

명세서

발명의 명칭: 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형 및 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 출원은 2021년 5월 18일자 한국 특허 출원 제10-2021-0064416호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국 특허 출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 명세서의 일부로서 포함한다.
- [2] 본 발명은 우수한 PARP 및 탄키라제 저해 활성을 갖는 트리사이클릭 유도체 화합물의 신규염 결정형, 이의 제조방법, 결정형의 변환 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 폴리(ADP-리보오스)폴리머라제(PARP)는 PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4(vPARP), PARP-5(Tankyrase-1, Tankyrase-2), PARP-7, PARP-10 등 대략 17종의 단백질로 구성된다[Curr Pharm Des., 13(9), 933-962, 2007]. 이들은 모두 그들의 촉매 도메인에서는 특정 수준의 상동성을 나타내지만 세포에서 작용하는 기능은 상이하다[BioEssays., 26(8), 882-893, 2004].
- [4] PARP-1 및 PARP-2의 주된 역할은 ADP-리보실화에 의한 DNA 복구를 용이하게 하는 것이며, 많은 DNA 복구 단백질의 수를 조절하는 것이다. 암세포의 DNA가 손상되면 PARP가 활성화되어 DNA의 한 가닥 사슬 파손을 복구하기 때문에, 암 치료 시 다양한 유형에서 저항성을 유발할 수 있다. 따라서 PARP 저해제를 통해 항암 효능을 기대할 수 있으며 특히, BRCA-1 및 BRCA-2와 같은 DNA의 두 가닥 사슬 손상 복구인자가 결핍된 종양의 특이적 사멸에 유용한 것으로서 보고되고 있어서 DNA 두 가닥 사슬 손상 복구인자에 이상이 있는 유방암, 난소암, 전립선암 등 다양한 암 종에 대한 환자 맞춤형 항암제로 개발되고 있다 [Nature, 434, 913-916, 2005; Cancer Biology & Therapy, 4, 934-936, 2005].
- [5] 또한, PARP 저해제는 허혈성 뇌손상을 포함한 각종 신경성 질환과 심혈관계(cardiovascular) 질환의 치료에 사용될 수 있으며, 더 나아가, 염증성 증상의 치료에도 유용하다. 최근에는 당뇨병으로 인한 신경병증(diabetic neuropathy)의 치료에도 PARP 저해제의 치료 가능성이 제기되고 있다[Diabetes. 54(12), 3435-3441, 2005].
- [6] 한편, PARP-5인 탄키라제-1, 탄키라제-2는 Wnt/ β -catenin 신호경로, DNA 복구과정 및 세포주기에 관련이 높은 유사분열에 관여하는 것으로 알려져 있다[Biochimica et Biophysica Acta, 1846, 201-205, 2014]. 또한, 종말체(telomere) 길이의 양성 조절인자로서 기능한다. 그러므로, 탄키라제-1, 탄키라제-2의 저해는 Wnt/ β -catenin 신호경로, DNA 복구과정 및 종말체(telomere)의 신장을

저해하여 PARP-1과 다른 기전으로 항암 효과를 나타낼 수 있다[Nature Reviews Drug Discovery, 11, 923-936, 2012].

- [7] 국제공개특허 WO2016-200101에는 폴리(ADP-리보오스)폴리머라아제(PARP)의 활성화에 의하여 유발되는 질환의 치료에 사용할 수 있는 PARP-1 및 탄키라제 저해제인 다양한 트리사이클릭 유도체 화합물이 공개되어 있다. 이 화합물들은 free base 또는 1~3 염산염 형태로 제조되었으며, 대부분은 염산염 형태이다. 본 발명자들은 WO2016-200101에서 제조된 화합물이 의약품으로 사용하기 어려울 정도로 낮은 수용해도를 갖고 있으며, 상기 화합물을 제조하기 위해 여러단계의 공정을 거쳐야하므로 상업적으로 이용하기에 바람직하지 않음을 확인하였다. 이에, 의약품에 적용가능한 수용해도를 가지면서, 광안정성 등 안정성이 확보된 신규염의 결정형 및 상업적 용도로 사용가능한 신규한 제조방법을 개발하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 본 발명의 제조방법은 반응 완료 후 추가의 정제 공정 없이 고순도의 화합물을 안정한 결정형 형태로 제조할 수 있어, 대량 생산이 가능하면서 상업적으로 매우 유용한 방법을 제공한다.

발명의 상세한 설명

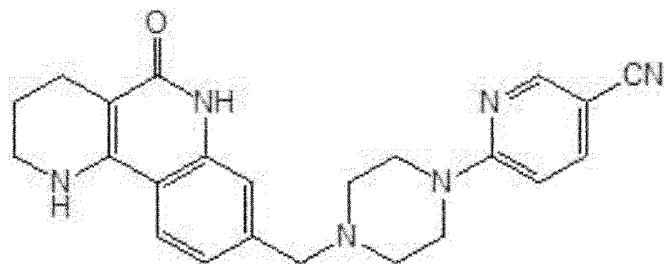
기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 우수한 PARP-1, 탄키라제-1 또는 탄키라제-2 저해 활성을 갖는 트리사이클릭 유도체 화합물의 신규염의 결정형, 및 이의 효과적인 제조방법을 제공하는 데 있다.
- [9] 이를 통해 종래 기술의 문제점, 특히 의약품에 적용 불가능한 낮은 수용해도를 해결하고, 순도를 높이기 위해 여러 단계의 공정을 거쳐야하는 비효율성을 개선함과 동시에, 생산 후 분리·제거가 어려운 유연물질을 감소시킴을 목적으로 한다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염의 결정형을 유효성분으로 포함하는 PARP-1, 탄키라제-1 또는 탄키라제-2의 활성화에 의하여 유발되는 각종 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [11] 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형
- [12] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형을 제공한다:
- [13] [화학식 1]

[14]

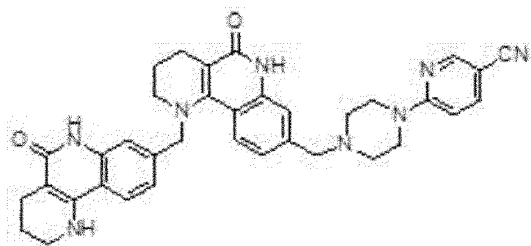


- [15] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 무수물일 수 있다.
- [16] 무수물 결정형은 약 1 중량% 이하의 수분을 포함할 수 있으며, 바람직하기로는 0.5 중량% 이하를 포함할 수 있다.
- [17] 상기 무수물 결정형은 분말 XRD 패턴에서 10.01° , 15.86° , 19.62° 및 26.58° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함함을 특징으로 한다.
- [18] 또한, 상기 무수물 결정형은 분말 XRD 패턴에서 9.79° , 20.10° , 및 21.71° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 더 포함할 수 있다.
- [19] 또한, 상기 무수물 결정형은 실질적으로 하기 도 7의 형태로 표시되는 XRD 패턴을 나타낸다.
- [20]
- [21] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 1수화물일 수 있다.
- [22] 1수화물 결정형은 약 2.0 ~ 4.5 중량% 범위의 수분을 포함할 수 있으며, 바람직하기로는 약 3 중량% 정도를 포함할 수 있다.
- [23] 상기 1수화물 결정형은 분말 XRD 패턴에서 6.94° , 9.99° , 16.57° , 18.17° , 23.68° 및 26.39° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함함을 특징으로 한다.
- [24] 또한, 상기 1수화물 결정형은 분말 XRD 패턴에서 11.89° , 13.35° , 15.07° , 및 20.90° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 더 포함할 수 있다.
- [25] 또한, 상기 시트르산 염 1수화물의 결정형은 실질적으로 하기 도 10의 형태로 표시되는 XRD 패턴을 나타낸다.
- [26]
- [27] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염은 2수화물일 수 있다.
- [28] 2수화물 결정형은 약 5.0 ~ 7.5 중량% 범위의 수분을 포함할 수 있으며, 바람직하기로는 약 5.7 중량% 정도를 포함할 수 있다. 상기 2수화물 결정형은 분말 XRD 패턴에서 8.15° , 10.96° , 16.09° , 21.47° , 25.45° , 및 26.86° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함함을 특징으로 한다.
- [29] 또한, 상기 2수화물 결정형은 분말 XRD 패턴에서 13.35° , 18.73° , 및 28.51° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 더 포함할 수 있다.
- [30] 또한, 상기 시트르산 염 2수화물의 결정형은 실질적으로 하기 도 13의 형태로 표시되는 XRD 패턴을 나타낸다.
- [31]
- [32] 본 발명의 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 광안정성

챔버에서,

- [33] 25°C, 습도 60% 조건에서, 광량 35W인 UV를 총 조사량이 200 watt가 되도록 조사한 후의 순도가 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상으로 유지되는 특징을 가질 수 있다.
- [34] 또한, 25°C, 습도 60% 조건에서, 광량 35k Lux인 가시광선을 총 조사량이 1200k lux가 되도록 조사한 후의 순도가 95% 이상, 바람직하게는 96% 이상으로 유지되는 특징을 가질 수 있다.
- [35] 즉, 본 발명의 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 종래의 염산 염 등과 비교하여 매우 우수한 광안정성을 제공한다.
- [36]
- [37] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 HPLC 분석에서 RT 43 min 내지 45 min에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.05% 미만, 더 바람직하게는 RT 43 min 내지 45 min에서 유연물질 피크가 관찰되지 않는(존재하지 않는) 특징을 가질 수 있다.
- [38] 또한, 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 HPLC 분석에서 RT 48 min 내지 50 min에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.15% 미만, 바람직하게는 0.1% 미만, 더 바람직하게는 0.05% 미만, 더 더욱 바람직하게는 0.015% 미만, 가장 바람직하게는 유연물질 피크가 관찰되지 않는(존재하지 않는) 특징을 가질 수 있다.
- [39] 또한, 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 HPLC 분석에서 RT 43 min 내지 45 min 및 RT 48 min 내지 50 min에서 유연물질 피크가 관찰되지 않는(존재하지 않는) 특징을 가질 수 있다.
- [40] 상기에서 RT 48 min 내지 50 min에서 발생하는 유연물질은 하기의 화학 구조식을 갖는다.

