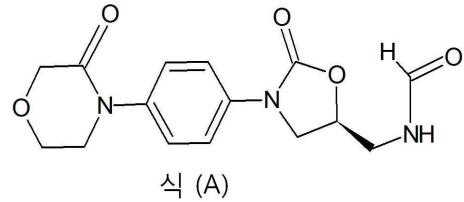
단계 (e)에서 화합물 식 (A)에는, 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소, 디알킬포름아미드, 에테르, 고리형 에테르, 치환된 고리형 에테르, 디알킬슬록시드, 디알킬아세트아미드, 니트릴, 이온성 액체, 에스테르, 할로겐화 지방족 탄화수소, 캐톤, 고리형 아미드 및 물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 군으로부터 선택된 용매 내에서, 선택적으로 무기 또는 유기성일 수 있는 염기의 존재 하에서 식 (VIII)이 가해졌고 리바록사반 식 (B)의 전구체를 얻었다. 단계 (e)의 반응 내에서 사용되는 활성화제는 CDI, DCC, HOBr, DMAP, EDCI, 보르산(boric acid), 보론산(boronic acid), 페닐 보론산 등 및 이들의 혼합물을 포함한다.

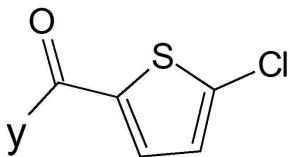
또 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 식(b)의 제조를 위한 방법을 제공하고;



하기를 포함한다:

화합물 식 (A)를 식 (VIII)의 화합물과 반응시켜 화합물 식 (B)를 얻는 단계로서





[0063]

식 (VIII)

상기;

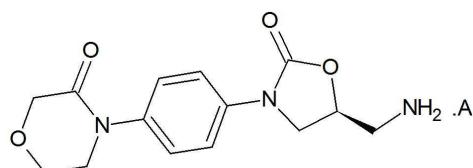
Y는 술포닐옥시, 이미다졸, 트리아졸, 테트라졸, 알콕시, 치환된 알콕시, 트리-할로메톡시, N-히드록시숙신아미드, 히드록시, 에스테르, 1차 아민, 2차 아민, p-니트로페놀, N-히드록시탈아미드, N-히드록시벤조트리아졸, 클로린, 플루오린, 브로민 및 이오딘일 수 있다. 사용되는 염기는 무기 또는 유기일 수 있다.

[0067]

상기 반응을 위해 사용되는 용매는, 식 (B)의 리바록사반 전구체를 얻기 위한, 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소, 디알킬포름아미드, 에테르, 고리형 에테르, 치환된 고리형 에테르, 디알킬술포시드, 디알킬아세트아미드, 니트릴, 이온성 액체, 에스테르, 할로겐화 지방족 탄화수소, 케톤, 고리형 아미드 및 물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 군으로부터 선택된 용매 중의 무기 또는 유기 용매일 수 있다. 상기 반응에서 사용되는 활성화제는 CDI, DCC, HOBr, DMAP, EDCI, 보르산, 보론산, 폐닐보론산 등 및 이들의 혼합물을 포함한다. 상기 사용되는 염기는 유기 또는 무기 염기로부터 선택된 것이고 선택적으로 화합물 식 (B)는 정제되거나 다음 반응과 같은 것에서 사용될 수 있다.

[0068]

본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 식 (VII)의 화합물의 유리 염기 또는 산 부가 염의 라세미체(recemate)에는 효소적 속도론적 분할(enzymatic kinetic resolution)이 수행될 수 있다.



식 (VII)

[0069]

상기;

A는 산 부가 염; 산은 무기 또는 유기산일 수 있다;

[0072]

본 발명의 또 다른 구체예에서, 식 (I)의 리바록사반을 얻기 위해, 전술한 단계에서 사용되는 염기는 무기 또는 유기이고 용매는 지방족 탄화수소, 방향족 탄화수소, 디알킬포름아미드, 에테르, 고리형 에테르, 치환된 고리형 에테르, 디알킬술포시드, 디알킬아세트아미드, 니트릴, 이온성 액체, 에스테르, 할로겐화 지방족 탄화수소, 케톤, 고리형 아미드 및 이들의 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택된 것이다. 상기 반응에서 사용되는 활성화제는 CDI, DCC, HOBr, DMAP, EDCI, 보르산, 보론산, 폐닐 보론산 등 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0073]

본 명세서에서 사용되는, 용어 "수화물(hydrate)"은, 화학량론적 또는 비-화학량론적인 양의, 비-공유 분자간 힘에 의해 결합된 물을 더 포함하는 화합물을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는, 용어 "용매화물(solvate)"은 화학량론적 또는 비-화학량론적인 양의, 비-공유 분자간 힘(non-covalent intermolecular force)에 의해 결합된, 물, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 디클로로메탄, 2-프로판올, 또는 이와 유사한 것들과 같은 용매를 더 포함하는 화합물을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074]

본 발명은 하기에 제공되는 실시예에서 설명된다: 더욱이 이러한 제공되는 것은 오로지 본 발명을 설명하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0075]

실시예-A

[0076] **약어 및 두문자어**

[0077] LC-MS - 결합된 액체 크로마토그래피-질량 분석기(Coupled Liquid chromatography - mass spectroscopy)

[0078] HPLC - 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography)

[0079] LLQ - 정량 하한(Lower limit of quantification)

[0080] SD - 표준 편차(Standard deviation)

[0081] AUC - 곡선 아래 면적(Area under curve)

[0082] DMSO - 디메틸 솔록시드

[0083] NADPH - 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트-옥시다(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxida)

[0084] CYP - 시토크롬

[0085] BLOQ - 정량 한계 이하(below limit of quantification)

[0086] SIF - 모의 장액(Stimulated Intestinal fluid)

[0087] SGF - 모의 위액(Stimulated gastric fluid)

[0088] CV - 농도 값

[0089] C_{max} - 최고 농도(Highest concentration)

[0090] 하기의 상세한 연구의 관점의 예시적 구체예는 본 발명을 설명하지만, 본 발명은 이러한 실시예와 그 과정에 한정되지 않는다.

[0091] **실시예 -1**

[0092] N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일}메틸)포름아미드의 제조(1차 아민의 알데히드);

[0093] 4구 등근 바닥 플라스크를 4-{4-[(5S)-5-(아미노메틸)-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]페닐}모르폴린-3-온 유리 염기 (50 g), 툴루엔 (350 ml) 및 포름산 (21.63 g)으로 채웠다. 반응 물질(reaction mass)은 이후 딘-스타크(dean-stark) 장치를 사용하여 3 내지 4시간 동안 공비적으로(azeotropically) 110-120°C까지 가열되었다(물은 공비적으로 제거). 반응 물질은 25 내지 30°C까지 냉각된다. 얻어진 고체는 여과되고 툴루엔에 의해 세척된다. 96%의 수율.

