

명세서

발명의 명칭: 이나보글리플로진의 신규한 공결정

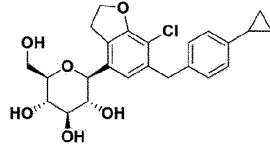
기술분야

- [1] 본 발명은 이나보글리플로진의 공결정에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 약학적으로 허용 가능한 염(salt form), 공결정(co-crystal), 결정다형(polymorph), 의사 결정다형(pseudo-polymorph) 등 활성성분의 바람직한 고체형태의 선정은 원료의약품 제조 공정 개발과 완제의약품 제형 설계 및 제형에 매우 중요한 영향을 준다.
- [3] 구체적으로 원료의약품의 염, 공결정, 결정다형, 의사 결정다형은 원료의약품 제조의 최종 단계, 즉, 재결정 및 정제 과정에서 재결정 수율, 공정속도 및 순도에 까지 영향을 미친다. 결정의 크기나 모양에 따라 결정화 공정에서의 속도가 달라질 수 있으며 이는 생산성 및 제조원가에 영향을 미치게 된다.
- [4] 또한, 약제학적 측면에서는 흡습성, 안정성, 용해도, 입자의 흐름성, 용출률 등의 물리화학적 특성이 염, 공결정, 결정다형, 의사 결정다형 등에 영향을 받게 되어 완제의약품의 생산공정, 생산 및 보관조건, 유통기한 등을 결정하는 요인이 된다.
- [5] 한편 약물의 생체이용률이 원료의약품의 물리화학적 특성에 영향을 받는 경우에는 염, 공결정, 결정다형, 의사 결정다형 등의 선정에 더욱 주의가 요구되기 때문에 최적화된 염, 공결정, 결정다형, 의사 결정다형은 기술개발 및 허가 측면에서의 매우 중요하다.
- [6] 본 발명은 이나보글리플로진의 신규한 공결정을 탐색하고 물리화학적 특징을 분석하여 약리학적 활성을 극대화시킬 수 있는 공결정을 개발하여 기존 결정다형의 단점인 낮은 용해도를 개선하는데 그 목적을 둔다.
- [7] SGLT-2(sodium glucose cotransporter 2)는 SGLT-1(sodium glucose cotransporter 1)과 함께 신장에서의 과도한 혈당 재흡수를 담당하고 있는 수송체이며, SGLT-2가 대부분의 역할을 담당하고 있다. 따라서, SGLT-2 저해제가 SGLT-2 수송체를 억제시키면 소변으로 배출되는 혈당이 늘어나게 되며, 결국 혈당이 낮아지고 더 나아가 혈당이 갖고 있는 칼로리가 배출되어 체중감소의 효과가 발생된다.
- [8] 이와 같은 효과로 제2형 당뇨병 치료제로서 유용하게 사용될 수 있는 SGLT-2 억제제로 개발된 약물 중 하나가 하기 구조식(화학식 1)로 표시되는 이나보글리플로진(Enavogliflozin)이며, 대한민국 공개특허공보 제2014-0022086호(특허문헌 1)에 개시된 바 있다.
- [9] [화학식 1]

[10]



[11] 또한, 대한민국 공개특허공보 제2017-0142904(특허문헌 2)에 이나보글리플로진 결정형과 이나보글리플로진 결정형을 제조하기 위한 제조 방법이 개시된 바 있다.

[12] 그러나 대한민국 공개특허공보 제2017-0142904(특허문헌 2)에 개시된 이나보글리플로진 결정형은 용해도가 0.25mg/mL 밖에 되지 않는 단점이 있다.

[13] 이에, 본 발명자들은 이나보글리플로진의 용해도를 개선할 수 있는 공결정에 대한 연구를 진행한 결과, 특정 공결정 형태로 제조 시 안정성도 우수하면서 용해도도 향상시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[14] [선행기술문헌]

[15] [특허문헌]

[16] 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제2014-0022086호

[17] 특허문헌 2. 대한민국 공개특허공보 제2017-0142904호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

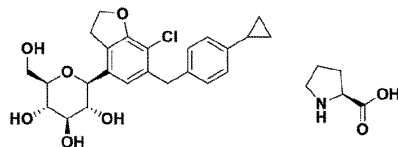
[18] 본 발명은 안정성 및 용해도가 우수한 이나보글리플로진의 신규한 공결정 및 이의 제조방법을 제공하기 위한 것이다. 본 발명은 또한 상기 이나보글리플로진의 신규 공결정을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[19] 본 발명은 하기 구조식(화학식 2)로 표시되는 이나보글리플로진의 신규 공결정 및 이의 제조방법을 제공한다.

[20] [화학식 2]

[21]



[22] 본 발명자들은 이나보글리플로진의 낮은 용해도를 극복하고자 용해도가 매우 높으며, NH, N, O, OH가 풍부한 아미노산 및 유기산을 선정하여 공결정 설계를 시도하였다.

