



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월14일  
(11) 등록번호 10-1363352  
(24) 등록일자 2014년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07D 401/12 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2007-7005834  
(22) 출원일자(국제) 2005년08월15일  
심사청구일자 2010년07월08일  
(85) 번역문제출일자 2007년03월13일  
(65) 공개번호 10-2007-0057832  
(43) 공개일자 2007년06월07일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/029013  
(87) 국제공개번호 WO 2006/023454  
국제공개일자 2006년03월02일  
(30) 우선권주장  
60/601,805 2004년08월16일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US6653323 B2  
WO2001042212 A1  
WO2004074276 A1

(73) 특허권자  
세라밴스 인코포레이티드  
미국 캘리포니아 94080 사우쓰 샌프란시스코 게이  
트웨이 불러바드 901  
(72) 발명자  
차오 로버트 에스.  
미국 캘리포니아 95054 산타 클라라 도일 씨클  
1121  
라프타 미로슬라브  
미국 캘리포니아 94085 쉐니베일 이. 듀안 에비뉴  
411  
콜슨 피에르-장  
미국 캘리포니아 94107 샌프란시스코 브라이언트  
스트리트 #403301  
(74) 대리인  
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 23 항

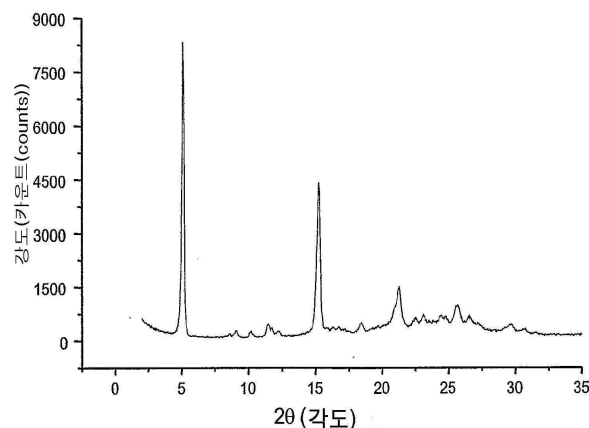
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 비페닐 화합물의 결정형

(57) 요약

본원 발명은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로  
퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정  
형 또는 그의 용매화합물을 제공한다. 또한 본원 발명은 그와 같은 염을 포함하거나 또는 그와 같은 염을 사용  
하여 제조된 약학적 조성물; 그와 같은 염을 제조하기 위한 제조공정 및 중간체; 및 폐질환을 치료하기 위해 그  
와 같은 염을 사용하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-{{(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노}메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물(solvate).

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 215℃ 내지 240℃의 범위에서 최대 흡열성 열 유속을 나타내는 시차주사열량계 곡선을 갖는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 215℃ 내지 229℃의 범위에서 최대 흡열성 열 유속을 나타내는 시차주사열량계 곡선을 갖는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화합물은 230℃ 내지 240℃의 범위에서 최대 흡열성 열 유속을 나타내는 시차주사열량계 곡선을 갖는 것을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 화합물은  $5.0 \pm 0.3$  및  $15.0 \pm 0.3$ 의  $2\theta$  값에서 회절 피크들을 갖는 분말 X-선 회절 패턴 및 230℃ 내지 245℃의 범위에서 최대 흡열성 열 유속을 나타내는 시차주사열량계 곡선을 특징으로 하는 화합물.

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

제1항에 있어서, 상기 화합물은 704, 748, 768, 841, 900, 1055, 1104, 1166, 1218, 1294, 1408, 1522, 1609, 1655, 및  $1701\text{ cm}^{-1}$ 에서 유의성 있는 흡수 밴드들을 갖는 적외선 흡수 스펙트럼을 갖는 것인 화합물.

### 청구항 11

삭제

### 청구항 12

제1항에 있어서, 미분화된(micronized) 형태인 것인 화합물.

### 청구항 13

약학적으로 허용가능한 담체 및 제1항 내지 제4항, 제7항, 제10항, 및 제12항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는, 폐질환 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 조성물은 스테로이드계 항-염증제를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 스테로이드계 항-염증제는 6 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -디플루오로-17 $\alpha$ -[(2-푸라닐카보닐)옥시]-11 $\beta$ -하이드록시-16 $\alpha$ -메틸-3-옥소안드로스타-1,4-디엔-17 $\beta$ -카보티오산 S-플루오로메틸 에스테르 또는 그의 용매화합물인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, 상기 조성물은 포스포디에스테라제-4 억제제를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 17

제13항에 있어서, 상기 조성물은 흡입 투여를 위해 제제화되는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 18

제13항에 있어서, 미분화된(micronized) 형태인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 19

제17항에 있어서, 상기 담체는 락토오스, 전분, 만니톨, 텍스트로스, 폴리락트산, 폴리락티드-코-글리콜라이드 또는 그의 조합인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 20

(a) 제1항 내지 제4항, 제7항, 제10항, 및 제12항 중 어느 한 항의 화합물; 및

(b) 스테로이드계 항-염증제를 포함하는 배합물.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 스테로이드계 항-염증제는 6 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -디플루오로-17 $\alpha$ -[(2-푸라닐카보닐)옥시]-11 $\beta$ -하이드록시-16 $\alpha$ -메틸-3-옥소안드로스타-1,4-디엔-17 $\beta$ -카보티오산 S-플루오로메틸 에스테르 또는 그의 용매화합물인 것인 배합물.

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

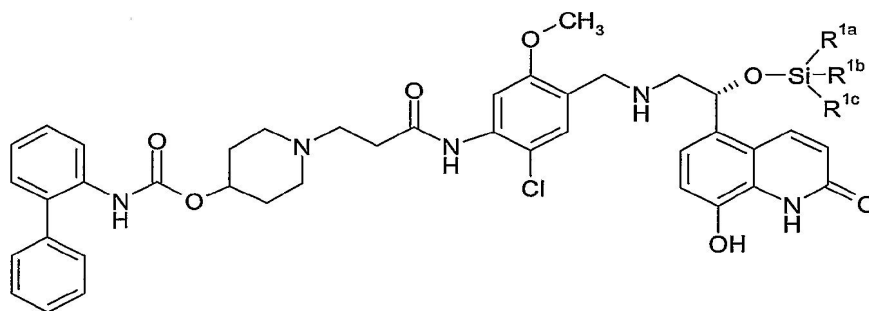
#### 청구항 25

제1항의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 비페닐-2-일카르복산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]-피페리딘-4-일 에스테르를 1,2-에탄디술포산 또는 그의 수화물과 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 26

제1항의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 하기 식 II를 가지며,



II

상기에서  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$  및  $R^{1c}$ 는  $C_{1-4}$  알킬, 페닐,  $-C_{1-4}$  알킬-(페닐)로부터 독립적으로 선택되거나, 또는  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$  및  $R^{1c}$  중 하나는  $-O-(C_{1-4}$  알킬)인 것인 식 II의 화합물을 플루오라이드 이온과 접촉시키는 단계; 및

(b) 단계 (a)의 생성물을 1,2-에탄디술포산 또는 그의 수화물과 접촉시켜 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물을 형성하는 단계를 포함하고, 상기 단계 (a)와 단계 (b)는 상기 단계 (a)의 생성물의 분리 없이 동일한 반응 용기에서 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 27

230°C 내지 245°C의 범위에서 용점을 갖는 제1항의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물의 시드 결정(seed crystal)을 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 이소부탄올, 에틸 아세테이트 및 디클로로메탄으로 구성되는 군으로부터 선택되는 비활성 희석제, 또는 그의 물과의 혼합물에 용해된 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염 또는 그의 용매화합물(solvate)을 포함하는 용액에 첨가하는 단계를 포함하고, 상기 시드 결정은 교반하지 않고, 냉각시키지 않으면서 천천히 결정화시켜 형성된 것인 방법.

#### 청구항 28

230°C 내지 245°C의 범위에서 용점을 갖는 제1항의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:

(a) 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형을 제 1 온도로 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 이소부탄올, 에틸 아세테이트 및 디클로로메탄으로 구성되는 군으로부터 선택되는 비활성 희석제, 또는 그의 물과의 혼합물에서 용해하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 생성물을 제 2 온도까지 냉각시키는 단계; 및

(c) 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 시드 결정(seed crystal)을 첨가하는 단계를 포함하고;

상기 시드 결정은 교반하지 않고, 냉각시키지 않으면서 천천히 결정화시켜 형성된 것이고, 상기 제 1 온도는 상기 1,2-에탄디술포산 염을 용해하기 위한 온도이고, 및 상기 제 2 온도는 상기 단계 (b)의 생성물에 첨가되었을 때 상기 시드 결정이 용해하는 온도 미만인 것인 방법.

#### 청구항 29

비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-{{(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노}메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르를 정제하는 방법으로서; 상기 방법은 제1항의 화합물을 형성하는 단계를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 30

치료법에서 또는 의약으로서 사용하기 위한, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-{{(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노}메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물(solvate).

#### 청구항 31

삭제

#### 청구항 32

삭제

#### 청구항 33

제13항에 있어서, 상기 폐질환은 만성 폐쇄성 폐질환 또는 천식인 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 34

삭제

#### 청구항 35

삭제

#### 청구항 36

삭제

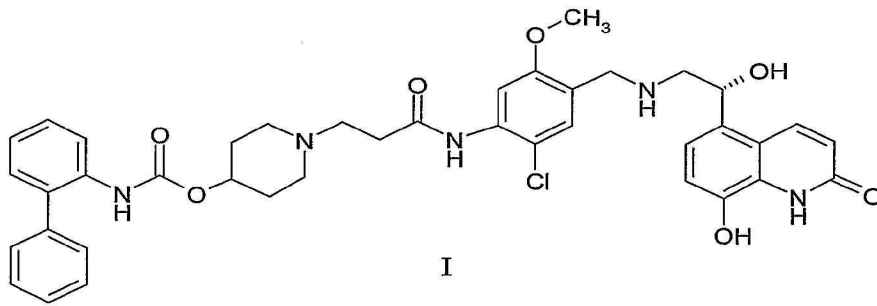
### 명세서

#### 기술분야

[0001] 본원 발명은 폐질환을 치료하기 위한 치료제로 유용할 것으로 기대되는 비페닐 화합물의 신규 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형(crystalline salt)과 관련된다. 본원 발명은 또한 그와 같은 결정질 화합물을 포함하거나 또는 그와 같은 결정질 화합물로부터 제조되는 약학적 조성물, 그와 같은 결정질 화합물을 제조하기 위한 방법 및 중간체 및 폐질환을 치료하기 위하여 그와 같은 결정질 화합물을 사용하는 방법과 관련된다.

#### 배경기술

[0002] 2004년 2월 13일에 출원되어 공동으로-양도된 미국특허출원 제10/779,157호는 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 및 천식과 같은 폐질환을 치료하기 위한 치료제로서 유용한 신규 비페닐 화합물을 개시하고 있다. 특히, 화합물, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-{{(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노}메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르는 특히 무스카린 안타고니스트 활성과  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성을 모두 가지고 있는 것으로 이 출원에서 개시되어 있다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-{{(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노}메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 화학 구조가 식 1에 의해 표현되어 있다:



[0003]

[0004]

폐질환을 치료하기 위해 유용한 치료제들은 편리하게는 흡입에 의해 기도 내에 직접적으로 투여된다. 이 점에 있어서, 건조 분말 흡입기(dry powder inhaler, DPI), 정량 흡입기(metered-dose inhaler, MDI) 및 네블라이저 흡입기를 포함하는 약학적 흡입 장치의 다양한 형태들이 흡입에 의해 치료제를 투여하기 위해서 개발되고 있다. 그와 같은 장치에서 사용하기 위한 약학적 조성물 및 제제를 제조할 때, 흡습성이 없고 조해성이 없으며, 비교적 높은 융점 (즉, 약 150℃보다 높은)을 가져서, 유효한 분해 또는 결정도의 손실 없이 물질이 미분화되도록 하는, 치료 약물의 결정형을 갖는 것이 매우 바람직하다.

[0005]

식 I의 화합물의 어떠한 염의 결정형도 이전에 보고된 적이 없다. 따라서, 허용가능한 기준의 흡습성과 비교적 높은 융점을 갖는, 식 I의 화합물의 안정하고, 조해성이 없는 염의 결정형 형태를 위한 필요성이 있어왔다.

### 발명의 상세한 설명

[0006]

#### 발명의 요약

[0007]

본원 발명은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물(solvate)을 제공한다.

[0008]

놀랍게도, 식 I의 화합물의 그와 같은 1,2-에탄디술포산 염의 결정형은 대기 중 수분에 노출되었을 때에도 조해성이 없는 것으로 밝혀졌다. 추가적으로는, 그와 같은 염의 결정형은 허용가능한 기준의 흡습성과 매우 높은 융점, 예를 들면 약 215℃보다 높은 융점을 가지고 있다. 특정 실시형태에서, 본원 발명의 염의 결정형은 약 230℃보다 높은 융점을 가지고 있다.

[0009]

다른 용도 중에서도, 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형은 폐질환(pulmonary disorder)을 치료하는데 유용할 것으로 기대되는 약학적 조성물을 제조하는데 유용하다. 따라서, 상기 조성물의 또 다른 실시형태에서, 본원 발명은 약학적으로 허용가능한 담체 및 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염 또는 그의 용매화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0010]

특정 실시형태에서, 본원 발명의 약학적 조성물은 코르티코스테로이드와 같은 스테로이드계 항-염증제; 또는 포스포디에스테라제-4 억제제; 또는 이들의 배합물을 더 포함한다.

[0011]

다른 실시형태에서, 본원 발명은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염을 함유하는 수성 등장 식염수 용액을 포함하는 약학적 조성물을 제공하는데, 상기 용액은 약 4 내지 약 6의 범위에서 pH를 가진다.

[0012]

또 다른 실시형태에서, 본원 발명은

[0013]

(a) 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물; 및

[0014]

(b) 스테로이드계 항-염증제를 포함하는 배합물을 제공한다.

[0015]

식 I의 화합물은 무스카린 안타고니스트(antagonist) 활성과  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트(agonist) 활성을 모두 가지고 있다. 따라서, 본원 발명의 1,2-에탄디술포산 염은 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환과 같은 폐질환을 치료하기 위한 치료제로서 유용할 것으로 기대된다.

[0016] 따라서, 방법의 한 실시형태에서, 본원 발명은 폐질환을 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 비페닐-2-일 카르바산

1-[2-(2-클로로-4-{[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염 또는 그의 용매화합물의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0017] 추가적으로, 방법의 다른 형태에서, 본원 발명은 환자에게 기관지 확장 (bronchodilation)을 유발하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-{[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]-피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염 또는 그의 용매화합물의 기관지 확장-유발량을 환자에게 흡입에 의해 투여하는 단계를 포함한다.

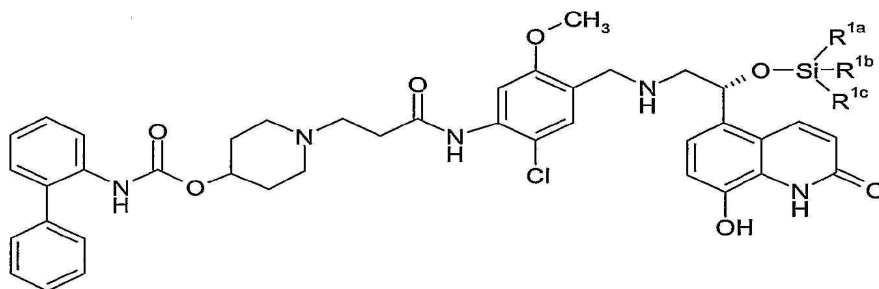
[0018] 또한, 본원 발명은 만성 폐쇄성 폐질환 또는 천식을 치료하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-{[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염 또는 그의 용매화합물의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0019] 또한, 본원 발명은 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 제조하는 방법과 관련되어 있다. 따라서, 방법의 또 다른 형태에서, 본원 발명은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-{[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물을 제조하는 방법을 제공하는데; 상기 방법은 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-{[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르를 1,2-에탄디술폰산과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0020] 방법의 또 다른 형태에서, 본원 발명은 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산염의 결정형을 제조하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은:

[0021] (a) 하기 식 II를 가지며,



II

[0022]

상기에서  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$  및  $R^{1c}$ 는  $C_{1-4}$  알킬, 페닐,  $-C_{1-4}$  알킬-(페닐)로부터 독립적으로 선택되고, 또는  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$  및  $R^{1c}$  중 한 개는  $-O-(C_{1-4}$  알킬)인 것인 식 II의 화합물을 플루오라이드 이온과 접촉시키는 단계; 및

[0023]

(b) 단계 (b)의 생성물을 1,2-에탄디술폰산 또는 그의 수화물과 접촉시켜 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 형성하는 단계를 포함하는데, 상기에서 단계 (a)와 단계 (b)는 단계 (a)의 생성물의 분리 없이 동일한 반응 용기에서 수행된다.

[0024]

방법의 다른 형태에서, 본원 발명은 약 230°C보다 높은 용점을 갖는 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 제조하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형의 시드 결정 (seed crystal)을 비활성 희석제에 용해된 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염을 함유하는 용액에 첨가하는 단계를 포함하는데, 상기에서 시드 결정은 약 230°C보다 높은 용점을 가지고 있다.

[0025]

또한, 이 방법은 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 재결정화시켜 약 230°C보다 높은 용점을 갖는 결정형(crystalline form)을 제공하기 위하여 사용될 수 있다. 따라서, 본원 발명은 약 230°C보다 높은 용점을 갖는 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 제조하는 방법을 추가적으로 제공하는데, 상기 방법은

[0026]



- [0027] (a) 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 용해하는 제 1 온도로 비활성 희석제에서 단계;
- [0028] (b) 단계 (a)의 생성물을 제 2 온도까지 냉각시키는 단계; 및
- [0029] (c) 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 시드 결정을 첨가하는 단계를 포함하고;
- [0030] 상기 시드 결정은 약 230℃보다 높은 용점을 가지고 있고, 상기 제 1 온도는 상기 1,2-에탄디술폰산 염을 용해하기 위해 충분한 온도이고, 및 상기 제 2 온도는 상기 시드 결정이 상기 단계 (b)의 생성물에 첨가되었을 때 상기 시드 결정이 완전히 용해하는 온도 미만이다.
- [0031] 추가적으로는, 본원 발명은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르를 정제하는 방법과 관련되는데; 상기 방법은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 형성하는 단계를 포함한다. 또한, 본원 발명은 본원 명세서에서 개시된 방법들에 의해 제조되는 생성물과 관련된다.
- [0032] 또한, 본원 발명은 치료법에서 또는 의약으로서 사용하기 위한 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물과 관련된다.
- [0033] 추가적으로는, 본원 발명은 의약의 제조를 위한, 특히 폐질환의 치료를 위한 의약의 제조를 위한, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물의 용도와 관련된다.
- [0034] 또한, 본원 발명은 폐질환의 치료를 위한 의약의 제조에서:
- [0035] (a) 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물; 및
- [0036] (b) 스테로이드계 항-염증제의 용도와 관련된다.
- [0037] 또한, 본원 발명은 미분화된(micronized) 형태인 것인 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물과 관련되고; 및 약학적으로 허용가능한 담체 및 미분화된 형태인 것인 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물을 포함하는 약학적 조성물과 관련된다.
- 실시예**
- [0044] **본원 발명의 상세한 설명**
- [0045] 본원 발명은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 또는 그의 용매화합물을 제공한다. 이 염에서 활성 치료 약물(즉, 식 I의 화합물)은 (R) 배치(configuration)를 갖는 하나의 키랄성 센터를 포함하고 있다.
- [0046] 그러나, 달리 지적되지 않는다면, 조성물의 소정의 유용성이 전체적으로 그와 같은 이성질체의 존재에 의해 소멸되지 않는다는 조건에서, (S) 입체이성질체 미량이 본원 발명의 조성물에서 존재할 수도 있음을 당해 분야의 당업자들은 이해할 것이다.
- [0047] 식 I의 화합물은 상업적으로-이용가능한 오토놈 (AutoNom) 소프트웨어 (MDL, San Leandro, California)를 사용하여 명명되고 있다. 추가적으로는, 또한, 1,2-에탄디술폰산 염은 에디실레이트 (edisylate) 염 또는 에디사일레이트 (edisilate) 염으로서 종종 지칭되고 있다.