[41]



- [42] 상기 유연물질은 생산 후 분리 제거가 어려우며, 인체에 유해하여 기준 이상으로 발생하는 경우 안전성 확인시험이 추가로 진행되어야 한다. 따라서 제조공정에서 상기 유연물질을 감소시키는 것은 매우 중요하다.
- [43]
- [44] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 순도가 99.6% 이상인 특징을 가질 수 있다.
- [45] 또한, 장기 보관 조건(온도 $25\pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60\pm 5\%$ 에서 보관)에서 3개월 보관시

순도가 99.6% 이상인 특징을 가질수 있다. 또한, 6개월 보관시 순도가 99.5% 이상, 바람직하게는 99.55% 이상인 특징을 가질수 있다. 또한, 12개월 보관시 순도가 99.7% 이상인 특징을 가질수 있다. 또한, 24개월 보관시 순도가 99.7% 이상인 특징을 가질수 있다. 또한, 36개월 보관시 순도가 99.7% 이상인 특징을 가질 수 있다.

[46] 또한, 장기 보관 조건(온도 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $60\pm 5\%$ 에서 보관)에서 9개월 이상 보관시 초기와 비교하여 순도가 저하되지 않는 특징을 가질수 있다.

[47] 또한, 가속 보관 조건(온도 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $75\pm 5\%$ 에서 보관)에서 3개월 보관시 순도가 99.6% 이상이며, 6개월 보관시 순도가 99.5% 이상인 특징을 가질 수 있다.

[48]

[49] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 장기 보관 조건(온도 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $60\pm 5\%$ 에서 보관)에서 3개월 보관후 HPLC 분석에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.30% 이하이고, 더욱 바람직하게는 0.29% 이하인 특징을 가질 수 있다. 또한, 6개월 보관후 HPLC 분석에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.32% 이하이고, 더욱 바람직하게는 0.30% 이하인 특징을 가질 수 있다. 또한, 12개월 보관후 HPLC 분석에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.32% 이하, 바람직하게는 0.30% 이하인 특징을 가질 수 있다. 또한, 24개월 보관후 HPLC 분석에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.35% 이하인 특징을 가질 수 있다. 또한, 36개월 보관후 HPLC 분석에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.32% 이하인 특징을 가질 수 있다.

[50] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 가속 보관 조건(온도 $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $75\pm 5\%$ 에서 보관)에서 3개월 보관후 HPLC 분석에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.35% 이하이고, 더욱 바람직하게는 0.25% 이하인 특징을 가질 수 있다. 또한, 6개월 보관후 HPLC 분석에서 유연물질 피크 면적(%)이 0.33% 이하이고, 더욱 바람직하게는 0.30% 이하인 특징을 가질 수 있다.

[51]

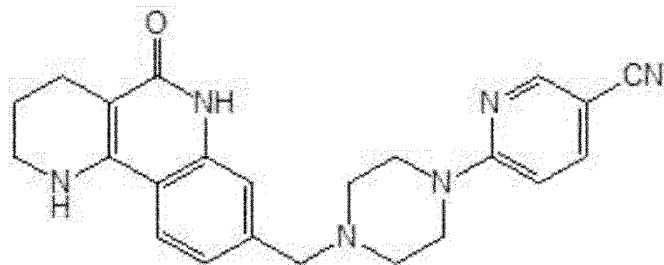
[52] 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형

[53] 또한, 본 발명은

[54] 하기 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형을 제공한다:

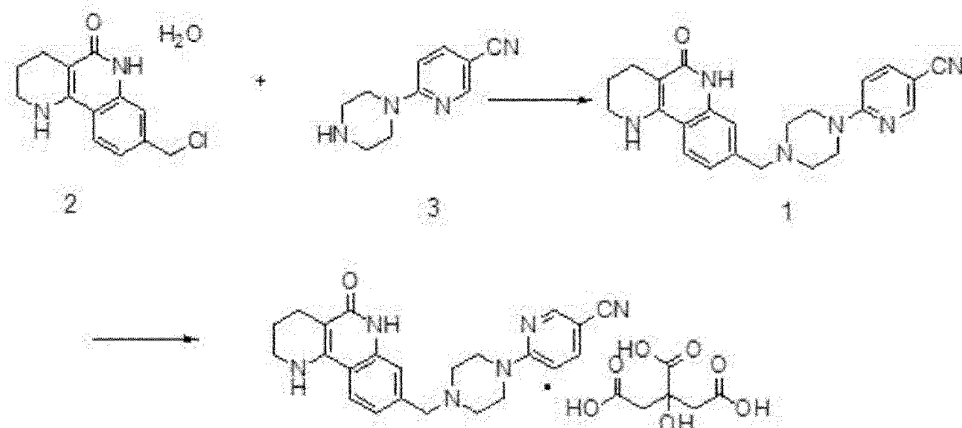
[55] [화학식 1]

[56]



- [57] 상기 화학식 1의 트리사이클릭 유도체 화합물(free base)은 생체내에서 PARP 및 탄키라제 저해제의 효력을 나타내는 유효성분이면서, 이의 산부가염인 시트르산 염 결정형의 제조 중간체로서도 매우 유용하게 사용된다.
- [58] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형은 무수물일 수 있다.
- [59] 무수물 결정형은 약 1 중량% 이하의 수분을 포함할 수 있으며, 바람직하기로는 0.5 중량% 이하를 포함함을 특징으로 한다.
- [60] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형은 분말 XRD 패턴에서 7.88° , 10.23° , 15.16° , 19.27° , 22.79° 및 23.94° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함함을 특징으로 한다.
- [61] 또한, 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형은 분말 XRD 패턴에서 13.89° , 15.78° , 18.05° , 및 19.51° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 더 포함할 수 있다.
- [62] 또한, 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형은 실질적으로 하기 도 1의 형태로 표시되는 XRD 패턴을 나타낸다.
- [63]
- [64] 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형은 2수화물일 수 있다.
- [65] 2수화물 결정형은 약 7.0 ~ 9.5 중량% 범위의 수분을 포함할 수 있으며, 바람직하기로는 약 8.3 중량% 정도를 포함함을 특징으로 한다.
- [66] 상기 2수화물 결정형은 분말 XRD 패턴에서 7.95° , 10.25° , 13.25° , 13.78° , 21.12° , 25.22° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함함을 특징으로 한다.
- [67] 또한, 상기 2수화물 결정형은 분말 XRD 패턴에서 11.93° , 12.50° , 15.98° , 19.12° , 22.80° , 26.72° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 더 포함할 수 있다.
- [68] 또한, 상기 2수화물 결정형은 실질적으로 하기 도 4의 형태로 표시되는 XRD 패턴을 나타낸다.
- [69]
- [70] 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법
- [71] <제 1 방법>
- [72] 본 발명은 하기 반응식 1-1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 제조방법은 우수한 수율 및 순도를 제공하며, 제조공정의 단순화에 의해 제조효율도 현저히 향상시키는 특징을 갖는다.
- [73] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 다음의 단계를 포함하여 제조될 수 있다.
- [74] (a) 하기 반응식 1의 화학식 2 화합물과 화학식 3의 화합물을 반응시킨 후, 결정화 공정을 수행하여 화학식 1의 결정 화합물을 얻는 단계; 및
- [75] (b) 상기 화학식 1의 결정 화합물과 시트르산을 유기용매 및 물로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 용매에서 50°C 내지 80°C 로 반응시키는 단계;
- [76] [반응식 1-1]

[77]



[78] 이하에서, 상기 제조방법을 단계별로 자세히 설명한다.

[79] < (a) 단계 >

[80] 상기 (a) 단계에서의 반응은 피리딘, 트리에틸아민, 디에틸이소프로필아민 등의 유기아민 또는 탄산칼륨 등 염기의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[81] 상기 반응 온도는 특별히 제한되지 않으나, 일반적으로 냉온 내지 가온 하에 수행할 수 있으며, 바람직하게 상온 내지 가온 하에 수행한다.

[82] 특히, 상기 (a) 단계에서 상기 반응용매로 N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸아세트아미드(DMAC), N-메틸피페리돈(NMP), 디메틸설폭사이드(DMSO) 등에서 선택되는 1종 이상이 사용될 수 있으며, 이들 용매가 사용되는 경우, 기존의 유기용매를 사용하는 경우와 비교하여, 반응시간을 획기적으로 단축시키며(반응시간 24시간 → 6시간으로 단축), 환류교반이 불필요하며, 유연물질 감소로 추가 재결정 및 크로마토그래피 등의 추가 공정이 불필요하여, 공정을 크게 단순화시키는 효과가 제공된다.

[83]

[84] 상기 (a) 단계의 결정화 공정에서 결정화 용매로는 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 아세토니트릴, 에틸아세테이트, 테트라히드로퓨란 및 물 중에서 선택되는 1종 이상이 사용될 수 있다. 상기 물로는 정제수 또는 증류수가 사용될 수 있다.

[85] 특히, 상기 결정화 용매로 물이 사용되는 경우, 재결정 등의 추가 공정 없이 고수율 고순도의 결정이 제조될 수 있으며, 공정을 크게 단순화시킬 수 있어, 대량 합성 공정에 적합하다.

[86] 더 나아가서, 상기 (a) 단계에서 반응용매로 디메틸포름아미드(DMF)가 사용되고, 결정화 용매로 물이 사용되는 경우에는 더 우수한 효과가 제공된다. 즉, 재결정 등의 추가 공정 없이 고수율 고순도의 결정이 제조될 수 있으며, 공정을 크게 단순화시킬 수 있어, 대량 합성 공정에 적합하다.

[87] 상기 (a) 단계의 반응은 35 내지 55°C에서 수행될 수 있으며, 결정화 공정

이후에는 여과과정이 더 수행될 수 있다. 특히, 본 발명의 상기 (a) 단계는 재결정화 등이 불필요할 정도로 우수한 순도를 제공하는 특징을 갖는다.

[88]

[89] < (b) 단계 >

[90] 상기 제조방법에 의해 제조되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염은 무수물 또는 수화물일 수 있으며, 상기 수화물은 1수화물 또는 2수화물일 수 있다.

[91] 상기 (b) 단계의 용매 중 유기용매로는 메탄올, 에탄올, 아세톤, 이소프로판올, 아세트니트릴, 부탄올, 프로판올 및 테트라하이드로퓨란 중에서 선택되는 1종 이상이 사용될 수 있다.

[92] 본 발명 전체에서 물로는 정제수 또는 증류수가 사용될 수 있다.

[93] 상기 제조방법에 의해 제조되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염은 결정형으로 제조될 수 있으며, 시트르산 무수물 결정형일 경우, 상기 (b) 단계에서 용매로는 상기에 기재된 용매 중 유기용매가 사용될 수 있으며, 메탄올과 에탄올 혼합용매가 바람직하게 사용될 수 있다. 이때 상기 혼합용매에서 메탄올과 에탄올은 1:9 내지 9:1의 부피비로 혼합하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 4:9 내지 2:7의 부피비로 사용될 수 있다.