[23] 공결정 제조를 위해 선정한 아미노산 및 유기산은 아스파르트산, 아세틸살리실산, 구연산, 니코틴산, 니코틴아미드, 베타-시클로텍스트린, 프로필렌글리콜, 페닐알라닌, 유당일수화물, L-프롤린, 요소, L-라이신, L-피로글루탐산, 오르토산일수화물, 말레산, 말산, L-아스코르빈산, 푸마르산, 숙신산, 말론산, 옥살산삼수화물, L-주석산, 염화나트륨, L-세린, L-아르기닌, L-발린, L-메티오닌, 트레오닌, 글

리신, L-알라닌, L-시스테인, L-트립토판, L-아스파라긴, L-이소류신, L-글루타민, L-히스티딘, L-글루타민산이다.

- [24] 위의 38종의 아미노산 및 유기산을 대상으로 이나보글리플로진의 공결정 제조를 시도하였고, 이 중 이나보글리플로진/프롤린 공결정, 이나보글리플로진/메티오닌 공결정, 이나보글리플로진/프롤린수화물로 3종의 공결정을 확보할 수 있었다.
- [25] 이나보글리플로진/프롤린 공결정, 이나보글리플로진/메티오닌 공결정, 이나보글리플로진/프롤린수화물 공결정에 대해 pH 1.2와 pH 6.8 용출액에서 용해도 평가를 진행한 결과 이나보글리플로진/프롤린 공결정, 이나보글리플로진/메티오닌 공결정, 이나보글리플로진/프롤린수화물 3종의 공결정이 이나보글리플로진 결정형보다 초기 2시간까지의 용해도가 높아 공결정을 통해 초기 용해도가 개선된 것을 확인할 수 있었다.
- [26] 그러나 이나보글리플로진/프롤린수화물 공결정은 스케일업(scale-up) 시 공결정 제조 재현성이 떨어지는 문제점이 있었고, 이나보글리플로진/메티오닌 공결정은 용점이 106°C로 낮아 안정성이 떨어질 것으로 예상되었다. 실제 60°C에서 4주간의 가속 안정성 실험 결과, 이나보글리플로진/메티오닌 공결정은 4주만에 순도가 약 3% 감소하여 이나보글리플로진 결정형 및 이나보글리플로진/프롤린 공결정보다 안정성이 떨어지는 것을 확인하였다. 이를 통해 이나보글리플로진/프롤린 공결정이 안정성 및 용해도가 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.
- [27] 실험적 최적화를 통해 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 재현성 있게 제조하는 방법을 확립하였으며, 이렇게 제조한 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 기존 이나보글리플로진 결정형 보다 인공위액에서의 용해도가 약 21%, 인공장액에서의 용해도가 약 2배 이상 증가되었으며 초기 용해도도 높아진 결과를 확보할 수 있었다. 또한, 상기 용해 특성으로 인하여 경구 흡수 효과 및 실제 마우스 약동학적 실험에서 개선된 효과를 확인할 수 있었다.
- [28] 따라서, 본 발명의 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 사용하면 이나보글리플로진의 용해도를 개선시킨 경구제의 제조가 가능하다. 이나보글리플로진의 용해도 개선은 고용량 투여를 필요로 하는 적응증을 위한 경구제 개발에 유리할 수 있다.
- [29] 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 수소결합에 의해 한 분자의 이나보글리플로진과 한 분자의 프롤린(L-프롤린)이 1:1 비율로 공결정을 형성한다.
- [30] 높은 수용해도를 갖는 프롤린이 이나보글리플로진과 수소결합으로 인해 공결정을 형성함으로써, 프롤린과의 상호작용으로 인해 프롤린이 용해될 때 이나보글리플로진도 함께 물에서 용해되기 때문에, 수용해도 및 인공위액 및 인공장액에서의 용해도가 증가되는 것이다.
- [31] 본 발명의 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 어디에도 보고된 바 없는 이나보글리플로진의 신규한 고체형태이다.

- [32] 본 발명의 일 구체예에서는, X선 회절(PXRD)분석에서 4.72 ± 0.2 , 6.81 ± 0.2 , 7.93 ± 0.2 , 8.59 ± 0.2 , 14.75 ± 0.2 , 15.21 ± 0.2 , 17.23 ± 0.2 , 18.80 ± 0.2 , 21.19 ± 0.2 , 24.42 ± 0.2 및 27.29 ± 0.2 로부터 선택되는 2θ 값에서 4개 이상, 예컨대, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 이상의 회절 피크를 가지는 X선 분말 회절 패턴으로 특정되는 것을 특징으로 하는 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 제공한다.
- [33] 특히, 상기 X선 분말 회절 패턴은 6.81 ± 0.2 , 8.59 ± 0.2 , 14.75 ± 0.2 , 17.23 ± 0.2 , 및 18.80 ± 0.2 로부터 선택되는 2θ 값에서 회절 피크를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [34] 보다 구체적으로, 상기 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 하기 표 1에 열거된 피크 위치들과 피크 위치가 일치되는 X선 분말 회절 패턴으로 특정되는 것을 특징으로 한다.