- [0048] 정의
- [0049] 본원 발명의 화합물, 조성물, 방법 및 공정을 설명할 때, 달리 지적되지 않는다면, 하기의 용어들은 하기의 의미를 가지고 있다.
- [0050] 본원 명세서에서 사용되는 용어 "용점(melting point)"은 최대의 흡열성 열 유속이 시차주사열량계에 의해 관찰되는 온도를 의미한다.
- [0051] 용어 "미분화된 형태(micronized form)"는 입자들의 약 90% 이상이 약 10 $\mu$ m 미만의 직경을 갖는 입자들의 형태를 의미한다.
- [0052] 용어 "용매화합물(solvate)"은 용질 즉, 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 하나 이상의 분자와 용매 하나 이상의 분자에 의해 형성되는 복합체 또는 집합체를 의미한다. 통상적으로 그와 같은 용매화합물은 용질과 용매의 실질적으로 고정된 몰 비율을 가지고 있다. 또한, 이 용어는 물과의 포접 화합물 (clathrate)을 포함하는, 포접 화합물들을 포함한다. 실시예에 의해서 대표적인 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 아세트산 및 그 등가물을 포함한다. 상기 용매가 물이 되었을 때, 형성되는 용매화합물은 수화물이다.
- [0053] 용어 "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"은 치료를 필요로 하는 환자에게 투여되었을 때 치료 효과를 나타내기엔 충분한 양을 의미한다.
- [0054] 본원 명세서에서 사용되는 용어 "치료하는(treating)" 또는 "치료(treatment)"는 포유동물 (특히 인간)과 같은 환자에서 질병 또는 의학적 증 상(COPD와 같은)을 치료하는 것 또는 치료를 의미하고, 이것은:
- [0055] (a) 질병 또는 의학적 증상이 발생하는 것을 예방하는 것, 즉 환자의 예방적 치료;
- [0056] (b) 질병 또는 의학적 증상을 호전시키는 것, 즉, 환자에서 질병 또는 의학적 증상을 제거하거나 또는 질병 또는 의학적 증상의 퇴행을 유발시키는 것;
- [0057] (c) 질병 또는 의학적 증상을 억제시키는 것, 즉, 환자에게서 질병 또는 의학적 증상의 진전을 늦추거나 또는 정지시키는 것; 또는
- [0058] (d) 환자에서 질병의 증상 또는 의학적 증상을 경감시키는 것을 포함한다.
- [0059] 용어 "단위 투여 제형(unit dosage form)"은 환자에게 투여하는데 적합한 물리적으로 분리된 단위, 즉 단독으로 또는 하나 이상의 추가적인 단위와 배합하여 바람직한 치료 효과를 유발하도록 계산된 본원 발명에 따른 염의 예정된 양을 포함하는 각각의 단위를 지칭한다. 예를 들면, 그와 같은 단위 투여 제형은 건조 분말 흡입용 캡슐, 정량된 흡입기의 정량된 투여, 캡슐, 정제, 알약 및 그 등가물이 될 수 있다.
- [0060] 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염
- [0061] 본원 발명의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르와 1,2-에탄디술폰산 또는 그의 수화물로부터 제조될 수 있다.
- [0062] 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염은 통상적으로 식 I의 화합물의 몰 당량 당 1,2-에탄디술폰산 약 0.95 내지 약 1.05 몰 당량을 포함하는, 식 I의 화합물의 몰 당량 당 1,2-에탄디술폰산 약 0.90 내지 약 1.10 몰 당량을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염은 식 I의 화합물의 몰 당량 당 1,2-에탄디술폰산 약 1 몰 당량을 포함한다.
- [0063] 비페닐-2-일카르바산  
1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르에 대한 1,2-에탄디술폰산의 몰 비율은 당해 분야의 당업자들에 의해 이용가능한 다양한 방법에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 예를 들면, 그와 같은 몰 비율은 <sup>1</sup>H NMR에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 다른 방법으로는, 원소 분석과 HPLC 방법이 몰 비율을 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0064] 본원 발명에서 사용된 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]-피페리딘-4-일 에스테르는 상업적으로 입

수 가능한 출발 물질과 시약으로부터 하기 실시예에서 설명되는 실험 방법을 사용하거나 또는 본원 출원의 배경 기술 부분에서 설명된 공동으로-양도된 미국출원에서 설명된 실험 방법을 사용하여 쉽게 제조될 수 있다.

[0065] 1,2-에탄디술포산은 예를 들면, 알파 케미칼즈 엘티디(Alfa Chemicals Ltd.), 베르크시레(Berkshire), 영국으로부터 상업적으로 입수 가능하다. 한 실시형태에서, 본원 발명의 염을 제조할 때 사용되는 1,2-에탄디술포산은 이수화물(dihydrate)이다. 특정 실시형태에서, 1,2-에탄디술포산 이수화물은 97%(HPLC에 의해 측정됨)보다 높거나 또는 동일한 순도를 가지고 있다. 바람직하다면, 본원 발명에서 사용되는 1,2-디술포산 이수화물은 사용하기 전에, 예를 들면 아세트산 및 아세트산 무수물로부터 재결정화될 수 있다.

[0066] 본원 발명의 염의 결정형을 제조하기 위해서, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르는 통상적으로 1,2-에탄디술포산 또는 그의 수화물 약 0.75 내지 약 1.3 몰 당량과 접촉된다. 일반적으로, 이 반응은 비활성 희석제에서 약 25℃ 내지 약 50℃와 같은 약 20℃ 내지 약 55℃를 포함하는, 약 0℃ 내지 약 60℃ 범위의 온도에서 수행된다. 이 반응을 위한 적절한 비활성 희석제는 선택적으로는 물을 포함하는, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 이소부탄올, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄 및 그 등가물을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 실시형태에서, 에탄올에 넣은 1,2-에탄디술포산 이수화물 용액은 이소프로판올과 디클로로메탄의 혼합물 (64:1)에 넣은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 약 다섯 배 부피까지 첨가된다. 다른 특정 실시형태에서, 1,2-에탄디술포산 이수화물 용액은 희석제로서 물 또는 에탄올을 포함하고, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 용액은 희석제로서 이소프로판올 또는 에탄올을 포함한다.

[0067] 다른 방법으로는, 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형은 식 I의 화합물의 실릴기로 보호된 유도체(즉, 식 II의 화합물)를 플루오라이드 이온의 공급원과 접촉시키고, 그런 다음 동일한 반응 용기에서, 생성물을 1,2-에탄디술포산 또는 그의 수화물과 접촉시킴으로써 제조될 수 있다. 특정 실시형태에서, 실릴-보호기는 *tert*-부틸디메틸실릴기이다. 다른 적절한 실릴-보호기는 *tert*-부틸디페닐실릴, 디페닐메틸실릴, 디-*tert*-부틸메틸실릴, *tert*-부톡시디페닐실릴 및 그 등가물을 포함한다. 이 공정에서 사용되는 플루오라이드 이온 공급원은 플루오라이드 이온을 포함하거나 또는 함유하는 소정의 시약 또는 플루오르화 수소가 될 수 있다. 특정 실시형태에서, 플루오라이드 이온의 공급원은 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드이다. 플루오라이드 이온의 다른 적절한 공급원은 테트라부틸암모늄 플루오라이드, 18-크라운-6을 포함한 포타슘 플루오라이드, 플루오르화 수소, 피리딘 하이드로플루오라이드 및 그 등가물을 포함한다.

[0068] 일반적으로, 이 공정은 비활성 희석제에서 약 25℃ 내지 약 30℃와 같은 약 20℃ 내지 약 35℃를 포함하는, 약 0℃ 내지 약 50℃의 범위의 온도에서 수행된다. 이 반응을 위한 적절한 비활성 희석제는 디클로로메탄, 메탄올 및 이들의 혼합물을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 실시형태에서, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(*R*)-2-(*tert*-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-2-클로로-5-메톡시-페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 용액은 디클로로메탄에서 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드 약 2.5 내지 약 3.0 몰 당량과 상온에서 약 12 시간 내지 24 시간 동안 또는 실릴기의 제거가 실질적으로 완료될 때까지 접촉된다. 반응 생성물의 분리 없이, 그 결과 생성된 용액에, 메탄올에 넣은 1,2-에탄디술포산 이수화물 약 0.9 내지 약 1.1 몰 당량이 첨가되고, 이 혼합물은 약 25℃ 내지 약 35℃에서 약 2 시간 내지 약 6 시간 동안 가열된다. 반응 완료 후에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형은 침전, 농축, 원심분리 및 그 등가물과 같은 소정의 통상적인 방법에 의해 반응 혼합물로부터 분리된다.

[0069] 선택적으로는, 본원 발명의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형은 부피로 물을 약 20%를 포함하는, 약 15% 내지 약 25%를 포함하는 이소프로판올에서 교반하거나 또는 상기 염을 현탁시킴으로써 추가적으로 정제될 수 있다. 특정 실시형태에서, 이소프로판올/물 혼합물 약 10 mL가 1,2-에탄디술포산 염 그램 당 사용된다.

[0070] 본원 발명의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형을 제조하는 공정은 특정 염의 결정형을 우세하게 만들기 위해서 선택적으로는 시드 결정을 사용하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, 보다 높은 온도(즉, 약 230℃보다 더 높은)에서 용해되는 염의 결정형의 시드 결정을 사용함으로써, 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형은 본질적으로 상기 시드 결정과 동일한 융점을 갖도록 제조될 수 있다. 그와 같은 시드 결정은 상기 염의 결

정형을 처음에 만들 때 사용될 수 있고, 또는 이들은 결정질 또는 부분적 결정질 염을 재결정화하기 위하여 사용될 수 있다.

[0071] 통상적으로, 시드 결정은 교반하지 않고 그리고 냉각시키지 않고 천천히 결정화시켜 작은 스케일로 제조된다. 설명하기 위해서, 시드 결정을 얻기 위해서는, 염의 결정형은 통상적으로 용해 상태를 제공하는데 충분한 온도에서 비활성 희석제 내에서 용해된다. 일반적으로, 시드 결정을 얻는 초기 공정에서는, 염의 결정형의 1 g 미만과 같은 5 g 미만을 포함하는, 통상적으로 10 g 미만의 소량이 사용된다. 특정 실시형태에서, 약 13% 내지 약 15% 물을 포함하는 약 12% 내지 약 20% 물을 포함하는 메탄올이 약 60℃ 내지 약 65℃와 같은 약 60℃ 내지 약 70℃의 범위의 온도에서 희석제로서 사용된다. 용액은 상온까지 냉각된다. 약 1 일 내지 약 3 일 후에, 그 결과 생성된 결정은 여과 또는 다른 통상적인 방법에 의해 분리된다. 다른 방법으로는, 시드 결정은 결정질 물질의 이전 제조로부터 얻을 수 있다.

[0072] 시드 결정을 사용하는 재결정화 공정에서, 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형은 시드 결정을 얻는 공정에서와 같이 통상적으로 15% 물을 포함하는 메탄올인 비활성 희석제에서 약 60℃ 내지 약 65℃ 범위의 온도에서 용해된다. 용액은 상기 시드 결정이 용해되지 않는 온도, 예를 들면 약 30℃ 내지 약 40℃ 범위의 온도까지 냉각되고, 그런 다음 시드 결정이 첨가된다. 통상적으로, 상기 용액에서 염의 결정형 중량에 대한 시드 결정 중량의 비율은 약 1:5 내지 약 1:35이다. 상기 용액은 결정화가 일어나는 온도, 예를 들면 약 20℃까지 냉각되고, 약 2 시간 내지 약 24 시간 동안 교반된다. 그 결과 생성되는 결정은 통상적인 방법에 의해 분리된다. 대량 배치(batch)로 물질을 제조하기 위해 충분한 시드 결정을 얻기 위해서는, 재결정화 공정은 연속적인 재결정화 단계를 위한 시드 결정으로서 제 1 재결정화에 의해 얻은 결정을 사용하여 연속적으로 수행될 수 있다. 상기 재결정화 공정의 단계들이 수행되는 특정 온도는 희석제의 특성 및 희석제 내에서 염의 결정형의 농도에 따라 선택된다는 것은 이해될 것이다. 추가적으로는, 상기 재결정화 공정은 냉각시키는 대신에 결정화를 용이하게 하는 증발 또는 항-용매(anti-solvent) 중 어느 하나를 사용하여 수행될 수 있다.

[0073] 다른 유용함 중에서도, 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 형성하는 것은 식 I의 화합물을 정제하는데 유용하다고 밝혀졌다. 일반적으로, 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형은 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정되었을 때, 95%보다 더 높은 순도; 및 통상적으로 98%보다 더 높은 순도를 가지고 있다.

[0074] 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형은 약 215℃ 내지 약 240℃의 범위에서 흡열성 열 유속 피크를 나타내는 시차주사열량계(DSC) 곡선에 의해 입증되는 바와 같이 매우 높은 용점을 갖는 것을 특징으로 한다. 상기 염의 결정형의 용점 온도는 상기 염의 결정형이 형성되었던 공정에 의존하는 것으로 관찰되었다. 교반하지 않고 그리고 냉각시키지 않고 천천히 결정화시켜 형성된 시드 결정은 약 230℃보다 더 높은 용점을 나타낸다. 그와 같은 시드 결정과의 재결정화를 포함하는 공정에 의해 형성된 염의 결정형은 예를 들면, 도 1에서 도시되는 바와 같이, 일반적으로 약 230℃ 내지 약 245℃의 범위에서 용점을 나타낸다. 약 230℃ 이상의 용점을 갖는 시드 결정 없이 형성된 염의 결정형은 예를 들면 도 2에서 도시되는 바와 같이, 통상적으로 약 215℃ 내지 약 229℃의 범위에서 용점을 나타낸다. 따라서, 특정 실시형태에서 본원 발명은 도 1에서 도시되는 곡선 또는 도 2에서 도시되는 곡선과 실질적으로 일치하는 약 200℃를 초과하는 온도 범위에서 DSC 곡선을 갖는 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 제공한다.

[0075] 다른 실시형태에서, 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형은  $5.0 \pm 0.3$ , 및  $15.0 \pm 0.3$ 의  $2\theta$  값에서 유효한 회절 피크들을 갖는 분말 X-선 회절(PXRD) 패턴을 갖는 것을 특징으로 한다. 도 3에서 도시되는 바와 같이, 높은 용점의 시드 결정의 재결정화에 의해 제조되는 염의 결정형의 PXRD 스펙트럼에서 피크 위치들과 도 4에서 도시되는 바와 같이, 그와 같은 시드 결정을 사용하지 않고 제조되는 염의 결정형의 PXRD 스펙트럼에서 피크 위치들에서 미묘한 차이점이 관찰될 수 있다. 따라서 별개의 실시형태에서, 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형은 피크 위치들이 도 3에서 도시되는 것 또는 도 4에서 도시되는 것과 실질적으로 일치하는 분말 X-선 회절 패턴을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0076] 다른 실시형태에서, 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형은 도 5에서 도시되는 바와 같이, 약 704, 748, 768, 841, 900, 1055, 1104, 1166, 1218, 1294, 1408, 1522, 1609, 1655, 및  $1701 \text{ cm}^{-1}$ 에서 유의성 있는 흡수 밴드들을 나타내는 적외선 (IR) 흡수 스펙트럼을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0077] 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형은 허용가능하고 적절한 수준의 흡습성(즉, 상대습도 40% 내지 상대습도 75%의 습도 범위에서 약 2.5% 미만의 중량 증가)으로 가역적 흡수/제거 프로파일을 가지고 있는 것으로 입증되었다.

- [0078] 본원 발명에 따른 상기 염의 이러한 특징들은 하기 실시예에서 추가적으로 설명되어 있다.
- [0079] 약학적 조성물과 제제
- [0080] 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술포산 염은 통상적으로 약학적 조성물 또는 제제의 형태로 환자에게 투여된다. 그와 같은 약학적 조성물은 흡입, 경구, 비강, 국소(경피를 포함) 및 비경구 투여를 포함하는 소정의 허용가능한 투여 경로에 의해 환자에게 투여될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 그러나, 본원 발명의 염의 결정형이 제제화되면, 이것은 더 이상 결정형이 될 수 없고, 즉 상기 염이 적절한 담체 내에서 용해될 것이라는 것은 당해 분야의 당업자들에 의해 이해될 것이다.
- [0081] 따라서, 조성물의 한 실시형태에서, 본원 발명은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염 또는 그의 용매화합물을 포함하는 약학적 조성물과 관련된다. 선택적으로는, 그와 같은 약학적 조성물은 바람직하다면, 다른 치료 약물 및/또는 제형화 제제를 포함할 수 있다.
- [0082] 본원 발명의 약학적 조성물은 통상적으로 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸}-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염 또는 그의 용매화합물의 치료적 유효량을 포함한다. 통상적으로, 그와 같은 약학적 조성물은 활성 약물 중량 기준으로 약 0.01 내지 10%와 같은, 중량 기준으로 약 0.01 내지 약 30%를 포함하는, 활성 약물 중량 기준으로 약 0.01 내지 약 95% 포함할 것이다.
- [0083] 소정의 통상적인 담체 또는 부형제가 본원 발명의 약학적 조성물에서 사용될 수 있다. 특정 담체 또는 부형제의 선택, 또는 담체 또는 부형제의 배합의 선택은 특정 환자 또는 의학적 증상의 유형 또는 질병 상태를 치료하기 위해 사용되는 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 이러한 점에 있어서, 특정 투여 방식을 위한 적절한 약학적 조성물의 제조는 약제학 분야의 당업자들의 범위 내에 있을 것이다. 추가적으로는, 그와 같은 조성물의 구성 성분들은 예를 들면 시그마 (Sigma), P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178로부터 상업적으로 입수 가능하다. 추가적인 설명을 위해서, 통상적인 제제 방법들이 레밍턴(Remington): *The Science and Practice of Pharmacy*, 제 20판, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); 및 H.C. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 제 7판, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999)에 기재되어 있다.
- [0084] 약학적으로 허용가능한 담체로서 도움이 될 수 있는 대표적인 물질들의 예는 하기 물질들을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.: (1) 락토오스, 글루코스, 및 수크로스와 같은 당류; (2) 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분류; (3) 셀룰로오스, 및 소듐 카복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트와 같은 그의 유도체류; (4) 분말형 트라가칸스; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 활석; (8) 코코아 버터 및 좌제용 왁스 (suppository wax)와 같은 부형제류; (9) 낙화생유, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일류; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; (11) 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리에틸렌; (12) 에틸 올리에이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르류; (13) 한천; (14) 마그네슘 하이드록시드 및 알루미늄 하이드록시드와 같은 완충제; (15) 알긴산; (16) 발열원 불포함수(pyrogen-free water); (17) 등장 식염수; (18) 링거액; (19) 에틸 알코올; (20) 인산염 완충 용액; (21) 클로로플루오로카본 및 하이드로플루오로카본과 같은 압축된 추진제 가스; 및 (22) 약학적 조성물에서 사용되는 기타 무-독성 적합 물질 (non-toxic compatible substance).
- [0085] 본원 발명의 약학적 조성물은 통상적으로 약학적으로 허용가능한 담체 및 하나 이상의 선택적인 구성 성분과 함께 본원 발명의 염을 철저히하고 완전하게 혼합하거나 또는 블렌딩함으로써 제조된다. 필요하거나 또는 바람직하다면, 그 결과 생성된 균일하게 블렌딩된 혼합물은 통상적인 절차 및 장비를 사용하여 정제, 캡슐, 알약, 캔니스터, 카트리지, 분배기 및 그 등가물로 제형화되거나 적재될 수 있다.
- [0086] 한 실시형태에서, 본원 발명의 약학적 조성물은 흡입 투여에 적합하다. 흡입 투여를 위한 적절한 약학적 조성물은 통상적으로 에어로졸 또는 분말의 형태일 것이다. 그와 같은 조성물은 일반적으로 네블라이저 흡입기, 정량 흡입기(metered-dose inhaler, MDI), 건조 분말 흡입기(dry powder inhaler, DPI), 또는 유사한 전달 장치와 같은 공지된 전달 장치를 이용하여 투여된다.
- [0087] 본원 발명의 특정 실시형태에서, 활성 약물을 포함하는 약학적 조성물은 네블라이저 흡입기를 이용한 흡입에 의해 투여된다. 그와 같은 네블라이저 장치는 통상적으로 활성 약물을 포함하는 약학적 조성물이 환자의 호흡기



까지 운반될 분무 (mist)로 분사되게 하는 고속 공기의 흐름을 생성한다. 따라서, 네블라이저 흡입기에서 사용을 위해 제제되는 경우, 활성 약물은 통상적으로 용액을 형성하기 위해 적합한 담체에 용해된다. 적합한 네블라이저 장치들은 상업적으로, 예를 들면, PARI GmbH(스텐베르그, 독일)에 의해 제공된다. 다른 네블라이저 장치들은 레스피맷(RespiMat) (Boehringer Ingelheim) 및 예를 들면, 미국특허 제 6,123,068호 및 국제공개특허 제97/12687호에서 개시된 것들을 포함한다.

[0088] 네블라이저 흡입기에서 사용을 위한 대표적인 약학적 조성물은 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염 또는 그의 용매화합물의 약 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  내지 약 10  $\text{mg}/\text{mL}$ 을 포함하는 수성 용액을 포함한다. 한 실시형태에서, 수성 네블라이저 제제는 등장성(isotonic)이다. 한 실시형태에서, 수성 네블라이저 제제는 약 4 내지 약 6의 범위에서 pH를 가진다. 특정 실시형태에서, 수성 네블라이저 제제는 시트레이트 완충제로 pH 약 5까지 완충된다. 다른 특정 실시형태에서, 수성 네블라이저 제제는 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 약 0.1  $\text{mg}/\text{mL}$  내지 약 1.0  $\text{mg}/\text{mL}$  유리 염기 당량을 포함한다.

[0089] 본원 발명의 또 다른 특정 실시형태에서, 활성 약물을 포함하는 약학적 조성물은 건조 분말 흡입기를 사용하는 흡입에 의해 투여된다. 그와 같은 건조 분말 흡입기는 통상적으로 흡기 동안, 환자의 기류(air-stream)에 분산될 수 있는 자유로운 유동 분말(free-flowing powder)로 활성 약물을 투여한다. 자유로운 유동 분말을 얻기 위해서는, 활성 약물은 통상적으로 락토오스, 전분, 만니톨, 텍스트로스, 폴리락트산(polylactic acid, PLA), 폴리락티드-코-글리콜라이드(poly lactide-co-glycolide, PLGA) 또는 이들의 배합물과 같은 적절한 부형제와 제제화된다. 통상적으로, 활성 약물은 미분화되고, 적절한 담체와 배합되어 흡입할 수 있는 크기의 미분화된 입자들의 블렌드를 형성하게 되고, 상기에서 "미분화된 입자" 또는 "미분화된 형태"는 입자들 중 약 90% 이상이 약 10 $\mu\text{m}$  미만의 직경을 갖는 것을 의미한다.

[0090] 건조 분말 흡입기에서 사용하기 위한 대표적인 약학적 조성물은 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 100  $\mu\text{m}$ 의 입자 크기를 갖는 락토오스와 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염 또는 그의 용매화합물의 미분화된 입자들을 포함한다.