[94] 또한, 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염이 1수화물일 경우, 상기 (b) 단계에서 용매로는 상기에 기재된 유기용매와 물을 1:9 내지 9:1의 부피비로 혼합하여 사용할 수 있으며, 메탄올과 물의 혼합용매가 바람직하게 사용될 수 있다. 이때 상기 혼합용매에서 메탄올과 물은 3:7 내지 7:3의 부피비로 사용될 수 있다.

[95] 또한, 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염이 2수화물일 경우는 상기 (b) 단계에서 용매로 상기에 기재된 유기용매와 물을 2:8 내지 0:10의 부피비로 혼합하여 사용할 수 있으며, 물을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[96] 상기 (b) 단계의 반응이 완료된 후, 반응 결과물에 대하여 여과 과정을 더 수행할 수 있다. 이 때, 별도의 재결정화, 크로마토그래피 등의 추가 공정없이도 반응종료 후 여과, 건조 하면 우수한 순도 및 수율로 결정형 상태의 화합물을 얻을 수 있다.

[97]

[98] < 제 2 방법 >

[99] 본 발명은 하기 반응식 1-2로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 제조방법은 우수한 수율 및 순도를 제공하며, 제조공정의 단순화에 의해 제조효율도 현저히 향상시키는 특징을 갖는다.

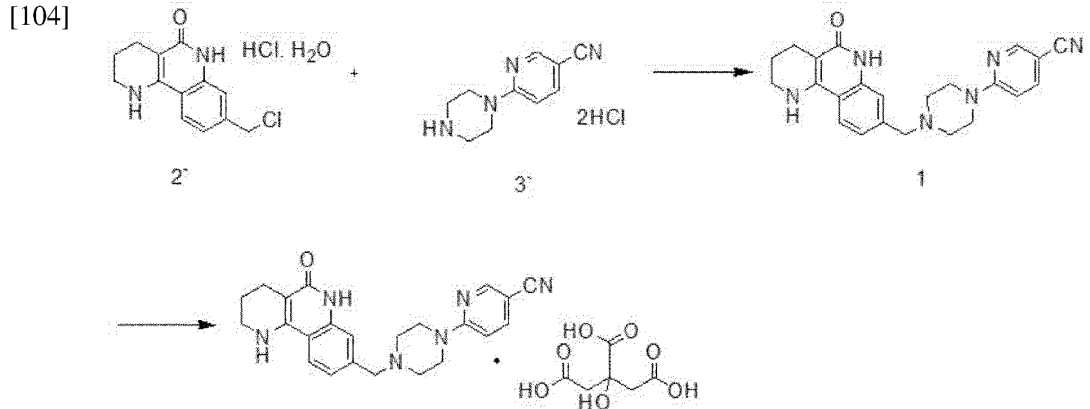
[100] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 다음의 단계를 포함하여 제조될 수 있다.

[101] (1) 하기 반응식 1-2의 화학식 2' 화합물과 화학식 3'의 화합물을 반응시킨 후,

결정화 공정을 수행하여 화학식 1의 결정 화합물을 얻는 단계; 및

[102] (2) 상기 화학식 1의 결정 화합물과 시트르산을 유기용매 및 물로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 용매에서 50 내지 80°C로 반응시키는 단계;

[103] [반응식 1-2]

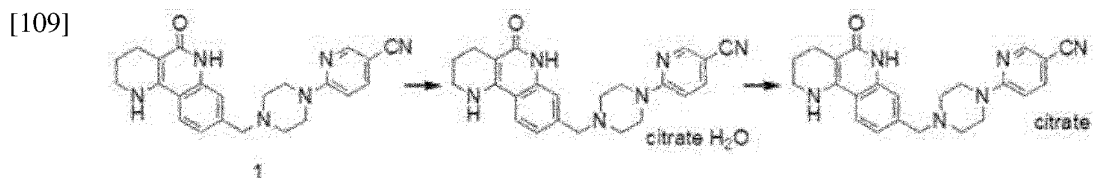


[105] 상기 (1) 단계 및 (2) 단계는 변경된 출발물질을 사용한 것을 제외하고는 위에서 설명한 제 1 방법의 (a) 단계 및 (b) 단계와 동일하게 실시될 수 있다.

[106]

[107] 한편, 상기 제 1 방법 또는 제 2 방법에서 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염의 결정형을 무수물로 제조할 경우, 상기 무수물은, 상기 (b) 단계 또는 (2) 단계에서 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물에 시트르산염을 부가하여 무수물 결정형으로 만들수도 있지만, 하기 반응식 2에 나타낸 바와 같이, 화학식 1의 화합물을 시트르산 염 1수화물 결정형으로 제조한 후, 상기 수화물 결정을 다시 무수물 결정으로 전환하여 제조할 수 있다.

[108] [반응식 2]



[110] 상기 반응식 2에서 1수화물을 무수물로 전환하는 공정은 1수화물을 유기용매 또는 유기용매와 물의 혼합용매 중에서 50 내지 80°C의 온도로 반응시켜서 수행할 수 있다. 이 때, 여과 과정이 더 수행될 수 있다.

[111] 이 때, 상기 유기용매로는 에탄올, 아세톤, 이소프로판올, 아세토니트릴, 프로판올, 부탄올, 에틸아세테이트, 및 테트라하이드로퓨란 중에서 선택되는 1종 이상이 사용될 수 있다.

[112] 또한, 상기 혼합용매를 사용하는 경우, 소량의 물이 포함됨으로써 잔류 용매 수준을 감소시키는 유리한 효과가 제공될 수 있다.

[113] 상기 혼합용매에 포함되는 물은 1수화물 100 중량부 기준으로 2 내지 15

[128] 상기 (c) 단계에서 pH 조절은 염기를 사용하여 수행될 수 있으며, 상기

염기로는 NaOH, KOH, K₂CO₃, Na₂CO₃, NaHCO₃ 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이 사용될 수 있다.

[129]

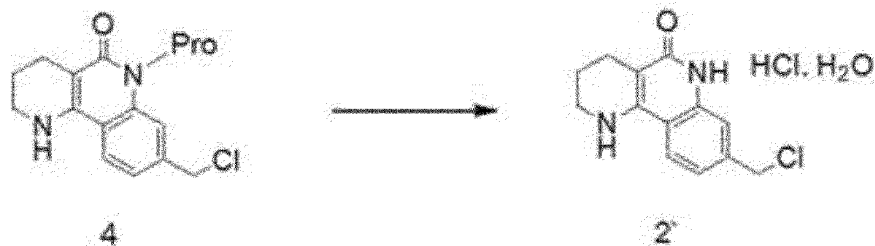
[130] 또한, 상기 제조방법에 있어서, 상기 반응식 1-2의 화학식 2'의 화합물은

[131] (1) 하기 반응식 3-2의 화학식 4 화합물에 유기용매를 첨가한 후, 염산을 반응시키는 단계; 및

[132] (2) 상기 반응 종료 후, 반응액에 염산 수용액을 첨가하고, 여과하는 단계;를 포함하여 제조될 수 있다:

[133] [반응식 3-2]

[134]



[135] 상기 (1) 단계에서 반응은 75~85°C에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 반응은 1~4 시간, 바람직하게는 2~3시간 동안 수행될 수 있으며, 이때, 교반도 함께 이루어질 수 있다.

[136] 상기 (2) 단계에서 염산 수용액의 첨가는 반응액을 냉각시킨 후 이루어질 수 있으며, 상기 냉각 온도는 10 내지 40°C일 수 있다. 바람직하게는 15 내지 25 °C일 수 있다.

[137] 상기 염산 수용액은 염산의 부피농도가 5 내지 25%, 바람직하게는 10 내지 20%인 것이 사용될 수 있다. 상기 염산 수용액은 출발물질 100 중량부를 기준으로 0.1 내지 6.5 중량부로, 바람직하게는 1.5 내지 4.5 중량부로 첨가될 수 있다.

[138] 상기 (1) 단계에서 유기용매로는 에탄올, 아세톤, 이소프로판올, 아세토니트릴, 프로판올, 부탄올, 에틸아세테이트, 및 테트라하이드로퓨란 중에서 선택되는 1종 이상이 사용될 수 있다.

[139] 상기 (2) 단계 후, 세척은 이소프로필알코올, 정제수 등에서 선택되는 1종이상이 바람직하게 사용될 수 있다.

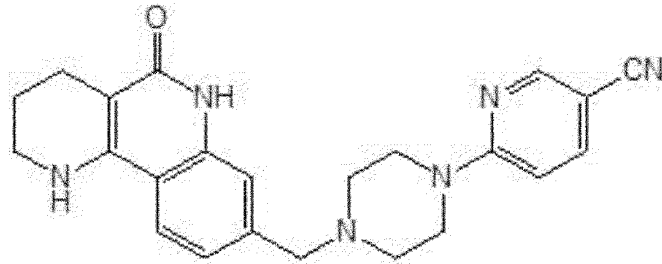
[140]

[141] 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형을 포함하는 약학적 조성물, 이의 용도, 이를 이용한 치료방법

[142] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형을 유효성분으로 포함하는 PARP-1, 탄키라제-1 또는 탄키라제-2 활성화에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[143] [화학식 1]

[144]



[145] 상기 PARP-1, 탄키라제-1 또는 탄키라제-2 활성에 의해 유발되는 질환으로는 신경병리성 동통, 간질, 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증(ALS), 헌팅턴병, 정신분열병, 만성 또는 급성 통증, 허혈성 뇌손상, 저산소증 후의 신경세포 손실, 외상 및 신경 손상, 신경퇴화질환, 아테롬성 동맥경화증, 고지혈증, 심혈관 조직손상, 관상동맥 질병, 심근경색증, 협심증, 심장성쇼크 등의 심혈관계 질환, 당뇨병으로 인한 신경병증, 골관절염, 골다공증 또는 암 등이 포함될 수 있다.