[0094] **실시예 -2**

[0095] 5-클로로-N-포르밀-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일}메틸)티오펜-2-카르복사미드(화합물 식-B)의 제조

[0096] 깨끗한 건조 4구 등근 바닥 플라스크 내에 25 내지 30°C에서 N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)포름아미드 (1 g), 디클로로메탄 (25 ml)이 첨가되었다. 이 투명한 용액에 포타슘 카르보네이트 (0.89 g)가 첨가되었고 25 내지 30°C에서 30분간 교반되었다. 이 반응 물질에, 천천히 5-클로로티오펜-2-카르보닐 클로리드 (1.0 g)와 디클로로메탄 (5 ml)의 용액이 첨가되었다. 상기 얻어진 반응 물질은 이후 25 내지 30°C에서 5 내지 6시간 동안 교반되었다. 물 (25 ml)이 반응 물질에 첨가되었고 유기층이 분리되었다. 얻어진 유기 층은 이후 물 (25 ml x 2)로 세척되었다. 마지막으로 유기층은 소듐 술페이트로 건조되었고 감압하에서 건조되어 그 잔류물을 얻었다. 메탄올 (5 ml)이 상기 잔류물에 첨가되었고 가열로 환류시켜 투명한 용액을 얻었다. 상기 얻어진 투명한 용액은 점차적으로 15 내지 20°C까지 냉각되었다. 그 침전된 고체는 이후 여과되었고 냉각된 메탄올 (1 ml)로 세척되었다.

[0097] ¹H-NMR (400MHz, d₆-DMSO), δ=3.74-3.77 (m, 2H), 3.84-3.87(m, 1H), 4.02-4.05(m, 2H), 4.07-4.11(m, 2H),

4.12-4.15 (m, 1H), 4.34-4.41 (m, 3H), 4.94-5.00 (m, 1H), 7.00-7.01(d, 1H 티오펜), 7.30-7.31 (d, 1H 티오펜), 7.33-7.37 (dt, 2H 방향족), 7.55-7.58 (dt, 2H 방향족), 9.28 (s, 1H 알데히드)

[0098] 상기 실시예 2는 같은 몰비/부분(molar ratio/parts)을 갖는 아세톤, 툴루엔 및 에테르와 같은 다양한 용매 내에서 수행되고 수율의 변화는 하기에 나타나있다.

용매	수율
아세톤	75 % (실시예 2에 반영된 바와 같이 반응 수행)
툴루엔	78 % (실시예 2에 반영된 바와 같이 반응 수행)
에테르	79% (실시예 2에 반영된 바와 같이 반응 수행)

[0099]

실시예-3

[0100] 5-클로로-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드의 제조(니트릴 경로)

[0101] 4-{4-[(5S)-5-(아미노메틸)-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]페닐}모르폴린-3-온 히드로클로리드 (5.7 g)의 에탄올 용액 (70 mL)에 포타슘 카르보네이트 (7.1 g)을 첨가하였고, 상기 혼합물은 25 내지 30°C에서 교반되었고, 이후 여과되어 4-{4-[(5S)-5-(아미노메틸)-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]페닐}모르폴린-3-온 (유리 염기)을 얻었다. 다른 플라스크는 질소하에서 5-클로로티오펜-2-카르보니트릴 (2.9 g)의 염산 에탄올 (ethanolic HCl) (12 mL) 용액으로 채워졌고, 하얀색의 침전물 (precipitate)이 얻어질 때까지 상온에서 5시간 동안 교반되었다. 질소하에서 수분을 피하기 위해 증류되었고 얻어진 잔류물은 4-{4-[(5S)-5-(아미노메틸)-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]페닐}모르폴린-3-온의 용액에 첨가되었다. 상기 혼합물은 16 내지 18시간 동안 환류 온도에서 교반되었다. 에탄올 수용액 (Aq. ethanol) (5 mL) 및 혼합물이 환류 온도에서 10 내지 12시간 동안 가열되었고 5-클로로-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드(미정제 물질(crud material))을 얻었고, 이는 칼럼 크로마토그래피에 의해 더 정제된다.

실시예-4

[0102] N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)포름아미드의 제조.

[0103] 4구 동근 바닥 플라스크를 4-{4-[(5S)-5-(아미노메틸)-2-옥소-1,3-옥사졸리딘-3-일]페닐}모르폴린-3-온 염산 (250 g), 디클로로메탄 (1250 mL) 및 암모니아 (250 mL)로 채웠다. 상기 용액은 15분간 교반되었고, 그 층이 분리되었고, 툴루엔 (1250 mL)을 물 (500 mL) 및 포름산 (140.6 g)과 함께 그 유기 층에 첨가하였다. 반응 물질은 이후 딘 스타크 장치를 사용하여 3 내지 4시간 동안 공비적으로 110-120°C까지 가열되었다(물은 공비적으로 제거). 반응 물질은 25 내지 30°C까지 냉각되었다. 얻어진 고체는 이후 여과되었고 툴루엔으로 세척되었다. 수율 =80.0%.

실시예-5

[0104] 5-클로로-N-포르밀-N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)티오펜-2-카르복사미드의 제조

[0105] N-((5S)-2-옥소-3-[4-(3-옥소모르폴린-4-일)페닐]-1,3-옥사졸리딘-5-일)메틸)포름아미드 (120 g), 디클로로메탄 (2400 mL)이 25 내지 40°C에서 깨끗한 건조 4구 동근 바닥 플라스크에 첨가되었다. 상기 반응 물질을 0 내지 5°C까지 냉각시켰다. 이 용액에 0 내지 5°C에서 디이소프로필에틸 아민 (145.7 g)이 적가(dropwise)하여 첨가되었고, 5-클로로티오펜-2-카르보닐 클로리드 (170 g), 및 디클로로메탄 (240 mL)이 첨가되었다. 그 얻어진 반응 물질은 이후 25 내지 30°C에서 교반되었고 12시간 동안 가열되어 환류되었다. 그 반응 물질은 25 내지 30°C로 냉각되었고 10% 시트르산 용액 (2 x 360 mL)으로 세척되었고, 유기 층이 분리되었다. 얻어진 유기 층은 이후 물 (600 mL x 2)로 세척되었고 감압하에서 농축되어 그 잔류물을 얻었다. 메탄올 (600 mL)이 잔류물에 첨가되었고 20분간 교반되었다. 그 침전된 고체는 이후 여과되었고 메탄올 (240 mL)로 세척되었고, 건조 흡입되었고, 그

젖은 고형물(wet cake)은 메탄올 (600 ml)이 첨가된 플라스크로 끓여졌고 그 용액은 이후 30분간 교반되었다. 고체는 이후 여과되었고 메탄올 (240 ml)로 세척되었다. 수율=85.0%.

[0109] **실시예-B**

[0110] **SGF 및 SIF 유체 내 화합물 식 B의 안정성 결정**

[0111] 상기 화합물 식 (B)는, DMSO에 용해되고 이후 메탄올:물 (90:10)로 희석된다. 다양한 pH 버퍼에서의 버퍼 내 안정성 및 SIF/SGF 매질(medium)이 연구된다:

[0112] 화합물 식 (B)의 5.7 mg^o, 2 ml HPLC 바이알(vial)에 첨량되고 0.250 ml DMSO에 용해된다. 화합물 식 (B) 용액의 2 μ l가 각각의 버퍼 용액의 250 μ l에 첨가되었고 상온에서 인큐베이터 쉐이커(incubator shaker) 상에서 24시간 동안 유지되었다. 인큐베이션 기간의 종료 후, 상기 용액은 원심분리되고 상등액(supernatant)을 얻는다. 상기 상등액에, IS를 포함하는 얼은 차가운 아세토니트릴이 첨가되고, 와류(vortex)되고 LCMS/MS로 주입된다.