[35] [표1]

$2\theta(\pm 0.2^\circ)$	d (Å)	I/I ₀ (%)
4.72	18.7	33.3
6.81	13.0	100.0
7.93	11.1	47.0
8.59	10.3	63.1
14.75	6.0	81.6
15.21	5.8	31.0
17.23	5.1	50.9
18.80	4.7	63.2
21.19	4.2	22.5
24.42	3.6	28.3
27.29	3.3	25.4

- [36] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 온도시차주사 열량(DSC) 분석에서 흡열개시온도 $217.71^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 및 흡열온도 $219.42^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 의 흡열피크를 보이는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 이나보글리플로진 1당량에 1당량의 프롤린이 결합된 형태이다. 핵자기공명분광(NMR)분석에 따르면, 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 이나보글리플로진 1분자와 프롤린 1분자로 이루어진 것임을 H-NMR 스펙트럼상 확인할 수 있다.
- [37]
- [38] 본 발명의 다른 구체예는 상기 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 제조 방법을 제공한다.
- [39] 이에 제한되는 것은 아니나, 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 (a) 이나보글리플로진 및 유기용매를 혼합하고 이에 프롤린을 첨가하는 단계; (b) 상기 단계

(a)의 결과물을 교반하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 진공건조하고 이나보글리플로진 공결정을 수득하는 단계를 포함하는 과정에 의해 제조된다.

[40] 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 제조하기 위한 본 발명의 방법을 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[41]

[42] (a) 이나보글리플로진 및 유기용매 혼합 및 프롤린의 첨가

[43] 우선, 본 발명의 방법은 고형의 이나보글리플로진 및 유기용매를 혼합하고 이에 프롤린을 첨가하는 단계를 포함한다. 여기에서 사용되는 고형의 이나보글리플로진의 물리화학적 형태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 고형의 이나보글리플로진은 대한민국 공개특허공보 제2017-0142904호의 실험예 4를 통하여 다음과 같은 X선 회절 스펙트럼을 갖는 것으로 보고된 이나보글리플로진 결정형 A, 결정형 B, 결정형 C, 결정형 D, 또는 이나보글리플로진 무정형일 수 있다.

[44] 결정형 A: $6.2^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $7.2^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $8.8^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $17.6^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $19.0^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $22.5^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 및 $25.1^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 로부터 선택되는 $2[\theta]$ 값에서의 피크들을 포함하는 X-선 회절(XRD) 스펙트럼을 갖는 결정형

[45] 결정형 B: $7.0^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $14.9^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $17.7^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $18.8^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $20.6^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $21.8^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 및 $23.5^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 로부터 선택되는 $2[\theta]$ 값에서의 피크들을 포함하는 X-선 회절(XRD) 스펙트럼을 갖는 결정형

[46] 결정형 C: $5.6^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $7.3^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $15.7^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $17.2^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $18.9^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $21.2^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 및 $21.9^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 로부터 선택되는 $2[\theta]$ 값에서의 피크들을 포함하는 X-선 회절(XRD) 스펙트럼을 갖는 결정형

[47] 결정형 D: $5.5^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $7.2^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $15.3^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $17.2^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $17.6^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $18.9^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 및 $21.1^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 로부터 선택되는 $2[\theta]$ 값에서의 피크들을 포함하는 X-선 회절(XRD) 스펙트럼을 갖는 결정형

[48] 상기 결정형 A, B, C 및 D는 각각 상기 제시된 $2[\theta]$ 값에서 4개 이상, 예컨대, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 이상의 피크를 가지는 X-선 회절 스펙트럼으로 특정 가능하다.

[49]

[50] 상기 단계 (a)의 유기용매는 이나보글리플로진과 프롤린 각각을 잘 용해시킬 수 있으면서, 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 생성시킬 수 있는 유기용매이면 어떠한 것이든 사용가능하다. 높은 수율로 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 생성시키고, 과량으로 사용된 프롤린의 제거에도 효과적인 용매로 검증된 유기용매는 메탄올, 에탄올, 이소프로필알콜, 1-부탄올, 아세톤, 테트라하이드로퓨란, 아세토니트릴, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, MTBE(Methyl t-Butyl ether), 톨루엔, 및 디옥산으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유기용매일 수 있다. 유기용매는 단일 용매 또는 혼합 용매일 수 있다.

[51] 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 이소프로필알콜 및 아세톤으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다. 보다 바람직하게는 상기 유기용매는 에탄올일 수 있다.