[146] 본 발명의 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 폴리(ADP-리보오스)폴리머라제의 활성을 억제함으로써, PARP-1, 탄키라제-1 또는 탄키라제-2 활성에 의해 유발되는 질환, 특히 신경병리성 동통, 신경퇴화질환, 심혈관계 질환, 당뇨병으로 인한 신경병증, 염증성 질환, 골다공증 또는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[147] 상기 암은 진행성 고형암, 재발성 고형암 또는 전이성 고형암 형태일 수 있다. 상기 고형암은 유방암, 전립선암, 췌장암, 난소암, 진행성 난소암, 고도장액성 난소암(난관암 또는 일차 복막암 포함), 원발암인 난소암에서 전이된 전이암, 유방암, 전립선암, 췌장암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[148] 본 발명의 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 정제, 산제, 과립제, 환제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 내용액제, 유제, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[149] 본 발명에 따른 약학적 조성물에는 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 하나 이상의 부형제 및/또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[150] 약제학적으로 적합한 담체의 비-제한적 예에는 고형물 및/또는 액상물, 예를 들면, 에탄올, 글리세롤, 물 등이 포함된다. 당해 치료 조성물 중의 담체의 양은 치료 조성물 또는 치료학적 조합물의 총 중량을 기준으로 하여 약 5 내지 약 99중량%의 범위일 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 부형제 및 희석제의 비-제한적 예에는 비독성의 상용성 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 방부제, 습윤제, 증량제, 산화방지제, 윤활제, 향미제, 점증제, 착색제, 계면활성제, 유화제, 현탁제 등이 포함된다. 이러한 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트,

셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 다른 약학적으로 허용가능한 모든 담체, 부형제 및 희석제가 사용될 수 있음은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.

[151] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기한 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 치료학적 유효량 또는 예방학적 유효량으로 함유된다. 본 발명에 따른 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위하여, 본 발명의 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 0.0001mg~1000mg, 0.01mg~500mg, 0.1mg~300mg, 또는 1mg~200mg, 50mg~200mg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물 중 상기 화학식 1의 화합물은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001~50중량%의 함량으로 배합될 수 있다.

[152] 또한, 본 발명은 PARP-1, 탄키라제-1 또는 탄키라제-2의 활성화에 의하여 유발되는 각종 질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형, 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형, 또는 상기 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

[153] 또한, 본 발명은 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형, 상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형, 또는 상기 약학적 조성물을 유효량으로 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 상기에 기술된 질환들을 갖는 동물을 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[154] 본 발명에 따른 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 PARP-1, 탄키라제-1 또는 탄키라제-2의 활성화 억제 효과가 우수하여, 신경병리성 동통, 신경퇴화질환, 심혈관계 질환, 당뇨병으로 인한 신경병증, 염증성 질환, 골다공증 또는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[155] 또한, 본 발명에 따른 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형은 순도, 용해도, 안정성이 개선되어, 약학적 제형의 제조를 용이하게 하며, 보관 안정성을 향상시키는 효과를 제공한다.

[156] 본 발명의 제조방법은 우수한 수율 및 순도의 화합물을 제공하며, 제조공정의 단순화에 의해 제조효율을 현저히 향상시켜 대량 생산이 가능하면서도 상업적으로 매우 유용한 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[157] 도 1은 실시예 1에서 제조된 화학식 1 화합물(무수물)의 XRD 분석 피크를 나타낸 그래프이며,

[158] 도 2는 실시예 1에서 제조된 화학식 1 화합물(무수물)의 DSC 분석 흡열 피크를

나타낸 그래프이며,

- [159] 도 3은 실시예 1에서 제조된 화학식 1 화합물(무수물)의 TGA 분석 결과를 나타낸 그래프이며,
- [160] 도 4는 실시예 1-4에서 제조된 화학식 1 화합물(2수화물)의 XRD 분석 피크를 나타낸 그래프이며,
- [161] 도 5는 실시예 1-4에서 제조된 화학식 1 화합물(2수화물)의 DSC 분석 흡열 피크를 나타낸 그래프이며,
- [162] 도 6은 실시예 1-4에서 제조된 화학식 1 화합물(2수화물)의 TGA 분석 결과를 나타낸 그래프이며,
- [163] 도 7은 실시예 2에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(무수물)의 XRD 분석 피크를 나타낸 그래프이며,
- [164] 도 8은 실시예 2에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(무수물)의 DSC 분석 흡열 피크를 나타낸 그래프이며,
- [165] 도 9는 실시예 2에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(무수물)의 TGA 분석 결과를 나타낸 그래프이며,
- [166] 도 10은 실시예 3에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(1수화물)의 XRD 분석 피크를 나타낸 그래프이며,
- [167] 도 11은 실시예 3에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(1수화물)의 DSC 분석 흡열 피크를 나타낸 그래프이며,
- [168] 도 12는 실시예 3에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(1수화물)의 TGA 분석 결과를 나타낸 그래프이며,
- [169] 도 13은 실시예 4에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(2수화물)의 XRD 분석 피크를 나타낸 그래프이며,
- [170] 도 14는 실시예 4에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(2수화물)의 DSC 분석 흡열 피크를 나타낸 그래프이며,
- [171] 도 15는 실시예 4에서 제조된 화학식 1 화합물의 시트르산 염(2수화물)의 TGA 분석 결과를 나타낸 그래프이며,
- [172] 도 16은 본 발명의 화학식 1 화합물의 시트르산 염 무수물 결정형과 종래의 약물들의 PARP-1 효소 저해활성을 측정하여 나타낸 그래프이며,
- [173] 도 17은 본 발명의 화학식 1 화합물의 시트르산 염 무수물과 종래의 약물들의 탄키라제-1 효소 저해활성을 측정하여 나타낸 그래프이며,
- [174] 도 18은 본 발명의 화학식 1 화합물의 시트르산 염 무수물과 종래의 약물들의 탄키라제-2 효소 저해활성을 측정하여 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

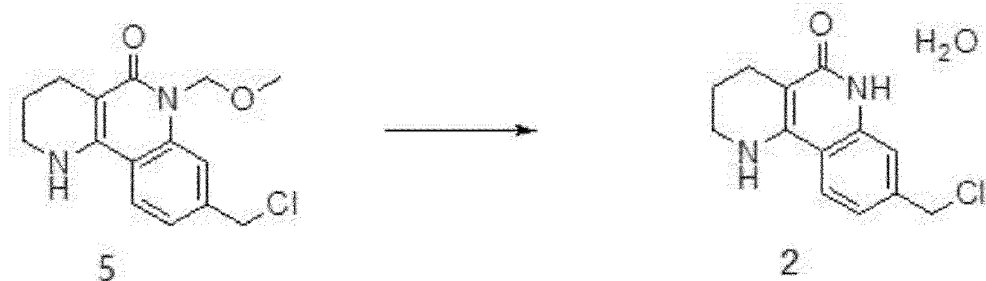
- [175] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진

자에게 있어서 자명할 것이다.

[176]

[177] 제조예 1: 화합물 2의 제조

[178]

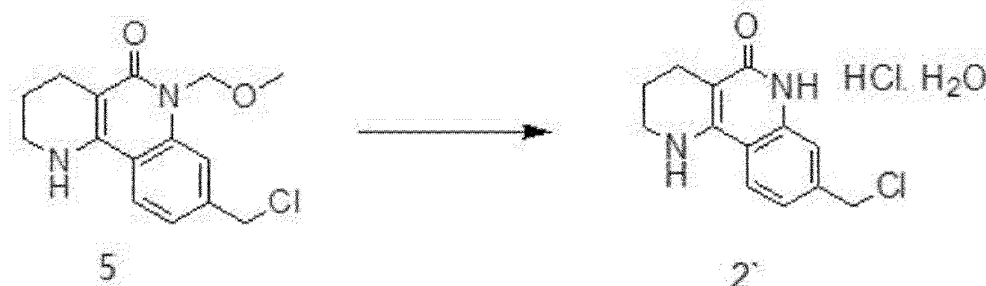


[179] 상기 화합물 5(4.5kg, 15.37mol)에 에탄올 46.7L를 가한 후 c-HCl(5.3L, 61.48mol)을 가하였다. 2시간 동안 환류교반하고 반응 종료를 확인한 후, 냉각하고 에탄올 16L와 정제수 29.4L를 첨가하였다. 6N NaOH 수용액으로 pH 8~10으로 조정한 후 여과하여 화합물 2(3.46kg, 수율 84.4%)를 얻었다.

[180]

[181] 제조예 2: 화합물 2'의 제조

[182]



[183] 상기 화합물 5(681.3g, 2.33mol)에 이소프로판올(6813mL)을 가한 후 c-HCl(970g, 9.32mol)을 가하였다. 75~85°C에서 2~3시간 교반하였다. 반응 종료를 확인한 후 냉각하고 6N-HCl 수용액을 첨가하였다. 생성된 고체를 여과하여 화합물 2'(600g, 수율 85.1%)을 얻었다.

[184]

[185] 실시예 1: 6-{4-[(5-옥소-1,2,3,4,5,6-헥사히드로벤조[h][1,6]나프티리딘-8-일)메틸]피페라진-1-일}니코티노니트릴의 합성(Free form)

[186]

[187] (1) 실시예 1-1

[198]

[199] (4) 실시예 1-4

[200] 실시예 1-1 내지 1-3에서 제조된 화합물 1(100g, 249.7mmol)을 DMAC(1.6L), THF(1.6L) 혼합용매에 투입 후, 45~55°C에서 교반하여 용해 시켰다. 여과 후 정제수(3.2L)를 첨가하고 0~10°C로 냉각 시켰다. 동 온도에서 교반하고 여과하는 공정을 통하여 화합물 1의 2수화물 결정을 얻었다.

[201]

[202] 실시예 1-1 내지 1-3에서 제조된 화합물 1은, 도 1 내지 도 3에 나타낸 바와 같이, XRD(X-Ray Diffraction) 분석에서 2θ 값이 7.88°, 10.23°, 13.89°, 15.16°, 15.78°, 18.05°, 19.27°, 19.51°, 22.79° 및 23.94°의 피크를 나타냈으며(도 1), DSC(Differential Scanning Calorimetry) 분석의 흡열 피크가 272°C에서 나타난 것으로 확인되었다(도 2). 또한 TGA(Thermogravimetric Analysis) 분석 결과 초기에 질량감소가 나타나지 않는 것으로부터 무수 결정형임이 확인되었다(도 3).