[0113] **LC/MS/MS 방법:**

[0114] API 4000, ESI Agilent 1100 칼럼: Gemini Nx 100 mmx4.6 mm 5. μ ; 칼럼 온도: 30°C; 용리액 A: 0.1% 물 내 포름산, 용리액 B: 아세토니트릴: 구배: 0-2.5분 95% A, 5% B; 2.5-2.6분 5% A, 95% B; 2.6-4.2분 95% A, 5% B; 유속: 0.8 ml/분; ESI. Q1:464.098, Q3:144.255.

[0115] 이러한 용액 내의 예시적 화합물의 분해는 pH 7.4 및 pH 7.8에서 관찰되었다.

[0116] **사용된 (버퍼)용액**

[0117] 시트르산 0.1 mol 및 물 내 디소듐 히드로겐 포스페이트 0.2 mol이 준비되었다. pH 2.2, 4 및 7.8의 버퍼가 시트르산 및 디소듐 히드로겐 포스페이트를 이용하고 pH를 0.1N HCl 또는 1N NaOH로 조정하여 준비되었다. pH 7.4: 8.89g의 디소듐 히드로겐 포스페이트(용액 A)가 1 리터(litre)의 물에 가해지고, 1.5601g 소듐 디-히드로겐 포스페이트(용액 B)가 1 리터의 물과 함께 구성된다; 용액 A (19 ml) 및 용액 B (81 ml)가 혼합된다.

[0118] SIF/SGF: SIF 원본(original) 분말(biorelevant media) 2.38g이 miliQ 물 1L에 용해된다. 그 용액의 pH는 SIF(7.4) 및 SGF(2.2)에 맞게 0.1N HCl로 조정된다. 시작 시점에서의 피크 영역과 관계있는 각 시점에서의 그 피크 영역(peak area)(F)의 비율이 계산된다. 이러한 모의 SIF 및 SGF 연구 시료에서, 화합물 식 B의 모의 유체 안정성(simulating fluid stability)이 다양한 시점과 장 및 위의 pH 상태에서 영점(zero minute)에 비교하여 온전히(intact) 남아있는 화합물 범위를 보기 위해 평가되었다. 상기 피크 영역 (F)은 직접적으로 LC MS 방법에 의해 정량화되는 테스트 화합물의 양과 관련된다.

[0119] 모의 장액 및 위액에서, 상기 식 B의 영역은 영점 영역 내지 120분과 비교된다. 상기 화합물 영역은 장내 조건에서 120분 동안 동일하게 남았고 유사한 결과가 모의 위 조건에서 관찰되었다.

[0120] pH 2.2 및 7.4에서 버퍼 내 안정성

[0121] pH 2.2, 4, 및 7.8의 다양한 pH 조건의 버퍼 안정성에서, 다양한 pH 조건에서의 상기 화합물 식 B의 안정성이 영점(zero minute)/ 또는 수성(aqueous) 표준에 가까운(neat) 한 점(single point) 교정과 비교하여 특정한 시점에서 온전히 남은 화합물의 범위를 보기 위해 평가되었다. 이러한 pH 7.4, pH 2.2의 pH 조건에서, 리바록사반의 형성이 LCMS로 모니터 되었다. 그러한 pH 조건에서의 분해 및 리바록사반으로의 변환에도 불구하고, pH 2.2, 4.0에서 화학식 B의 존재가 관찰된다.

[0122] 흥미롭게도, LCMS에 의해 모니터되는 리바록사반으로의 변환이 있다. 이는 식 B 화합물이 다양한 pH 버퍼 조건에서 분해(degraded)되고 리바록사반 형성이 관찰되는 것을 증명한다. pH 버퍼에서 인-비보 쥐 약동학적 연구의 증거에 의해 뒷받침되는 인-비트로 조건에서 리바록사반으로의 변환이 관찰되고 또한 인-비보 조건에서의 변경도 관찰된다. 또한 리바록사반으로의 변환이 미크로솜(microsome)을 이용한 대사 안정성 연구 및 마우스, 쥐 및

인간 내 혈장 안정성 연구와 같은 다양한 인-비트로 분석에서 발견된다는 증거가 있다.

[0123] 이 분석에서, 다양한 pH 조건에서의 테스트 물질(화합물 식 B)뿐만 아니라 리바록사반의 형성 또한 발견되었다. 그러나, 상기 테스트 화합물 식 B는 모의 장내 조건에서 안정하다. 다양한 pH 조건에서의 식 B의 안정성의 비교를 표 1, 2 & 3에 플로팅함으로써 잘 정리되어 있다.

[0124] 표 1은 pH 7.8, pH 4 및 pH 2.1에서의 화합물 식 B의 안정성 비교 차트를 나타낸다.

	시료 이름	분석 피크 영역 (개수)	평균	SD	CV
화합물 식 B	pH 2.1	20975674	28315038	162.0453269	0.000572294
		35654402			
	pH 4	42841292	34879190	285.7428233	0.000819236
		26917087			
	pH 7.8	35312	38907.5	0.097829461	0.000251441
		42503			
	표준	40131132	39849828	11.6442782	2.92204E-05
		39542018			
		39876334			

[0125]

표 2는 모의 장액에서의 화합물 식 B의 안정성 비교 차트를 나타낸다.

SIF 내 안정성	시료 이름	분석 피크 영역 (개수)	IS 피크 영역 (개수)	영역 비율	평균	SD	CV
화합물 식 B	0 분	38191589	165067	231.371	226.928	6.2833509	2.7688742
		39972052	179662	222.485			
	30 분	37765238	188499	200.347	194.377	8.442855	4.3435463
		36339204	192876	188.407			
	60 분	35757521	194543	183.803	182.7045	1.5535136	0.8502875
		36426366	200580	181.606			
	120 분	34245401	200460	170.834	179.8485	12.748428	7.0884262
		33738135	178638	188.863			

[0127]

표 3은 모의 위액에서의 화합물 식 B의 안정성 비교 차트를 나타낸다.

SIF 내 안정성	시료 이름	분석 피크 영역 (개수)	IS 피크 영역 (개수)	영역 비율	평균	SD	CV	% 남은 부모	결론	
화합물 식 B	0 분	34733277	186737	186.001	202.267	23.003598	11.372887	100	화합물 식 B는 안정하다	
		32540774	148905	218.533						
	30 분	32217743	147631	218.232	200.7875	24.670248	12.286745	99.27		
		36940283	201482	183.343						
	60 분	35234526	174138	202.336	204.6365	3.2533983	1.5898426	101.17		
		35427185	171198	206.937						
	120 분	36170541	185892	194.578	202.3615	11.007531	5.4395383	100.05		
		31588036	150315	210.145						

[0128] 비교(표 1, 2 및 3)

[0131] 이 분석에서, 테스트 물질(화합물 식 B)뿐만 아니라 리바록사반의 형성 또한 다양한 pH 조건에서 관찰되었다. 그러나, 상기 테스트 화합물 식 B는 모의 장내 조건에서 안정하다. 표 1, 2 & 3에 다양한 pH 조건에서의 식 B의 안정성의 비교가 정리되어 잘 설명되어 있다.