- [52] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 단계 (a)의 유기용매는 이나보글리플로진의 중량 대비 10배 이상의 부피, 예를 들어, 이나보글리플로진의 중량 대비 10배 내지 200배, 예컨대, 이나보글리플로진의 중량 대비 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 120배, 150배, 200배의 부피로 사용될 수 있다.
- [53] 유기용매의 종류, 또는 단일 용매/혼합 용매로의 사용 여부에 따라 유기용매의 사용량은 달라질 수 있다. 예를 들어, 메탄올, 디옥산, 테트라하이드로퓨란의 경우 이나보글리플로진의 중량 대비 10배의 용매만으로도 공결정을 생성시킬 수 있다. 에탄올, 이소프로필 알코올, 1-부탄올, 아세톤, 아세토니트릴의 경우 이나보글리플로진의 중량 대비 50배의 용매량에서도 공결정이 생성되었다. 에틸 아세테이트를 용매로 사용할 경우 이나보글리플로진의 용해도가 낮아 이나보글리플로진의 중량 대비 50배 수준에서 가온 후 결정화가 필요하다. 디클로로메탄 또한 이나보글리플로진의 용해도가 낮아 이나보글리플로진의 중량 대비 100배 수준의 용매가 필요하다. MTBE나 톨루엔의 경우에는 이나보글리플로진의 이들 용매에 대한 용해도가 매우 낮아 이나보글리플로진의 중량 대비 150배 이상의 용매가 필요하다.
- [54] 따라서, 용매에 대한 이나보글리플로진의 용해도와 공결정 생성 정도를 고려하여 유기용매의 종류와 혼합 여부를 선택하고 유기용매의 사용량을 조절할 수 있다. 또한 필요에 따라, 이나보글리플로진의 용해를 위한 가온이 병행될 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 유기용매는 에탄올이고, 이나보글리플로진의 중량 대비 10배 내지 60배의 부피로 사용될 수 있다.
- [56] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 프롤린은 이나보글리플로진에 대하여 1 내지 1.5 당량의 물비로 첨가된다.
- [57] (b) 상기 결과물의 교반
- [58] 그 다음, 본 발명의 방법은 상기 단계 (a)의 결과물을 교반하는 단계를 포함한다.
- [59] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 상기 단계 (b)의 교반은 0 내지 50°C 예를 들어, 15 내지 40°C, 바람직하게는 15 내지 30°C, 보다 바람직하게는 20 내지 25°C에서 실시할 수 있다.
- [60] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기 단계 (b)의 교반은 0.5 내지 24시간, 바람직하게는 1시간 내지 12시간, 보다 바람직하게는 4시간 내지 8시간 동안 실시할 수 있다.
- [61] (c) 상기 결과물의 진공 건조 및 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 수득
- [62] 마지막으로, 본 발명의 방법은 상기 단계 (b)의 결과물을 진공 건조하고 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 수득하는 단계를 거친다.
- [63] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기 단계 (c)의 진공 건조는 온도 30 내지 65°C, 바람직하게는 온도 40 내지 55°C, 보다 바람직하게는 45 내지 50°C에서 8시간 내지 12시간 동안 실시할 수 있다.

- [64] 이러한 방법으로 SGLT-2 억제제로서 신장에서 혈당의 재흡수를 억제시켜 혈당을 소변으로 배출하도록 하여 혈당을 조절하는 제2형 당뇨병의 치료제로서 이용 가능한 이나보글리플로진 1당량에 1당량의 프롤린이 결합된 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 제조할 수 있다.
- [65] 본 발명은 또한 유효성분으로서 상기 이나보글리플로진/프롤린 공결정, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [66] 상기 약제학적 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나 당뇨병 치료 또는 예방을 위한 것일 수 있다.
- [67] 본 발명에 따른 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

발명의 효과

- [68] 본 발명의 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 이나보글리플로진의 인공위액 및 인공장액에서의 용해도를 증가시켰다. 이러한 이나보글리플로진의 용해도 개선은 고용량 투여를 필요로 하는 적응증을 위한 경구제 개발에 특히 유리할 수 있다. 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 그 안정성 또한 기존 이나보글리플로진의 결정형과 동일하여 이나보글리플로진 원료의약품으로서 매우 유용하다. 또한, 본 발명의 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 기존 결정형 A 대비 반감기가 길고 체내 노출(AUC_{inf})이 높아 약효가 더 오래 지속되기 때문에, 이를 필요로 하는 다양한 적응증 및/또는 제형 개발에 있어서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [69] 도 1은 제조예 2에 따라 제조된 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 핵자기공명분광(NMR) H-NMR 스펙트럼 결과를 보여준다.
- [70] 도 2는 제조예 1에 따라 제조된 이나보글리플로진 결정형 A의 핵자기공명분광(NMR) H-NMR 스펙트럼 결과를 보여준다.
- [71] 도 3은 제조예 2에 따라 제조된 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 분말 X선 회절(PXRD) 패턴 결과를 보여준다.
- [72] 도 4는 제조예 1에 따라 제조된 이나보글리플로진 결정형 A의 분말 X선 회절(PXRD) 패턴 결과를 보여준다.
- [73] 도 5는 제조예 2에 따라 제조된 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 온도시차주사열량(DSC)의 열량곡선 결과를 보여준다.
- [74] 도 6은 본 발명의 실시예에 따라 제조된 이나보글리플로진/프롤린 공결정, 프롤린, 이나보글리플로진 결정형의 온도시차주사열량(DSC)의 열량곡선 결과를 보여준다.
- [75] 도 7은 본 실시예에 따라 제조된 이나보글리플로진/프롤린 공결정과 이나보글리플로진 결정형의 인공장액에서의 용해도 비교를 보여준다.