[0091] 그와 같은 건조 분말 제제는 예를 들면, 락토오스를 활성 약물과 배합하고, 그런 다음 구성 성분들을 건조하여 블렌딩함으로써 만들 수 있다. 다른 방법으로는 바람직하다면, 활성 약물은 부형제 없이 제제화될 수 있다. 그런 다음, 약학적 조성물은 건조 분말 전달 장치에서 사용하기 위하여 통상적으로 건조 분말 분배기, 또는 흡입 카트리지 또는 캡슐 안에 적재된다.

[0092] 건조 분말 흡입기 전달 장치의 예는 Diskhaler(GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC)(예를 들면, 미국특허 제5,035,237호를 참조); Diskus (GlaxoSmithKline)(예를 들면, 미국특허 제6,378,519호를 참조); Turbuhaler (AstraZeneca, Wilmington, DE)(예를 들면, 미국특허 제4,524,769호를 참조); Rotahaler(GlaxoSmithKline)(예를 들면, 미국특허 제4,353,365호를 참조) 및 Handihaler(Boehringer Ingelheim)를 포함한다. 적절한 DPI 장치의 추가적인 예들은 미국 특허 제 5,415,162호, 제5,239,993호, 및 제5,715,810호 및 본원 명세서에서 인용된 참조문헌에서 개시되어 있다.

[0093] 본원 발명의 또 다른 실시형태에서, 활성 약물을 포함하는 약학적 조성물은 정량 흡입기를 사용하는 흡입에 의해 투여된다. 그와 같은 정량 흡입기는 통상적으로 압축된 추진제 가스를 사용하여 활성 약물 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염의 측정된 양을 분사한다. 따라서, 정량 흡입기를 사용하여 투여되는 약학적 조성물은 통상적으로 액화된 추진제 내에서 활성 약물의 용액 또는 현탁액을 포함한다. 소정의 적절한 액화된 추진제는  $\text{CCl}_3\text{F}$ 와 같은 클로로플루오로카본, 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄(HFA 134a) 및 1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로-*n*-프로판(HFA 227)과 같은 하이드로플루오로알칸(HFA)을 포함하여 사용될 수 있다. 오존층에 영향을 미치는 클로로플루오로카본에 대한 우려 때문에, HFA를 포함하는 제제들이 일반적으로 바람직하다. HFA 제제의 추가적인 선택적 구성 성분들은 에탄올 또는 펜탄과 같은 공-용매(co-solvent), 및 소르비탄 트리올리이트와 같은 계면활성제, 올레산, 레시틴, 및 글리세린을 포함한다. 예를 들면, 미국특허 제5,225,183호, 유럽특허 제0717987호 A2, 및 국제공개특허 제92/22286호를 참조한다.

[0094] 정량 흡입기에서 사용하기 위한 대표적인 약학적 조성물은 중량 기준으로 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염 약 0.01% 내지 약 5%; 중량 기준으로 에탄올 약 0% 내지 약 20%; 및 중량 기준으로 계면활성제 약 0% 내지 약 5% 및; 그 나머지가 HFA 추진제가 되도록 포함한다.

[0095] 그와 같은 조성물은 통상적으로 냉각된 또는 가압된 하이드로플루오로알칸을 활성 약물, 에탄올(존재하는 경우), 및 계면 활성제(존재하는 경우)를 포함하는 적절한 용기에 첨가함으로써 제조된다. 현탁액을 제조하기 위

해서는, 활성 약물은 미분화되고, 그런 다음 추진제와 배합된다. 그런 다음, 제제는 정량 흡입기 장치의 일 부분을 형성하는, 에어로졸 캐니스터에 적재된다. HFA 추진제와 사용하기 위해 특별히 개발된 정량 흡입기 장치의 예는 미국 특허 제6,006,745호 및 미국 특허 제6,143,277호에서 제공된다. 다른 방법으로는, 현탁액 제제는 활성 약물의 미분화된 입자에 계면 활성제의 코팅을 분무 건조함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 국제공개특허 제99/53901호 및 국제공개특허 제00/61108호를 참조한다.

[0096] 흡입가능한 입자들, 및 흡입 투여를 위한 적절한 제제 및 장치들을 제조하는 방법의 추가적인 예들을 위해서는, 미국 특허 제6,268,533호, 미국 특허 제5,983,956호, 미국 특허 제5,874,063호 및 미국 특허 제6,221,398호 및 국제공개특허 제99/55319호 및 국제공개특허 제00/30614호를 참조한다.

[0097] 다른 실시형태에서, 본원 발명의 약학적 조성물은 경구 투여를 위해 적합하다. 경구 투여를 위한 적합한 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 알약, 로젠지(lozenge), 교감(cachet), 당의정(dragee), 분말, 과립; 또는 수성 또는 비-수성(non-aqueous) 액체에 담긴 용액 또는 현탁액; 또는 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil)형 유화액; 또는 엘릭시르(elixir) 또는 시럽; 및 그 등가물의 형태로 될 수 있고; 각각은 활성 성분으로서 본원 발명의 염의 예정된 양을 포함한다.

[0098] 고형 투여 제형(즉, 캡슐, 정제, 알약 및 그 등가물)에 의한 경구 투여를 위해 의도되는 경우, 본원 발명의 약학적 조성물은 통상적으로 활성 성분으로서 본원 발명의 염과 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트와 같은, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 것이다. 선택적으로 또는 다른 방법으로는, 그와 같은 고형 투여 제형은 또한: (1) 전분, 락토오스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및/또는 규산과 같은 충전제 또는 증량제(extender); (2) 카르복시메틸셀룰로오스, 알긴산염, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아와 같은 결합제; (3) 글리세롤과 같은 보습제(humectant); (4) 아가-아가, 칼슘 카보네이트, 감자 전분 또는 타피오카 전분, 알긴산, 소정의 규산염, 및/또는 소듐 카보네이트와 같은 붕해제; (5) 파라핀과 같은 용액 지연제(solution retarding agent); (6) 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수 촉진제; (7) 세틸 알코올 및/또는 글리세롤 모노스테아레이트와 같은 습윤제; (8) 카올린 및/또는 벤토나이트 클레이(bentonite clay)와 같은 흡수제; (9) 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트, 및/또는 그 혼합물과 같은 윤활제; (10) 착색제; 및 (11) 완충제(buffering agent)를 포함할 수 있다.

[0099] 방출제, 습윤제, 코팅제, 감미료, 향료 및 방향제, 보존제 및 항산화제가 또한 본원 발명의 약학적 조성물에 존재할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 항산화제의 예들은: (1) 아스코르브 산, 시스테인 하이드로클로라이드, 소듐 비술페이트, 소듐 메타비술페이트, 소듐 설파이트 및 그 등가물과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화된 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈리에이트, 알파-토코페롤, 및 그 등가물과 같은 지용성 항산화제; 및 (3) 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산, 및 그 등가물과 같은 금속-킬레이트제를 포함한다. 정제, 캡슐, 알약 및 그 등가물을 위한 코팅제는 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트(CAP), 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(PVAP), 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 프탈레이트, 메타크릴산-메타크릴산 에스테르 공중합체, 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트(CAT), 카르복시메틸 에틸 셀룰로오스(CMEC), 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트(HPMCAS), 및 그 등가물과 같은 장용제피(enteric coating)를 위해 사용되는 것들을 포함한다.

[0100] 바람직하다면, 본원 발명의 약학적 조성물은 또한 예를 들면, 다양한 비율의 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스; 또는 폴리락트 산(PLA) 또는 폴리락티드-코-글리콜라이드(PLGA), 리포솜 및/또는 미소 구체(microsphere)와 같은 다른 중합체 매트릭스를 사용하여 활성 성분의 서방성 또는 제어된 방출을 제공하도록 제제될 수 있다.

[0101] 또한, 본원 발명의 약학적 조성물은 선택적으로 백탁제(opacifying agent)를 포함할 수 있고, 활성 성분을 위장관의 특정 부분에서만 또는 그 부분에서만 선택적으로, 선택적으로는 지연된 방식으로 방출하도록 제제화될 수 있다. 사용될 수 있는 임베드형 조성물(embedding composition)의 예들은 중합체성 물질 및 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 적합하다면, 전술된 하나 이상의 부형제를 갖는 피하-삽입형(microencapsulated form)일 수 있다.

[0102] 경구 투여를 위한 적합한 액체 투여 제형은 예로서, 약학적으로 허용가능한 유화액, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 이러한 액체 투여 제형은 통상적으로 활성 성분 및 비활성 희석제, 예를 들면, 물 또는 기타 용매, 용해제 및 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일 (특히, 면실유, 낙화생유, 옥수수유, 배종유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 그 혼합물과 같은 유화제를 포함한다. 현탁액은 활성 성분 이외에 현탁제, 예를 들

면 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가-아가 및 트라가칸스, 및 그 혼합물을 포함할 수 있다.

[0103] 경구 투여를 위해 의도되는 경우, 본원 발명의 약학적 조성물은 바람직하게는 단위 투여 제형으로 포장된다. 예를 들면, 이러한 단위 투여 제형은 캡슐, 정제, 알약 및 그 등가물이 될 수 있다.

[0104] 본원 발명의 염은 또한 공지된 경피 전달 시스템 및 부형제를 사용하여 경피로 투여될 수 있다. 예를 들면, 본원 발명의 화합물은 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 아자사이클로알칸-2-온 및 그 등가물과 같은 투과 증강제(permeation enhancer)와 혼합되고, 패치 또는 유사한 전달 시스템으로 통합될 수 있다. 겔화제, 유화제, 및 완충제를 포함하는 추가적인 부형제는 바람직하다면, 그와 같은 경피용 조성물에서 사용될 수 있다.

[0105] 본원 발명의 약학적 조성물은 또한 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염 또는 그의 용매화합물과 동시-투여(co-administer)되는 다른 치료 약물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본원 발명의 약학적 조성물은 항-염증제(예를 들면, 코르티코스테로이드와 같은 스테로이드계 항-염증제; 및 비-스테로이드계 항-염증제(NSAIDs), 포스포디에스테라제 IV 억제제, 항감염제(예를 들면, 항생제 또는 항바이러스제), 항히스타민제,  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트, 무스카린 수용체 안타고니스트(즉, 항콜린제) 및 그 등가물로부터 선택되는 하나 이상의 치료제를 추가적으로 포함할 수 있다. 다른 치료제들은 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화합물의 형태로 사용될 수 있다. 추가적으로는, 적절하다면 다른 치료제들은 광학적으로 순수한 입체이성질체들로 사용될 수 있다.

[0106] 바람직하다면, 본원 발명의 염은 또한 본원 명세서에서 설명된 것들과 같은, 또 다른 치료제 또는 치료제들과 배합하여 투여될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 구성 성분들은 물리적으로는 함께 혼합되지 않지만, 동시에 투여되거나 또는 독립된 조성물로서 연속적으로 투여된다. 예를 들면, 본원 발명의 염은 각각의 치료제를 위해 독립된 구획들(예를 들면, 돔 모양의 플라스틱 포장(blister pack))을 갖는 흡입 전달 장치를 사용하여, 코르티코스테로이드와 같은 스테로이드계 항-염증제와 동시에 또는 연속적으로 흡입에 의해 투여될 수 있다. 다른 방법으로는, 배합물은 다중 전달 장치, 즉 각각의 치료제를 위한 하나의 전달 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0107] 본원 발명의 화합물과 배합하여 사용될 수 있는 대표적인  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트는 살메테롤, 살부타몰, 포르모테롤, 살메파놀, 페노테롤, 테르부탈린, 알부테롤, 이소에타린, 메타프로테레놀, 비틀테롤, 피르부테롤, 레발부테롤 및 그 등가물, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본원 발명의 화합물과 배합하여 사용될 수 있는 다른  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트는 3-(4-{[6-((2R)-2-하이드록시-2-[4-하이드록시-3-(하이드록시메틸)페닐]에틸)아미노]-헥실}옥시)부틸)벤젠술폰아미드 및 3-(-3-{[7-((2R)-2-하이드록시-2-[4-하이드록시-3-(하이드록시메틸)페닐]에틸)아미노]헥틸}옥시)프로필)벤젠술폰아미드 및 2002년 8월 29일에 공개된 국제공개특허 제02/066422호에서 개시되어 있는 관련 화합물들; 3-[3-(4-{[6-((2R)-2-하이드록시-2-[4-하이드록시-3-(하이드록시메틸)페닐]에틸)아미노]헥실}-옥시)부틸)페닐]이미다졸리딘-2,4-디온 및 2002년 9월 12일에 공개된 국제공개특허 제02/070490호에서 개시되어 있는 관련 화합물들; 3-(4-{[6-((2R)-2-[3-(포르밀아미노)-4-하이드록시페닐]-2-하이드록시에틸)아미노]헥실}옥시)부틸)벤젠술폰아미드, 3-(4-{[6-((2S)-2-[3-(포르밀아미노)-4-하이드록시페닐]-2-하이드록시에틸)아미노]헥실}옥시)부틸)-벤젠술폰아미드, 3-(4-{[6-((2R/S)-2-[3-(포르밀아미노)-4-하이드록시페닐]-2-하이드록시에틸)아미노]헥실}옥시)부틸)벤젠술폰아미드, N-(*tert*-부틸)-3-(4-{[6-((2R)-2-[3-(포르밀아미노)-4-하이드록시페닐]-2-하이드록시에틸)아미노]헥실}-옥시)부틸)벤젠술폰아미드, N-(*tert*-부틸)-3-(4-{[6-((2S)-2-[3-(포르밀아미노)-4-하이드록시페닐]-2-하이드록시에틸)아미노]헥실}옥시)부틸)벤젠술폰아미드, N-(*tert*-부틸)-3-(4-{[6-((2R/S)-2-[3-(포르밀아미노)-4-하이드록시페닐]-2-하이드록시에틸)아미노]헥실}옥시)부틸)벤젠술폰아미드 및 2002년 10월 3일에 공개된 국제공개특허 제02/076933호에서 개시된 관련 화합물들; 4-((1R)-2-[(6-{2-[(2,6-디클로로벤질)옥시]에톡시}헥실)아미노]-1-하이드록시에틸)-2-(하이드록시메틸)페놀 및 2003년 3월 27일에 공개된 국제공개특허 제03/024439호에서 개시된 관련 화합물들; N-{2-[4-((R)-2-하이드록시-2-페닐에틸아미노)페닐]에틸}-(R)-2-하이드록시-2-(3-포르아미도-4-하이드록시페닐)에틸아민 및 2003년 6월 10일에 등록된 미국 등록 특허 제6,576,793호에서 개시되어 있는 관련 화합물들; N-{2-[4-(3-페닐-4-메톡시페닐)아미노페닐]에틸}-(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2(1*H*)-퀴놀리논-5-일)에틸아민 및 2003년 11월 25일에 등록된 미국 등록 특허 제6,653,323호에서 개시되어 있는 관련 화합물들; 및 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 실시형태에서,  $\beta_2$ -아드레



날린성 수용체 아고니스트는 N-{2-[4-((R)-2-하이드록시-2-페닐에틸아미노)페닐]에틸}-(R)-2-하이드록시-2-(3-포르아미도-4-하이드록시페닐)에틸아민의 결정질 모노하이드로클로라이드 염이다.  $\beta_2$ -아드레날린성 수용체 아고니스트가 사용될 때, 이것은 치료적 유효량으로 약학적 조성물에 존재할 것이다. 통상적으로,  $\beta_2$ -아드레날린성 수용체 아고니스트는 1회 투여마다 약 0.05  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 을 제공하는데 충분한 양으로 존재할 것이다.

[0108] 본원 발명의 화합물과 배합하여 사용될 수 있는 대표적인 스테로이드계 항-염증제는 메틸 프레드니솔론, 프레드니솔론, 텍사메타손, 플루티카손 프로피오네이트, 6,9-디플루오로-17-[(2-푸라닐카보닐)옥시]-11-하이드록시-16-메틸-3-옥소안드로스타-1,4-디엔-17-카보티오산 S-플루오로메틸 에스테르, 6,9-디플루오로-11-하이드록시-16-메틸-3-옥소-17-프로피오닐옥시-안드로스타-1,4-디엔-17-카보티오산 S-(2-옥소테트라하이드로푸란-3S-일)에스테르, 비클로메타손 에스테르류 (예를 들면, 17-프로피오네이트 에스테르 또는 17,21-디프로피오네이트 에스테르), 부테소나이드, 플루니솔리드, 모메타손 에스테르 (예를 들면, 푸로에이트 에스테르), 트리암시놀론 아세토나이드, 로플레포나이드, 시클레소나이드, 부티소코르트 프로피오네이트, RPR-106541, ST-126 및 그 등가물, 또는 약학적으로-허용가능한 그의 염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체예에서, 스테로이드계 항-염증제는 6 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -디플루오로-17 $\alpha$ -[(2-푸라닐카보닐)옥시]-11 $\beta$ -하이드록시-16 $\alpha$ -메틸-3-옥소안드로스타-1,4-디엔-17 $\beta$ -카보티오산 S-플루오로메틸 에스테르 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염 또는 그의 용매화합물이다. 스테로이드계 항-염증제가 사용될 때, 이것은 치료적 유효량으로 약학적 조성물에 존재할 것이다. 통상적으로, 스테로이드계 항-염증제는 1회 투여마다 약 0.05  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 을 제공하는데 충분한 양으로 존재할 것이다.

[0109] 다른 적절한 배합은 예를 들면, 다른 항-염증제, 예를 들면, NSAID(소듐 크로모글리케이트; 네도크로밀 소듐과 같은); 포스포디에스테라제(PDE) 억제제(예를 들면, 테오필린, PDE4 억제제 또는 혼합된 PDE3/PDE4 억제제류); 류코트리엔 안타고니스트류(예를 들면, 몬테루카스트); 류코트리엔 합성의 억제제류; iNOS 억제제류; 트립타아제 및 엘라스타제 억제제류와 같은 프로테아제 억제제류; 베타-2 인테그린 안타고니스트 및 아데노신 수용체 아고니스트 또는 안타고니스트(예를 들면, 아데노신 2a 아고니스트); 시토킨 안타고니스트류(예를 들면, 인터루킨 항체 (IL 항체)와 같은 케모킨 안타고니스트, 특히, IL-4 테라피, IL-13 테라피, 또는 이들의 배합물); 또는 시토킨 합성 억제제류를 포함한다.

[0110] 예를 들면, 본원 발명의 화합물과 배합하여 사용될 수 있는 대표적인 포스포디에스테라제-4 (PDE4) 억제제류 또는 혼합된 PDE3/PDE4 억제제류는 시스 4-시아노-4-(3-사이클로펜틸옥시-4-메톡시페닐)사이클로헥산-1-카복시산, 2-카보메톡시-4-시아노-4-(3-사이클로프로필메톡시-4-디플루오로메톡시페닐)사이클로헥산-1-온; 시스-[4-시아노-4-(3-사이클로프로필메톡시-4-디플루오로메톡시페닐)사이클로헥산-1-올]; 시스-4-시아노-4-[3-(사이클로펜틸옥시)-4-메톡시페닐]사이클로헥산-1-카복시산 및 그 등가물, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 다른 대표적인 PDE4 또는 혼합된 PDE4/PDE3 억제제류는 AWD-12-281(elbion); NCS-613(INSERM); D-4418 (Chiroscience 및 Schering-Plough); CI-1018 또는 PD-168787(Pfizer); 국제공개특허 제99/16766호에서 개시되어 있는 벤조디옥솔 화합물들(Kyowa Hakko); K-34(Kyowa Hakko); V-11294A(Napp); 로플루밀라스트(Byk-Gulden); 국제공개특허 제99/47505호에서 개시되어 있는 프탈라지논 화합물들(Byk-Gulden); 푸마켄트린(Byk-Gulden, 현재의 Altana); 아로필린(Almirall-Prodesfarma); VM554/UM565(Vernalis); T-440(Tanabe Seiyaku); 및 T2585 (Tanabe Seiyaku)을 포함한다.

[0111] 본원 발명의 화합물과 배합하여 및 이에 추가되어 사용될 수 있는 대표적인 무스카린 안타고니스트(즉, 항콜린제)는 아트로핀, 아트로핀 술페이트, 아트로핀 옥사이드, 메틸아트로핀 나이트레이트, 호마트로핀 하이드로브로마이드, 히오시아민(d,l) 하이드로브로마이드, 스코폴라민 하이드로브로마이드, 이프라트로피움 브로마이드, 옥시트로피움 브로마이드, 티오토트로피움 브로마이드, 메탄텔린, 프로판텔린 브로마이드, 아니소트로핀 메틸 브로마이드, 클리디늄 브로마이드, 코피롤레이트(Robinul), 이소프로파미드 아이오다이드, 메펜졸레이트 브로마이드, 트리디헥세틸 클로라이드(Pathilone), 헥소시클리움 메틸술페이트, 사이클로펜톨레이트 하이드로클로라이드, 트로피카미드, 트리헥시페니딜 하이드로클로라이드, 피렌제핀, 텔렌제핀, AF-DX 116 및 메톡트라민 및 그 등가물, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염; 또는, 열거된 화합물들의 경우, 그의 염, 대안적인 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0112] 본원 발명의 화합물과 배합하여 사용될 수 있는 대표적인 항히스타민제 (즉,  $H_1$ -수용체 안타고니스트)는 카르비녹사민 말리에이트, 클레마스틴 푸마레이트, 디페닐히드라민 하이드로클로라이드 및 디펜히드리네이트와 같은 에탄올아민류; 피릴아민 암리에이트, 트리펠렌아민 하이드로클로라이드 및 트리펠렌아민 사이트레이트와 같은

에틸렌디아민류; 클로르페니라민 및 아크리바스틴과 같은 알킬아민류; 하이드록시진 하이드로클로라이드, 하이드록시진 파모에이트, 사이클리진 하이드로클로라이드, 사이클리진 락테이트, 메클리진 하이드로클로라이드 및 세티리진 하이드로클로라이드와 같은 피페리딘류; 아스테미졸, 레보카바스틴 하이드로클로라이드, 로라타딘 또는 그의 테스카보에톡시 유사체, 테르페나딘 및 펙소페나딘 하이드로클로라이드와 같은 피페리딘류; 아젤라스틴 하이드로클로라이드; 및 그 등가물, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염; 또는, 열거된 화합물들의 경우, 그의 염, 대안적인 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0113] 본원 발명의 화합물과 배합하여 투여되는 다른 치료제의 적절한 투여량은 약 0.05 mg/일 내지 약 100 mg/일의 범위에 있다.

