



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월13일

(11) 등록번호 10-2177982

(24) 등록일자 2020년11월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/495* (2006.01) *A61K 31/167* (2006.01)  
*A61K 31/44* (2006.01) *A61K 31/46* (2006.01)  
*A61K 31/47* (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 31/495* (2013.01)  
*A61K 31/167* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7028970
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월17일  
 심사청구일자 2019년03월12일
- (85) 번역문제출일자 2015년10월13일
- (65) 공개번호 10-2015-0139533
- (43) 공개일자 2015년12월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2014/050834
- (87) 국제공개번호 WO 2014/140648  
 국제공개일자 2014년09월18일
- (30) 우선권주장  
 61/799,177 2013년03월15일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 WO2011058308 A1  
 WO2012020016 A1  
 EP2111861 A

- (73) 특허권자  
 베로나 파마 피엘씨  
 영국 씨에프10 1에프에스 카디프 원 센트럴 스퀘어
- (72) 발명자  
 워커, 마이클 제이.에이.  
 캐나다 브리티쉬 콜롬비아 브이6티 오에이8 벤쿠버 월터 게이지 로드 5989 아파트 1502
- 카줄라, 마리오  
 이태리 아이-80121 나폴리 비아 델 파르코 마르케리타 24
- 칼제타, 루이지노  
 이태리 아이-00176 로마 비아 카실리나 403
- (74) 대리인  
 특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 10 항

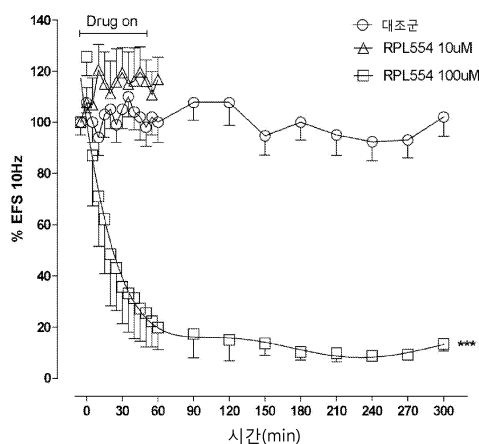
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 약물 복합제

### (57) 요약

본 발명은 (a) 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온 또는 이의 약제학적으로 허용되는 산 부가 염인 PDE3/PDE4 억제제 및 (b) 무스카린성 리셉터 길항 물질을 포함하는 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 31/44* (2013.01)

*A61K 31/46* (2013.01)

*A61K 31/47* (2013.01)

*A61K 31/519* (2013.01)

*A61K 9/0075* (2013.01)

*A61K 9/0078* (2013.01)

*A61K 9/008* (2013.01)

*A61K 9/0095* (2013.01)

*A61K 9/4858* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

약제학적 조성물로서, 상기 조성물은

(a) 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온 또는 이의 약제학적으로 허용되는 산 부가 염(acid addition salt)인 PDE3/PDE4 억제제; 및

(b) 아트로핀(atropine), 메틸아트로핀(methylatropine), 호마트로핀(homatropine), 히오시아민(hyoscyamine), 히오스신(hyoscine), 글리코피롤레이트(glycopyrrolate), 이프라트로피움(ipratropium), 옥시트로피움(oxitropium), 클리디늄(clidinium) 또는 메펜졸레이트(mepenzolate)인 무스카린성 리셉터 길항 물질(muscarinic receptor antagonist)

을 포함하고,

상기 약제학적 조성물은 천식, 알러지 천식, 고초열, 알러지 비염, 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 성인 호흡 장애 증후군(ARDS), 스테로이드 내성 천식(steroid resistant asthma), 심한 천식, 소아 천식, 낭성 섬유증, 폐 섬유증(lung fibrosis), 폐 섬유화증(pulmonary fibrosis), 간질성 폐질환, 피부질환, 아토피 피부염, 건선, 눈염증, 대뇌허혈 또는 자가면역 질환인 질병 또는 질환을 치료하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PDE3/PDE4 억제제 (a)는 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온인 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 무스카린성 리셉터 길항 물질 (b)는 아트로핀 또는 글리코피롤레이트인 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 무스카린성 리셉터 길항 물질 (b)는 아트로핀인 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 고정 복합제(fixed combination)인 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