발명의 실시를 위한 형태

[76] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[77]

[78] **[제조예 1] 이나보글리플로진 결정형 A의 제조**

[79] 대한민국 공개특허공보 제2017-0142904호의 실험예 4를 통하여 보고된 이나보글리플로진 결정형 A를 제조하였다.

[80] 미정제의 이나보글리플로진에 에틸아세테이트(미정제 이나보글리플로진 무게대비 15배)를 넣고 환류 교반하여 용해한 후 실온으로 냉각하였다. 실온에서 현탁액이 형성된 후 30분 동안 추가로 교반하였다. 생성된 혼합물에 이소프로필 에테르(미정제 이나보글리플로진 무게대비 15배)를 30분에 걸쳐 적가하고, 실온에서 30분간 추가 교반하였다. 생성된 침전물을 여과하고, 0°C 에틸아세테이트(이나보글리플로진 무게대비 2배)로 세척한 후, 진공 오븐(50°C, 12시간)에서 건조하여 흰색 결정을 수득하였다(수율: 88.3%).

[81] **[제조예 2] 이나보글리플로진/프롤린 공결정 제조**

[82] 이나보글리플로진 결정형 A 300mg과 에탄올 10ml를 넣은 후 상온에서 20분간 교반한다. 그 후 L-프롤린 77.3 mg (1당량)을 투입하고 20°C-25°C에서 1시간 동안 교반 하였다. 석출된 결정을 감압 여과 후 에탄올 1ml로 세척하고 50°C에서 12시간 진공 건조하여 결정형 형태의 이나보글리플로진/프롤린 공결정을 78% 수율로 얻었다.

[83] **[제조예 3] L-Proline 공결정 형성을 위한 13종 용매 평가**

[84] 이나보글리플로진 결정형 A 100mg(0.224 mmol, 1당량)을 각각의 용매에 용해한 후 L-프롤린(0.224 mmol, 1당량)을 실온에서 투입하고, 1시간 이상 교반하여 프롤린 공결정의 형성을 평가하였다.

[85] [표2]

용매	용매 사용량	공결정 생성여부
메탄올	10 mL	O
에탄올	5 mL	O
이소프로필알콜	5 mL	O
1-부탄올	5 mL	O
아세톤	5 mL	O
테트라하이드로퓨란	1 mL	O

아세토니트릴	5 mL	O
에틸 아세테이트	15 mL 이상	O
디클로로메탄	10 mL 이상	O
MTBE(Methyl t-Butyl ether)	15 mL	O
톨루엔	15 mL	O
디옥산	1 mL	O
DMSO	0.1 mL	X

- [86] 메탄올, 디옥산, 테트라하이드로퓨란의 경우 이나보글리플로진의 중량 대비 10배의 용매량에도 이나보글리플로진이 완전하게 용해되었고, L-프롤린을 투입하면 공결정으로 석출되었다. 에탄올, 이소프로필 알코올, 1-부탄올, 아세톤, 아세토니트릴의 경우 이나보글리플로진의 중량 대비 50배의 용매량에서도 공결정이 생성되었다.
- [87] 에틸 아세테이트와 디클로로메탄은 이나보글리플로진을 녹이기 위해서 다량의 용매가 사용되었어야 했고, L-프롤린을 투입하면 공결정으로 석출됨을 확인할 수 있었다. 에틸 아세테이트를 용매로 사용할 경우 이나보글리플로진의 용해도가 낮아 이나보글리플로진의 중량 대비 50배 수준에서 가온 후 결정화가 필요한 것으로 확인되었다. 디클로로메탄 또한 이나보글리플로진의 용해도가 낮아 이나보글리플로진의 중량 대비 100배 수준의 용매가 필요한 것으로 확인되었다.
- [88] MTBE나 톨루엔의 경우에는 이나보글리플로진의 이들 용매에 대한 용해도가 매우 낮아 이나보글리플로진의 중량 대비 150배 이상의 용매가 사용되었어야 하나 L-프롤린을 투입하면 공결정이 서서히 생성됨을 확인할 수 있었다.
- [89] 반면, DMSO의 경우에는 공결정에 대한 용해도가 높아 석출되지 않는 것으로 확인되었다.
- [90] 용매의 극성에 따른 용해도에 따라 용매량의 조절이 필요하였으나 물, DMSO와 같이 이나보글리플로진, L-프롤린 및 공결정의 용해도에 영향을 미치는 용매의 경우에는 프롤린 공결정을 얻을 수 없었지만 일정 정도의 용해도를 보일 경우 프롤린 공결정을 확보할 수 있었다.
- [91] **[실험예 1] 핵자기공명분광(NMR) 스펙트럼**
- [92] 제조예 2에 따라 얻어진 결정형 형태의 이나보글리플로진에 대해 핵자기공명분광(NMR) H-NMR 스펙트럼을 측정하였다. 그 결과, 도 1에서 볼 수 있는 바와 같은 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 핵자기공명분광(NMR) H-NMR 스펙트럼 결과를 얻을 수 있었다. 도 2는 제조예 1의 이나보글리플로진 결정형 A의 핵자기공명분광(NMR) H-NMR 스펙트럼 결과를 보여준다. 도 1에 따르면, 이나보글리플로진/프롤린의 화학양론적 비율이 1:1로 정확하게 그 피크가 적분되어 나타나, 제조예 2에 따라 얻어진 결정형 형태의 이나보글리플로진이 이나보글리플로진/프롤린 공결정임을 확인할 수 있다.