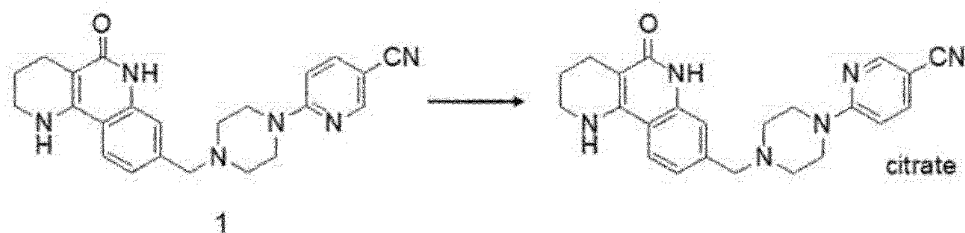
[203] 상기 실시예 1-4에서 추가로 제조한 화합물 1의 2수화물 결정은, XRD(X-Ray Diffraction) 분석에서 2θ 값이 7.95°, 10.25°, 13.25°, 13.78°, 21.12°, 25.22°인 피크를 나타냈으며(도 4), DSC(Differential Scanning Calorimetry) 분석의 흡열 피크가 117°C 및 272°C에서 나타난 것으로 확인되었다(도 5). 또한 TGA(Thermogravimetric Analysis) 분석 결과 94°C 부근에서 약 7.7%의 질량감소가 나타난 것으로 보아 2수화물임이 확인되었다(도 6).

[204]

[205] 실시예 2: 6-{4-[(5-옥소-1,2,3,4,5,6-헥사히드로벤조[h][1,6]나프티리딘-8-일)메틸]피페라진-1-일}니코티노니트릴 시트르산 염 무수물의 합성

[206] (1) 실시예 2-1

[207]

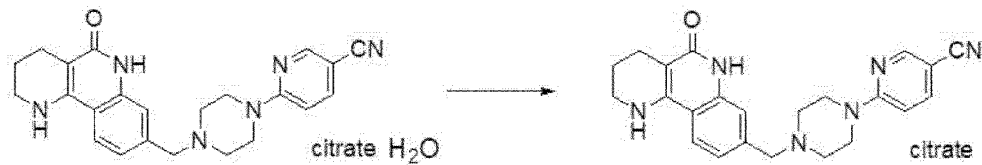


[208] 시트르산(690.8g, 3.59mol)에 에탄올(7.2L), 메탄올(2.4L)을 가하였다. 상기 실시예 1에서 제조된 화합물 1(960g, 2.39mol)을 첨가하고 65~70°C에서 2시간 교반하였다. 상온으로 냉각 후 여과하였다. 습체 고체에 메탄올(7.2L)을 가하고 2시간동안 환류교반하였다. 냉각 후 여과하여 목적 화합물(1.31kg, 92%)을 얻었다.

[209]

[210] (2) 실시예 2-2

[211]



[212]

하기 실시예 3에서 제조된

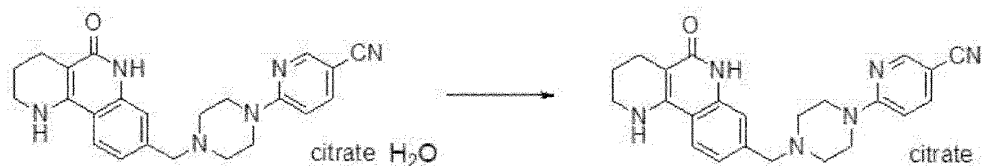
6-{4-[(5-옥소-1,2,3,4,5,6-헥사히드로벤조[h][1,6]나프티리딘-8-일)메틸]피페라진-1-일}니코티노니트릴 시트르산 염 (1수화물) (4.7kg, 7.7mol)에 에탄올(15.5L), 아세톤(15.5L), 이소프로판올(15.5L)를 가하였다. 55°C로 승온 후 55~70°C에서 4시간 동안 교반하였다. 25°C이하로 냉각 후 30분간 교반하였다. 생성된 고체를 여과하여 목적 화합물의 결정형(4.39kg, 수율 96.3%)을 얻었다.

[213]

[214]

(3) 실시예 2-3

[215]



[216]

하기 실시예 3에서 제조된

6-{4-[(5-옥소-1,2,3,4,5,6-헥사히드로벤조[h][1,6]나프티리딘-8-일)메틸]피페라진-1-일}니코티노니트릴 시트르산 염 (1수화물) (500g, 0.82mol)에 에탄올(2.5L), 아세톤(2.5L), 이소프로판올(2.5L)을 가하고, 정제수(20mL)를 첨가하였다. 55°C로 승온 후 55~75°C에서 4시간 동안 교반하였다. 25°C이하로 냉각 후 30분간 교반하였다. 생성된 고체를 여과하여 목적 화합물의 결정형(470g, 수율96.7%)을 얻었다.

[217]

[218]

상기 화학식 1의 시트르산 염 무수물 결정 화합물은, 도 7 내지 도 9에 나타낸 바와 같이, XRD 분석에서 2θ 값이 9.79°, 10.01°, 15.86°, 19.62°, 20.10°, 21.71° 및 26.58 인 피크를 나타냈으며(도 7), DSC 분석의 흡열 피크가 230°C 및 270°C에서 나타났다(도 8). 또한 TGA 분석 결과 초기에 질량감소가 나타나지 않는 것으로 보아 무수물임이 확인되었다(도 9).

[219]

[220]

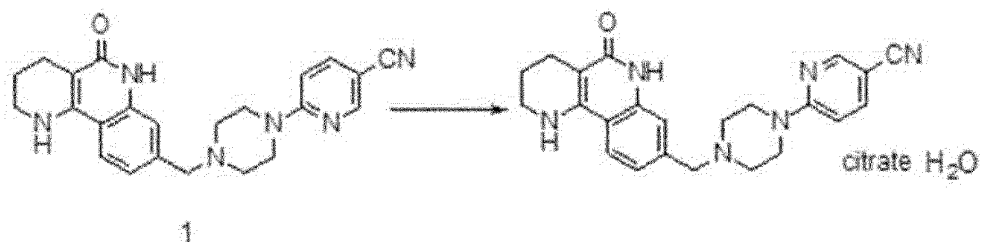
상기 실시예 2-2 및 실시예 2-3의 방법은 수화물로부터 무수물로 전환되는 과정에서 유연물질이 추가로 제거되는 효과가 나타나 보다 고순도의 무수결정형 화합물을 얻을 수 있었다.

[221]

[222]

실시예 3: 6-{4-[(5-옥소-1,2,3,4,5,6-헥사히드로벤조[h][1,6]나프티리딘-8-일)메틸]피페라진-1-일}니코티노니트릴 시트르산 염 1수화물의 합성

[223]



[224] 상기 실시예 1에서 제조된 화합물 1(7.34kg, 18.32mol)에 메탄올(25.7L), 정제수(25.7L)를 가하였다. 시트르산(5.28kg, 27.49mol)을 메탄올과 정제수의 1:1 혼합용액(22L)에 용해시킨 후 첨가하였다. 15~25°C에서 30분 교반 후 60°C로 승온하고, 60~70°C에서 2시간 동안 교반하였다. 상온으로 냉각 후 여과하여 목적 화합물(10.7kg, 95.8%)를 얻었다.

[225] 상기 화학식 1의 시트르산 염 1수화물 결정 화합물은 도 10 내지 도 12에 나타낸 바와 같이, XRD 분석에서 2θ 값이 6.94°, 9.99°, 11.89°, 13.35°, 15.07°, 16.57°, 18.17°, 20.90°, 23.68° 및 26.39°인 피크를 나타냈으며(도 10), DSC 분석의 흡열 피크가 120°C 및 193°C에서 나타났다(도 11). 또한 TGA 분석 결과 80~120°C에서 약 2.4%의 질량감소가 나타난 것으로부터 일수화물임이 확인되었다(도 12)

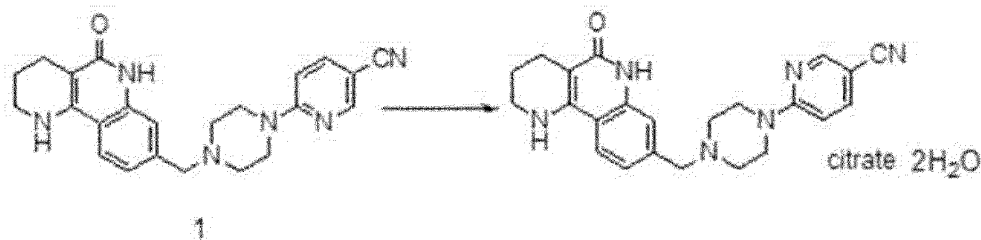
[226] 상기 제조방법은 반응이 완료되면서 목적 화합물이 결정형으로 얻어진다. 따라서 순도를 높이기 위한 재결정 또는 잔류용매를 낮추기 위한 추가 공정이 필요하지 않다.

[227]

[228] 실시예 4: 6-{4-[(5-옥소-1,2,3,4,5,6-헥사하이드로벤조[h][1,6]

나프티리딘-8-일)메틸]피페라진-1-일}니코티노니트릴 시트르산 염 2수화물의 합성

[229]



[230] 상기 실시예 1에서 제조된 화합물 1(6g, 15mmol)에 정제수(42mL)을 가하였다. 정제수(18mL)에 시트르산(3.6g, 22.5mmol)을 녹여서 첨가하였다. 상온에서 30분 교반 후 60°C로 승온하고, 60~65°C에서 1.5시간 동안 교반하였다. 상온으로 냉각한 후 여과하여 목적 화합물(8.45g, 수율 97.8%)를 얻었다.

[231] 상기 화학식 1의 시트르산 염 2수화물 결정 화합물은 도 13 내지 도 15에 나타낸 바와 같이, XRD 분석에서 2θ 값이 8.15°, 10.96°, 13.35°, 16.09°, 18.73°, 21.47°, 25.45°, 26.86° 및 28.51°인 피크를 나타냈으며(도 13), DSC 분석의 흡열 피크가 140°C, 176°C 및 266°C에서 나타났다(도 14). 또한 TGA 분석 결과 100~150°C에서

약 5.6%의 질량감소가 나타난 것으로부터 2수화물임이 확인되었다(도 15).

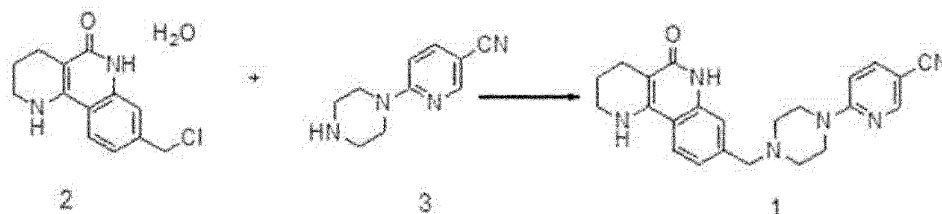
[232]

[233] **비교예 1:**

6-{4-[(5-옥소-1,2,3,4,5,6-헥사히드로벤조[h][1,6]나프티리딘-8-일)메틸]피페라진-1-일}니코티노니트릴의 합성(Free form)

[234] **(1) 비교 합성예 1-1**

[235]



[236] 상기 화합물 2(2.56kg, 9.6mol) 및 화합물 3(1.98kg, 10.56mol)에 메탄올 35.8L를 가하였다. 트리에틸아민(2.67L, 19.2mol)을 첨가하고 24시간 동안 환류교반하였다. 반응 종료 확인 후 DMAC(38.4L), THF(38.4L)를 가하고 승온하여 용해 시켰다. 용해액에 활성탄을 가하고 교반하였다. 여과 후 정제수에 적가하여 결정화하고 여과하였다.