[0132] 2. 쥐, 마우스 및 인간 혈장의 인 비트로 안정성(LC-MS 검출)

[0133] 화합물 식(B) 1 mg이 1.5 마이크로퓨즈(microfuge) 투브로 청량되었고 DMSO에 용해되었다. 이 분석에서 테스트 화합물의 최종 농도는 5 마이크로 몰랄(micromolar)이다. 상기 화합물 식 (B)는 쥐 또는 인간 혈장 또는 마우스 혈장에 첨가되었고 37 °C에서 배양되었다. 시점에서 분취량 100 마이크로 리터가 제거되었고 반응을 중지시키기 위해 IS를 포함하는 얼은 차가운 아세토니트릴(200 μ L)로 희석되었다. 시료는 10,000 RPM에서 5분간 단백질을 침전시키기 위해 원심분리되었다. 상등액은 마이크로 원심분리 투브에 옮겨졌고, LC/MS/MS 분석을 위해 -20°C에서 저장되었다. 상기 테스트 물질의 남은 부모(remaining parent)의 비율(percent)은 영분의 피크 영역 비율에 대한 각 시점의 피크 영역의 비율에, 100을 곱하여 계산된다. 상기 화합물 식 (B)는 리바록사반으로 변환되는 것이 관찰된다.

[0134] LC/MS/MS 방법:

[0135] API 4000, ESI Agilent 1100 칼럼: Gemini Nx 100 mmx4.6 mm 5 μ ; 칼럼 온도: 30°C.; 용리액 A: 0.1% 물 내 포름산, 용리액 B: 아세토니트릴; 구배: 0-2.5분 95% A, 5% B; 2.5-2.6분 5% A, 95% B; 2.6-4.2분 95% A, 5% B; 유속: 0.8 mL/분; ESI. Q1:464.098, Q3:144.255

[0136] 표-4

[0137] 상기 테스트 화합물 (식-B) 및 리바록사반의 인간, 쥐 및 마우스의 혈장 안정성을 나타낸다

테스트 화합물 (화학식-B) 및 리바록사반의 인간, 쥐 및 마우스에서의 혈장 안정성 (표-4)									
시간 (분)	% 남은 부모 (인간)		% 남은 부모(쥐)			% 남은 부모(마우스)			
	테스트 산물	리바록사 반 형성*	테스트 산물	리바록사 반 형성	리바록사 반	테스트 산물	리바록사 반		
0	100	100		100	100	100	100		
30	95.46	100		100	82.35	100	100		
60	77.84	99.68		82.43	88.4	82.18	100		
변환	리바록사반 으로의 변환 은 0분에서 관찰됨. 테 스트 산물의 무시할만한 양이 검출됨	테스트 물 질 내 리 바록사반 형성	99.99%, 변화 없음 , 혈장 내 안정	리 바 록 사 반 으로의 변환은 0분 에서 관찰 됨. 테스트 산물의 무 시 할 만한 양이 검출 됨	테스트 물 질 내 리 바록사반 형성	88.4%, 변 화 없음, 혈장 내 안정	리 바 록 사 반 으로의 변환은 0분 에서 관찰 됨. 테스트 산물의 무 시 할 만한 양이 검출 됨	테스트 물 질 내 리 바록사반 형성	변화 없음 , 혈장 내 안정

[0138] 비교(표 4)

[0139] 표 4는 식 B의 화합물의 쥐, 마우스 및 인간 혈장 기질(matrix)에서의 안정성 분석을 보여준다. 본 실험은 마우스, 쥐 및 인간의 혈장 기질에서 식 B 화합물의 리바록사반으로의 변환이 발생하는지 여부를 보기 위한 것뿐만 아니라, 식 B의 화합물의 안정성을 결정하기 위해 수행되었다. 모든 세 종에 대해 수행된 실험에서 리바록사반으로의 급격한 변환이 관찰되었다.

[0140] 표 4는 쥐, 마우스 및 인간의 혈장 기질에서의 식 B의 화합물의 안정성 분석을 보여준다. 상기 실험은 마우스, 쥐 및 인간의 혈장 기질에서 식 B 화합물의 리바록사반으로의 변환이 발생하는지 여부를 보기 위한 것뿐만 아니라, 식 B의 화합물의 안정성을 결정하기 위해 수행되었다. 모든 세 종에 대해 수행된 실험에서 리바록사반으로의 급격한 변환이 관찰되었다. 식 B의 화합물의 무시할만한 양이 인-비트로 혈장 안정성 실험에서 관찰되었고 급격한 리바록사반으로의 변환이 테스트 종으로부터의 혈장 시료를 이용한 인-비트로 조건에서 관찰되었다.

[0142] CYP 억제 분석

인간 내에서 물질의 CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19, CYP2J2 및 CYP3A4를 억제하는 능력이 효소원(enzyme source)으로서 모아진(pooled) 인간 간 미크로솜을 이용하여 CYP-이성체-특이적 대사물질을 형성하는 표준 기질(하기 참조)의 존재하에서 조사되었다. 그 억제효과는, 화합물 식 (B)의 부재하에서의 표준 기질의 CYP-이성체-특이적 대사물질 형성의 범위와 비교하여, 테스트 화합물의 8개의 다른 농도(0.001, 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μM)에서 조사되었고, 상응하는 IC_{50} 값이 계산된다. 특히 하나의 CYP 이성체를 억제하는 표준 억제제(standard inhibitor)가, 얻어지는 결과의 대조군(control)으로서 제공된다.

[0144] 절차:

페나세틴, 디클로페낙, 텍스트로메토르판(dextromethorphan), 메페노토인(mephenotoin), 알벤다졸(albendazole) 및 테스토스테론을, 각각의 경우의 화합물 식 (B)의 8개의 다른 농도(잠재적 억제제로서)의 존재하에서 인간 간 미크로솜과 함께 배양하는 것을 37°C에서 인큐베이터 쉐이커 상에서 수행하였다. 표준 배양 혼합물은 총 부피 200 μl 의 100 mM 포스페이트 버퍼 (pH 7.4) 내 NADPH 및 기질을 포함한다. 테스트 화합물은 아세토니트릴에 용해된다. 모아진 인간 간 미크로솜과 함께 37°C에서 정해진(defined) 시간 동안 배양되었다. 그 반응은 적절한 내부 표준(internal standard)이 언제나 존재하는 아세토니트릴 100 μl 를 첨가하여 중단된다. 침전된 단백질은 원심분리에 의해 제거되고, 그 상동액은 LC-MS/MS로 분석된다. 그 데이터는 3 μM 로부터 나온(derived from) 추정되는(extrapolated) IC_{50} (μM) 농도를 나타낸다.

CYP 억제 연구 (표-5)		
CYP 이성체의 IC_{50} (μM)		
CYP 이성체	테스트 산물 (식B)	리바록사반
1A2	1.4	18.9
3A4	5.7	9.7
2C9	22.4	16.7
2C19	25.3	13.2
2J2	6.7	억제 없음
2D6	8.2	13.2
해석	투여시 낮은 약물-약물 상호작용 (다른 약물과 화합물 식-B)	
caco2 시스템에서의 투과율		
화합물	Papp ($10^{-6} \text{ cm}/\text{초}$)	
	A>B	B>A (B>A/A>B)
유도체	17.41	40.3
해석	유도체가 높은 투과율을 보여주었음. Papp에 근거한 분류.	
	유도체가 >2의 유출율을 보여주었고 Pgp기질로 관찰됨.	
$(10^{-6} \text{ cm/sec}) < 2 = 낮음, 2-20 = 중간, >20 = 높음$		

[0146]

표-5는 다양한 CYP 이성체를 억제하기 위해 필요한 농도를 결정하기 위해 탐침 기질 방법(probe substrate method)을 이용한 CYP 억제 연구가 수행된 것을 나타낸다. 이는 약물-약물 상호작용을 측정하기 위한 기초적인 파라미터이다. 식 B의 화합물은 분석된 CYP 이성체($>1 \mu\text{M}$)의 최소의 억제를 보여주었다.