[93] [실험예 2] 분말 X-선 회절 (PXRD)

[94] 제조예 2에 따라 얻어진 이나보글리플로진/프롤린 공결정에 대해 Bruker PXRD (30kV, 10 mA, Cu target)을 이용하여 PXRD를 측정하였다. 0.02° Step size로 $5\sim 40^\circ$ 2 θ Scan 하여 도 3의 결과를 얻었다. 주요 피크를 요약하면 아래 표 3과 같다. 도 3에 따른 PXRD 결과는 제조예 1의 이나보글리플로진 결정형 A의 PXRD 결과 (도 4)와는 명확히 구분되었다.

[95] [표3]

2 θ ($\pm 0.2^\circ$)	d (Å)	I/I _o (%)	2 θ ($\pm 0.2^\circ$)	d (Å)	I/I _o (%)
4.72	18.7	33.3	17.23	5.1	50.9
5.81	15.2	4.9	18.80	4.7	63.2
6.81	13.0	100.0	20.63	4.3	16.7
7.93	11.1	47.0	21.19	4.2	22.5
8.59	10.3	63.1	21.75	4.1	9.5
11.11	8.0	6.8	22.31	4.0	8.9
12.01	7.4	6.0	24.42	3.6	28.3
13.60	6.5	6.2	25.17	3.5	11.7
14.75	6.0	81.6	26.00	3.4	12.3
15.21	5.8	31.0	27.29	3.3	25.4
16.11	5.5	9.0	27.98	3.2	14.5

[96] [실험예 3] 온도 시차주사 열량법 (DSC)

[97] TA사로부터 입수한 DSC Q20을 사용하여, 질소 가스 하에서 30°C 에서 300°C 까지 10°C 의 스캔속도로, 제조예 1에 따라 제조된 이나보글리플로진 결정형 A와 제조예 2에 따라 얻어진 이나보글리플로진/프롤린 공결정에 대해 DSC 측정을 하였다. 도 5는 제조예 2에 따라 제조된 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 온도시차주사열량(DSC)의 열량곡선 결과를 보여준다. 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 온도시차주사 열량(DSC) 분석에서 흡열개시온도 $217.71^\circ\text{C}\pm 3^\circ\text{C}$ 및 흡열온도 $219.42^\circ\text{C}\pm 3^\circ\text{C}$ 의 흡열피크를 보이는 것을 확인하였다. 도 6은 본 발명의 실시예에 따라 제조된 이나보글리플로진/프롤린 공결정, 프롤린, 이나보글리플로진 결정형의 온도시차주사열량(DSC)의 열량곡선을 대조한 결과를 보여준다. 이는 제조예 1에 따라 제조된 이나보글리플로진 결정형 A와 제조예 2에 따라 얻어진 이나보글리플로진/프롤린 공결정이 명확히 다른 흡열개시온도 및 흡열온도에서의 흡열피크를 보이는 것을 보여준다.

[98] [실험예 4] 이나보글리플로진/L-프롤린 공결정의 결정다형 평가

- [99] 이나보글리플로진/L-프롤린 공결정 10mg씩에 하기 표의 용매를 1mL씩 각각 넣고, 현탁 및 용해 상태로 24시간 방치한 후 이나보글리플로진/L-프롤린 공결정의 결정다형 생성 여부를 평가하였다.