[237] 습체 고체에 DMAC, THF를 가하여 용해 후 재결정하여 화합물1(2.93kg, 71.1%)을 얻었다. (1단계)

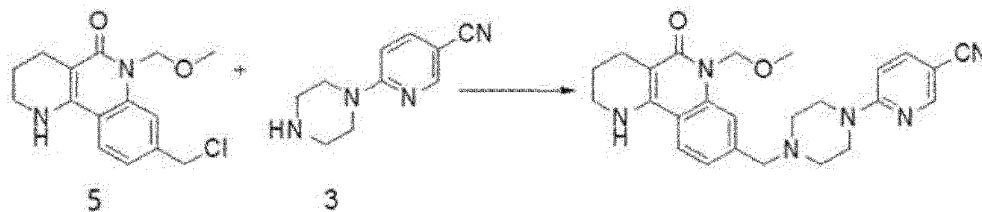
[238] 이후 유연물질 제거를 위해 추가로 정제공정을 수행하여 깨끗한 화합물 1(1.59kg, 수율 39%)을 얻었다. (2단계)

[239]

[240] **(2) 비교 합성예 1-2**

[241] (단계 a)

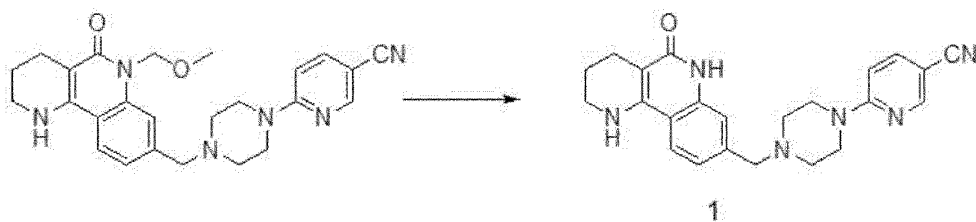
[242]



[243] 상기 화합물 5에 메탄올을 가한 후 6-(피페라진-1-일)니코티노니트릴과 트리에틸아민을 가하였다. 80°C에서 24시간 교반하여 반응종료 확인 후 반응액을 농축하였다. 그 후 디클로로메탄으로 추출하고 유기용매층을 무수황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 감압 농축하여 얻은 잔여물을 관 크로마토그래피(헥산:에틸아세테이트=1:9)로 정제하여 위의 반응식과 같은 화합물(수율: 75%)을 얻었다.

[244] (단계 b)

[245]



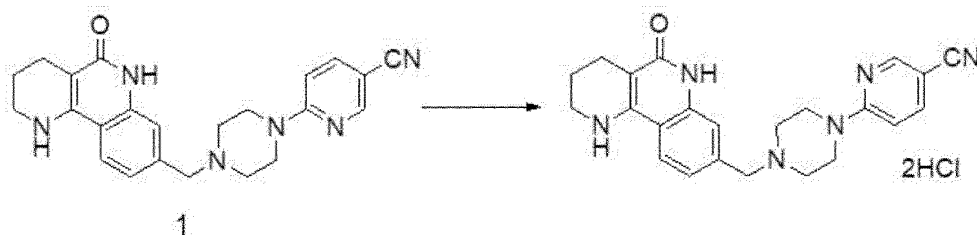
[246] 단계 a에서 제조한 화합물을 디클로로메탄에 녹인 후 트리플루오로아세트산을 넣고 환류 냉각기를 사용하여 24시간 동안 가열하였다. 반응종료 확인 후 디클로로메탄으로 추출하고 탄산수소나트륨 포화수용액에서 한번 더 디클로로메탄으로 추출하였다. 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 용매를 감압 농축하여 얻은 잔여물을 관 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=1:9)로 정제하여 화학식 1의 화합물(수율: 65%)을 얻었다.

[247]

[248] 비교예 2:

6-{4-[(5-옥소-1,2,3,4,5,6-헥사히드로벤조[h][1,6]나프티리딘-8-일)메틸]피페라진-1-일}니코티노니트릴 2염산염의 합성

[249]



[250] 상기 비교 합성에 1-2에서 얻은 화합물 1을 메탄올에 녹인 후, 1.25M 염산 메탄올 용액을 가하고 12시간 동안 교반하였다. 반응 종결 후 용매를 감압 농축한 후 아세트산에틸로 고체를 여과하여 상기 화합물 1의 2염산염(수율: 95%)을 얻었다.

[251]

[252] 분석방법: 수분량, DSC, TGA, 및 XRD 분석

[253] 본 발명에 기재된 수분량, DSC, TGA, 및 XRD 분석은 아래의 방법으로 실시되었다.

[254] (1) 수분량 측정

[255] 수분량 측정은 870KF Titrino Plus(Metrohm) 칼-피셔 수분 측정기를 이용하여 측정하였다.

[256] (2) DSC 분석

[257] DSC 분석은 30~250 내지 350°C에서 DSC 8000(PerkinElmer) 분석기에서 수행하였다. 0.5~2mg의 시료를 알루미늄 DSC 펜에 칭량하고, 천공된 알루미늄 뚜껑으로 비-밀폐식으로 밀봉한 후, 시료를 10°C/min의 스캔 속도로 30°C에서 250 내지 350°C까지 가열하여 생성된 열류 반응을 모니터링 하였다.

[258] (3) TGA 분석

[259] TGA 분석은 30~900°C에서 TGA 8000(PerkinElmer) 분석기에서 수행하였다. 0.5~2mg의 시료를 Ceramic Crucible에 칭량하고, 시료를 5°C/min의 스캔 속도로 30°C에서 900°C까지 가열하여 생성된 질량 감소를 모니터링 하였다.

[260] (4) XRD 분석

[261] XRD 분석은 2° 2θ에서 40° 2θ까지 D8 Focus(Bruker ASX) 분석기에서 수행하였다. 샘플 표면이 평활하고 샘플 홀더 수준 바로 위로 되도록, 약 100mg의 샘플을 플라스틱 샘플 홀더에 부드럽게 압착시킨 후 다음과 같은 조건에 측정하였다.

[262] <분석 조건>

[263] 애노드 재료(Ka): Cu Ka(1.5406Å); 스캔범위: 2~40도; 제니에이터 설정: 40mA, 40kV; 스캔 속도: 10도/min; 발산슬릿 크기: 0.6mm; 온도: 25°C; 스텝 크기: 0.02도 2θ; 회전: 사용

[264]

[265] 실험예 1: 유연물질 분석

[266] HPLC(제품명: Agilent 1100, 제조사: Agilent)를 사용하여, 상기 실시예 및 비교예에서 제조된 화합물들에 포함된 유연물질의 양을 측정하고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[267] <HPLC 조작 조건>

[268] 검출기: UV 검출기(검출파장: 220nm)

[269] 컬럼 : Watchers 100 ODS-P, 4.6 X 250mm, 5 μ m 또는 이와 동등한 칼럼

[270] 온도 : 25°C 부근의 일정온도

[271] 이동상 A: 제일인산암모늄 11.503g을 1000mL 물에 넣어 녹이고 필터 후 탈기하여 제조, 이동상 B: 아세트니트릴

[272] 이동상 농도구배:

[273] [표1]

분석시간(분)	이동상 A (%)	이동상 B(%)
0	85	15
5	80	20
15	80	20
20	75	25
25	75	25
75	30	70
76	85	15
90	85	15

[274] 희석액: 이동상 A와 아세트니트릴을 5:5로 섞어서 사용

[275] 유속: 1.0mL/분, 주입량: 10.0 μ L, 분석시간: 90분

[276] * 검액조제 : 검체 10mg을 희석액 50mL에 녹여 사용

[277] [표2]

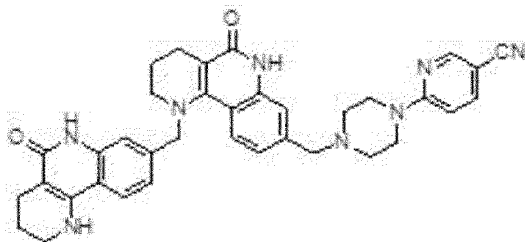
화합물 1 결정(Free form)의 유연물질 분석					
비교 합성에 1-1 제조 화합물 1(1단계)		비교 합성에 1-1 제조 화합물 1(2단계)		실시에 1-2 제조 화합물 1	
RT(min)	Area(%)	RT(min)	Area(%)	RT(min)	Area(%)
43.884	0.2435	44.006	0.0530	-	-
49.185	0.2475	48.987	0.1655	48.734	0.0225
화합물 1 시트르산 염 결정의 유연물질 분석					
실시에 3 제조 화합물 1의 시트르산 염 결정			실시에 2-3 제조 화합물 1의 시트르산 염 결정		
RT(min)	Area(%)	RT(min)	Area(%)	RT(min)	Area(%)
-	-	-	-	-	-
48.843	0.0122	-	-	-	-

[278]

[279] 상기 실험결과, 본 발명의 실시에에 의해 제조된 화합물 1의 시트르산 염 결정형의 경우, 전체 제조과정을 통하여 재결정 과정을 전혀 수행하지 않았음에도 불구하고, 주요 유연물질이 현저하게 감소하거나 검출되지 않은 것으로 확인되었다.

[280] HPLC 분석시 Retention time 49분 근처에서 나오는 유연물질은 상기 화학식 2 및 화학식 3, 또는 화학식 5 및 화학식 3의 커플링 공정이 과반응하여 생긴 물질로 예측되며 생산 후 분리 제거가 어렵기 때문에, 제조공정에서 상기 유연물질을 감소시키는 것은 매우 중요하다.