[0148] 3. 인 비트로 간 미크로솜의 안정성 분석

간 미크로솜의 안정성 분석이 포스페이트 버퍼 (100mM, pH 7.4) 내의 NADPH와 함께 1 mg/mL 간 미크로솜 단백질

에서 수행된다. 테스트 화합물(본 발명의 식 B의 화합물)은 20% 메탄올-물 내의 용액으로서 제조되고 분석 혼합물(최종 분석 농도 1 μ M)에 첨가되고 37°C에서 배양된다. 분취액(100 μ L)을 0, 15, 및 30분에 취하고, 반응을 멈추기 위해 IS를 포함하는 얇은 차가운 아세토니트릴(200 μ L)에 희석된다. 시료는 단백질을 침전시키기 위해 5분간 10,000 RPM에서 원심분리된다. 상동액은 마이크로 원심분리 투브에 옮겨지고 LC/MS/MS 분석을 위해 -20°C에서 저장된다. 상기 테스트 물질의 남은 부모의 비율은 영점의 피크 영역 비율에 대한 각 시점의 피크 영역의 비율에, 100을 곱하여 계산된다. 상기 화합물 식 (B)는 마이크로솜 분석에서 리바록사반으로 변환되는 것이 관찰된다.

표-6

인간, 쥐 및 마우스에서 테스트 화합물(식-B) 및 리바록사반의 미크로솜 안정성을 나타낸다

시간 (분)	% 남은 부모 (인간)	테스트 산률			% 남은 부모(쥐)			% 남은 부모(마우스)		
		테스트 산률 리바록사 반 형성*	리바록 사반	테스트 산률	테스트 산률 리바록사반 형성	리바록사반	테스트 산률	리바록사반	테스트 산률 리바록사반	리바록사반
0	-	100	100	-	100	100	-	100	100	
15	-	100	0.01	-	19.78	0.01	-	41.93	0.03	
30	-	66.2	0.01	-	5.20	0.02	-	25.70	0.02	
대사된 %	리바록사반 으로의 대사 가 0분에서 관찰됨.	테스트 산 률 마이크로 솜 단백질 중 리바록 사반 형성 률이 무시할 한 양이 검출 됨(44.8%)	99.99% 대사됨	리바록사반 으로의 대사 가 0분에서 관찰됨.	99.98% 대사 됨	리바록사반 으로의 대사 가 0분에서 관찰됨.	리바록사반 으로의 대사 가 0분에서 관찰됨.	리바록사반 으로의 대사 가 0분에서 관찰됨.	리바록사반 으로의 대사 가 0분에서 관찰됨.	99.98% 대사 됨
관찰	반응의 시작부터 리바록 사반의 형성 및 형성된 리 바록사반이 인간 미크로 솜에서 안정	높은 대 비	반응의 시작부터 리바록 사	높은 대 비	반응의 시작부터 리바록 사반의 형성 및 형성된 리 바록사반이 대사되는 것이 보임	반응의 시작부터 리바록 사반의 형성 및 형성된 리 바록사반이 대사되는 것이 보임	반응의 시작부터 리바록 사반의 형성 및 형성된 리 바록사반이 대사되는 것이 보임	반응의 시작부터 리바록 사반의 형성 및 형성된 리 바록사반이 대사되는 것이 보임	반응의 시작부터 리바록 사반의 형성 및 형성된 리 바록사반이 대사되는 것이 보임	높은 대사 됨

비고(표 6)

표 6에서 보여지는 결과는 테스트 화합물 식 B가 쥐, 마우스 및 인간 미크로솜 내에서 종들에 걸쳐 급격하게 대사된다는 것을 제안한다. LCMS에 의한 이러한 미크로솜의 안정성 실험에서 볼 수 있는 즉각적인 리바록사반으로의 변형이 있다. 상기 형성된 리바록사반은 또한 종들에 걸친 미크로솜 실험에서 대사되는 것이 관찰되었다.

[0155] 표 6에서 보여지는 결과는 테스트 화합물 식 B가 쥐, 마우스 및 인간 미크로솜 내에서 종들에 걸쳐 급격하게 대사되는 것을 제안한다. LCMS에 의한 이러한 미크로솜의 안정성 실험에서 보여지는 즉각적인 리바록사반으로의 변형이 있다. 상기 형성된 리바록사반은 또한 종들에 걸친 미크로솜 실험에서 대사되는 것이 관찰되었다.

4. 혈장 단백질 결합의 결정

[0157] 본 발명에 따른 화합물 용액 (DMSO 내 1mM)(5 μ L)이, 쥐 또는 인간 또는 마우스 각각의 혈장 기질(1 mL)에 첨가되었다.

[0158] 150 μ L 포스페이트 버퍼를 투석 웰(dialysis well)의 수용면(receiving side)에 가한다. 5 μ M 화합물 식 (B)와 섞인(spiked) 혈장 150 μ L을 투석 웰의 시료 면에 가하고, 6시간 동안 투석한다. 아세토니트릴로 침전시키고 분석에 앞서 1.5mL 폴리프로필렌 튜브에서 시료를 희석한다. 투석 웰의 시료면(sample side)으로부터 50 μ L를 제거하고 포스페이트 버퍼 50 μ L + IS를 포함하는 아세토니트릴 300 μ L을 첨가한다. 상기 투석 웰의 버퍼면(buffer side)으로부터 50 μ L을 제거하고 각각의 기질 혈장 50 μ L + ACN 300 μ L을 첨가한다. 이후 5분간 와류시키고 원심분리하고, 상등액을 취하여 LCMS에 주입한다.

[0159] 0.1 μ M 내지 20 μ M의 여러 테스트 농도가 메탄올:물(90:10)에서 만들어진다. 테스트 용액은 혈장:포스페이트 버퍼(50:50)를 포함하는 예혼합(premixed) 기질에 첨가된다. IS를 포함하는 얇은 차가운 아세토니트릴 300 μ L으로 침전시키고, 와류시키고, 원심분리시킨다. 상등액을 취하여 LCMS로 주입한다.

[0160] 혈장 단백질 결합의 비율은 등식 (2)를 통하여 얻어졌다: % 비결합 분획=(버퍼면 상의 농도/시료면 상의 농도)*100

인간, 쥐 및 마우스에서 테스트 화합물(식-B)의 단백질 결합 및 리바록사반의 정량(표-7)						
시간(시)	인간		쥐		마우스	
	테스트 산물		테스트 산물		테스트 산물	
	테스트 산물	리바록사반 형성	테스트 산물	리바록사반 형성	테스트 산물	리바록사반 형성
유리 부분 (Free fraction) (%)	NA	1.34	NA	9.39	NA	8.41
% 결합	NA	98.66	NA	96.61	NA	91.59
관찰	검출 가능하지 않은 양의 테스트 산물, 혈장 안정성에 기반한, 리바록사반으로의 변환과 형성된 리바록사반의 혈장 단백질에 대한 높은 결합. 테스트 산물로부터 형성된 리바록사반은 리바록사반 단독인 것과 비교적으로 낮은 단백질 결합.	검출 가능하지 않은 양의 테스트 산물, 혈장 안정성에 기반한, 리바록사반으로의 변환과 형성된 리바록사반의 혈장 단백질에 대한 중간-높은 결합. 테스트 산물로부터 형성된 리바록사반은 리바록사반 단독인 것과 비교적으로 낮은 단백질 결합.	검출 가능하지 않은 양의 테스트 산물, 혈장 안정성에 기반한, 리바록사반으로의 변환과 형성된 리바록사반의 혈장 단백질에 대한 중간-높은 결합. 테스트 산물로부터 형성된 리바록사반은 리바록사반 단독인 것과 유사한 단백질 결합.			