분말식 흡입기(DPI) 또는 정량 흡입기(MDI)에 의한 투여를 위한, 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 질병 또는 질환은 천식 또는 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)인 것인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제1항, 제3항 및 제4항 중 어느 한 항에 정의된 무수카린성 리셉터 길항 물질과 병용되는 제1항 또는 제8항에 정의된 질병 또는 질환의 치료용 약제로서,

상기 약제는 활성 성분으로 제1항 또는 제2항에 정의된 PDE3/PDE4 억제제를 포함하는 것인, 약제.

#### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 정의된 PDE3/PDE4 억제제와 병용되는 제1항 또는 제8항에 정의된 질병 또는 질환의 치료용 약제로서,

상기 약제는 활성 성분으로 제1항, 제3항 및 제4항 중 어느 한 항에 정의된 무스카린성 리셉터 길항 물질을 포함하는 것인, 약제.

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

## 청구항 18

삭제

## 청구항 19

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 출원은 참조로 인용되는 2013년 3월 15일에 출원된 US 가출원 제61/799,177로부터 우선권을 주장한다.

[0002] 본 발명은 호흡기 및 염증성 질병의 치료에 놀라운 치료 효능을 갖는 약물의 새로운 조합에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)과 같은 호흡기 질환에 대한 수많은 치료적 접근법이 있다. 예컨대, 코르티코스테로이드,  $\beta_2$ -아드레날린성 리셉터 작용 물질( $\beta_2$ -adrenergic receptor agonist), 포스포디에스테라아제(PDE) 4 억제제, PDE 3 억제제, 류코트리엔 리셉터 길항 물질(leukotriene receptor antagonist), 표피 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, egfr) 키나아제 억제제, p38 키나아제 억제제, NK1 작용 물질 및 무스카린성 리셉터 길항 물질 모두는 호흡기 질환의 치료에 이용되는 것이 알려져 있다.

[0004] RPL554(9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온)은 이중 PDE3/PDE4 억제제이고, WO 00/58308에 기재되어 있다. 조합된 PDE3/PDE4 억제제로서, RPL554는 항염증 및 기관지 확장 활성이 있고, 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환(COPD)과 같은 호흡기 질환의 치료에 유용하다.

[0005] 다양한 분류의 호흡기 약물은 호흡기 질병의 치료를 위해 조합으로 이용될 수 있는 것이 알려져 있다. 그러나, 이러한 조합 성분들 사이의 시너지 상호 작용이 거의 발견되지 않았다.

### 발명의 내용

### 해결하려는 과제

### 과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 놀라운 발견은, RPL554가 무스카린성 리셉터 길항 물질의 활성을 강력하게 할 수 있다는 것이다. 따라서, RPL554 및 무스카린성 리셉터 길항 물질은 개선된 치료 효과를 제공하기 위해 조합하여 시너지적으로 상호 작용한다.

[0007] 약물 사이의 진정한 시너지 상호 작용은 드물다. 시너지 상호 작용의 존재는, 예컨대 베런바움법(Berenbaum method), BI (Bliss Independence) 기준 및/또는 곡선의 이소볼(curved isoboles)을 통한 LA (Loewe Additivity) 모델에 의해 측정될 수 있다(Berenbaum, 1977; Greco et al., 1995; Grabovsky and Tallarida, 2004; Tallarida, 2006; Goldoni and Johansson, 2007; Tallarida and Raffa, 2010 참조).

[0008] 베런바움법에 따르면, 조합의 시너지는 우선 각각의 약물의 저용량 및 고용량을 정의하기 위해 단일 치료로서 구성 약물 각각에 대한 용량-반응 곡선을 결정함으로써 측정된다. 그 후, 각각의 약물의 저용량의 조합의 효과가 측정된다. 각각의 약물의 저용량의 조합이 단일 치료로 단독으로 고용량인 것보다 우수한 반응을 나타내는 경우에, 두 가지 약물 사이의 시너지가 있다.