[0114] 하기의 제제들은 본원 발명의 대표적인 약학적 조성물을 예시한다:

[0115] 제제 실시예 A

[0116] 흡입에 의한 투여를 위한 건조 분말은 하기와 같이 제조된다:

[0117]

구성 성분	함량
본원 발명의 염	0.2 mg
락토오스	25 mg

[0118] 대표적인 절차: 본원 발명의 화합물을 미분화하고 락토오스와 블렌딩한다. 이 블렌딩된 혼합물을 젤라틴 흡입 카트리지에 적재한다. 카트리지의 내용물을 분말 흡입기를 사용하여 투여한다.

[0119] 제제 실시예 B

[0120] 건조 분말 흡입 장치에서 사용하기 위한 건조 분말 제제를 하기와 같이 제조한다:

[0121] 대표적인 절차: 락토오스에 대한 본원 발명의 미분화된 염의 벌크 제제 비율을 1:200으로 갖는 약학적 조성물을 제조한다. 투여량 당 본원 발명의 화합물을 약 10  $\mu$ g 내지 약 100  $\mu$ g으로 전달할 수 있는 건조 분말 흡입 장치에 상기 조성물을 패키징한다.

[0122] 제제 실시예 C

[0123] 정량 흡입기에서 흡입에 의해 투여하기 위한 건조 분말을 하기와 같이 제조한다:

[0124] 대표적인 절차: 탈염수 200 mL에 용해된 레시틴 0.2 g으로부터 형성된 용액에 본원 발명의 화합물 10 g을 10  $\mu$ m 미만의 평균 크기를 갖는 미분화된 입자로 분산시켜 본원 발명의 염 5 중량%와 레시틴 0.1 중량%를 포함하는 현탁액을 제조한다. 상기 현탁액을 분무 건조시키고, 그 결과 생성된 물질을 1.5  $\mu$ m 미만의 평균 직경을 갖는 입자들로 미분화시킨다. 입자들을 가압된 1,1,1,2-테트라플루오로에탄과 함께 카트리지에 적재한다.

[0125] 제제 실시예 D

[0126] 정량 흡입기에서 사용하기 위한 약학적 조성물을 하기와 같이 제조한다:

[0127] 대표적인 절차: 탈염수 100 mL에 용해된 트레할로스 0.5 g과 레시틴 0.5 g으로부터 형성된 콜로이드 용액에 활성 성분 5 g을 10 m 미만의 평균 크기를 갖는 미분화된 입자들로 분산시켜 본원 발명의 염 5%, 레시틴 0.5%, 및 트레할로스 0.5%를 포함하는 현탁액을 제조한다. 상기 현탁액을 분무 건조시키고, 그 결과 생성되는 물질을 1.5  $\mu$ m 미만의 평균 직경을 갖는 입자들로 미분화시킨다. 입자들을 가압된 1,1,1,2-테트라플루오로에탄과 함께 카니스트에 적재한다.

[0128] 제제 실시예 E

[0129] 네블라이저 흡입기에서 사용하기 위한 약학적 조성물을 하기와 같이 제조한다:

[0130] 대표적인 절차: 시트르산으로 산성화시킨 0.9% 소듐 클로라이드 용액 1 mL에 본원 발명의 염 0.5 mg을 용해시켜 네블라이저에서 사용하기 위한 수성 에어로졸 제제를 제조한다. 활성 성분이 용해될 때까지 혼합물을 교반하고 소니케이션시킨다. NaOH를 서서히 첨가하여 용액의 pH를 약 5의 값으로 조정한다.

[0131] 제제 실시예 F

[0132] 경구 투여를 위한 경질 젤라틴 캡슐을 하기와 같이 제조한다:

[0133]	구성 성분	합량
	본원 발명의 염	250 mg
	락토오스(분무-건조)	200 mg
	스테아르산 마그네슘	10 mg

[0134] 대표적인 절차: 구성 성분들을 완전히 블렌딩하고, 경질 젤라틴 캡슐에 적재한다(캡슐 당 조성물 460 mg).

[0135] 제제 실시예 G

[0136] 경구 투여를 위한 현탁액을 하기와 같이 제조한다:

[0137]	구성 성분	합량
	본원 발명의 염	1.0 g
	푸마르산	0.5 g
	소듐 클로라이드	2.0 g
	메틸 파라벤	0.15 g
	프로필 파라벤	0.05 g
	과립화된 당	25.5 g
	소르비톨 (70% 용액)	12.85 g
	비검 (Veegum) k (Vanderbilt Co.)	1.0 g
	향료	0.035 ml
	착색제	0.5 mg
	증류수	총 부피를 100 ml로 맞춤

[0138] 대표적인 절차: 구성 성분들을 혼합하여 현탁액 10 ml당 활성 성분 100 mg을 현탁액을 형성한다.

[0139] 제제 실시예 H

[0140] 주사 가능한 제제를 하기와 같이 제조한다:

[0141]	구성 성분	합량
	본원 발명의 염	0.2 g
	소듐 아세테이트 완충 용액(0.4 M)	2.0 ml
	HCl (0.5 N) 또는 NaOH (0.5 N)	pH를 4까지 맞춤
	물 (증류, 멸균)	총 부피를 20 ml로 맞춤

[0142] 대표적인 절차: 상기 성분들을 블렌딩하고, 0.5 N HCl 또는 0.5 N NaOH를 사용하여 pH를 4±0.5까지 조정한다.

[0143] 유용성

[0144] 식 I의 화합물은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 모두 가지고 있으므로, 본원 발명의 식 I의 화합물의 1,2-에탄디술폰산 염은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 또는 무스카린 수용체에 의해 매개되는 의학적 증상들, 즉  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 또는 무스카린 수용체 안타고니스트에 의한 치료에 의해 호전되는 의학적 증상들을 치료하기 위한 치료제로서 유용할 것으로 기대된다. 그와 같은 의학적 증상들은 예로서, 만성 폐쇄성 폐질환(예를 들면, 만성적인 숨가쁨 기관지염(chronic and wheezy bronchitis) 및 폐기종), 천식, 폐섬유화증, 알레르기성 비염, 비루 및 그 등과물과 같은 폐질환 또는 가역적 기도 폐쇄와 연관된 질병을 포함하는 질환을 포함한다. 치료될 수 있는 다른 증상들은 조기 분만, 우울증, 울혈성 심부전증, 피부병(예를 들면, 염증성, 알레르기성, 건선 및 증식성 피부병), 소화기 산도 저하가 바람직한 증상들 (예를 들면, 소화성 궤양 및 위궤양), 및 근소모성질환(muscle wasting disease)을 포함한다.

[0145] 따라서, 한 실시형태에서, 본원 발명은 폐질환을 치료하는 방법과 관련되는데, 상기 방법은 치료를 필요로 하는 환자에게 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일]에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염 또는 그의 용매화화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 본원 발명의 염이 폐질환을 치료하기 위해 사용될 때, 본원 발명의 염은 통상적으로 일일 복수회 투여량, 단일 일별 투여량 또는 단일 주별 투여량으로 흡입

에 의해 투여될 것이다. 일반적으로, 폐질환을 치료하기 위한 투여량은 약 10  $\mu\text{g}/\text{일}$  내지 약 200  $\mu\text{g}/\text{일}$  범위에 있을 것이다.

[0146] 본원 발명의 화합물이 흡입에 의해 투여될 때, 본원 발명의 화합물은 통상적으로 기관지 확장을 제공하는 효과를 갖는다. 따라서, 방법의 또 다른 실시형태에서, 본원 발명은 기관지 확장의 필요가 있는 환자에게 기관지 확장을 제공하는 방법과 관련되는데, 상기 방법은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염 또는 그의 용매화합물의 기관지 확장-유발량을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 기관지 확장을 제공하는 투여량은 약 10  $\mu\text{g}/\text{일}$  내지 약 200  $\mu\text{g}/\text{일}$  범위에 있을 것이다.

[0147] 한 실시형태에서, 본원 발명은 만성 폐쇄성 폐질환 또는 천식을 치료하는 방법과 관련되는데, 상기 방법은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]-피페리딘-4-일 에스테르 또는 그의 용매화합물의 1,2-에탄디술폰산 염의 치료적 유효량을 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 본원 발명의 염이 COPD 또는 천식을 치료하기 위해 사용될 때, 본원 발명의 염은 통상적으로 일일 복수회 투여량 또는 단일 일별 투여량으로 흡입에 의해 투여될 것이다. 일반적으로, COPD 또는 천식을 치료하기 위한 투여량은 약 10  $\mu\text{g}/\text{일}$  내지 약 200  $\mu\text{g}/\text{일}$  범위에 있을 것이다. 본원 명세서에서 사용될 때, COPD는 만성 폐쇄성 기관지염과 폐기종을 포함한다(예를 들면, Barnes, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *N Engl J Med* 2000: 343:269-78을 참조한다).

[0148] 본원 발명의 염이 폐질환을 치료하기 위해 사용될 때, 본원 발명의 염은 선택적으로 다른 치료제와 배합하여 투여된다. 따라서, 특정 구체예에서, 본원 발명의 약학적 조성물과 방법은 스테로이드계 항-염증제의 치료적 유효량을 추가적으로 포함한다. 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염의 특징과 유용성은 당해 분야의 당업자들에게 공지되어 있는 다양한 생체외(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*) 어레이들을 사용하여 입증될 수 있다. 예를 들면, 대표적인 어레이들이 하기 실시예에서 더 상세하게 설명되어 있다.

#### [0149] 실시예

[0150] 본원 발명의 특정 구체화들을 설명하기 위하여 하기의 제조예와 실시예를 제공한다. 그러나, 특별히 지적하지 않는다면, 어떠한 방식으로든 이러한 특정 구체예들이 본원 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0151] 달리 지적하지 않는다면, 하기의 줄임말은 하기의 의미를 내포하고 있으며, 본원 명세서에서 사용되고 정의되지 않은 소정의 다른 줄임말은 그들의 표준 의미를 갖는다:

[0152] AC 아테닐 사이클라제

[0153] Ach 아세틸콜린

[0154] ATCC 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)

[0155] BSA 소 혈청 알부민

[0156] cAMP 3'-5' 사이클릭 아데노신 모노포스페이트

[0157] CHO 중국 햄스터 난소

[0158] cM<sub>5</sub> 클로닝된 침팬지 M<sub>5</sub> 수용체

[0159] DCM 디클로로메탄(즉, 메틸렌 클로라이드)

[0160] DIPEA *N,N*-다이이소프로필에틸아민

[0161] dPBS 둘베코의 포스페이트 완충된 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline)

[0162] DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

[0163] DMSO 디메틸 술폰사이드

[0164] EDTA 에틸렌디아민테트라아세트산

[0165] E<sub>max</sub> 최대 효능

[0166] EtOAc 에틸 아세테이트

- [0167] EtOH 에탄올
- [0168] FBS 우태혈청
- [0169] FLIPR 형광성 이미지화 플레이트 판독기(fluorometric imaging plate reader)
- [0170] Gly 글라이신
- [0171] HATU *O*-(7-아자벤조트리아졸-1-일-*N,N,N',N'*-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트
- [0172] HBSS (Hank's buffered salt solution)
- [0173] HEK 인간 태아 콩팥 세포(human embryonic kidney cells)
- [0174] HEPES 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄술포산
- [0175] hM<sub>1</sub> 클로닝된 인간 M<sub>1</sub> 수용체
- [0176] hM<sub>2</sub> 클로닝된 인간 M<sub>2</sub> 수용체
- [0177] hM<sub>3</sub> 클로닝된 인간 M<sub>3</sub> 수용체
- [0178] hM<sub>4</sub> 클로닝된 인간 M<sub>4</sub> 수용체
- [0179] hM<sub>5</sub> 클로닝된 인간 M<sub>5</sub> 수용체
- [0180] HPLC 고-성능 액체 크로마토그래피
- [0181] IBMX 3-이소부틸-1-메틸크산틴
- [0182] %Eff %효능
- [0183] PBS 인산 완충 식염수
- [0184] PyBOP 벤조트리아졸-1-일옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트
- [0185] rpm 1 분당 회전수
- [0186] TFA 트리플루오로아세트산
- [0187] THF 테트라하이드로푸란
- [0188] Tris 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄
- [0189] 달리 지적하지 않는다면, 시약, 출발 물질 및 용매를 통상적인 공급 회사(알드리치(Aldrich), 플루카(Fluka), 시그마(Sigma) 및 그 등가물)로부터 구입하였고, 이들은 추가로 정제하지 않고 사용하였다.
- [0190] 하기에 기술된 실시예에서는, 3.5 마이크론 입자 크기를 가지고 있고 애질런트(Agilent)에 의해 공급되는, 조르박스 보너스(Zorbax Bonus) RP 2.1 x 50 mm 컬럼(C14 컬럼)을 보유한 애질런트 (Palo Alto, CA) 시리즈 1100 장비를 사용하여 HPLC 분석을 실시하였다. 214 nm에서 UV 흡광도에 의해 검출하였다. 6 분에 걸쳐 10%-70% B로 0.5 ml/분의 유속으로 HPLC 10-70 데이터를 얻었다. 이동상 A는 2%-98%-0.1% ACN-H<sub>2</sub>O-TFA이었고; 및 이동상 B는 90%-10%-0.1% ACN-H<sub>2</sub>O-TFA이었다. 전술한 상기 이동상 A와 B를 사용하여, 5 분 동안의 구배로 HPLC 5-35 데이터와 HPLC 10-90 데이터를 얻었다.
- [0191] 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems, Foster City, CA) 모델 API-150EX 기구를 가지고 액체 크로마토그래피 질량 분광기(LCMS) 데이터를 얻었다. 5 분 동안의 구배로 10%-90% 이동상 B를 가지고 LCMS 10-90 데이터를 얻었다.
- [0192] 어플라이드 바이오시스템즈의 API 150EX 프랩(Prep) 워크스테이션 시스템 (Workstation system)을 사용하여, 소량의 스케일로 정제를 실시하였다. 이동상은 A: 물 + 0.05% v/v TFA; 및 B: 아세트니트릴 + 0.05% v/v TFA 이었다. 어레이를 위해서는(통상적으로 약 3 내지 50 mg을 포함하는 시료 크기), 하기의 조건들을 사용하였다: 20 ml/분 유속; 15 분 구배, 및 5 마이크론 입자들을 갖는 20 mm x 50 mm 프리즘(Prism) RP 컬럼(Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA). 대량 스케일로 정제하기 위해서는(일반적으로 정제되지 않은 시료가



100 mg보다 많음), 하기의 조건들을 사용하였다: 60 mL/분 유속; 30 분 구배 및 10 마이크론 입자들을 갖는 41.4 mm x 250 mm 마이크로소르브(Microsorb) BDS 컬럼(Varian, Palo Alto, CA).

[0193] 20℃에서 텅스텐 할로겐 광원과 589 nm 필터를 보유한 자스코(Jasco) 편광계(Model P-1010)를 사용하여, 키랄성 화합물을 위한 특정 로테이션 ( $[\alpha]_D^{20}$ 로 나타냄)을 측정하였다. 테스트용 화합물의 시료는 통상적으로 물에서 1 mg/mL로 측정하였다.

[0194] **제조예 1**

[0195] **메틸 4-아미노-5-클로로-2-메톡시벤조에이트**

[0196] 톨루엔 (9 mL)과 메탄올 (1 mL)의 혼합물에 넣은 4-아미노-5-클로로-2-메톡시벤조산 (1.008 g, 5.0 mmol)의 용액에, (트리메틸실릴)디아조메탄 (헥산 2.0 M 용액, 3.0 mL, 6.0 mmol)을 0℃에서 적가하였다. 그런 다음 반응 혼합물을 상온까지 가온하였고, 16 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물의 밝은 노란색이 사라질 때까지 아세트산을 첨가함으로써, 초과량의 (트리메틸실릴)디아조메탄을 없앴다. 그런 다음 혼합물을 진공 하에서 농축시켜 회색을 포함한 흰색 고체로 표제 화합물을 얻었으며, 이것을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

[0197] **제조예 2**

[0198] **메틸 4-아크릴로일아미노-5-클로로-2-메톡시벤조에이트**

[0199] 제조예 2의 정제되지 않은 생성물에, 디클로로메탄 (10 mL, 0.5 M)과 트리에틸아민(2.1 mL, 15 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 0℃까지 냉각시켰고, 아크릴로일 클로라이드 (812  $\mu$ L, 10 mmol)를 적가하면서 교반하였다. 2 시간 후에, 0℃에서 메탄올(약 2 mL)을 첨가함으로써 반응을 중지시켰고, 결과로 만들어진 혼합물을 상온에서 15 분 동안 교반하였고, 그런 다음 진공에서 농축시켰다. 디클로로메탄(30 mL)과 물(30 mL)을 얻은 잔여물에 첨가하였고, 이 혼합물을 완전히 혼합시켰다. 층 분리를 하였고, 수성 층을 디클로로메탄(20 mL)으로 추출하였다. 유기층을 합하였고, 물을 제거하였고( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 여과하였고, 용매를 진공에서 제거하여 갈색의 거품 형태의 고체로 표제 화합물을 얻었고, 이것을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

[0200] **제조예 3**

[0201] **비페닐-2-일카르바산 피페리딘-4-일 에스테르**

[0202] 알드리치 (Aldrich), 밀와우키 (Milwaukee), WI에서 상업적으로-입수가능한, 비페닐-2-이소시아네이트 (97.5 g, 521 mmol)와 4-하이드록시-1-벤질피페리딘 (105 g, 549 mmol)을 70℃에서 12 시간 동안 함께 가열하였고, 그 동안 안에 비페닐-2-일카르바산 1-벤질피페리딘-4-일 에스테르가 형성되는 여부를 LCMS에 의해 모니터하였다. 그런 다음 반응 혼합물을 50℃까지 냉각시켰고, 에탄올 (1 L)을 첨가하였고, 그런 다음 6M 염산 (191 mL)을 천천히 첨가하였다. 그런 다음, 반응 혼합물을 상온까지 냉각시켰고, 암모늄 포르메이트 (98.5 g, 1.56 mol)를 첨가하였고, 20 분 동안 질소 가스를 용액으로 격렬하게 주입하였다. 그런 다음, 팔라듐 (활성화된 탄소에서 10 중량 % (건조 상태 기준) (20 g)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 40℃에서 12 시간 동안 가열하였고, 그런 다음 셀라이트 패드를 통해 여과시켰다. 그런 다음 감압 하에서 용매를 제거하였고, 얻은 잔여물에 1M 염산 (40 mL)을 첨가하였다. 그런 다음, 소듐 하이드록사이드 (10N)를 첨가하여 pH를 12까지 조절하였다. 수성 층을 에틸 아세테이트 (150 mL로 2회)로 추출하였고, 물을 제거하였고 (마그네슘 설페이트), 그런 다음 감압하에서 용매를 제거하여 표제 화합물 (155 g, 100%)을 얻었다. HPLC (10-70)  $R_t$  = 2.52; MS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$   $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ 의 계산 값 297.15; 측정 값 297.3.

[0203] **제조예 4**

[0204] **메틸 4-{3-[4-(비페닐-2-일카바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피오닐아미노}-5-클로로-2-메톡시벤조에이트**

[0205] 제조예 2의 정제하지 않은 생성물에, 제조예 3의 생성물 (1.33 g, 4.5 mmol), THF (22.5 mL)와 메탄올 (2.5 mL)의 혼합물을 첨가하였다. 이 혼합물을 50℃에서 가열하며 16 시간 동안 교반하였고, 그런 다음 용매를 진공 하에서 제거하였다. 잔여물을 크로마토그래피하여 (실리카 겔; EtOAc) 표제 화합물 (0.82 g;  $R_f$  = 0.4, 3 단계 전체 수득율 29%)을 회색을 포함한 흰색의 거품 형태의 고체로 얻었다. MS  $m/z$  566.4 (M+H,  $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{ClN}_3\text{O}_6$ 는 565.20로 예상됨).