- [100] [표4]

용매	용매 극성 (p)	DSC (흡열개시온도 °C)	결정다형
물	10.2	154.0	결정형 A의 변형
아세토니트릴	5.8	217.0	프롤린공결정
에탄올	5.2	214.1	프롤린공결정
메탄올	5.1	217.3	프롤린공결정
아세톤	5.1	209.7	프롤린공결정
에틸 아세테이트	4.4	215.1	프롤린공결정
테트라하이드로퓨란	4.0	212.3	프롤린공결정
이소프로필 알콜	3.9	215.6	프롤린공결정
디클로로메탄	3.1	215.2	프롤린공결정
디에틸에테르	2.89	215.4	프롤린공결정
톨루엔	2.4	215.8	프롤린공결정
n-헥산	0.1	215.3	프롤린공결정

- [101] 실험 결과 얻어진 결정의 DSC 평가 결과, 물을 사용한 경우 결정형 A의 변형이 얻어졌으나, 그 외의 용매를 사용한 경우 모두 약 217.71°C±3°C 전후의 흡열개시온도를 갖는 이나보글리플로진/L-프롤린 공결정으로 확인되었으며, 그 외의 결정다형은 발견되지 않았다.

- [102] [실험예 5] 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 용해도 평가

- [103] 이나보글리플로진은 0.25mg/ml의 수용해도를 갖는 난용성이기 때문에 프롤린 공결정을 제조하여 이나보글리플로진의 수용해도 및 위장관 용해도를 개선시키고자 하였다. 용해 상태를 유지해 주는 물질이 많이 포함된 인공위액 및 인공장액에서의 용해도 측정을 통해 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 용해도가 이나보글리플로진 결정형에 비해 개선되었는지 확인하였다. 그 결과를 아래 표 5 및 6, 그리고 도 7에 정리하였다.

- [104] [표5]

인공위액(FaSSGF)에서의 용해도

	초기	30분	1시간	2시간	4시간
이나보글리플로진 결정형 A	0.00 m g/mL	0.31 m g/mL	0.34 m g/mL	0.35 m g/mL	0.35 m g/mL

이나보글리플로 진/프롤린 공결정	0.00 m g/mL	0.40 m g/mL	0.41 m g/mL	0.43 m g/mL	0.39 m g/mL
----------------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

[105] [표6]

인공장액(FaSSIF)에서의 용해도

	초기	30분	1시간	2시간	4시간
이나보글리플 로진 결정형	0.00 mg/mL	0.69 m g/mL	0.94 m g/mL	1.00 m g/mL	0.92 m g/mL
이나보글리 플로진/프 롤린 공결정	0.00 mg/mL	2.02 m g/mL	2.20 m g/mL	1.98 m g/mL	1.04 m g/mL

[106] 상기 표 5 및 표 6에서 보는 바와 같이 이나보글리플로진 결정형에 비해 본 발명의 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 인공위액 및 인공장액에서의 용해도가 증가하였고, 특히 표 6 및 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 인공장액에서의 2시간까지의 용해도가 약 2배 이상 증가되었고 용해도가 4시간까지 높게 유지된다는 것이 확인되었다. 따라서 본 발명의 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 이나보글리플로진 결정형의 문제점인 낮은 수용해도를 극복할 수 있는 신규한 고체형태이며, 인공장액에서의 초기 용해도 2배의 개선은 경구 흡수를 크게 개선시키고 약효를 극대화시킬 수 있음이 예측되었다. 이러한, 이나보글리플로진의 용해도 개선은 고용량 투여를 필요로 하는 적응증을 위한 경구제 개발에 특히 유리할 수 있다.

[107] [실험예 6] 이나보글리플로진 공결정과 이나보글리플로진 결정형의 가혹 안정성 비교 평가

[108] 본 발명의 이나보글리플로진/프롤린 공결정(제조예 2)의 제품화 가능성을 확인하기 위해 이나보글리플로진 결정형 A(제조예 1)을 대조군으로 하여 60°C에서 4주동안 열에 대한 안정성을 실시하고 액체크로마토그래피(HPLC) 정성 분석법을 이용하여 분석한 후 그 결과를 표 7에 나타내었다.

[109] 표 7에서 나타난 것 같이 이나보글리플로진/프롤린과 이나보글리플로진 결정형이 순도의 영향 없이 안정하게 유지되는 것이 확인되었다.

[110] 따라서 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 열에 대한 안정성은 이나보글리플로진 결정형과 동등하다는 것이 확인되었다.

[111] [표7]

가혹 안정성 평가결과, 60°C, 4주

	초기	2주	4주
이나보글리플로 진/프롤린 공결정	99.9%	99.9%	99.8%

이나보글리 플로진결정형	99.1%	98.8%	99.1%
-----------------	-------	-------	-------

[112] [실험예 7] 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 비글견 약동학 평가

[113] 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 비글견에서의 약물동태 프로파일 개선을 확인하고자 하였다. 이나보글리플로진 결정형 A를 대조군으로 설정하고, 프롤린 공결정을 비교군으로 설정하여 수컷 비글견에 1 mg/kg의 투여용량으로 이나보글리플로진 결정형 A와 프롤린 공결정을 경구투여하여 투여 전(0 시간), 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간 (총 13회)동안 채혈을 진행하였다. 혈중 약물 농도는 채취된 검체로부터 분리한 혈장을 이용하여 LC-MS/MS로 분석하였고, WinNonlin 5.0.1 프로그램을 이용하여 약동학 파라미터 최대 관측된 혈장 농도 (C_{max}), 혈장 농도-시간 곡선 하 면적 (AUC_{last} 및 AUC_{inf}), 시간-대-최대 관측된 혈장 농도 (T_{max}), 반감기 (T_{1/2}), 산출하여 해석하였다.