[0161]

비교(표 7)

[0162] 인간, 쥐 및 마우스에서의 단백질 결합을 나타내고, 식 B의 상기 혈장 단백질 결합 분획은 쥐, 마우스 및 인간의 여러 종의 혈장 기질에서 결정된다. 이는 마우스, 쥐에서 인간까지의 종에 걸쳐 혈장 기질에서 식 B 화합물의 리바록사반으로의 변환 여부를 보기 위한 것뿐만 아니라 화합물 식 B, 혈장 결합을 보기 위한 것이다. 모든 세종류의 종에서 수행된 실험에서 리바록사반으로의 급격한 변환이 있었다. 식 B의 화합물의 무시할만한 양이 인-비트로 혈장 안정성 실험에서 관찰되었고 급격한 리바록사반으로의 변환이 인-비트로 조건에서 종 간에 걸쳐 관찰되었다. 형성된 리바록사반은 또한 종 간에 걸쳐 혈장 단백질에 결합된다.

5. Wistar 쥐에서의 정맥 및 구강 약동학

[0164] 물질의 투여 날 전에, 이소플루란(isofluran).RTM.마취하에서 혈액을 얻기 위한 카테터가 실험 동물(수컷 Wistar 쥐, 몸무게 200-250g)의 경정맥(jugular vein)에 이식되었다.

[0165] 실험 날에, 화합물 식 (B)의 정해진 용량이 용액으로 꼬리 정맥에 투여되고, 혈액 또는 용액으로서 블루스 투여 및 경구 투여하였다. 혈액 시료(8-12 시점)가 상기 물질의 투여 후 24시간에 걸쳐 카테터를 통해 순차적으로 채취되었다. 상기 투여 부피는 수컷 Wistar 쥐에서 경구의 경우 10ml/kg 및 IV의 경우 1ml/kg이다. 정맥 투여는 IV 주입(58%)의 경우 2% N-N 디메틸 아세트아미드/에탄올 10%/PEG400(30%)/물 제형을 통한 것이고 경구 투여의 경우 Tween80/PEG400/멸균 물을 통한 것이다.

[0166] 혈액의 제거는 IV의 경우 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 및 12시간 이후였고, 경구 투여의 경우는 0.25, 0.5, 1.0, 2, 3, 4, 6, 8 및 12시간 이후 혈액이 회수되었다.

[0167] 혈장은 혈관 처리된튜브/heparinized tube 내 시료를 원심분리하여 얻는다. IS를 포함하는 아세토니트릴은 단백질을 침전시키기 위해 시점마다 정해진 혈장 부피에 첨가된다. 원심분리 후, 화합물 식 (B) 및 상등액 내의 적절하고, 알려진 화합물 식 (B)의 분해 산물이 적절한 LC/MS-MS 방법을 이용하여 정량적으로 결정된다.

[0168] 측정된 혈장 농도는 테스트 물질 및 거기서 유리된 활성 성분 화합물 (A)의, AUC, C_{max}, T_{1/2}(반감기) 및 CL(청소율)과 같은 약동학적 파라미터를 계산하기 위해 사용된다.

[0169] 상기 화합물의 정맥 투여 후, 그 테스트 물질은 혈장 내에서, 심지어 첫 번째 측정점에서도 더 이상 탐지할 수 없었다. 오직 활성 성분만이 24시간 시점까지 탐지 가능하였다.

[0170] 상기 화합물의 경구 투여 후, 이러한 물질들은 더이상 혈장 내에서, 심지어 첫 번째 측정점에서도 더 이상 탐지할 수 없었다. 오직 활성 성분만이 24시간 시점까지 탐지 가능하였다.

[0171] IS를 포함하는 아세토니트릴이 연구 시료에 첨가되고, 교정(calibration) 시료 및 QC, 및 그 단백질이 아세토니트릴을 이용하여 침전되었다. 와류되고 4000rpm에서 원심분리되고 그 상등액은 LC-MS/MS(API 4000, AB Sciex)에 의해 주입되었다. 크로마토그래피에 의한 분리가 Shimadzu UFC-2000 상에서 수행된다. 그 주입 부피는 10 μl이다. 사용되는 분리 칼럼은 Phenomenex Gemini NX 4.6x5 μ, 100mm이고, 30°C의 온도로 조정된다. 800 μl/분에서 이 원 이동상(binary mobile phase) 구배가 사용된다(A: 0.1% 물 내 포름산, B:아세토니트릴: API 4000, ESI Agilent 1100 칼럼: Gemini Nx 100mm x 4.6 mm 5. μ; 칼럼 온도: 30°C.; 용리액 A: 0.1% 물 내 포름산, 용리액 B: 아세토니트릴; 구배: 0-2.5분 95% A, 5% B; 2.5-2.6분 5% A, 95% B; 2.6-4.2분 95% A, 5% B; 유속: 0.8 ml/분; ESI. Q1:464.098, Q3:144.255). 터보 V 이온 공급원(ion source)의 온도는 500°C이다. 이후 MS 설비 파라미터가 사용된다(instrument parameter): 커튼 가스(curtain gas) 20 단위, 이온 스프레이 전압 5kV, 가스 1 50 단위, 가스 2 50단위, CAD 가스 6단위. 상기 물질은 특정 MRM 실험의 추출된 이온 크로마토그램을 이용하여, 피크 높이 또는 영역에 의해 정량화된다.

[0172] 결정된 혈장 농도/시간 도표(plot)는, 검증된 약동학적 계산 프로그램을 이용하여 AUC, C_{max}, MRT(평균 잔류 시간), t_{1/2}(반감기) 및 CL(청소율)과 같은 약동학적 파라미터를 계산하기 위해 사용된다.

6. 정맥 투여를 위한 혈액

[0173] 조성물:

[0174] 본 발명에 따른 화합물 2.2 mg, 에탄올 0.22 (10%), PEG400 0.66ml (30%), 주입을 위한 물 1.27ml(58%) 및 2% N-N-디메틸 아세트아미드 0.04ml. 본 발명에 따른 화합물의 1mg의 일회 용량은 정맥 용액의 1ml에 상응한다.

[0175] 제조:

[0176] 화합물 식 (B)의 요구되는 양은 유리 바이알로 청량된다. 여기에, N,N 디메틸 아세트아미드가 첨가되었고 와류되었다. 이후 에탄올, PEG400이 첨가되었고 와류되었다. 마지막으로, 주입을 위한 물이 첨가되고, 혼합되고, 와류되고, 초음파처리되어 1mg/ml의 최종 농도가 달성된다. 그 최종 용액은 외관상 투명하고 무색이었다.

[0179] 7. 경구 투여를 위한 용액

[0180] 조성물:

[0181] 화합물 식 (B) 8.3, Tween 80, PEG400 및 주입을 위한 멸균된 물이 첨가되었다. 테스트 화합물의 요구되는 양은 유리 바이알로 청량된다. 여기에, N,N 디메틸 아세트아미드가 첨가되었고 와류되었다. 이후 에탄올, PEG400이 첨가되었고 와류되었다. 마지막으로, 주입을 위한 물이 첨가되고, 혼합되고, 와류되고, 초음파처리되어 1mg/ml의 최종 농도가 달성된다. 그 최종 용액은 외관상 투명하고 무색이었다.