[0206] **제조예 5**

- [0207] **비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-하이드록시메틸-5-메톡시-페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**
- [0208] THF (4.5 mL)와 메탄올 (0.5 mL)의 혼합물에 넣은 제조예 4 (0.82 mg, 1.45 mmol)의 생성물 용액에, 리튬 보로 하이드라이드 (32 mg, 1.45 mmol)를 0℃에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 상온까지 가온하였고, 41 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 더 이상 기포가 관찰되지 않을 때까지 0℃에서 1N 수성 염산을 첨가함으로써 반응을 중지시켰고, 이 혼합물을 10 분 동안 교반하였다. 진공 하에서 용매를 제거하였고, 얻은 잔여물을 아세트니트릴 (약 2 mL)에 용해시켰다. 이 용액을 제조용-RP-HPLC (구배: 0.05% TFA를 포함한 물에서 아세트니트릴을 2 내지 50%)로 정제하였다. 적절한 분획들을 모아서, 이들을 합하였고, 동결 건조시켜 표제 화합물을 트리플루오로아세트레이트 염으로 얻었다. 이 염을 이소프로필 아세트레이트 (10 mL)와 1N 수성 소듐 하이드록시드(10 mL)로 처리하였고, 유기층을 포집하였고, 물을 제거하였고 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 여과하였고, 감압 하에서 용매를 제거하여 흰색 거품 형태의 고체로 표제 화합물 (161 mg, 21% 수득율)을 얻었다. MS *m/z* 538.4 (M+H, C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>는 537.20로 예상됨).
- [0209] **제조예 6**
- [0210] **비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-포르밀-5-메톡시페닐-카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**
- [0211] 디클로로메탄 (3 mL)에 넣은 제조예 3의 생성물 (161 mg, 0.3 mmol)의 용액에, 디메틸 숏폭사이드 (213 μL, 3.0 mmol)와 디이소프로필에틸아민 (261 μL, 1.5 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 -20℃까지 냉각시켰고, 삼산화황 피리딘 복합체 (238 mg, 1.5 mmol)를 천천히 첨가하였다. 30 분 경과 후에, 물 (약 3 mL)을 첨가함으로써 반응 혼합물을 중지시켰다. 층 분리를 하였고, 유기층에서 물을 제거하였고 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 여과하였고, 진공 하에서 용매를 제거하여 밝은 노란색 고체로 표제 화합물을 얻었다. MS *m/z* 536.3 (M+H, C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>는 535.19로 예상됨).
- [0212] **제조예 7**
- [0213] **8-벤질옥시-5-(2-브로모아세틸)-1H-퀴놀린-2-온**
- [0214] **(a) 8-아세톡시-1H-퀴놀린-2-온**
- [0215] 알드리치, 밀와우키, WI로부터 상업적으로-이용가능한 8-하이드록시퀴놀린-*N*-옥사이드 (160.0 g, 1.0 mol)와 아세트산 무수물 (800 mL, 8.4 mol)을 100℃에서 3 시간 동안 가열하였고, 그런 다음 얼음에서 냉각시켰다. 생성물을 뷰흐너 깔때기에서 포집하였고, 아세트산 무수물 (100mL로 2회)로 세척하였고, 감압 하에서 건조시켜 8-아세톡시-1H-퀴놀린-2-온 (144 g)을 고체로 얻었다.
- [0216] **(b) 5-아세틸-8-하이드록시-1H-퀴놀린-2-온**
- [0217] 1,2-디클로로에탄 (280 mL)에 넣은 알루미늄 클로라이드 (85.7 g, 640 mmol)의 슬러리를 얼음에서 냉각시켰고, 단계 (a)로부터 얻은 생성물 (56.8 g, 280 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 상온까지 가온하였고, 그런 다음 85℃에서 가열하였다. 30분 경과 후에, 아세틸 클로라이드 (1.5 mL, 21 mmol)를 첨가하였고, 혼합물을 추가로 60 분 동안 가열하였다. 그런 다음 반응 혼합물을 냉각시켰고, 잘 교반하면서 0℃에서 1N 염산 (3 L)을 첨가하였다. 2 시간 동안 교반시킨 후에, 고체를 뷰흐너 깔때기에서 포집하였고, 물로 세척하였고 (250 mL로 3회), 감압 하에서 건조시켰다. 수 개의 배치 (135 g)로부터 분리시킨 조 생성물을 합하였고, 디클로로메탄 (4 L)으로 6 시간 동안 부수었다. 결과로 만들어진 고체를 뷰흐너 깔때기에서 포집하였고, 감압 하에서 건조시켜 표제 화합물 (121 g)을 얻었다.
- [0218] **(c) 5-아세틸-8-벤질옥시-1H-퀴놀린-2-온**
- [0219] 단계 (b)로부터 얻은 생성물 (37.7 g, 186 mmol)에, *N,N*-디메틸포름아미드 (200 mL)와 포타슘 카보네이트 (34.5 g, 250 mmol)를 첨가하였고, 그 다음에 벤질브로마이드 (31.8 g, 186 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 상온에서 2.25 시간 동안 교반하였고, 그런 다음 포화된 소듐 클로라이드 (3.5 L)에 0℃에서 넣었고, 1 시간 동안 교반하였다. 생성물을 포집하였고, 뷰흐너 깔때기에서 1 시간 동안 건조시켰고, 그 결과 생성된 고체를 디클로로메탄 (2 L)에서 용해시켰고, 이 혼합물을 소듐 설페이트에서 물을 제거하였다. 용액을 셀라이트 패드를 통해 여과하였고, 그런 다음 상기 셀라이트 패드를 디클로로메탄 (200 mL로 5회)으로 세척하였다. 그런 다음, 합한 여과액을 건조될 때까지 농축시켰고, 그 결과 생성된 고체를 2 시간 동안 에테르 (500 mL)로 부수었다. 생성물을 뷰흐너 깔때기에서 포집하였고, 에테르 (250 mL로 2회)로 세척하였고, 감압 하에서 건조시켜 표제 화합물



(44 g)을 분말로 얻었다.

[0220] (d) 8-벤질옥시-5-(2-브로모아세틸)-1H-퀴놀린-2-온

[0221] 단계 (c)로부터 얻은 생성물 (20.0 g, 68.2 mmol)을 디클로로메탄 (200 mL)에 용해시켰고, 0℃까지 냉각시켰다. 보론 트리플루오라이드 디에틸 에써레이트 (10.4 mL, 82.0 mmol)를 시린지로 첨가하였고, 혼합물을 상온까지 가온하여 진한 현탁액을 얻었다. 현탁액을 45℃ (오일 배쓰)에서 가열하였고, 디클로로메탄 (100 mL)에 넣은 브로민 (11.5 g, 72.0 mmol) 용액을 40분에 걸쳐 첨가하였다. 혼합물을 추가로 15분 동안 45℃에서 유지하였고, 그런 다음 상온까지 냉각시켰다. 혼합물을 감압 하에서 농축시켰고, 그런 다음 1 시간 동안 수성 소듐 카보네이트 (200 mL)로 부수었다. 고체를 뷰흐너 깔때기에서 포집하였고, 물 (100 mL로 4회)로 세척하였고, 감압 하에서 건조시켰다. 2회 반복으로 얻은 생성물을 정제하기 위하여 합하였다. 조 생성물 (52 g)을 클로로포름 (500 mL)에 넣은 50% 메탄올로 1 시간 동안 부수었다. 생성물을 뷰흐너 깔때기에서 포집하였고, 클로로포름에 넣은 50% 메탄올 (50 mL로 2회)로 세척하였고, 메탄올 (50 mL로 2회)로 세척하였다. 고체를 감압 하에서 건조시켜 표제 화합물 (34.1 g)을 분말로 얻었다.

[0222] 제조예 8

[0223] 8-벤질옥시-5-[(R)-2-브로모-1-(*터트*-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-1H-퀴놀린-2-온

[0224] (a) 8-벤질옥시-5-((R)-2-브로모-1-하이드록시에틸)-1H-퀴놀린-2-온

[0225] (R)-(+)- $\alpha$ ,  $\alpha$ -디페닐프롤린을 (30.0 g, 117 mmol)과 트리메틸보록신 (11.1 mL, 78 mmol)을 톨루엔 (300 mL)에서 혼합하였고, 상온에서 30분 동안 교반하였다. 혼합물을 150℃ 오일 배쓰에서 유지시켰고, 액체를 증류시켜 제거하였다. 톨루엔을 20 mL 일정량으로 첨가하였고, 증류를 4 시간 동안 계속하였다. 전체적으로 톨루엔 300 mL를 첨가하였다. 그런 다음, 혼합물을 상온까지 냉각시켰다. 500  $\mu$ l 일정량을 건조상태가 될 때까지 증류시켰고, 무게를 측정하여 (246 mg) 촉매의 농도가 1.8 M이 됨을 결정하였다.

[0226] 8-벤질옥시 5-(2-브로모아세틸)-1H-퀴놀린-2-온 (90.0 g, 243 mmol)을 질소하에 유지시켰고, 테트라하이드로푸란 (900 mL)을 첨가하였고, 그 다음에 상기에서 기술한 촉매 (톨루엔에서 1.8 M, 15 mL, 27 mmol)를 첨가하였다. 현탁액을 얼음/이소프로판올 배쓰에서  $-10 \pm 5^\circ\text{C}$ 까지 냉각시켰다. 보레인 (THF 1.0 M 용액, 294 mL, 294 mmol)을 4 시간에 걸쳐 첨가하였다. 그런 다음, 반응을  $-10^\circ\text{C}$ 에서 추가로 45 분 동안 교반하였고, 그런 다음 메탄올 (250 mL)을 천천히 첨가하였다. 혼합물을 진공하에서 농축시켰고, 잔여물을 끓는 아세토니트릴 (1.3 L)에서 용해시켰고, 뜨거운 상태에서 여과시켰고, 그런 다음 상온까지 냉각시켰다. 결정을 여과하였고, 아세토니트릴로 세척하였고, 진공 하에서 건조시켜 표제 화합물 (72.5 g, 196 mmol, 81% 수득율, 95% ee, HPLC에서 95% 순도)을 얻었다.

[0227] (b) 8-벤질옥시-5-[(R)-2-브로모-1-(*터트*-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-1H-퀴놀린 2-온

[0228] 단계 (b) (70.2 g, 189 mmol)로부터 얻은 생성물에, *N,N*-디메틸포름아미드 (260 mL)를 첨가하였고, 이 혼합물을 질소 하에 얼음 배쓰에서 냉각시켰다. 2,6-루티딘 (40.3 g, 376 mmol)을 5 분에 걸쳐 첨가하였고, 그런 다음 *터트*-부틸디메틸실릴 트리플루오로메탄술포네이트 (99.8 g, 378 mmol)를 천천히 첨가하였고, 첨가하는 동안에 온도가 20℃ 미만으로 유지되도록 하였다. 혼합물을 45분 동안 상온까지 가온시켰다. 메탄올 (45 mL)을 10분에 걸쳐 혼합물에 적가하였고, 혼합물을 에틸 아세테이트/사이클로헥산(1:1, 500 mL)과 물/브라인 (1:1, 500 mL)으로 분배시켰다. 유기층을 물/브라인 (1:1, 각각 500 mL)으로 2회 더 세척하였다. 혼합한 유기층을 감압 하에서 증류시켜 밝은 노란색 오일을 얻었다. 사이클로헥산 (400 mL)을 두 번으로 나누어 상기 오일에 첨가하였고, 진한 흰색을 슬러리가 형성될 때까지 증류시켰다. 사이클로헥산 (300 mL)을 상기 슬러리에 첨가하였고, 그 결과 생성된 흰색 결정을 여과하였고, 사이클로헥산 (300 mL)으로 세척하였고, 감압 하에서 건조시켜 표제 화합물 (75.4 g, 151 mmol, 80% 수득율, 98.6 % ee)을 얻었다.

[0229] 제조예 9 A

[0230] 8-벤질옥시-5-[(R)-2-(*N*-벤질아미노)-1-(*터트*-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-1H-퀴놀린-2-온

[0231] DMSO (1.7 mL)에서 제조예 8의 생성물 (1.00 g, 2.05 mmol)과 벤질아민 (493  $\mu$ l, 4.51 mmol)의 교반 중인 용액을 105℃에서 4 시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 냉각시켰고, 그런 다음 EtOAc (10 mL)로 희석시켰고, 유기층을 포화된 수성 암모늄 클로라이드 용액 (5 mL)과 1N 소듐 하이드록사이드 (5 mL)로 세척하였고, 물을 제거하였고 (MgSO<sub>4</sub>), 감압 하에서 용매를 제거하였다. 정제되지 않은 잔여물을 칼럼 크로마토그래피 (50% EtOAc/헥

산)로 정제하여 표제 화합물 (700 mg, 67%)을 얻었다. MS m/z:  $[M + H]^+$   $C_{31}H_{38}N_2O_3Si$ 의 계산 값 515.27; 측정 값 515.5.

[0232] **제조예 9B**

[0233] **8-벤질옥시-5-[(R)-2-(N-벤질아미노)-1-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-1H-퀴놀린-2-온**

[0234] 500 mL 목이 세 개인 둥근 바닥 플라스크에, 8-벤질옥시-5-[(R)-2-브로모-1-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-1H-퀴놀린-2-온 (43 g, 0.124 mol, 키랄성 순도가 약 95%), 1-메틸-2-피롤리디논 (210 mL) 및 벤질아민 (28.3 g, 0.37 mol)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물에 질소를 주입하였고, 그런 다음 90℃에서 6 시간 동안 교반하였다. 그런 다음 상기 혼합물을 상온까지 냉각시켰고, 물 (300 mL)와 에틸 아세테이트 (300 mL)를 첨가하였다. 층 분리를 하였고, 유기층을 물 (200 mL), 물과 수성 포화된 소듐 클로라이드 용액의 1 : 1 혼합물 (200 mL), 및 물 (200 mL)로 세척하였다. 그런 다음, 유기층에서 마그네슘 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 감압 하에서 농축시켜 표제 화합물을 오렌지색 오일로 얻었다.

[0235] 상기 오렌지색 오일에, 헵탄 (200 mL)과 에틸 아세테이트 (200 mL)를 첨가하였고, 그 결과 생성된 혼합물을 65℃까지 가열하여 투명한 용액을 얻었다. 이 용액을 상온까지 냉각시켰고, 밤새 유지시켜 (약 16 시간), 침전물이 형성되도록 하였다. 상기 침전물을 여과시켜 포집하여 화학양론적으로-순수하지 않은 표제 화합물 (8.85 g, 79.6% ee)을 얻었다. 여과액을 감압 하에서 농축하여 표제 화합물 (38.6 g, 99.4% ee)을 얻었다. 이 물질을 이 전 배치에서 얻은 물질 (19.2 g, 99.5% ee)과 혼합하였고, 헵탄 (250 mL)과 에틸 아세테이트 (100 mL)를 첨가하였다. 이 혼합물을 80℃까지 가열하였고 (흐린 용액에서 투명한 용액으로 됨), 그런 다음 상온까지 냉각시켰고, 밤새 유지하였다. 그 결과 생성된 침전물을 여과에 의해 포집하여 표제 화합물 (36.8 g, 98.4% ee, 화학적 순도 99.9%)을 흰색 고체로 얻었다. 여과액을 감압 하에서 농축하였고, 얻은 잔여물을 헵탄 (100 mL)에서 농축시켰다. 그 결과 생성된 고체를 포집하여 표제 화합물 (24 g, 키랄성 순도 100%, 화학적 순도 95%)을 황갈색 고체로 얻었다.

[0236] **제조예 10A**

[0237] **5-[(R)-2-아미노-1-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-8-하이드록시-1H-퀴놀린-2-온**

[0238] 에탄올 (62 mL)에 넣은 제조예 9 A의 생성물 (3.16 g, 6.15 mmol)과 팔라듐 (활성화된 탄소에서 10 중량 % (건조 상태 기준)) (1.58 g)의 교반 중인 용액을 수소 분위기 하에서 24 시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였고, 메탄올 (15 mL)로 세척하였고, 그런 다음 용매를 감압 하에서 제거하여 표제 화합물 (1.52 g, 4.55 mmol, 74%)을 고체로 얻었다.

[0239] **제조예 10B**

[0240] **5-[(R)-2-아미노-1-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-8-하이드록시-1H-퀴놀린-2-온 아세트산 염**

[0241] 8-벤질옥시-5-[(R)-2-(N-벤질아미노)-1-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-1H-퀴놀린-2-온 (100 g, 194 mmol)과 아세트산 (17.5 mL, 291 mmol)을 메탄올 (1 L)에 용해시켰다. 투명한 용액에 질소를 주입하였고, 그런 다음 탄소에 있는 팔라듐 하이드록사이드 (20 g, Pd 20 중량 % (건조 상태 기준), 습도 (물이 약 50%))를 첨가하였다. 수소 기체를 교반 중인 용액에 상온에서 6 시간 동안 버블링시켰고, 그 동안 진한 슬러리가 만들어지도록 하였다. 그런 다음, 반응 혼합물에 질소를 주입하였고, 메탄올 (1 L)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 약 30 분 동안 교반하였고 (생성물을 용해시키기 위함), 그런 다음 혼합물을 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 여과액을 약 500mL 부피가 될 때까지 감압 하에서 농축시켰고, 그 결과 생성된 슬러리에 에탄올 (500 mL)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 약 500 mL 부피가 될 때까지 감압 하에서 농축시켰고, 그 결과 생성된 침전물을 여과에 의해 포집하였고, 건조시켜 표제 화합물을 노란색-흰색 고체로 얻었다 (65g, 85% 수득율, 순도 >98%).

[0242] **제조예 11**

[0243] **비페닐-2-일카르바민산 1-[2-(4-[(R)-2-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸]-2-클로로-5-메톡시-페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

[0244] 디클로로메탄 (0.5 mL)과 메탄올 (0.5 mL)의 혼합물에 넣은 제조예 6의 생성물에, 제조예 10A의 생성물 (124.1 mg, 3.1 mmol)을 첨가하였고, 그 결과 생성된 혼합물을 상온에서 1.5 시간 동안 교반하였다. 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드 (190.7 mg, 0.9 mmol)를 첨가하였고, 그 결과 생성된 혼합물을 상온에서 15 시간 동안 교반

하였다. 물 (약 0.2 mL)을 첨가하여 반응을 중지시켰고, 혼합물을 진공 내에서 농축시켜 표제 화합물을 얻었고, 이것은 추가로 정제하지 않고 사용하였다. MS m/z 854.5 (M+H, C<sub>46</sub>H<sub>56</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si는 853.36으로 예상됨).

[0245] 제조예 12

[0246] 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르

[0247] 디클로로메탄에 넣은 제조예 11의 현탁액 (1.0 mL, 0.3 M)에, 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드 (245  $\mu$ l, 1.5 mmol)를 첨가하였다. 이 혼합물을 상온에서 45 시간 동안 교반하였고, 그런 다음 상기 혼합물을 진공 내에서 농축시켰다. 잔여물을 DMF (0.5 mL), 아세트니트릴/물 (1:1, 0.1% TFA를 포함, 0.6 mL), TFA (0.3 mL) 및 아세트니트릴 (약 1 mL)의 혼합물에 용해시켰고, 얻은 혼합물을 프랩-RP-HPLC (구배: 0.05% TFA를 포함하는 물에서 아세트니트릴이 2 내지 50%)로 정제하였다. 적절한 분획들을 포집하였고, 합하였고, 동결건조시켜 표제 화합물의 디트리플루오로아세이트 염 (100 mg, 34% 수득율, HPLC 순도 98.7%)을 회색을 포함하는 흰색 고체로 얻었다. MS m/z 740.5 (M+H, C<sub>40</sub>H<sub>42</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>7</sub>는 739.28로 예상됨).

[0248] 실시예 1

[0249] 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염

[0250] 에탄올 (0.2 mL)에 넣은 1,2-에탄디술폰산 이수화물 (3.8 mg, 0.02 mmol) 용액을 이소프로판올과 디클로로메탄의 64:1 v/v 혼합물 (1 mL)에 넣은 제조예 12의 생성물의 용액 (14.3 mg, 0.02 mmol)에 천천히 첨가하였다. 그 결과 생성된 용액을 약 30 분 동안 45°C 내지 50°C에서 가열하였다. 그런 다음 혼합물을 상온까지 천천히 냉각시켰고, 이때 용액이 약간 흐려진 상태가 되었다. 질소가 천천히 주입되는 상태로 용액을 상온에서 밤새 유지시켰다. 그 결과 생성된 침전물을 여과에 의해 포집하였고, 건조시켜 표제 화합물 (13 mg, 72% 수득율)을 흰색 결정질 고체로 얻었다.

[0251] 실시예 2

[0252] 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염

[0253] 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 용액 (26.8mg, 0.0362mmol)을 에탄올 (5.36 mL)에서 제조하였고, 상온에서 교반하여 (5 분) 완전히 용해된 상태를 얻었다. 에탄올 (0.2 mL)에 넣은 1,2-에탄디술폰산 이수화물 (8.2mg, 0.0362mmol) 용액을 상기 첫 번째 용액에 거의 1 분에 걸쳐 천천히 첨가하였다. 그 결과 생성된 현탁액을 5 분 동안 교반하였고, 그런 다음 질소 하에서 여과에 의해 분리시켰다. 그 결과 생성된 침전물을 건조시켜 표제 화합물 (28.5 mg, 85% 수득율)을 흰색 고체로 얻었다.

[0254] 실시예 3

[0255] 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염

[0256] 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 (5 g, 6.75 mmol, 순도 >99%)를 이소프로판올 (100 mL)에 용해시켰고, 그 다음에 물 (20 mL)에서 용해시킨 에탄 디술폰산 이수화물 (1.525 mg, 6.75 mmol)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 슬러리를 상온에서 1 시간 동안 교반하였고, 그런 다음 -30°C에서 밤새 두었다. 표제 화합물 (6.0 g)을 흰색 분말로 분리시켰다. 생성물을 이소프로판올 (100 mL)에 넣은 20 %물에서 48 시간 동안 30°C에서 가열하였다. 상온까지 냉각시킨 후에, 그 결과 생성된 침전물을 여과에 의해 분리시켰고, 공기 중에서 2 시간 동안 건조시켜 표제 화합물 (5.4 g)을 얻었다.

**[0257] 제조예 13****[0258] 메틸 4-아크릴로일아미노-5-클로로-2-메톡시벤조에이트**

**[0259]** 오버헤드 스테러 (overhead stirrer), 온도 조절기, 및 첨가용 깔때기가 구비되어 있는 1-리터의 목이 세 개인 둥근 바닥 플라스크에, 메틸 4-아미노-5-클로로-2-메톡시벤조에이트 (44.2 g, 200 mmol), 디클로로메탄 (500 mL) 및 디이소프로필에틸아민 (104.5 mL, 600 mmol)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 상온에서 교반하여 구성 성분들을 용해시켰고, 그런 다음 혼합물을 0℃까지 냉각시켰다. 그런 다음, 아크릴로일 클로라이드 (16.25 mL, 200 mmol)를 적가하였고, 적가하는 동안에는 내부에 있는 반응 혼합물의 온도를 10℃ 미만으로 유지하였다. 첨가 시간은 전체적으로 약 30분이 되도록 하였다. 그런 다음 반응 혼합물을 0℃ 부터 상온까지 약 2 시간의 기간에 걸쳐 천천히 가온시켰다. 그런 다음, 수성의 포화된 소듐 바이카보네이트 용액 (200 mL)과 디클로로메탄 (200 mL)을 첨가하였고, 이 혼합물을 15 분 동안 교반하였고, 그런 다음 층 분리를 하였다. 디클로로메탄층을 1 M 염산 (200 mL)으로 세척하였고, 그런 다음 감압 하에서 원래 부피의 약 3분의 1까지 농축시켜 진한 슬러리 상태로 만들었다. 상기 슬러리를 여과하였고, 여과하여 얻은 고체 (filter cake)를 디클로로메탄 (100 mL)으로 세척하였고, 건조시켜 표제 화합물 (36 g, 67 % 수득율, HPLC 순도 >98%)을 회색이 있는 흰색 고체로 얻었다.