[0009] 본 발명자는, 베런바움법에 따른 진정한 시너지 효과는 RPL554가 무스카린성 리셉터 길항 물질과 조합되는 경우에 발생한다는 것을 예상 외로 발견했다. 각각의 구성 약물의 저용량을 이용하지만 얻어지는 향상된 치료 효과는 임상적 맥락에서 매우 바람직하고, 예컨대 환자에게 경험되는 부작용을 감소시킨다.

[0010] 따라서, 본 발명은 (a) 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-

3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온 또는 이의 약제학적으로 허용되는 산 부가 염인 PDE3/PDE4 억제제 및 (b) 무스카린성 리셉터 길항 물질을 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0011] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 (i) 혈관 또는 기관지의 급성 또는 만성 폐색 또는 (ii) 급성 또는 만성 염증에 기초한 질병 또는 질환의 치료 방법으로, 그것을 필요로 하는 피험자에 있어서, 여기에 정의되는 (a) PDE3/PDE4 억제제 및 (b) 무스카린성 리셉터 길항 물질을 상기 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 여기에 정의되는 질병 또는 질환의 치료용으로 동시에, 분리되어 또는 순차적으로 이용되는, 여기에 정의되는 (a) PDE3/PDE4 억제제 및 (b) 무스카린성 리셉터 길항 물질을 포함하는 제품을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 (b) 무스카린성 리셉터 길항 물질과 조합하여 여기에 정의되는 질병 또는 질환의 치료용으로 동시에, 분리되어 또는 순차적으로 이용되는 약제의 제조 시에 여기에 정의되는 (a) PDE3/PDE4 억제제의 용도를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 여기에 정의되는 (a) PDE3/PDE4 억제제와 조합하여 여기에 정의되는 질병 또는 질환의 치료용으로 동시에, 분리되어 또는 순차적으로 이용되는 약제의 제조 시에 (b) 무스카린성 리셉터 길항 물질의 용도를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 여기에 정의되는 질병 또는 질환의 치료용 약제의 제조 시에 여기에 정의되는 (a) PDE3/PDE4 억제제 및 (b) 무스카린성 리셉터 길항 물질의 용도를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 여기에 정의되는 질병 또는 질환의 치료용 본 발명의 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 무스카린성 리셉터 길항 물질과 조합으로 여기에 정의되는 질병 또는 질환의 치료용으로 여기에 정의되는 PDE3/PDE4 억제제를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 여기에 정의되는 PDE3/PDE4 억제제와 조합으로 여기에 정의되는 질병 또는 질환의 치료용 무스카린성 리셉터 길항 물질을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 RPL554과의 50분 배양 후 EPS에 대한 인간의 분리된 기관지 표본의 수축 억제를 나타내는 선 그래프. 도시되는 점들은 n=5의 다른 피험자의 시료로 수행되는 실험으로부터 얻은 것이고, 이들은 평균±SEM으로 나타내고; \*\*\*P<0.001 vs 대조군.
- 도 2는 아세틸콜린에 의해 준최대 수축에 대한 RPL554 및 아트로핀의 인간의 기관지 이완. 도시되는 점들은 n=5의 다른 피험자의 시료로 수행되는 실험으로부터 얻은 것이고, 이들은 평균±SEM으로 나타내고; \*\*\*P<0.001 vs 아트로핀.
- 도 3은 소극적으로 예민해진 인간의 분리된 기관지에서 히스타민의 수축 효과에 대한 RPL554의 복용량 증가 효과. 도시되는 점들은 n=5의 다른 피험자의 시료로 수행되는 실험으로부터 얻은 것이고, 이들은 평균±SEM으로 나타내고; \*\*\*P<0.001 vs 소극적으로 예민해진 대조군.
- 도 4는 아트로핀과 RPL554 사이의 저농도 상호 작용(10 nM 및 100 nM). 데이터는 n=5의 다른 피험자의 시료로 수행되는 실험으로부터 얻은 것이고, 이들은 평균±SEM으로 나타낸다. \*P<0.05 및 \*\*P<0.01.
- 도 5는 RPL554와 아트로핀의 조합에서 BI 약물 상호 작용의 반응 표면 분석(response surface analysis)으로부터 얻어지는 상호 작용 표면. 수평축은 화합물의 농도를 나타내고, 수직축은 ΔE를 나타낸다(이완율, %). 0-평면은 BI 상호 작용을 나타내고, 0-평면 위의 체적은 시너지 (포지티브 ΔE) 상호 작용을 나타낸다. 상호 작용의 규모는 직접적으로 ΔE와 연관되고, 3D 플롯에서 다양한 톤은 시너지(10%)의 다양한 퍼센타일 밴드를 나타낸다. 각각의 점의 교차점은 다른 피험자(n=5)로부터 시료에 대해 수행되는 실험의 평균을 나타낸다.
- 도 6은 아트로핀(개방된 컬럼; 아트로핀, nM), RPL554(폐쇄된 컬럼; nM)에 대한 이완 반응, 각각의 양의 조합의 첨가 반응(반점 컬럼; 첨가제) 및 각각의 양의 조합의 관측된 이완 반응(다크한 반점 컬럼; 조합 1:1)을 나타내는 바 그래프. 각각의 작용 물질의 농도는 X축에 나타낸다. 각각의 바는 평균을 나타내고, 수직선은 표준편차를 나타낸다(N=5). 첨가 반응의 경우에, SD는 Tallarida 및 Raffa 법을 이용하여 측정된다(2010). 하나의 시