[0182] 제조:

[0183] 화합물 식 (B)의 요구되는 양은 유리 바이알로 청량된다. 여기에, Tween 80이 첨가되고 와류되었다. 이후 에탄올, PEG400이 첨가되었고 와류되었다. 마지막으로, 주입을 위한 물이 첨가되고, 혼합되고, 와류되고, 초음파처리되어 0.5mg/ml의 최종 농도가 달성된다. 그 최종 용액은 외관상 투명하고 무색이었다.

[0184] 10mg/kg 용량에서 테스트 화합물의 정맥 투여 후의 리바록사반의 농도-시간 프로필

[0185] 표-8

리바록사반 단독 (표-8)			
PK 파라미터	단위	평균 IV (1 mg/kg)	평균 PO (10 mg/kg)
F	[%]	n.c.	81.99
AUC(0-t)	[ng/mL*h]	1002.09	8481.44
AUC	[ng/mL*h]	1102.73	9040.96
ΔAUC	[%]	7.11	6.01
C0(tdose)	[ng/mL]	581.14	n.c.
C(max)	[ng/mL]	n.c.	1420.27
t(max)	[h]	n.c.	1.42
t(½,Z)	[h]	6.08	5.70
MRT	[h]	3.38	6.29
CL	[mL/min/kg]	25.33	18.75
V(z)	[L/kg]	10.72	9.13

[0186] 10mg/kg 용량에서 테스트 화합물의 경구 투여 후의 리바록사반의 농도-시간 프로필

[0188]

표-9

유도체 (유도체의 투여로 형성된 리바록사반)			
PK 단위 파라미터		평균 IV (1 mg/kg)	평균 PO (10 mg/kg)
F	[%]	n.c.	26.95
AUC(0-t)	[ng/mL*h]	3859.31	10398.42
AUC	[ng/mL*h]	3906.91	10530.40
ΔAUC	[%]	1.51	1.49
C0(tdose)	[ng/mL]	559.12	n.c.
C(max)	[ng/mL]	n.c.	2022.31
t(max)	[h]	n.c.	1.67
t(½,z)	[h]	6.61	3.69
MRT	[h]	2.50	4.97
CL	[mL/min/kg]	4.47	17.63
V(z)	[L/kg]	2.78	5.84

[0189]

표 8 및 9는 화합물 식 B가 리바록사반에 비교하여 증가된 Cmax 뿐만 아니라 AUC의 측면에서 증가된 노출(exposure)을 보이는 것을 나타낸다. 이것은 화합물 식 B는 빠르게 흡수되고 즉시 리바록사반으로 변환된다는 것을 제안한다.

8. 항응고 활성의 결정

상기 테스트 물질(화합물 식-B) 및 리바록사반의 항응고 작용이 인 비트로에서 인간 혈장을 이용하여 결정되었다. 본 실험을 위해 사용된 상기 인간 혈장은, 항응고제(anticoagulant)로서 소듐 시트레이트에 모아진 혈액으로부터 분리되었다. 프로트롬빈 시간(PT)은 상업적 테스트 키트(Stagid로부터의 Neoplastin)를 이용하여 결정되었고 APTT는 IL이 제조한 Synthasil 키트를 이용하여 결정되었다. 사용되는 테스트 물질 및 리바록사반의 다양한 농도는, 대조군(control)으로서 그의 상응하는 용매와 함께, 0.1 내지 1.0 μ g/mL 였다. PT의 결정을 위해 상기 테스트 화합물 및 리바록사반은 혈장과 함께 37°C에서 10분간 배양되었다. 응고는 이후 트롬보플라스틴(thromboplastin)의 첨가와 함께 시작되었고 응고가 발생하는 시간이 결정되었다. 프로트롬빈 시간의 두 배 증가에 영향을 미쳤던 상기 테스트 물질의 농도가 결정되었다. PTT의 결정을 위해 상기 테스트 물질 및 리바록사반은 CaCl_2 가 첨가된 후 혈장과 함께 37°C에서 10분간 배양되었다. 그 분석 결과는 상기 테스트 화합물(화합물 식-B)가 상당한 항응고 활성을 갖는 것을 나타내었다.

본 발명의 일 구체예에서, 상기 식 B의 화합물은 일반적으로 하나 이상의 불활성, 비-독성, 약학적으로 적합한 부형제와 함께 약제에 포함될 수 있고 전술한 목적을 위한 이들의 용도에 대한 것일 수 있다.

상기 화합물은 전신적 및/또는 국소적 작용을 위해 투여될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 이들은, 예를 들면 경구, 비경구, 폐 또는 코 경로, 바람직하게는 경구와 같은 적절한 방법 및 형태로 투여될 수 있다.

경구 투여를 위한 적절한 투여 형태는 통상적인 기술에 따라 기능하고 본 발명에 따른 화합물을 빠르게 및/또는 수정된 방식으로 운반하고, 본 발명에 따른 화합물을, 예를 들면 정제(tablet)(비코팅 또는, 장용성(enteric) 코팅 또는 불용성 또는 지연된 용해성과 본 발명에 따른 화합물의 방출을 제어하는 코팅을 갖는 코팅된 정제), 입에서 빠르게 분해되는 정제, 또는 필름/웨이퍼, 필름/동결건조(lyophilizate), 캡슐(예를 들면 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐), 당-코팅된 정제, 과립, 펠릿, 파우더, 에멀전, 혼탁액, 에어로졸 또는 용액인 결정 및/또는 무정형 및/또는 용해된 형태로 포함하는 투여형태이다.

[0196] 9. Wistar 쥐에서의 정맥 및 경구 배출 프로필:

[0197] 상기 물질의 투여 날 전에, 이소플루란(isofluran) 마취하에서 혈액을 얻기 위한 카테터가 실험 동물(수컷 Wistar 쥐, 몸무게 200-250g)의 경정맥에 이식되었다.

[0198] 실험 날에, 화합물 식 (B)의 정해진 용량이 용액으로 꼬리 정맥에 투여되고, 혼탁액 또는 용액으로서 블루스 투여 및 경구 투여되었다.

[0199] 소변 및 대변이 대사 상기 물질의 투여 후 144시간에 걸쳐 대사 케이지(metabolic cage)로부터 채취된다. 상기 투여 부피는 수컷 Wistar 쥐에서 경구의 경우 10ml/kg 및 IV의 경우 1ml/kg이다. 정맥 투여는 IV 주입(58%)의 경우 2% N-N 디메틸 아세트아미드/에탄올 10%/PEG400(30%)/물 혼합을 통한 것이고 경구 투여의 경우 Tween80/PEG400/멸균 물을 통한 것이다. 소변 및 대변 채취는 IV의 경우 및 경구 투여의 경우 0-4, 4-8, 8-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144이다.

[0200] 소변 및 대변은 처리되고 IS를 포함하는 아세토니트릴이 정해진 소변/대변에 첨가되고 침전되었다. 원심분리 후, 상등액 내의 화합물 식 (B) 및, 적절하고, 알려진 화합물 식 (B)의 분해 산물이 적절한 LC/MS-MS 방법을 이용하여 정량적으로 결정된다.

[0201] 측정된 소변 및 대변 농도는 테스트 물질 및 거기서 유리된 활성 성분 화합물 (A)의, AUC, C_{max} 와 같은 파라미터를 계산하기 위해 사용된다.