**[0260] 제조예 14****[0261] 메틸 4-{3-[4-(비페닐-2-일카바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피오닐아미노}-5-클로로-2-메톡시벤조에이트**

**[0262]** 오버헤드 스테러, 온도 조절기 및 환류용 응축기가 구비되어 있는 1-리터의 목이 세 개인 둥근 바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 피페리딘-4-일 에스테르 (36.3 g, 122 mmol), 디클로로메탄 (500 mL) 및 이소프로판올 (100 mL)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 상온에서 교반하여 구성 성분들을 용해시켰고, 그런 다음 제조예 10의 생성물 (30 g, 111.5 mmol)을 첨가하였다. 상온에서 교반을 계속하여 구성 성분들을 용해시켰고, 그런 다음 혼합물을 환류 상태 (50℃ 내지 55℃)에서 18 시간 동안 가열하였다. 그런 다음, 반응 혼합물을 상온까지 냉각시켰고, 에탄올 (200 mL)을 첨가하였다. 이 혼합물을 약 150 mL 부피가 될 때까지 감압 하에서 농축시켜 진한 슬러리 상태가 되도록 만들었다. 상기 슬러리를 여과하였고, 여과하여 얻은 고체를 에탄올 (50 mL)로 세척하였고, 건조시켜 표제 화합물 (58 g, 수득율 92%, HPLC 순도 99.5%)을 흰색 고체로 얻었다.

**[0263] 제조예 15****[0264] 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-하이드록시메틸-5-메톡시-페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

**[0265]** 2-리터 둥근-바닥 플라스크에, 제조예 14의 생성물 (40 g, 70.8 mmol)과 THF (400 mL)를 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 상온에서 교반하여 구성 성분들을 용해시켰고, 그런 다음 플라스크에 5 분 동안 질소를 주입하였다. 그런 다음, 혼합물을 0℃ (내부 온도)까지 냉각시켰고, THF에 넣은 리튬 알루미늄 하이드라이드 1 M 용액 (106 mL, 106 mmol)을 첨가용 깔때기로 적가하였으며, 적가하는 동안에는 반응물의 내부 온도가 10℃ 미만으로 유지되도록 하였다. 첨가하는 시간은 전체로 약 40 분이 되도록 하였다. 그런 다음 반응 혼합물을 0℃에서 1 시간 동안 교반하였고, 그런 다음 1 M 소듐 하이드록사이드 (200 mL)를 첨가하였고, 첨가하는 동안에는 반응물의 내부 온도가 15℃ 미만으로 유지되도록 하였다. 그런 다음, 층 분리를 하였고, THF 층을 수성 포화된 소듐 클로라이드 용액 (100 mL)으로 세척하였고, 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 감압 하에서 농축시켜 표제 화합물 (38 g, 수득율 100 %, HPLC 순도 94 %)을 흰색 고체로 얻었다.

**[0266] 제조예 16****[0267] 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-포르밀-5-메톡시페닐-카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

**[0268]** 1-리터의 둥근-바닥 플라스크에, 제조예 15의 생성물 (28 g, 52 mmol)과 디클로로메탄 (500 mL)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 상온에서 교반하여 구성 성분들을 용해시켰고, 그런 다음 활성화된 망간 (IV) 산화물 (45 g, 520 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 질소 하에 상온에서 12 시간 동안 교반하였고, 그런 다음 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 그런 다음 반응 혼합물을 감압 하에서 농축시켰고, 얻은 잔여물을 진공 하에서 밤새 건조시켜 표제 화합물 (26 g, 수득율 93 %, HPLC 순도 약 93%)을 노란색 고체로 얻었다.

**[0269] 제조예 17****[0270] 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(8- 하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-2-클로로-5-메톡시-페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**



[0271] 500 mL 둥근-바닥 플라스크에, 제조예 16의 생성물 (6 g, 11.2 mmol)과 디클로로메탄 (50 mL)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 상온에서 교반하여 구성 성분들을 용해시켰고, 그런 다음 제조예 7의 생성물 (6 g, 15.0 mmol)과 물을 제거한 메탄올 (50 mL)을 첨가하였다. 이 혼합물을 질소 하에 상온에서 2 시간 동안 교반하였고 (투명한 노란색이 오렌지색 용액으로 됨), 그런 다음 상기 혼합물을 0 내지 5℃까지 냉각시켰다. 고체형 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드 (7.2 g, 34 mmol)을 10 분 기간에 걸쳐 여러 부분으로 첨가하였고, 그런 다음 반응 혼합물을 0℃부터 상온까지 약 2 시간의 기간에 걸쳐 천천히 가온시켰다. 그런 다음, 혼합물을 0℃까지 냉각시켰고, 수성의 소듐 하이드록사이드 1 M 용액 (50 mL)과 디클로로메탄 (150 mL)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 완전히 교반하였고, 그런 다음 층 분리를 하였다. 유기층을 수성의 포화된 소듐 클로라이드 용액 (50 mL)으로 세척하였고, 여과하였고, 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 감압 하에서 농축시켜 표제 화합물 (10.1 g, 수득율 100%, HPLC 순도 87%)을 노란색 고체로 얻었다.

[0272] 실시예 4

[0273] 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-[(*(R)*-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염

[0274] 50 mL 둥근-바닥 플라스크에, 제조예 17의 생성물 (2.0 g, 2.5 mmol)과 디클로로메탄 (10 mL)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 상온에서 교반하여 구성 성분들을 용해시켰고, 그런 다음 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드 (1.2 mL, 7.5 mmol)를 첨가하였고, 그 결과 생성된 혼합물을 25℃에서 20 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 메탄올 (10 mL)에 넣은 1,2-에탄디술폰산 이수화물(0.56 g, 2.5 mmol) 용액을 첨가하였고, 이 혼합물을 30℃에서 2 시간 동안 교반하였고, 이때 흰색의 진한 슬러리가 형성되었다. 상기 슬러리를 천천히 여과하였고, 여과하여 얻은 고체를 메탄올 (10 mL)로 세척하였고, 공기 중에서 2 시간 동안 건조시켰고, 진공 하에서 밤새 건조시켜 표제 화합물 (1.5 g, HPLC 순도 >98%)을 흰색의 미세한 분말로 얻었다.

[0275] 실시예 5

[0276] 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-[(*(R)*-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염의 정제

[0277] 실시예 4에서 제조한, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*(R)*-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염 (80 g)에, 이소프로판올에 넣은 20% 수용액을 부피 (800 mL)까지 첨가하였다. 그 결과 생성된 슬러리를 상온에서 밤새 유지시켰고, 그런 다음 여과하여 개선된 결정성과 순도를 갖는 표제 화합물 (74 g)을 얻었다.

[0278] 제조예 18

[0279] 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-[(*(R)*-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염의 시드 결정(seed crystal)

[0280] 단계 (a)

[0281] 실시예 4에서 제조한, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*(R)*-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염 (100 mg)을 메탄올 (20 mL)에 넣은 13% 물에서 ~60℃에서 용해시켰다. 그 결과 생성된 투명한 용액을 밀폐된 용기 내에서 상온까지 냉각시켰다. 48 시간 후에, 그 결과 생성된 플레이트 형태의 결정을 여과에 의해 분리하였다.

[0282] 단계 (b)

[0283] 실시예 4에서 제조한, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*(R)*-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸]-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염 (1.0 g)을 메탄올 (100 mL)에 넣은 15% 수용액에서 60-65℃에서 용해시켰다. 투명한 상태로 교반 중인 용액을 30℃까지 냉각시켰고, 그런 다음 단계 (a)의 결정형 생성물 (4.2 mg)을 첨가하였다. 용액을 20℃까지 냉각시켰고, 2 시간 동안 교반하였다. 그 결과 생성된 침전물을 여과에 의해 분리하였고, 공기 중에서 1 시간

동안 건조시켜 표제 화합물 (680 mg)을 얻었다.

[0284] 단계 (c)

[0285] 단계 (a)의 생성물을 단계 (b)의 생성물 (20 mg)로 바꾸고, 단계 (b)의 실험 방법을 반복하여, 표제 화합물 (690 mg)을 얻었다.

[0286] 단계 (d)

[0287] 실시예 4에서 제조한, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염 (10 g)을 메탄올 (1 L)에 넣은 15% 수용액에서 60-65℃에서 용해시켰다. 투명한 상태로, 교반 중인 용액을 30℃까지 냉각시켰고, 그런 다음 단계 (c)의 결정질 생성물 (4.2 mg)을 첨가하였다. 용액을 20℃까지 냉각시키고, 18 시간 동안 교반하였다. 그 결과 생성된 침전물을 여과에 의해 분리하였고, 공기 중에서 2 시간 동안 건조시켜 표제 화합물 (5.5 g)을 얻었다.

[0288] 실시예 6

[0289] 시드 결정을 사용하는, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르 1,2-에탄디술폰산 염의 재결정화

[0290] 12 L 둥근-바닥 플라스크에, 실시예 5의 생성물 (60 g, 64.5 mmol), 물 (0.9 L) 및 메탄올 (5.1 L)을 첨가하였다. 그 결과 생성된 혼합물을 25℃부터 61-65℃까지 교반하면서 가열하여 구성 성분들을 용해시켰고, 60-65℃에서 추가로 20 분 동안 교반하였다. 혼합물을 30℃까지 냉각시켰고, 그런 다음 제조예 18의 생성물 (2 g, 2.15 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20℃까지 천천히 냉각시켰고, 그 결과 생성된 슬러리를 30℃에서 추가로 2 시간 동안 교반하였다. 생성물을 메탄올 (500 mL)로 여과하였고, 공기 중에서 2 시간 동안 건조시켰고, 그런 다음 25-30℃에서 진공 하에 18 시간 동안 건조시켜 표제 화합물 (43 g, 수득율 72 %, 순도 99.2 %)을 얻었다.

[0291] 실시예 7

[0292] 열 분석

[0293] 열분석 조절기를 갖는 TA 장치 모델 Q-10 모듈을 사용하여 시차주사열량분석법(DSC)을 수행하였다. 데이터를 수집하였고, TA 장치 열 해석 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 뚜껑이 있는 알루미늄 팬에 약 1 mg의 시료를 정확하게 무게 측정하였다. 5℃/분의 선형 가열 램프를 사용하여 상온에서부터 약 300℃까지 상기 시료를 평가하였다. 사용하는 동안에는, DSC 셀에 수분을 제거한 질소를 주입하였다. 실시예 6의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형의 시료를 위한 대표적인 DSC 곡선을 도 1에서 도시하고 있고, 실시예 2의 시료를 위한 대표적인 DSC 곡선을 도 2에서 도시하고 있다.

[0294] 높은 해상력을 갖는 TA 장치 모델 Q-50 모듈을 사용하여 열중량분석 (TGA)을 수행하였다. 데이터를 수집하였고, TA 장치 열 해석 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 약 10 mg의 무게가 나가는 시료를 플래티넘 팬에 놓았고, 상온에서부터 300℃까지 고 해상-발열율로 스캐닝하였다. 사용하는 동안에, 저울과 가열로 챔버에 질소를 주입하였다. 실시예 6의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(*R*)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형의 시료를 위한 대표적인 TGA 곡선을 도 1에서 도시하고 있다.

[0295] 상기 DSC 곡선은 본원 발명의 1,2-에탄디술폰산 염이 각각 약 239℃와 약 219℃에서 용점을 가져 탁월한 열적 안정성을 가지고 있으며, 약 200℃ 미만에서 어떤 열적 분해도 없음을 입증해준다.

[0296] 실시예 8

[0297] 분말 X-선 회절

[0298] 1.542 Å (45 kV, 40 mA)에서 Cu K 알파 광원을 사용하고, Si(Li) 고체-상 검출기를 갖는 Thermo ARL X-선 회절계 모델 X'TRA (Thermo ARL SA, 스위스)로 분말 X-선 회절 패턴을 얻었다. 통상적으로 분석은 2 내지 30°의 2-세타(theta) 각도의 범위에서 포인트 당 0.03°의 스텝 크기로 2°/분의 스캔 속도에서 수행되었다. 받은 상

태로 또는 미세 분말로 마멸시킨 상태로 시료들을 분석을 위해 기구의 상부에 로딩시키는 시료 컵에 적합하도록 설계된 맞춤형 작은-용적의 삽입구에 채웠다. 기구를  $\pm 0.02^\circ$  2-세타 각도의 범위 내에서 실리콘 금속 기준으로 매주 조정하였다. 실시예 6의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형 시료의 대표적인 PXRD 패턴이 도 3에서 도시되고 있고, 실시예 2의 시료의 패턴이 도 4에서 도시되고 있다.

#### [0299] 실시예 9

#### [0300] 적외선 분석

[0301] 니코레트 (Nicolet) 감쇠 전반사 (attenuated total reflection, ATR) 시료 고정기를 구비한 아바타 (Avatar) 360 FT-IR 스펙트로미터를 사용하여 4000 내지  $675\text{ cm}^{-1}$  주파수 범위에서 적외선 (IR) 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 실시예 6의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형의 시료를 위한 대표적인 IR 흡수 스펙트럼은 도 5에서 도시되는 바와 같이,  $704\pm 1$ ,  $748\pm 1$ ,  $768\pm 1$ ,  $841\pm 1$ ,  $900\pm 1$ ,  $1055\pm 1$ ,  $1104\pm 1$ ,  $1166\pm 1$ ,  $1218\pm 1$ ,  $1294\pm 1$ ,  $1408\pm 1$ ,  $1522\pm 1$ ,  $1609\pm 1$ ,  $1655\pm 1$ , 및  $1701\pm 1$ 에서 유의성 있는 흡수 밴드들을 가지고 있다.

#### [0302] 실시예 10

#### [0303] 동적 흡습 평가 (Dynamic Moisture Sorption Assessment)

[0304] 브리티아이 (VTI) 대기상 미량천칭 (atmospheric microbalance), SGA-100 시스템 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016)을 사용하여, 제조예 18의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형의 한 줌의 시료를 위한 동적 흡습(dynamic moisture sorption, DMS) 평가 (또한 흡습-탈습 프로파일로 알려져 있음)를 수행하였다. 약 10 mg의 시료 크기를 사용하였고, 분석을 시작할 때에는 습도를 주변 값으로 세팅하였다. 일반적인 DMS 분석은 세 번의 스캔으로 구성되어 있다: 5 % RH/단계의 스캔 속도에서 주변 값 내지 2% 상대 습도 (relative humidity, RH), 2% RH 내지 90% RH, 90% RH 내지 5% RH. 중량은 2분 마다 측정하였고, 상기 RH는 시료의 중량이 5 개의 연속된 점을 위해 0.01 % 내에서 안정하게 되었을 때 다음 값 (+/- 5 %RH)으로 변경되었다. 대표적인 DMS 곡선이 도 6에서 도시되고 있다.

[0305] 상기 DMS 곡선은 본원 발명의 1,2-에탄디술포산 염이 알맞은 흡습성 (< 9%)으로 가역적 흡습/탈습 프로파일을 가지고 있음을 입증해준다. 상기 염은 40 % RH 내지 75 % RH의 습도 범위에서 2.5 % 미만의 중량 증가를 가지고 있다. 상기 가역적 흡습/탈습 프로파일은 본원 발명의 염의 결정형이 허용가능한 흡습성을 소유하고 있으며, 조해성이 없음을 입증해준다.

#### [0306] 실시예 11

#### [0307] 원소 분석과 반대 이온 (Counterion) 비율

[0308] 플래쉬 (flash) EA 1112 원소 분석기 (CE Elantech, Lakewood, NJ)를 사용하는 연소 분석에 의해서 실시예 6의 비페닐-2-일카르바산

1-[2-(2-클로로-4-((R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노)메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술포산 염의 결정형 시료의 탄소, 수소, 질소, 및 황에 대한 하기의 원소 백분율을 측정하였다.: 탄소 52.95 %, 수소 5.43 %, 질소 6.83 %, 및 황 6.87 %. 황의 측정된 질량 백분율로부터 계산한, 결정질 시료에서 1,2-에탄디술포산의 질량 백분율은 20.4 %이고, 이것은 이론적인 질량 백분율인 20.4%와 같고, 이것은 반대 이온과의 비율이 1:1임을 나타낸다.

#### [0309] 제조예 A

#### [0310] 세포 배양 및 인간 $\beta_1$ , $\beta_2$ 또는 $\beta_3$ 아드레날린성 수용체를 발현하는 세포로부터 막 제조

[0311] 각각 클로닝된 인간  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  또는  $\beta_3$  아드레날린성 수용체를 안정하게 발현하는 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovarian, CHO) 세포주를 500  $\mu\text{g/mL}$  제네티신(Geneticin)이 있는 상태에서 10% FBS를 갖는 햄스 (Hams) F-12 배지에서 거의 집합 상태가 될 때까지 길렀다. 세포 단일층을 PBS에 넣은 2mM EDTA로 들어올렸다. 세포



들을 1,000 rpm에서 원심분리하여 펠렛으로 만들었고, 세포 펠렛을 -80℃에서 동결시켜 보관하거나, 또는 사용하기 위해 막을 즉시 제조하였다. 막을 발현하는  $\beta_1$  및  $\beta_2$  수용체 제조를 위해서, 세포 펠렛을 용해용 완충용액(lysis buffer)(10 mM HEPES/HCl, 10mM EDTA, 4℃에서 pH 7.4)에서 다시 현탁시켰고, 짙게 끼는 다운스 글래스 호모지나이저(Dounce glass homogenizer)(30 스트로크)를 사용하여 얼음 속에서 균질화시켰다. 막을 발현하는 프로테아제에 더 민감성인  $\beta_3$  수용체를 위해서는, 세포 펠렛을 50 ml 완충용액 당 "2mM EDTA를 갖는 완전한 프로테아제 저해제 (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets with 2 mM EDTA)" (Roche Catalog No. 1697498, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 정제 한 알이 보충된 용해용 완충용액(10mM Tris/HCl, pH 7.4)에서 균질화시켰다. 균질 현탁액을 20,000 x g에서 원심분리하였고, 그 결과 생성된 펠렛을 상기와 같이 재-현탁과 원심분리할 때까지 용해용 완충용액으로 한번 세척하였다. 그런 다음 최종 펠렛을 얼음으로 냉각시킨 결합 어레이 완충용액(binding assay buffer) (75 mM Tris/HCl pH 7.4, 12.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA)에서 재-현탁시켰다. 막 현탁액의 단백질 농도를 Lowry et al., 1951, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265; 및 Bradford, *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248-54에서 기재된 방법으로 측정하였다. 모든 막을 -80℃에서 일정량으로 동결하여 보관하거나, 또는 즉시 사용하였다.

[0312] **제조예 B**

[0313] **세포 배양 및 인간  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  및  $M_4$  무스카린 수용체를 발현하는 세포로부터 막 제조**

[0314] 클로닝된 인간 hM<sub>1</sub>, hM<sub>2</sub>, hM<sub>3</sub> 및 hM<sub>4</sub> 무스카린 수용체 서브타입을 안정하게 발현하는 CHO 세포주를 10% FBS와 250  $\mu$ g/mL 제네티신을 보충한 햄스 (HAM's) F-12 배지에서 거의 집합 상태가 될 때까지 길렀다. 세포들을 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 배양기에서 길렀고, dPBS에서의 2 mM EDTA로 들어올렸다. 세포들을 650 x g에서 5분 원심분리에 의해 수거하였고, 세포 펠렛을 -80℃에서 동결시켜 보관하거나 또는 사용을 위해 막을 즉시 제조하였다. 막 제조를 위해서는, 세포 펠렛을 용해용 완충용액에서 재현탁시켰고, 폴리트론 (Polytron) PT-2100 조직 파쇄기 (Kinematica AG; 20 초 x 2회 작동 (burst))로 균질화시켰다. 정제되지 않은 막을 4℃에서 40,000 x g로 15분 동안 원심분리하였다. 그런 다음, 막 펠렛을 재현탁용 완충용액으로 재현탁시켰고, 폴리트론 조직 파쇄기로 다시 균질화시켰다. 막 현탁액의 단백질 농도는 Lowry et al., 1951, *Journal of Biochemistry*, 193, 265에서 개시된 방법으로 측정하였다. 모든 막을 -80℃에서 일정량으로 동결시켜 보관하거나 또는 즉시 사용하였다. 제조된 hM<sub>5</sub> 수용체 막의 일정량을 페르킨 엘머 (Perkin Elmer)로부터 바로 구입하여 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다.