[114] 그 결과를 아래 표 8에 정리하였다.

[115] [표8]

이나보글리플로진/프롤린 공결정의 비글견 약동학 평가

약동학 파라미터	이나보글리플로진 결정형 A	프롤린 공결정
T _{max} (hr)	4.00	5.20
T _{1/2} (hr)	5.32	6.10
C _{max} (ng/mL))	482.20	482.60
AUC _{last} (ng*hr/mL)	4340.69	4428.20
AUC _{inf} (ng*hr/mL)	4639.38	5341.58

[116] 상기 표 8 에서 보는 바와 같이 이나보글리플로진 결정형 A에 비해 본 발명의 프롤린 공결정은 시간-대-최대 관측된 혈장 농도(T_{max})와 반감기(T_{1/2})가 느리게 확인되었고, PK 노출 파라미터인 AUC_{last} 및 AUC_{inf}가 높게 확인되었다.따라서 본 발명의 프롤린 공결정은 기존 결정형 A 대비 반감기가 길고 체내 노출(AUC_{inf})이 높기 때문에, 프롤린 결정형이 조금 더 체내에 유지되고, 약효가 오래 지속될 것으로 확인된다. 결정형 A 대비 프롤린 공결정의 이러한 약동학적 특성은 체내에서 약효가 오래 지속됨에 따라 혈당을 강하하는데 에너지를 소모하게 하고, 그로 인한 2차 효과에 의해 체내 신진대사가 활발해지게 하는 효과를 나타낼 수 있다. 따라서, 이러한 약동학적 특성은 다양한 적응증 및/또는 제형 개발에 있어서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 4.72 ± 0.2 , 6.81 ± 0.2 , 7.93 ± 0.2 , 8.59 ± 0.2 , 14.75 ± 0.2 , 15.21 ± 0.2 , 17.23 ± 0.2 , 18.80 ± 0.2 , 21.19 ± 0.2 , 24.42 ± 0.2 및 27.29 ± 0.2 로부터 선택되는 2[θ]값에서 4개 이상의 회절 피크를 가지는 X선 분말 회절 패턴으로 특정되는 것을 특징으로 하는 이나보글리플로진/프롤린 공결정.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 X선 분말 회절 패턴은 6.81 ± 0.2 , 8.59 ± 0.2 , 14.75 ± 0.2 , 17.23 ± 0.2 , 및 18.80 ± 0.2 로부터 선택되는 2[θ]값에서 회절 피크를 가지는 것을 특징으로 하는 이나보글리플로진/프롤린 공결정.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 하기 표에 열거된 피크 위치들과 피크 위치가 일치되는 X선 분말 회절 패턴으로 특정되는 것을 특징으로 하는 결정형:

$2\theta (\pm 0.2^\circ)$	$d (\text{\AA})$	$I/I_0 (\%)$
4.72	18.7	33.3
6.81	13.0	100.0
7.93	11.1	47.0
8.59	10.3	63.1
14.75	6.0	81.6
15.21	5.8	31.0
17.23	5.1	50.9
18.80	4.7	63.2
21.19	4.2	22.5
24.42	3.6	28.3
27.29	3.3	25.4

- [청구항 4] 제1항에 있어서, 온도차주사 열량(DSC) 분석에서 흡열개시온도 $217.71^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 및 흡열온도 $219.42^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 의 흡열피크를 보이는 것을 특징으로 하는 이나보글리플로진/프롤린 공결정.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 이나보글리플로진/프롤린 공결정은 이나보글리플로진 1당량에 1당량의 프롤린이 결합된 형태인 이나보글리플로진/프롤린 공결정.
- [청구항 6] (a) 이나보글리플로진 및 유기용매를 혼합하고 이에 프롤린을 첨가하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 결과물을 교반하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 진공건조하고 이나보글리플로진 공결정을 수득하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 제조방법.

- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 이소프로필알콜, 1-부탄올, 아세톤, 테트라하이드로퓨란, 아세토니트릴, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, MTBE(Methyl t-Butyl ether), 톨루엔, 및 디옥산으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유기용매인 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 제조방법.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 유기용매는 이나보글리플로진의 중량 대비 10배 내지 200배의 부피로 사용되는 것인 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 제조방법.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 유기용매는 에탄올이고, 이나보글리플로진의 중량 대비 10배 내지 60배의 부피로 사용되는 것인 이나보글리플로진/프롤린 공결정의 제조방법.
- [청구항 10] 유효성분으로서 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 이나보글리플로진/프롤린 공결정, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 당뇨병 치료 또는 예방을 위한 것인 약제학적 조성물.