료 t-시험을 이용하여 첨가 반응 \*  $P < 0.05$  (조절됨).

도 7은 RPL554 단독(●) 또는  $2\mu\text{g/kg}$  아트로핀과의 조합(▲)의 정맥 투여 후 기도의 차단 감소(봄베신( $2\mu\text{g/ml}$ ;  $5\text{ml/hr}$ )의 정맥(iv.) 투여에 의해 유도되는) .

도 8은 RPL554 단독(●) 또는  $2\mu\text{g/kg}$  아트로핀과의 조합(▲)의 정맥 투여 후 평균 동맥 혈압의 감소.

도 9는 아트로핀의 정맥 투여 후 기도의 차단 감소(봄베신( $2\mu\text{g/ml}$ ;  $5\text{ml/hr}$ )의 정맥 투여에 의해 유도되는).

도 10은 아트로핀의 정맥 투여 후 평균 동맥 혈압의 감소.

도 11은 다른 전기장 자극(EFS) 주파수에서 글리코피로늄(glycopyrronium)의 농도 반응 곡선(CRC).

도 12는 글리코피로늄의 다른 농도에서 글리코피로늄의 기관지 톤(bronchial tone)의 주파수 반응 곡선 및 AUC(area under curve) 플롯.

도 13은 다른 전기장 자극(EFS) 주파수에서 RPL554의 기관지 톤의 CRC(Concentration response curve).

도 14는 다른 농도에서 RPL554의 기관지 톤의 주파수 반응 곡선.

도 15는 RPL554, 글리코피로늄 및 (A) 3 Hz, (B) 10 Hz, 및 (C) 25 Hz의 EFS에서 RPL554과 글리코피로늄의 조합의 인간의 분리된 기관지의 수축 반응, 및 각각의 주파수에서 AUC 비교(D).

도 16은 RPL554, 글리코피로늄의 이완 반응, RPL554와 글리코피로늄의 조합으로 기대되는 반응, RPL554와 글리코피로늄의 조합으로 관측되는 반응.

도 17은 준최대 수축 유도된 카르바콜(CCh)에서 인간의 분리된 기관지에 대한 RPL554 및 글리코피로늄의 농도 반응 곡선.

도 18은 작은 인간의 기관지(< 1 mm 직경)에 대한 RPL554와 글리코피로늄의 조합으로 기대 및 관측되는 이완 반응.