[281] RT 49 근처의 유연물질:



[282]

[283] 실험예 2: 물에 대한 용해도 측정

[284] 화합물 1 부가염의 물에 대한 용해도를 측정하고, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

- [285] 구체적으로, Shake-flask에 과량의 화합물과 용매(10mM, in 1mL water)를 넣은 후 24시간 shaking한 후 UPLC를 이용하여 정량분석하였다.
- [286] <사용장비 및 조건>
- [287] 장비명: Acquity UPLC(Waters)
- [288] 컬럼: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7um X 2.1mm X 50mm
- [289] 파장: 226, 276, 310nm(PDA detector)
- [290] 컬럼온도: 40°C, 샘플온도: 25°C, 주입량: 5ul
- [291] 이동상 및 농도구배
- [292] [표3]

Time(min)	Water(0.2% 인산)	Acetonitrile
0	90	10
0.3	90	10
1.5	1	99
1.6	0	100
1.8	90	10
3.0	90	10

- [293] 화합물을 DMSO에 녹여 UPLC로 측정한 후 calibration curve를 그린다.
- [294] Shke-flask법으로 포화시킨 화합물을 여과 후 UPLC로 측정하여 calibration curve에 대입시켜 농도를 계산한다.
- [295] [표4]

염	Water solubility (mM)	염	Water solubility (mM)
화합물 1의 시트르산 염 결정 무수물	1.067	화합물 1의 숙신산 염 결정 무수물	0.498
화합물 1의 타타르산 염 결정 무수물	0.241	화합물 1의 푸마르산 염 결정 무수물	0.444
화합물 1의 2HCl 염 결정 무수물	0.392	비교예 1-1 화학식1의 화합물 결정(Free form)	0.001

- [296] 상기 실험결과, 본 발명의 화합물 1의 시트르산염 결정 무수물의 경우 다른 염들과 비교하여 물에 대한 용해도가 현저히 우수한 것으로 확인되었다.
- [297]

[298] 실험예 3: 화합물 1 부가염의 안정성 확인

[299] 상기 실시예 및 비교예에서 제조된 화합물 1의 부가염 결정의 안정성을 확인하고, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[300] 온도, 습도 및 광 조건에 따르는 실험은 안정성 챔버에 각각의 조건으로 보관한 후, HPLC로 순도를 확인하는 방법으로 실시하였다.

[301] <UV 200 watt 조사>

[302] 각 시료를 페트리 디쉬에 얇게 퍼지게 담은 후, 광안정성시험챔버(CARON 6542-2)를 사용하여, 25°C, 습도 60% 조건에서, 광량 35W인 UV를 총 조사량이 200 watt가 되도록 조사하여 안정성을 평가하였다.

[303] <Visible 1200k lux 조사>

[304] 각 시료를 페트리 디쉬에 얇게 퍼지게 담은 후, 광안정성시험챔버(CARON 6542-2)를 사용하여, 25°C, 습도 60% 조건에서, 광량 35k Lux인 가시광선을 총 조사량이 1200k lux가 되도록 조사하여 안정성을 평가하였다.

[305] [표5]

조건	순도(%)	
	비교예 2의 2HCl 염 결정 무수물	실시예 2의 시트르산 염 결정 무수물
초기 값	97.89	97.97
온도 50°C, 3일	97.79	97.86
습도 75 %, 3일	97.76	97.81
온도 40°C, 습도 70 %, 3일	97.83	97.79
UV 200 watt - dark	97.89	98.38
UV 200 watt	86.89	96.94
Visible 1200k lux - dark	97.89	98.39
Visible 1200k lux	93.40	96.73

[306] 상기 실험결과, 화합물 1의 2염산염 및 시트르산염 무수물 모두 온습도에 안정한 것으로 나타났다. 하지만, 2염산염은 UV200 watt 및 Visible1200k lux에서 광안정성이 현저히 떨어지는 것으로 나타났다. 광 안정성이 낮을 경우 햇빛뿐만 아니라 실내 조명에 의해서도 보관 안정성이 저하되어 순도가 낮아질 수 있으므로, 원료를 차광보관해야 하는 등 관리에 주의를 요한다. 이와 같이 안정성을 확인하였을 때, 화합물 1의 시트르산 염이 가장 적합한 것으로 확인되었다.

[307]

[308] 실험예 4: 염의 융점 확인

[309] 상기 실시예에서 제조된 시트르산 염 화합물들의 용점을 B-454(BUCHI) 용점 측정기를 사용하여 측정하고, 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[310] [표6]

실시예 2의 시트르산 염 결정 무수물	실시예 3의 시트르산 염 결정 1수화물	실시예 4의 시트르산 염 결정 2수화물
206°C	176°C	173°C

[311] 상기 실험결과, 본 발명의 시트르산 염의 결정형은 모두 의약품 원료로서 충분히 높은 용점을 갖는 것이 확인되었다.

[312]

[313] **실험예 5: 다양한 용매에 대한 용해도 측정**

[314] 상기 실시예에서 제조된 결정 화합물들의 다양한 용매에 대한 용해도를 측정하고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

[315] 구체적으로, 시료 0.1g을 정확히 달아 각 용매에 넣고 15~25°C에서 5분마다 30초씩 세계 흔들어 섞고, 30분 이내에 녹는 양을 측정하였다.

[316] [표7]

용매	용해도(0.1g/mL)			
	Free form	실시예 2의 시트르산 염 결정 무수물	실시예 3의 시트르산 염 결정 1수화물	실시예 4의 시트르산 염 결정 2수화물
DMF	8mL	8mL	2.9mL	2.5mL
MeOH	300mL	100mL이상	9mL	9mL
HCl 수용액(pH 1.1)	350mL	100mL이하	50mL	55mL
EtOH	1000mL이상	1000mL이상	350mL	450mL
water	1200mL이상	1000mL이하	400mL	400mL이상

[317]

[318] **실험예 6: 화합물 1의 시트르산 염 무수물과 1수화물의 순도 및 안정성 평가**

[319] 본 발명의 실시예 2에서 제조된 시트르산 염 결정 무수물과 실시예 3에서 제조된 시트르산 염 결정 1수화물을 순도 및 안정성을 평가하고 그 결과를 그 결과를 하기 표 8 및 표 9에 나타내었다.

[320] 하기 표에서 가속 보관 조건은 온도 40±2°C, 습도 75±5%로 안정성 시험을 실시하였고, 장기 보관 조건은 온도 25±2°C, 습도 60±5%로 순도 및 안정성 시험을 실시하였다. 실험 결과는 HPLC(제품명: agilent 1290, 제조사: Agilent)를

사용하여 상기 실험예 1와 동일한 조건 하에서 측정하였다.

[321] [표8]

(기준 %)	가속 보관 조건 순도 (기간: month, 면적 %)				장기 보관 조건 순도 (기간: month, 면적 %)			
기간	initial	1	3	6	initial	1	3	6
실시예 2시트르산 염 결정 무수물 (순도)	99.66%	99.64%	99.65%	99.54%	99.66%	99.64%	99.66%	99.58%
						9	12	18
						99.67%	99.72%	99.73%
						24	36	
						99.74%	99.73%	

[322] [표9]

(기준 %)	가속 보관 조건(유연물질) (기간: month, 면적 %)			장기 보관 조건(유연물질) (기간: month, 면적 %)			
기간	initial	3	6	initial	3	6	9
실시예 2시트르산 염 결정 무수물	0.26%	0.24%	0.28%	0.26%	0.28%	0.29%	0.31%
					12	18	24
					0.29%	0.33%	0.34%
					30	36	
					0.34%	0.30%	
기간	initial	3	6	initial	3	6	
실시예 3시트르산 염 결정 1수화물	0.38%	0.34%	0.32%	0.38%	0.29%	0.32%	-

[323]

[324] 실험예 7: 폴리(ADP-리보오스)폴리머라제[PARP-1] 효소 저해 시험

[325] 본 발명의 화학식 1 화합물의 시트르산 염 결정 무수물(실시예 2) 및 화학식 1 화합물의 염산염 결정 무수물(비교예 2)의 PARP-1 효소 저해 활성은 BPS Bioscience 사에서 구입한 키트(cat. 80551)를 사용하여 다음과 같이 검정하였다.

[326] 히스톤을 BPS Bioscience의 kit에서 제공한 96웰 플레이트에 코팅하고 16 시간

동안 4 °C에서 방치하였다. 그 후, 플레이트를 PBST(7.5mM Na₂HPO₄, 2.5mM NaH₂PO₄, 145mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 4번 세척한 후에 비특이적 반응을 막기 위해 blocking buffer(BPS Bioscience의 kit에서 제공)를 첨가하여 25 °C에서 한 시간 동안 방치하였다. 한 시간 방치 후, 플레이트를 PBST로 다시 4번 세척하고 다양한 농도의 실시예 2 및 비교예 2의 화합물을 PARP-1 효소 (50 ng/well)와 assay mixture와 activated DNA를 함유하는 반응액에 넣고 25°C에서 한 시간 동안 반응시켰다. 한 시간 후에 각 웰을 PBST로 4번 세척하고, PARP 효소에 의한 리보실화의 양을 측정하기 위해 streptavidin-linked peroxidase (Strep-HRP, 1:50 희석)를 첨가하여 25°C에서 30 분간 반응시켰다. 플레이트를 PBST로 4번 세척하고 난 후, 최종적으로 HRP chemiluminescent 기질을 넣고 반응시켰다. 각 효소에 의해 형성된 히스톤 리보실화의 양은 Synergy™ H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., US(A))를 이용하여 정량화하였다. 본 발명의 화합물에 대해서 각각의 농도별로 수득된 결과는 2개의 웰에서 얻어진 평균값이고, 결과 분석은 SigmaPlot 10 (Systat Software Inc., US(A))을 사용하여 화합물의 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[327] 대조 화합물로는 대표적인 PARP 저해제인 AZD-2281 (Olaparib)을 사용하였다.

[328] 상기 실험결과는 하기 표 10에 나타내었으며, 도 16에 그래프로 도시하였다.

[329] [표10]

IC ₅₀		
AZD-2281 (Olaparib)	비교예 2염산염 결정 무수물	실시예 2의 시트르산염 결정 무수물
5.48 nM	3.03 nM	2.62 nM

[330]

[331] 실험예 8: 탄키라제-1, 2 효소 저해 시험

[332] 본 발명의 화학식 1 화합물의 시트르산 염 결정 무수물(실시예 2) 및 화학식 1 화합물의 염산염 결정 무수물(비교예 2)의 탄키라제-1 또는 탄키라제-2 효소 저해 활성은 BPS Bioscience 사에서 구입한 키트(cat. 80573, 80578)를 사용하여 다음과 같이 검정하였다.