[0315] **분석 실험 절차 A**

[0316] **인간  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  및  $\beta_3$  아드레날린성 수용체에 대한 방사성리간드 결합 분석**

[0317] 분석용 완충용액 (75 mM Tris/HCl 25℃에서 pH 7.4, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.2% BSA)에서 인간  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  또는  $\beta_3$  아드레날린성 수용체를 포함하는 막 단백질 10-15  $\mu$ g를 갖는 100  $\mu$ l의 총 분석 용량으로 96-웰 마이크로티터 플레이트에서 결합 분석을 실시하였다. 방사성리간드의 K<sub>d</sub> 값을 측정하기 위한 포화 결합 (Saturation binding) 연구는 0.01 nM 내지 20 nM 범위에 속하는 10개 또는 11개의 다른 농도에서  $\beta_1$  수용체와  $\beta_2$  수용체를 위해서 [<sup>3</sup>H]-디하이드로알프레놀올 (NET-720, 100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) 과 [<sup>125</sup>I]-(-)-아이오도시아노핀돌올 (NEX-189, 220 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA)을 사용하여 수행하였다. 시료 화합물의 K<sub>i</sub> 값의 측정을 위한 치환 (displacement) 분석은 10 pM 내지 10  $\mu$ M 범위 내에 속하는 시료 화합물의 10개 또는 11개의 서로 다른 농도를 위해 1 nM의 [<sup>3</sup>H]-디하이드로알프레놀올과 0.5 nM의 [<sup>125</sup>I]-(-)-아이오도시아노핀돌올을 가지고 수행하였다. 비-특이적 결합은 10  $\mu$ M 프로프라놀올이 있는 상태에서 측정하였다. 분석물들을 37℃에서 1 시간 동안 배양하였고, 그런 다음 결합 반응은 0.3% 폴리에틸렌이민에서 미리 침지시켜 놓은,  $\beta_1$  수용체와  $\beta_2$  수용체를 위한 GF/B 상에서 또는  $\beta_3$  수용체를 위한 GF/C 유리 섬유 필터 플레이트 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 상에서 계속 여과시켜 종결하였다. 필터 플레이트를 필터용 완충용액 (75 mM Tris/HCl 4℃에서 pH 7.4, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA)으로 3회 세척하여 결합하지 않은 방사성 활성을 제거하였다. 그런 다음 플레이트를 건조시켰고, 마이크로싯트 (Microscint)-20 액성 형광액 (scintillation fluid) (Packard BioScience Co., Meriden, CT) 50 $\mu$ l를 첨가하였고, 팩커드 톱카운트

(Packard Topcount) 액성 신틸레이션 계수관 (scintillation counter) (Packard BioScience Co., Meriden, CT)에서 플레이트를 카운트하였다. 일-부위 경쟁 (one-site competition)에 대해 3-매개변수 모델을 사용하는 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 갖는 비선형 회귀 분석에 의해 결합 데이터를 분석하였다. 10  $\mu$ M 프로프라놀롤이 있는 상태에서 측정된 바와 같이, 곡선의 최소값을 비특이적인 결합을 위한 값까지 고정시켰다. 실험 화합물의  $K_i$  값은 Cheng-Prusoff 식 (Cheng Y, and Prusoff WH., Biochemical Pharmacology, 1973, 22, 23, 3099-108)을 사용하여 관찰된  $IC_{50}$  값과 방사성리간드의  $K_d$  값으로부터 계산하였다.

[0318] 이 분석에서, 더 낮은  $K_i$  값은 실험 화합물이 실험된 수용체에 대해 보다 높은 결합 친화도를 가지고 있음을 나타낸다. 이 분석으로 식 I의 화합물을 실험하였을 때, 식 I의 화합물은 인간  $\beta_2$  아드레날린성 수용체에 대해 10 nM 미만의  $K_i$  값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

#### [0319] 분석 실험 절차 B

##### [0320] 무스카린 수용체에 대한 방사성리간드 결합 분석

[0321] 클로닝된 인간 무스카린 수용체를 위한 방사성리간드 결합 분석을 100  $\mu$ l의 총 분석 용량으로 96-웰 마이크로티터 플레이트에서 수행하였다. hM<sub>1</sub>, hM<sub>2</sub>, hM<sub>3</sub>, hM<sub>4</sub> 또는 hM<sub>5</sub> 무스카린 서브타입 중 어느 하나를 안정하게 발현하는 CHO 세포막을 유사한 시그널 (cpm)을 얻기 위해서 하기의 특정 표적 단백질 농도 ( $\mu$ g/웰)까지 분석용 완충용액에서 희석하였다: hM<sub>1</sub>을 위해서는 10  $\mu$ g, hM<sub>2</sub>을 위해서는 10-15  $\mu$ g, hM<sub>3</sub>을 위해서는 10-20  $\mu$ g, hM<sub>4</sub>를 위해서는 10-20  $\mu$ g, 및 hM<sub>5</sub>를 위해서는 10-12  $\mu$ g. 분석 플레이트에 첨가하기 전에 막을 폴리트론 조직 파쇄기를 사용하여 짧게 균질화시켰다(10초). 방사성리간드의  $K_D$  값을 측정하기 위한 포화 결합 연구는 0.001 nM 내지 20 nM의 범위에 속하는 농도에서 L-[N-메틸-<sup>3</sup>H]스코폴아민 메틸 클로라이드 ([<sup>3</sup>H]-NMS) (TRK666, 84.0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)를 사용하여 수행하였다. 실험 화합물의  $K_i$  값을 측정하기 위한 치환 분석은 1 nM의 [<sup>3</sup>H]-NMS와 11개의 다른 실험 화합물의 농도에서 수행하였다. 실험 화합물을 처음에는 희석용 완충용액에서 400  $\mu$ M 농도까지 용해시켰고, 그런 다음 10 pM 내지 100  $\mu$ M 범위에 속하는 최종 농도까지 희석용 완충용액으로 5회 계대 희석하였다. 분석 플레이트로 첨가하는 순서와 용량은 하기와 같다: 방사성리간드 25  $\mu$ l, 희석된 실험 화합물 25  $\mu$ l, 및 막 50  $\mu$ l. 분석 플레이트를 37°C에서 60분 동안 배양하였다. 1% BSA에서 미리-처리된 GF/B 유리 섬유 필터 플레이트 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) 상에서 계속 여과에 의해 결합 반응을 종결하였다. 필터 플레이트를 세척용 완충용액 (10 mM HEPES)으로 3회 세척하여 결합하지 않은 방사성활성을 제거하였다. 그런 다음, 플레이트를 공기 중에서 건조시켰고, 마이크로신틸-20 액성 형광액 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) 50 $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하였다. 그런 다음 플레이트를 팩커드 톱카운트 액성 신틸레이션 계수관 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA)에서 카운트하였다. 일-부위 경쟁 모델을 사용하는 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 갖는 비선형 회귀 분석에 의해 결합 데이터를 분석하였다. 실험 화합물의  $K_i$  값은 관찰된  $IC_{50}$  값과 방사성리간드의  $K_d$  값으로부터 Cheng-Prusoff 식 (Cheng Y; Prusoff WH. (1973) *Biochemical Pharmacology*, 22(23):3099-108)을 사용하여 계산하였다.  $K_i$  값을  $pK_i$  값으로 변환시켜 기하 평균과 95% 신뢰 구간을 결정하였다. 그런 다음, 데이터 보고를 위해 이와 같은 요약 통계값 (summary statistics)을 다시  $K_i$  값으로 변환시켰다.

[0322] 이 분석에서, 더 낮은  $K_i$  값은 실험 화합물이 실험된 수용체에 대해 보다 높은 결합 친화도를 갖는다는 것을 나타낸다. 식 I의 화합물을 이 분석에서 실험하였을 때, 식 I의 화합물은 인간 M<sub>2</sub> 및 M<sub>3</sub> 무스카린 수용체에 대해 10 nM 미만의  $K_i$  값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

#### [0323] 분석 실험 절차 C

##### [0324] 인간 $\beta_1$ , $\beta_2$ 또는 $\beta_3$ 아드레날린성 수용체를 이중 조직으로 발현하는 CHO 세포주에서 전체-세포(whole-cell) cAMP 플래쉬플레이트 분석

[0325] [<sup>125</sup>I]-cAMP에 의한 Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA)을 사용하여 제조자의 지시사항에 따라 방사성면역분석법 포맷으로 cAMP 분석을 수

행하였다.  $\beta$  수용체 아고니스트 효능 ( $EC_{50}$ )의 측정을 위해서, 클로닝된 인간  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  또는  $\beta_3$  아드레날린성 수용체를 안정하게 발현하는 CHO-K1 세포주를 10% FBS와 제네티신 ( $250 \mu\text{g/mL}$ )을 보충한 햄스 F-12 배지에서 거의 집합 상태가 될 때까지 길렀다. 세포들을 PBSFH 세정하였고, 2 mM EDTA 또는 트립신-EDTA 용액 (0.05% 트립신/0.53 mM EDTA)을 포함하는 dPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline,  $\text{CaCl}_2$ 와  $\text{MgCl}_2$ 가 없음)에서 탈착시켰다. 쿨터 (Coulter) 세포 카운터에서 세포들을 카운트한 후에, 세포들을 1,000 rpm에서 원심분리에 의해 펠렛으로 만들고, 상온까지 미리-예열시킨 IBMX (PerkinElmer 키트)를 포함하는 자극용 완충용액(stimulation buffer)에서  $1.6 \times 10^6$  내지  $2.8 \times 10^6$  세포/mL 농도까지 재-현탁시켰다. 웰 당 약 60,000 내지 80,000 세포들을 이 분석에서 사용하였다. 테스트 화합물 (DMSO에서 10 nM)을 Beckman Biomek-2000에서 0.1% BSA를 포함하는 PBS로 희석하였고, 100  $\mu\text{M}$  내지 1 pM의 범위에 속하는 11개의 서로 다른 농도에서 테스트하였다. 반응을 37°C에서 10분 동안 배양시켰고, [ $^{125}\text{I}$ ]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA)를 포함하는 냉각시킨 검출용 완충용액(detection buffer) 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 중지시켰다. 생성된 cAMP의 양 (pmol/웰)은 시료에 대해 관찰된 카운트와 제조자의 사용자 매뉴얼에서 개시된 cAMP 기준에 기초하여 계산하였다. S 자형의 평형상태를 갖는 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)로 비선형 회귀분석에 의해 데이터를 분석하였다.  $EC_{50}$  값을 계산하기 위해 Cheng-Prusoff 방정식 (Cheng Y, and Prusoff WH., Biochemical Pharmacology, 1973, 22, 23, 3099-108)을 사용하였다.

[0326] 이 분석에서는, 보다 낮은  $EC_{50}$  값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에서 보다 높은 기능적 활성을 가지고 있음을 나타낸다. 이 분석에서 식 I의 화합물을 테스트하였을 때, 식 I의 화합물은 인간  $\beta_2$  아드레날린성 수용체에 대해 10 nM 미만의  $EC_{50}$  값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

#### [0327] 분석 실험 절차 D

#### [0328] 무스카린 수용체 서브타입에 대한 길항 작용의 기능적 분석

#### [0329] A. 아고니스트-매개 [ $^{35}\text{S}$ ] GTP $\gamma$ S 결합의 차단

[0330] 테스트 화합물의 기능적 효능은  $\text{hM}_2$  수용체를 발현하는 CHO-K1 세포에서 상기 화합물이 옥소트레모린-촉진되는 [ $^{35}\text{S}$ ]GTP  $\gamma$  S 결합을 차단하는 능력을 측정함으로써 결정하였다.

[0331] 사용할 때에는, 동결시킨 막을 녹이고, 그런 다음 최종 표적 조직의 농도가 웰당 5-10  $\mu\text{g}$  단백질을 갖는 분석용 완충용액에서 희석시켰다. 막을 폴리트론 PT-2100 조직 파쇄기를 사용하여 단시간에 균질화시켰고, 그런 다음 분석 플레이트에 첨가하였다.

[0332] 아고니스트 옥소트레모린에 의한 [ $^{35}\text{S}$ ]GTP  $\gamma$  S 결합의 촉진을 위한  $EC_{90}$  값 (90% 최대 반응을 위한 유효 농도)은 각각의 실험에서 측정하였다.

[0333] 테스트 화합물이 옥소트레모린-촉진되는 [ $^{35}\text{S}$ ]GTP  $\gamma$  S 결합을 억제하는 능력을 측정하기 위하여, 하기의 것들이 96 웰 플레이트의 각각의 웰에 첨가되었다: [ $^{35}\text{S}$ ]GTP  $\gamma$  S (0.4nM)을 갖는 분석용 완충용액 25  $\mu\text{L}$ , 옥소트레모린 ( $EC_{90}$ )과 GDP (3 $\mu\text{M}$ ) 25  $\mu\text{L}$ , 희석된 테스트 화합물 25  $\mu\text{L}$  및  $\text{hM}_2$  수용체를 발현하는 CHO 세포막 25  $\mu\text{L}$ . 그런 다음, 분석 플레이트를 37°C에서 60분 동안 배양시켰다. 1% BSA-미리 처리된 GF/B 필터 상에서 PerkinElmer 96-웰 수확기(harvester)를 사용하여 분석 플레이트를 여과시켰다. 얼음-냉각시킨 세척용 완충용액으로 3초 동안 3회 플레이트를 세정하였고, 그런 다음 공기 또는 진공 하에서 건조시켰다. 마이크로신트-20 형광액 (50  $\mu\text{L}$ )을 각각의 웰에 첨가하였고, 각각의 플레이트를 밀봉하였고, 방사성 활성을 톱카운터 (PerkinElmer)에서 카운트하였다. 비-선형 회귀, 일-부위 경쟁 방정식을 사용하여 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 갖는 비선형 회귀 분석에 의해 데이터를 분석하였다. 테스트 화합물에 대한 농도-반응량 곡선의  $IC_{50}$  값, 분석에서의 옥소트레모린 농도를 각각  $K_0$  및 리간드 농도, [L]로 이용하여,  $K_i$ 를 계산하기 위해 Cheng-Prusoff 식을 사용하였다.

[0334] 이 분석에서, 보다 낮은  $K_i$  값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에 대해 보다 높은 기능적 활성을 갖는다는 것을 나타낸다. 이 분석에서 테스트된 식 I의 화합물들은  $\text{hM}_2$  수용체를 발현하는 CHO-K1 세포에서 옥소트레모린

-촉진된 [<sup>35</sup>S]GTP γ S 결합의 차단에 대해 약 10 nM 미만의 K<sub>i</sub> 값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0335] **B. FLIPR 분석을 통한 아고니스트-매개 칼슘 방출의 차단**

[0336] Gq 단백질에 결합하는 무스카린 수용체 서브타입 (M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> 및 M<sub>5</sub> 수용체)들은 수용체에 아고니스트가 결합되면 포스포리파제 C (PLC) 경로를 활성화시킨다. 그 결과, 활성화된 PLC는 포스파티딜 이노시톨 디포스페이트 (PIP<sub>2</sub>)를 디아실글리세롤 (DAG)과 포스파티딜-1,4,5-트리포스페이트 (IP<sub>3</sub>)로 가수분해하고, 이것은 세포내 저장고, 즉 소포체 및 근소포체로부터 칼슘 방출을 일으킨다. FLIPR (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 분석은 유리 칼슘이 결합되면 형광을 내는 칼슘 민감성 염료 (Fluo-4AM, Molecular Probes, Eugene, OR)를 사용함으로써 세포내 칼슘의 증가를 활용한다. 이 형광 발생 (fluorescence event)은 FLIPR에 의해 실시간으로 측정되는데, 이것은 인간 M<sub>1</sub> 및 M<sub>3</sub>, 및 침팬지 M<sub>5</sub> 수용체들로 클로닝된 세포들의 단일층으로부터의 형광의 변화를 검출한다. 안타고니스트 효능은 안타고니스트가 아고니스트-매개되는 세포내 칼슘의 증가를 억제하는 능력에 의해 측정될 수 있다.

[0337] FLIPR 칼슘 자극 분석에서, hM<sub>1</sub>, hM<sub>3</sub> 및 cM<sub>5</sub> 수용체들을 안정하게 발현하는 CHO 세포들을 분석 수행 전날 밤에 96-웰 FLIPR 플레이트로 접종하였다. 접종된 세포들을 FLIPR 완충용액 (10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM 칼슘 클로라이드, 칼슘과 마그네슘이 없는 Hank's 완충시킨 염 용액 (HBSS)에 넣은 2.5 mM 프로베네시드)을 갖는 Cellwash (MTX LabSystems, Inc.)에 의해 2회 세척하여 배양용 배지를 제거하고, FLIPR 완충용액 50 μl/웰을 남겼다. 그런 다음, 세포들을 0분 동안 37℃, 5% 이산화탄소에서 4 μM FLUO-4AM (2X 용액으로 제조됨)의 50 μl/웰과 배양시켰다. 다음에 염료 배양 기간을 거치고, 세포들을 FLIPR 완충용액으로 2회 세척하였고, 최종 부피를 50 μl/웰로 남겨두었다.

[0338] 안타고니스트 효능을 측정하기 위해, 옥소트레모린에 대한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 방출의 용량-의존적인 자극을 먼저 측정하여 EC<sub>90</sub> 농도에서 옥소트레모린 자극에 대한 안타고니스트 효능이 나중에 측정될 수 있도록 하였다. 먼저, 세포들을 화합물 희석용 완충용액과 함께 20분 동안 배양하였고, 아고니스트를 첨가하였으며, 이것은 FLIPR에 의해 수행하였다. 식  $EC_F = ((F/100-F)^{1/H}) * EC_{50}$ 과 함께 FLIPR 측정 및 하기의 데이터 해석 (data reduction) 섹션에서 상술된 방법에 따라, 옥소트레모린을 위한 EC<sub>90</sub> 값을 산출하였다. 3 x EC<sub>F</sub>의 옥소트레모린 농도를 자극 플레이트에서 제조하여, 옥소트레모린의 EC<sub>90</sub> 농도가 안타고니스트 억제 플레이트의 각각의 웰에 첨가되게 하였다.

[0339] FLIPR을 위해 사용된 파라미터들은: 0.4초의 노출 시간, 0.5와트의 레이저 강도, 488 nm의 여기 파장, 및 550 nm의 방출 파장이었다. 기본값 (Baseline)은 아고니스트를 첨가하기 전에 10초 동안 형광 변화를 측정함으로써 결정하였다. 아고니스트 자극 후에, FLIPR은 최대 형광 변화를 포착하기 위해서 1.5분 동안 0.5 내지 1초 간격으로 형광 변화를 연속적으로 측정하였다.

[0340] 형광 변화량은 최대 형광에서 기본 형광을 뺀 값으로 표현된다. 보정되지 않은 데이터를 S자형 투여량-반응량에 대한 내장형 (built-in) 모델을 이용하여 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)에 의한 비선형 회귀로 약물 농도의 로그값에 대해 분석하였다. 안타고니스트 K<sub>i</sub> 값들은 옥소트레모린 EC<sub>50</sub> 값을 K<sub>D</sub>로서, 및 옥소트레모린 EC<sub>90</sub>을 리간드 농도를 사용하여 Cheng-Prusoff 식 (Cheng & Prusoff, 1973)에 따라 Prism에 의해 측정하였다.

[0341] 이 분석에서, 보다 낮은 K<sub>i</sub> 값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에 대해 더 높은 기능적 활성을 가지고 있음을 나타낸다. 이 분석에서 테스트하였을 때, 식 I의 화합물은 hM<sub>1</sub>, hM<sub>3</sub> 및 cM<sub>5</sub> 수용체를 안정하게 발현하는 CHO 세포에서 아고니스트-매개되는 칼슘 방출의 차단에 대해 약 10 nM 미만의 K<sub>i</sub> 값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0342] **분석 테스트 절차 E**

[0343] **인간 β<sub>2</sub> 아드레날린성 수용체를 내생적으로 발현하는 폐 상피 세포주로 전체-세포 cAMP 플래쉬플레이트 분석**

[0344] β<sub>2</sub> 아드레날린성 수용체의 내생적 정도를 발현하는 세포주에서 아고니스트 효능과 효율 (내재 활성)의 측정을 위해, 인간 폐 상피 세포주 (BEAS-2B)를 사용하였다 (ATCC CRL-9609, American Type Culture Collection, Manassas, VA) (January B, et al., *British Journal of Pharmacology*, 1998, 123, 4, 701-11). 세포들을 완



전환, 혈청이 없는 배지 (LHC-9 MEDIUM containing Epinephrine and Retinoic Acid, cat # 181-500, Biosource International, Camarillo, CA)에서 75-90% 집합 상태까지 길렀다. 분석 전날에, 배지를 LHC-8 (에피네프린 또는 레티노산이 없음, cat # 141-500, Biosource International, Camarillo, CA)로 교체하였다.

[0345] 제조자의 지시사항에 따라, cAMP 분석을 [ $^{125}$ I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences hie, Boston, MA)을 갖는 플래쉬플레이트 Adenylyl Cyclase Activation Assay System을 사용하여, 방사성면역분석법 포맷에서 수행하였다.

[0346] 분석하는 날에, 세포들을 PBS로 세정하였고, PBS에 넣은 5mM EDTA로 문질러서 들어올렸고, 카운트하였다. 세포들을 1,000 rpm에서 원심분리하여 펠렛으로 만들었고, 37°C까지 미리-가열시킨 자극용 완충용액에서 최종 농도가 600,000 세포/mL이 되도록 재-현탁시켰다. 이 분석에서는 100,000 내지 120,000 세포/웰의 최종 농도에서 세포들을 사용하였다. 테스트 화합물을 Beckman Biomek-2000에서 분석용 완충용액 (75 mM Tris/HCl 25°C에서 pH 7.4, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.2% BSA)으로 계대 희석하였다. 분석에서는, 테스트 화합물을 10  $\mu$ M 내지 10 pM 범위에 있는 11개의 다른 농도에서 테스트하였다. 반응을 37°C에서 10분 동안 배양하였고, 얼음-냉각된 검출용 완충용액 100  $\mu$ L의 첨가에 의해 중지시켰다. 플레이트를 밀봉하였고, 4°C에서 밤새 배양하였고, 다음 날 아침 톱카운트 신틸레이션 카운터 (Packard BioScience Co., Meriden, CT)에서 카운트하였다. 반응 mL 당 산출된 cAMP의 양은 제조자의 사용자 매뉴얼에서 설명된 바와 같이, 시료에 대해 관찰된 카운트와 cAMP 기준에 기초하여 계산하였다. S자형 투여량-반응량을 위한 4-파라미터 모델을 사용하여 GraphPad Prism 소프트웨어 패키지 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)을 갖는 비선형 회귀 분석으로 데이터를 분석하였다.