도 19는 RPL554와 글리코피로늄의 조합으로 유도되는 관측 및 기대되는 이완 반응 사이의 델타 효과.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

여기에, 이하 약기가 이용된다:

[0022]

RPL554: 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온; ANOVA: 분산 분석(analysis of variance); BI: Bliss Independence; COX: 사이클로옥시제나아제(cyclooxygenase); EC30: 최대 효과의 30%를 야기하도록 요구되는 농도; EC50: 최대 효과의 50%를 야기하도록 요구되는 농도; EC70: 최대 효과의 70%를 야기하도록 요구되는 농도; EFS: 전기장 자극(electrical field stimulation); Emax: 최대 효과; KH: Krebs-Henseleit 완충 용액(buffer solution); LA: 로이 첨가제(Loewe Additivity); 및 PDE: 포스포디에스테라아제(phosphodiesterase).

[0023]

"약제학적으로 허용되는(pharmaceutically acceptable)"이란 생물학적 또는 달리 말해 바람직하지 않은 것이 아닌 재료를 말한다. 예컨대, "약제학적으로 허용되는 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"란 조성물에 도입될 수 있고, 조성물의 다른 성분과 해로운 방법으로 상호 작용하거나 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하지 않고, 피험자/환자에 투여되는 재료를 말한다. 이러한 약제학적으로 허용되는 재료는 일반적으로 독물 학상 및 제조 시험에 요구되는 표준을 충족하고, 미국 FDA(Food and Drug administration)에 의해 적합한 불활 성 성분으로 인정된 재료를 포함한다.

[0024]

"약제학적으로 허용되는 산 부가 염(pharmaceutically acceptable acid addition salt)"이란 생물학적 또는 달리 말해 바람직하지 않은 것이 아닌 약제학적인 산 부가 염을 말한다. 이러한 약제학적으로 허용되는 산 부가 염은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0025]

"치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)"은 치료가 필요한 피험자에 투여되는 경우에 유효한 치료에 충분한 양을 의미한다. 특히, "유효(effective)" 양은 바람직한 결과를 얻기 위해 필요한 양이고, "치료학적으로 유효한(therapeutically effective)" 양은 바람직한 치료 효과를 얻기 위해 필요한 양이다. 예컨대, 무스카린성 리셉터의 길항 작용을 위해, "유효한 양(effective amount)"은 무스카린성-리셉터-길항 물질의 양이다. 마찬가지로, COPD(chronic obstructive pulmonary disease)를 치료하기 위한 치료학적으로 유효한



양은 질병 예방, 개선, 억제 또는 완화될 수 있는 바람직한 치료적 결과를 얻을 수 있는 양이다.

[0026] 여기서 사용되는 "치료(treating or treatment)"는 이하를 포함하는, 포유류(특히 인간)와 같은 피험자에 질병 또는 질환(예컨대 COPD)의 치료(treating or treatment)를 의미한다: (a) 질병 또는 질환이 발생하는 것을 예방, 즉 피험자의 예방 치료; (b) 질병 또는 질환을 개선, 즉 피험자의 질병 또는 질환의 퇴행(regression)을 야기 또는 제거; (c) 질병 또는 질환의 억제, 즉 피험자의 질병 또는 질환의 진행을 더디게 하거나 멈추게 함; 또는 (d) 피험자의 질병 또는 질환의 징후를 완화. 예컨대, "COPD의 치료"는 COPD가 발생하는 것을 예방하고, COPD를 개선하고, COPD를 억제하고, COPD의 증상을 완화하는 것을 포함하는 것이다. "피험자(subject)"는 특정 질병 또는 질환의 질병 예방 또는 치료를 위해 현재 치료되는, 치료 또는 질병 예방에 필요한 인간과 같은 동물 및 본 발명의 조성물이 분석, 예컨대 동물 모델에 평가 또는 이용되는 시험 피험자를 포함하는 것이다.

[0027] PDE3/PDE4 억제제

[0028] 본 발명에서 사용되는 PDE3/PDE4 억제제는 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온 (RPL554로도 알려짐) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 산 부가 염이다.