[0202] 상기 화합물의 정맥 투여 후, 그 테스트 물질은 소변 및 대변 내에서, 심지어 첫 번째 측정점에서도 더 이상 탐지할 수 없었다. 오직 그 활성 성분만이 소변 및 대변 모두에서 탐지 가능하였다.

[0203] 상기 화합물의 경구 투여 후, 이러한 물질들은 더 이상 소변 및 대변 내에서, 심지어 첫 번째 측정점에서도 더 이상 탐지할 수 없었다. 오직 활성 성분(실시예 1)만이 대변뿐만 아니라 소변 내에서 탐지 가능하였다.

[0204] IS를 포함하는 아세토니트릴이 연구 시료에 첨가되고, 교정 시료 및 QC, 및 그 단백질이 아세토니트릴을 이용하여 침전되었다. 와류되고, 원심분리되고 그 상등액은 LC-MS/MS(API 4000, AB Sciex)에 의해 주입되었다. 크로마토그래피에 의한 분리가 Shimadzu UFLC 상에서 수행된다. 그 주입 부피는 10 μ l이다. 사용되는 분리 칼럼은 Phenomenex Gemini NX 4.6x5 μ , 100mm이고, 30°C의 온도로 조정된다. 800 μ l/분에서 이원 이동상 구배가 사용된다(A: 0.1% 물 내 포름산, B: 아세토니트릴: API 4000, ESI Agilent 1100 칼럼: Gemini Nx 100mm x 4.6 mm 5. μ ; 칼럼 온도: 30°C.; 용리액 A: 0.1% 물 내 포름산, 용리액 B: 아세토니트릴; 구배: 0-2.5분 95% A, 5% B; 2.5-2.6분 5% A, 95% B; 2.6-4.2분 95% A, 5% B; 유속: 0.8 ml/분; ESI. Q1:464.098, Q3:144.255). 터보 V 이온 공급원의 온도는 500°C이다. 이후 MS 설비 파라미터가 사용된다: 커튼 가스 20 단위, 이온 스프레이 전압 5kV, 가스 1 50 단위, 가스 2 50단위, CAD 가스 6단위. 상기 물질은 특정 MRM 실험의 추출된 이온 크로마토그램을 이용하여, 피크 높이 또는 영역에 의해 정량화된다.

[0205] 10. 정맥 투여를 위한 혼탁액

[0206] 조성물:

[0207] 본 발명에 따른 화합물 2.2 mg, 에탄올 0.22 (10%), PEG400 0.66ml (30%), 주입을 위한 물 1.27ml(58%) 및 2% N-N-디메틸 아세트아미드 0.04ml. 본 발명에 따른 화합물의 1mg의 일회 용량은 정맥 용액의 1ml에 상응한다.

[0208] 제조:

[0209] 테스트 화합물의 요구되는 양은 유리 바이알로 청량된다. 여기에, N,N 디메틸 아세트아미드가 첨가되었고 와류되었다. 이후 에탄올, PEG400이 첨가되었고 와류되었다. 최종적으로, 주입을 위한 물이 첨가되고, 혼합되고, 와류되고, 초음파처리되어 1mg/ml의 최종 농도가 달성된다. 그 최종 용액은 외관상 투명하고 무색이었다.

[0210] 11. 경구 투여를 위한 용액:

[0211] 조성물:

[0212] 화합물 식 (B), Tween 80, PEG400 및 주입을 위한 멸균된 물이 첨가되었다. 테스트 화합물의 요구되는 양은 유리 바이알로 청량된다. 여기에, N,N 디메틸 아세트아미드가 첨가되었고 와류되었다. 이후 에탄올, PEG400이 첨가되었고 와류되었다. 최종적으로, 주입을 위한 물이 첨가되고, 혼합되고, 와류되고, 초음파처리되어 1mg/ml의 최종 농도가 달성된다. 그 최종 용액은 외관상 투명하고 무색이었다.

[0213] 제조:

[0214] 화합물 식 (B)의 요구되는 양은 유리 바이알로 청량된다. 여기에, Tween 80이 첨가되고 와류되었다. 이후 에탄올, PEG400이 첨가되었고 와류되었다. 마지막으로, 주입을 위한 물이 첨가되고, 혼합되고, 와류되고, 초음파처리된다. 그 최종 용액은 외관상 투명하고 무색이었다.

[0215] 1 mg/kg 용량에서 테스트 화합물(화합물 식 B)의 정맥 투여 및 10 mg/kg 용량에서 테스트 화합물의 구강 투여 후의 리바록사반의 농도-시간 프로필

표-10(A)

그룹	동물 무게 (g)	투여량 (mg/kg)	투여 부피 (mL/kg)	투여 농도 (mg/mL)	투여 경로	동물 수	소변/대변 시료 시간 (h)
1	250-300	1	1	1	i.v.	3	0-4, 4-8, 8-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144
2	250-300	10	10	1	p.o.	3	0-4, 4-8, 8-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144

[0217]

[0218]

표-10(B)

시간 [h]	리바록사반 (IV 1 mg/Kg)		리바록사반 (PO 10 mg/Kg)		유도체 (IV 1 mg/Kg)		유도체 (PO 10 mg/Kg)	
	평균 (ng)	평균 (ng/G)	평균 (ng)	평균 (ng/G)	평균 (ng)	평균 (ng/G)	평균 (ng)	평균 (ng/G)
	소변	대변	소변	대변	소변	대변	소변	대변
4	559.4	442.8	2381.3	5458.8	345.5	3122.7	1200.6	9675.3
8	28.9	1442.0	1770.9	19583.2	447.0	911.6	1828.5	11184.7
24	169.4	1328.8	1838.1	236961.7	451.5	614.6	3296.0	6274.2
48	333.6	342.8	464.5	35049.4	24.6	164.5	1166.5	4881.3
72	539.5	110.7	236.1	6655.8	20.0	7.4	130.8	360.4
96	41.9	32.6	22.9	2291.2	7.1	3.3	92.5	5.0
120	BLQ	40.3	48.4	63.9	BLQ	5.2	30.6	45.0
144	BLQ	16.8	30.4	57.4	4.2	BLQ	29.7	70.7
결과 요약								
		경구 (10mg/kg)			IV(1mg/kg)			
		리바록사반	유도체	리바록사반	유도체			
소변 (ng)		6720.4	7744.6	1425.9	1152.8			
대변 (ng/g)		408546.9	32503.0	2937.9	4974.9			
혈장-AUC		9041.0	10530.4	1102.7	3906.9			
소변 평균 AUC		76389.7	121079.3	20998.3	55548.0			
대변 평균 AUC		8189000.0	354379.0	12537.0	30631.7			
T _{max}		1.4	1.7	581.2	559.1			

[0219]

표 10(A), 10(B) 및 10(C)는 테스트 화합물(화합물 식-B)의 혈장 노출이 리바록사반보다 높은 것을 나타낸다. 상기 리바록사반 및 테스트 화합물(화합물 식-B)의 소변 배출 프로필은 유사한 배출 프로필을 나타냈지만 흡수되지 않은 리바록사반이 테스트 산물(화합물 식-B)의 경구 투여에 비해 더 적었다.

[0220]

화합물 식 (B)는, 리바록사반 단일의 경우와 비교하여 대변 내에 적은 양의 리바록사반이 존재하는 것을 보여주었다. 이는 리바록사반에 비교하여 혈장 내에서 높은 노출을 갖는 것 및 대변 내에 낮은 배출을 갖는 장점을 나타낸다.