[0347] 이 분석에서, 보다 낮은 EC<sub>50</sub> 값은 테스트된 수용체에서 보다 높은 기능적 활성을 가지고 있음을 나타낸다. 이 분석에서 테스트하였을 때, 식 1의 화합물은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체에 대해 약 10 nM 미만의 EC<sub>50</sub> 값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0348] **분석 테스트 절차 F**

[0349] **아세틸콜린-유도 또는 히스타민-유도 기관지수축의 기니아 피그 모델에서 기관지보호의 지속기간**

[0350] 이 생체내 분석은 무스카린 수용체 안타고니스트 활성과  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성 모두를 나타내는 테스트 화합물의 기관지보호 효과를 평가하기 위해 사용하였다. 아세틸콜린-유도 기관지수축 모델에서 무스카린 안타고니스트 활성을 분리하기 위해, 아세틸콜린의 투여 전에, 동물들에게  $\beta$  수용체 활성을 차단하는 화합물인 프로파놀올을 투여하였다. 히스타민-유도 기관지수축 모델에서 기관지보호의 지속기간은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성을 반영한다.

[0351] 250 g 내지 350 g의 체중이 나가는 6 마리의 수컷 기니아 피그 (Duncan-Hartley (HsdPoc:DH) Harlan, Madison, WI)으로 이루어진 그룹들을 개별적으로 케이지 카드 (cage card)로 식별시켰다. 연구 내내, 동물들은 음식과 물에 임의로(*ad libitum*) 접근할 수 있게 하였다.

[0352] 테스트 화합물을 전신-노출 투여 챔버(R&S Molds, San Carlos, CA)에서 10분에 걸쳐 흡입에 의해 투여하였다. 투여 챔버들은 에어로졸이 중앙의 다기관 (manifold)으로부터 6개의 개별적인 챔버에 동시에 전달될 수 있도록 배열하였다. 기니아 피그를 테스트 화합물 또는 비이클 (WFI)의 에어로졸에 노출시켰다. 이 에어로졸은 22 psi의 압력에서 기체들(CO<sub>2</sub> = 5%, O<sub>2</sub> = 21% 및 N<sub>2</sub> = 74%)의 혼합물에 의해 추진되는 LC Star 네블라이저 세트 (Model 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA)를 사용하여 수성 용액으로부터 생성하였다. 이 작동 압력에서 네블라이저를 통한 기체 유속은 거의 3 L/분이었다. 생성된 에어로졸은 양의 압력 (positive pressure)에 의해 챔버로 이동된다. 에어로졸 용액의 전달 동안에는 희석 공기를 사용하지 않았다. 10분의 분무화 (nebulization) 동안에, 약 1.8 mL의 용액이 분무화되었다. 충전된 네블라이저의 분무화-전 중량과 분무화-후 중량을 비교함으로써, 이 값을 중량으로 측정하였다. 흡입을 통해 투여된 테스트 화합물의 기관지 보호 효과는 투여-후 1.5, 24, 48 및 72 시간에 전신 체적 변동 기록계 (whole body plethysmography)를 사용하여 평가하였다.

[0353] 폐 검사 (pulmonary evaluation)의 개시 45분 전에, 각각의 기니아 피그를 케타민 (43.75 mg/kg), 자이알리진 (3.50 mg/kg) 및 아세프로마진 (1.05 mg/kg)의 근육내 주사로 마취시켰다. 수술 부위를 면도하고 70% 알코올로 세정한 후에, 목의 복면 (ventral aspect)에 2-3 cm 중앙선 절개를 만들었다. 그런 다음, 경정맥을 분리하였고, 식염수에 담긴 아세틸콜린 (Ach) 또는 히스타민의 정맥내 주입을 위해 식염수가 충전된 폴리에틸렌

카테터 (PE-50, Becton Dickinson, Sparks, MD)로 도관 삽입하였다. 그 후, 기관을 절개하여 14G 테플론 튜브 (#NE- 014, Small Parts, Miami Lakes, FL)로 도관 삽입하였다. 필요한 경우, 전술된 마취 각테일의 추가적인 근육내 주사들에 의해 마취상태를 유지시켰다. 마취의 깊이를 모니터링하고 동물이 발의 꼬집기에 반응하거나 호흡속도가 100회 호흡/분보다 크면 마취의 깊이를 조정하였다.

[0354] 일단 도관 삽입이 완료되면, 동물들을 체적변동 기록계 (#PLY3114, Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT)에 놓고, 폐압 (pulmonary driving pressure)(압력)을 측정하기 위해 식도압력 삽입관 (PE-160, Becton Dickinson, Sparks, MD)을 삽입하였다. 테플론 기관 튜브를 체적변동 기록계의 개구부 (opening)에 부착하여 기니아 피그가 챔버 외부의 실내 공기를 호흡할 수 있게 하였다. 그런 다음 챔버를 밀봉하였다. 가열 램프를 이용하여 체온을 유지시키고 하부 기도들이 붕괴되지 않고 동물이 호흡항진 (hyperventilation)을 겪지 않도록 하기 위하여 기니아 피그의 폐들을 10 mL 눈금 주사기 (#5520 Series, Hans Rudolph, Kansas City, MO)를 이용하여 4 mL의 공기로 3회 팽창시켰다.

[0355] 기본 값들이 순응도를 위해 0.3-0.9 mL/cm H<sub>2</sub>O 내에 있고, 저항도의 경우 초당 0.1-0.199 cm H<sub>2</sub>O/mL의 범위 내에 있는 것으로 결정되면, 폐 검사를 개시하였다. Buxco 폐 측정 컴퓨터 프로그램은 폐 측정값들의 수집 및 유도를 가능하게 하였다.

[0356] 이 프로그램의 구동으로 실험 프로토콜 및 데이터 수집을 시작하였다. 매 호흡에 따라 체적변동 기록계 내에서 일어난 경시적인 용적 변화들은 Buxco 압력 변환기를 통해 측정하였다. 시간의 경과에 대해 이 신호를 적분하여, 매 호흡당 유속을 측정하였다. Sensym 압력 변환기 (#TRD4100)를 이용하여 수집된, 폐구동압력의 변화들과 함께 이 신호는 Buxco (MAX 2270) 전치 증폭기를 통해 데이터 수집 인터페이스 (#'s SFT3400 및 SFT3813)에 연결되었다. 모든 다른 폐 파라미터들은 이 두 개의 인풋들로부터 유래하였다.

[0357] 기본 값들을 5분 동안 수집하였고, 그 후 기니아 피그를 Ach 또는 히스타민으로 공격하였다. 무스카린 안타고니스트 효과를 평가할 때에는, Ach로 공격하기 전에 프로프라놀올 (5 mg/Kg, iv) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO)을 15분 동안 투여하였다. Ach (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) (0.1 mg/mL)를 1분 동안 하기 투여량 및 실험 시작부터 책정된 시간에 따라 시린지 펌프 (sp210iw, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL)로 정맥 내에 주입하였다: 5분에 1.9 µg/분, 10분에 3.8 µg/분, 15분에 7.5 µg/분, 20분에 15.0 µg/분, 25분에 30 µg/분 및 30분에 60 µg/분. 다른 방법으로는, 테스트 화합물의 기관지 보호는 베타 차단 화합물로 전처리하지 않고 아세틸콜린 공격 모델에서 평가하였다.

[0358] 테스트 화합물의 β<sub>2</sub> 아드레날린성 수용체 아고니스트 효과를 평가할 때, 히스타민 (25 µg/mL) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO)을 1분 동안 하기의 투여량 및 실험 시작부터 책정된 시간에 따라 정맥 내에 주입하였다: 5분에 0.5 µg/분, 10분에 0.9 µg/분, 15분에 1.9 µg/분, 20분에 3.8 µg/분, 25분에 7.5 µg/분 및 30분에 15 µg/분. 각각 Ach 또는 히스타민 복용 후에 3분이 되는 때에 저항도 또는 순응도가 기본 값으로 복귀되지 않는다면, 기니아 피그의 폐를 10 mL 눈금 주사기로부터 공기 4 mL로 3회 팽창시켰다. 기록된 폐 파라미터들은 호흡 빈도 (호흡수/분), 순응도 (mL/cm H<sub>2</sub>O) 및 폐 저항도 (초당 cmH<sub>2</sub>O/mL)를 포함한다. 일단 이 프로토콜의 35분 무렵에 폐 기능 측정이 완료되면, 기니아 피그를 체적변동 기록계로부터 꺼내고, 이산화탄소 질식으로 안락사시켰다.

[0359] 데이터는 두 개의 방식 중 어느 하나로 평가하였다:

[0360] (a) 폐 저항도 (RL, 초당 cm H<sub>2</sub>O/mL)를 "유속의 변화"에 대한 "압력의 변화"의 비율로부터 계산하였다. 비히클 및 테스트 화합물 그룹을 위해 ACh (60 µg/분, IH)에 대한 RL 반응을 계산하였다. 각각의 전-처리 시기에서, 비히클-처리된 동물에서 평균 ACh 반응을 계산하였고, 이것을 상응하는 전-처리 시기 및 각각의 테스트 화합물의 투여량에서, ACh 반응 억제 %를 계산하기 위해 사용하였다. 기관지 보호 ID<sub>50</sub> (ACh (60 µg/분)을 기관지 수축 반응량을 50% 억제하기 위해 필요함)을 추정하기 위하여, 'RL'에 대한 억제 투여량-반응량 곡선들을 GraphPad Prism, 윈도우용 3.00 버전 (GraphPad Software, San Diego, California)을 이용하여 4 개의 파라미터 로지스트 식으로 맞추었다. 사용된 식은 다음과 같다:

[0361] 
$$Y = \text{Min} + (\text{Max}-\text{Min}) / (1 + 10^{((\log \text{ID}_{50}-X) * \text{HillSlope})})$$

[0362] 식 중에서 X는 투여량의 로그값이고, Y는 반응량 (R<sub>L</sub>에서 ACh 유도된 증가의 % 억제)이다. Y는 Min에서 출발하여 S 자형으로 Max까지 S 자형으로 점근적으로 접근한다.

[0363] (b) 기본 폐 저항도를 두 배로 증가시키기 위해 요구되는 Ach 또는 히스타민의 양으로 정의되는 약 PD<sub>2</sub> 는 다음 식 (임상에서 PC<sub>20</sub> 값을 계산하기 위해 사용되는 식으로부터 유래됨, *Am. Thoracic Soc*, 2000을 참조)을 사용하여 Ach 또는 히스타민 공격의 범위에 걸쳐 유속 및 압력으로부터 유래되는 폐 저항 값을 사용하여 계산하였다:

$$PD_2 = \text{antilog} \left[ \log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1)(2R_0 - R_1)}{R_2 - R_1} \right]$$

[0364] 상기에서:

[0366] C<sub>1</sub> = C<sub>2</sub>에 선행하는 Ach 또는 히스타민의 농도

[0367] C<sub>2</sub> = 폐 저항도 (R<sub>L</sub>)에서 2-배 이상의 증가를 가져오는 Ach 또는 히스타민의 농도

[0368] R<sub>0</sub> = 기본 R<sub>L</sub> 값

[0369] R<sub>1</sub> = C<sub>1</sub> 후의 R<sub>L</sub> 값

[0370] R<sub>2</sub> = C<sub>2</sub> 후의 R<sub>L</sub> 값

[0371] 데이터의 통계 분석은 two tailed-Students t-test를 사용하여 수행하였다. P-값 <0.05은 유의한 것으로 간주하였다.

[0372] 이 분석에서 테스트하였을 때, 식 I의 화합물은 MCh-유도된 기관지 수축과 His-유도된 기관지 수축에 대해서 용량-의존적인 기관지 보호 효과를 생성하였다. 추가적으로는, 식 I의 화합물은 이 분석에서 약 24 시간 이상 동안 기관지 보호 활성의 지속 기간 (PD T<sub>1/2</sub>)을 가졌다.

[0373] 본원 발명은 그의 특정 실시형태들을 참조하여 설명되었으나, 본원 발명이 속하는 기술분야의 당업자들은 본원 발명의 진정한 원리 및 본원 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변형들이 이루어질 수 있고 등가물들이 치환될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 또한, 특정 상황, 물질, 조성, 방법 단계, 또는 단계들을 본원 발명의 목적, 원리 및 범위에 적당하게 하기 위해 수정이 이루어질 수 있다. 모든 그와 같은 수정들은 본원 명세서에 첨부된 청구항들의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 추가적으로는 본원 명세서에서 인용된 모든 문헌들, 특허들 및 특허 문헌들은 개별적으로 원용에 의해 포함된 것처럼, 그 전체가 원용으로 본원 명세서에 포함된다.

## 도면의 간단한 설명

[0038] 도면의 간단한 설명

[0039] 본원 발명의 다양한 실시형태가 첨부되는 도면에 의해 참조되어 설명된다.

[0040] 도 1은 시차주사열량계(differential scanning calorimetry, DSC) 곡선과 열중량분석 (TGA) 곡선을 도시한 것이고, 도 2는 본원 발명의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형의 시료를 위한 DSC 곡선을 도시하고 있다.

[0041] 도 3과 도 4는 본원 발명의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형 시료의 분말 X-선 회절(powder x-ray diffraction, PXRD) 패턴을 도시하고 있다.

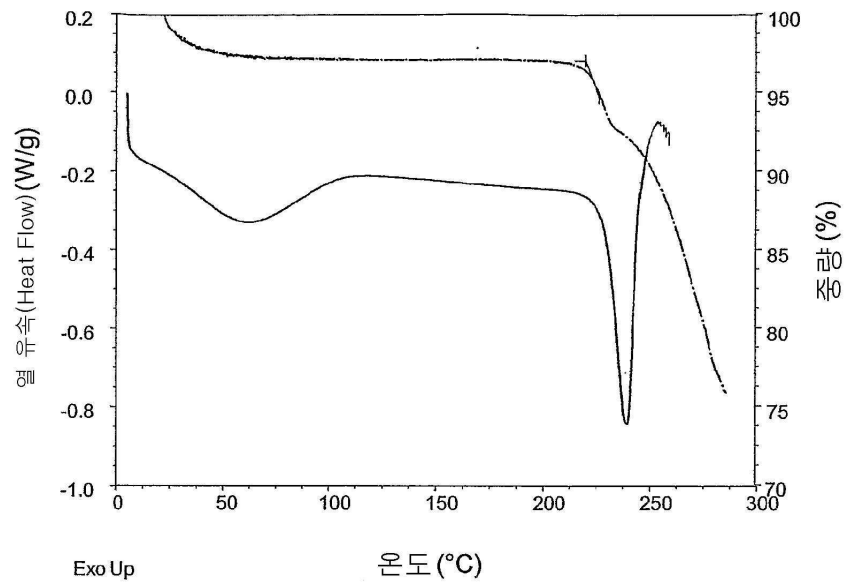
[0042] 도 5는 본원 발명의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형의 적외선 (IR) 흡수 스펙트럼을 도시하고 있다.

[0043] 도 6은 본원 발명의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(2-클로로-4-[(R)-2-하이드록시-2-(8-하이드록시-2-옥소-1,2-디하이드로퀴놀린-5-일)에틸아미노]메틸)-5-메톡시페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 1,2-에탄디술폰산 염의 결정형을 위한 동적 흡습 (dynamic moisture sorption, DMS) 곡선을 도시하고 있다.

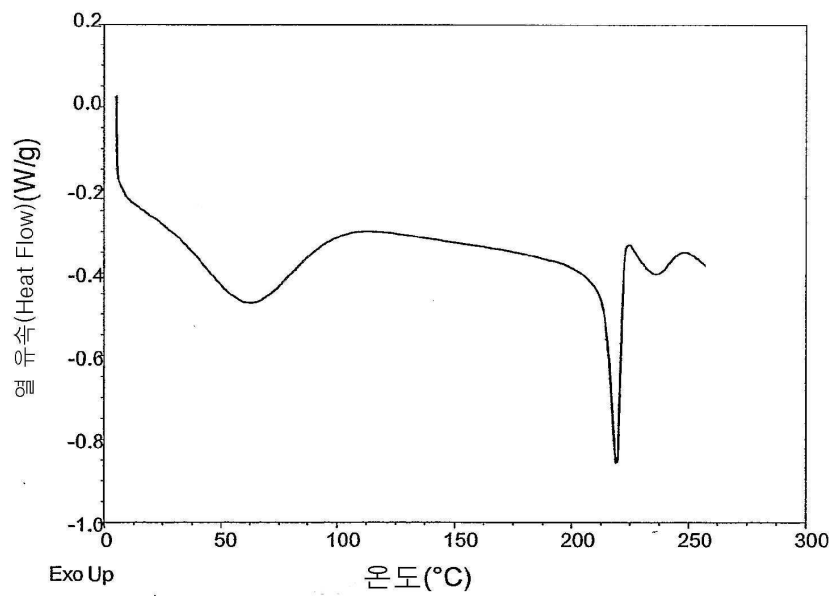


도면

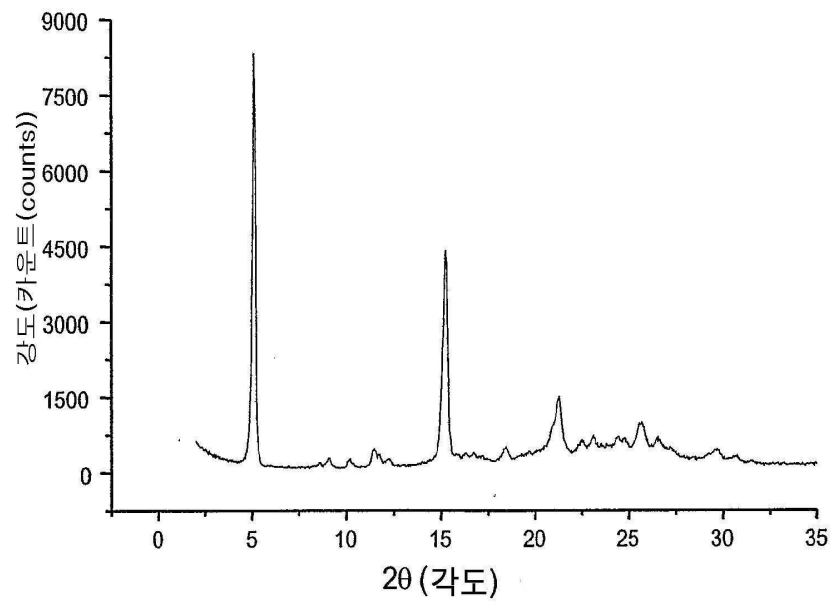
도면1



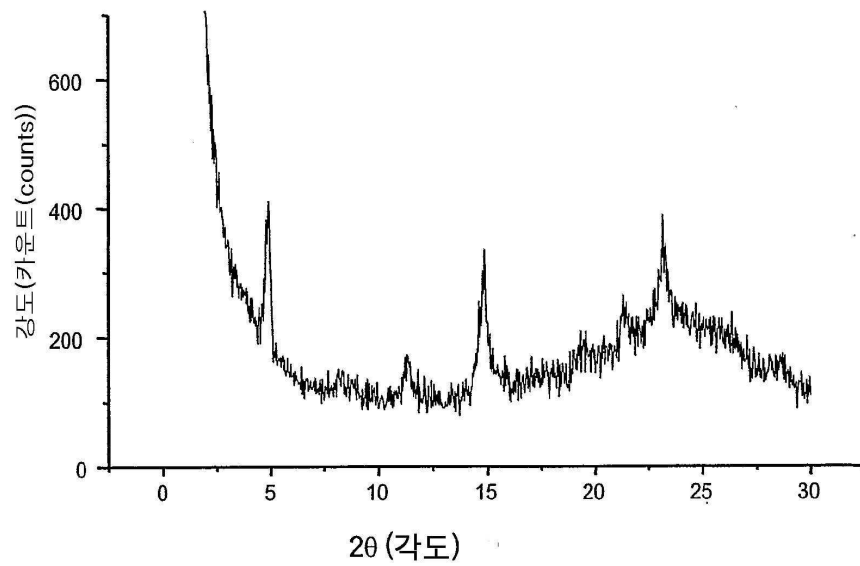
도면2



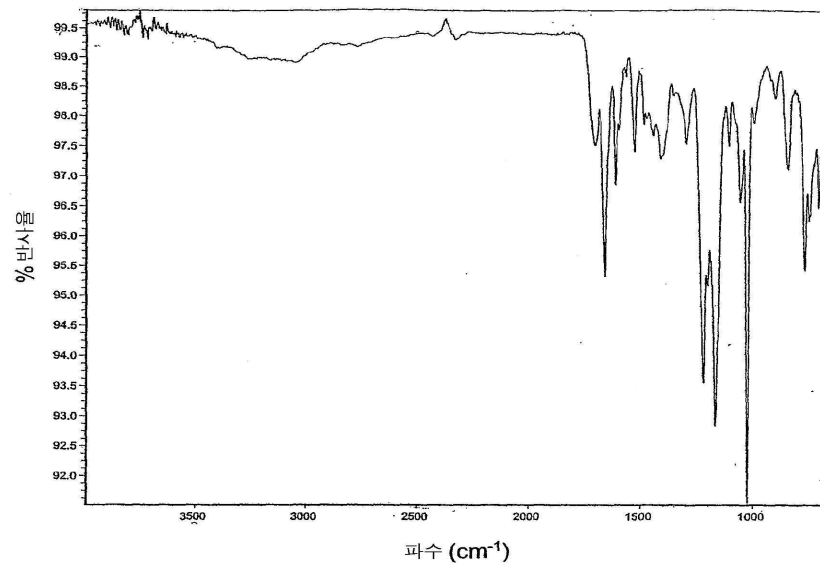
도면3



도면4



도면5



도면6