[333] 히스톤을 BPS Bioscience의 kit에서 제공한 96웰 플레이트에 코팅하고 16 시간 동안 4 °C에서 방치하였다. 그 후, 플레이트를 PBST (7.5mM Na₂HPO₄, 2.5mM NaH₂PO₄, 145mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 4번 세척한 후에 비특이적 반응을 막기 위해 blocking buffer (BPS Bioscience의 kit에서 제공)를 첨가하여 25 °C에서 한 시간 동안 방치하였다. 한 시간 방치 후, 플레이트를 PBST로 다시 4번 세척하고 다양한 농도의 실시예의 화합물을 탄키라제-1 효소 (40 ng/well) 또는 탄키라제-2 효소 (15 ng/well)와 assay mixture를 함유하는 반응액에 넣고 25 °C에서 한 시간 동안 반응시켰다. 한 시간 후에 각 웰을 PBST로 4번 세척하고,

PARP 효소에 의한 리보실화의 양을 측정하기 위해 streptavidin-linked peroxidase (Strep-HRP, 1:50 희석)를 첨가하여 25 °C에서 30 분간 반응시켰다. 플레이트를 PBST로 4번 세척하고 난 후, 최종적으로 HRP chemiluminescent 기질을 넣고 반응시켰다. 각 효소에 의해 형성된 히스톤 리보실화의 양은 Synergy™ H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., US(A))를 이용하여 정량화하였다. 본 발명의 화합물에 대해서 각각의 농도별로 수득된 결과는 2개의 웰에서 얻어진 평균값이고, 결과 분석은 SigmaPlot 10 (Systat Software Inc., US(A))을 사용하여 화합물의 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[334] 대조 화합물로는 대표적인 탄키라제 inhibitor인 XAV-939 및 PARP 저해제로 개발 되었지만 탄키라제 억제에도 효능이 좋은 것으로 알려진 BMN-673 (Talazoparib)을 사용하였다.

[335] 상기 실험결과는 하기 표 11 내지 12에 나타내었으며, 도 17 및 도 18에 그래프로 도시하였다.

[336] [표11]

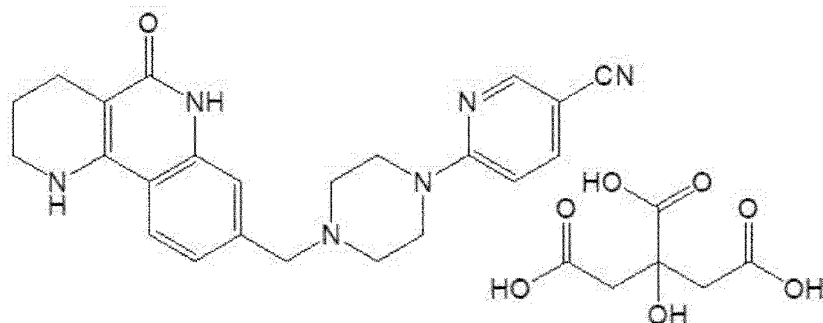
IC ₅₀		
BMN-673 (Talazoparib)	XAV-939	실시에 2 시트르산염 무수물
8.29 nM	8.22 nM	4.31 nM

[337] [표12]

IC ₅₀			
BMN-673 (Talazoparib)	XAV-939	비교예 2의 2염산염 결정 무수물	실시에 2 시트르산염 결정 무수물
2.53 nM	2.21 nM	1.12 nM	1.06 nM

청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식으로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형:

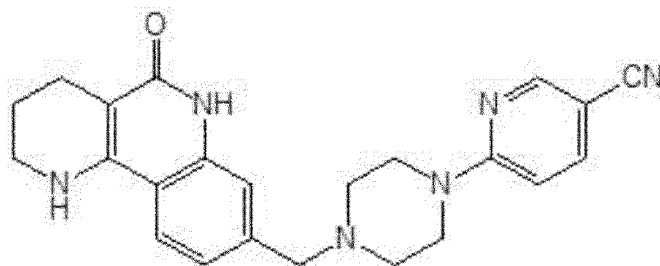


- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염은 무수물인 것을
특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 결정형은 분말 XRD 패턴에서 10.01° , 15.86° , 19.62° 및 26.58° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의
시트르산 염 결정형.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 결정형은 분말 XRD 패턴에서 9.79° , 20.10° 및 21.71° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$
값을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의
시트르산 염 결정형.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염은 1수화물인 것을
특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 결정형은 분말 XRD 패턴에서 6.94° , 9.99° , 16.57° , 18.17° , 23.68° , 및
 26.39° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭
유도체 화합물의 시트르산 염 결정형.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 결정형은 분말 XRD 패턴에서 11.89° , 13.35° , 15.07° , 및 20.90° 의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$
값을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체
화합물의 시트르산 염 결정형.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염은 2수화물인 것을
특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,

상기 결정형은 분말 XRD 패턴에서 8.15°, 10.96°, 16.09°, 21.47°, 25.45°, 및 26.86°의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 결정형은 분말 XRD 패턴에서 13.35°, 18.73°, 및 28.51°의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형.

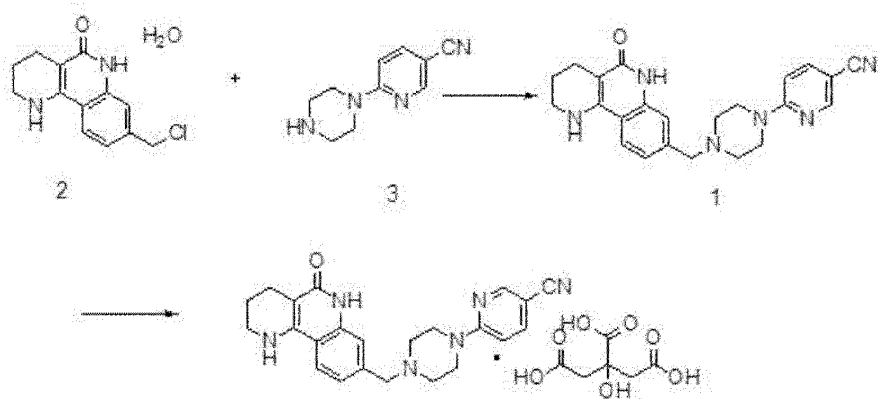
[청구항 11] 하기 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형:
[화학식 1]



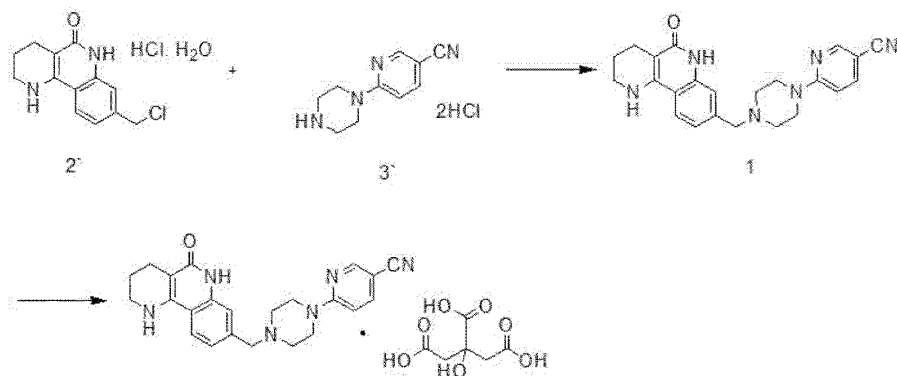
[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 결정형은 분말 XRD 패턴에서 7.88°, 10.23°, 15.16°, 19.27°, 22.79° 및 23.94°의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 결정형은 분말 XRD 패턴에서 7.95°, 10.25°, 13.25°, 13.78°, 21.12°, 및 25.22°의 $2\theta(\pm 0.2^\circ)$ 값을 포함하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 결정형.

[청구항 14] (a) 하기 반응식 1-1의 화학식 2 화합물과 화학식 3의 화합물을 반응시킨 후, 결정화 공정을 수행하여 화학식 1의 결정 화합물을 얻는 단계; 및
(b) 상기 화학식 1의 결정 화합물과 시트르산을 유기용매 및 물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매에서 50 내지 80°C로 반응시키는 단계;를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법:
[반응식 1-1]



- [청구항 15] (1) 하기 반응식 1-2의 화학식 2' 화합물과 화학식 3'의 화합물을 반응시킨 후, 결정화 공정을 수행하여 화학식 1의 결정 화합물을 얻는 단계; 및
(2) 상기 화학식 1의 결정 화합물과 시트르산을 유기용매 및 물로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 용매에서 50 내지 80°C로 반응시키는 단계:를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법:
[반응식 1-2]



- [청구항 16] 제14항 또는 제15항에 있어서,
제14항의 (a) 단계 또는 제15항의 (1) 단계의 반응은 반응용매로 N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸아세트아미드(DMAC), N-메틸피페리돈(NMP), 및 디메틸설폭사이드(DMSO) 중에서 선택되는 1종 이상을 사용하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
제14항의 (a) 단계 또는 제15항의 (1) 단계의 결정화 공정은 결정화 용매로 메탄올 또는 물을 사용하는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법.

- [청구항 18] 제14항 또는 제15항에 있어서,
상기 결정형은 무수물 또는 수화물인 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 결정형은 무수물이며, 상기 무수물은 제14항의 (b) 단계 또는 제15항의 (2) 단계에서 화학식 1로 표시되는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염을 1수화물 결정형태로 제조한 후, 상기 1수화물 결정을 다시 무수물 결정으로 전환하여 제조되는 것을 특징으로 하는 트리사이클릭 유도체 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법.
- [청구항 20] 제14항 또는 제15항에 있어서,
제14항의 (b) 단계 또는 제15항의 (2) 단계의 용매로는 메탄올과 에탄올 혼합용매가 사용되며, 이러한 용매의 사용에 의해 무수물 결정형을 제조하는 것을 특징으로 하는, 화학식 1 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법.
- [청구항 21] 제14항 또는 제15항에 있어서,
제14항의 (b) 단계 또는 제15항의 (2) 단계의 용매로는 메탄올과 물의 혼합용매가 사용되며, 이러한 용매의 사용에 의해 1수화물 결정형을 제조하는 것을 특징으로 하는, 화학식 1 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법.
- [청구항 22] 제14항 또는 제15항에 있어서,
제14항의 (b) 단계 또는 제15항의 (2) 단계의 용매로는 물이 사용되며, 이러한 용매의 사용에 의해 2수화물 결정형을 제조하는 것을 특징으로 하는, 화학식 1 화합물의 시트르산 염 결정형의 제조방법.
- [청구항 23] 제1항 내지 13항 중 어느 한 항의 결정형 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.