[0029] 일반적으로, PDE3/PDE4 억제제는 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온이다. 따라서, 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온의 자유 염기가 바람직하다.

[0030] 무스카린성 리셉터 길항 물질

[0031] 무스카린성 리셉터 길항 물질(MRA)은 무스카린성 아세틸콜린 리셉터의 활성을 차단하는 화합물이다. 당업자들은 제공된 화합물이 당업자에게 알려진 분석을 이용하여 어려움 없이 무스카린성 아세틸콜린 리셉터의 활성을 차단하는지를 결정할 수 있다.

[0032] 본 발명에서는 RPL554가 2개의 기능학적으로 분명한 무스카린성 리셉터 길항 물질, 즉 아트로핀 및 글리코피로늄의 활성을 강화할 수 있다는 것이 발견되었다. 2개의 구조적으로 분명한 무스카린성 리셉터 길항 물질의 발견에 기초하여, RPL554와 함께 관측되는 시너지 상호 작용은 이들 화합물의 특정 구조에 기인한다기 보다는 무스카린성 리셉터 길항 물질과 같은 이들 화합물의 활성에 기인하여 일어난다는 결론이 나온다. 따라서, RPL554와 함께 시너지 상호 작용은 무스카린성 리셉터 길항 물질의 활성을 갖는 모든 화합물에서 기대될 수 있다는 결론이 나온다.

[0033] 일반적으로, 무스카린성 리셉터 길항 물질은 아트로핀, 메틸아트로핀(methylatropine), 홈아트로핀(homatropine), 히오시아민(hyoscyamine), 스코폴라민(scopolamine), 이프라트로퓜(ipratropium), 옥시트로퓜(oxitropium), 티오토로퓜(tiotropium), 메탄텔린(methantheline), 프로판텔린(propanteline), 아니소트로핀(anisotropine), 클리디늄(clidinium), 코피롤레이트(copyrrolate) (로비놀(Robinul)), 이소프로파미드(isopropamide), 메펜졸레이트(mepenzolate), 트리디헥세틸(tridihexethyl), 헥소시클륨(hexocyclium), 시클로펜톨레이트(cyclopentolate), 트로피카미드(tropicamide), 트리헥시페니딜(trihexyphenidyl), 피렌제핀(pirenzepine), 텔렌제핀(telenzepine), AF-DX 116 및 메토평트라민 등이다. 예컨대, 무스카린성 리셉터 길항 물질은 아트로핀, 아트로핀 설페이트(atropine sulfate), 아트로핀 옥시드(atropine oxide), 메틸아트로핀 니트레이트(methylatropine nitrate), 홈아트로핀 하이드로브로마이드(homatropine hydrobromide), 히오시아민(d,l) 하이드로브로마이드, 스코폴라민 하이드로브로마이드(scopolamine hydrobromide), 이프라트로퓜 브로마이드(ipratropium bromide), 옥시트로퓜 브로마이드(oxitropium bromide), 티오토로퓜 브로마이드(tiotropium bromide), 메탄텔린, 프로판텔린 브로마이드(propanteline bromide), 아니소트로핀 메틸 브로마이드(anisotropine methyl bromide), 클리디늄 브로마이드(clidinium bromide), 코피롤레이트 (로비놀), 이소프로파미드 요오드(isopropamide iodide), 메펜졸레이트 브로마이드(mepenzolate bromide), 트리디헥세틸 클로라이드(tridihexethyl chloride) (과틸론), 헥소시클륨 메틸설페이트(hexocyclium methylsulfate), 시클로펜톨레이트 하이드로클로라이드(cyclopentolate hydrochloride), 트로피카미드, 트리헥시페니딜 하이드로클로라이드(trihexyphenidyl hydrochloride), 피렌제핀, 텔렌제핀, AF-DX 116 및 메토평트라민 등이다. 무스카린성 리셉터 길항 물질의 다른 대표적인 예는 아클리디늄(acclidinium)(예컨대 아클리디늄 브로마이드) 및 유메클리디늄(예컨대 유메클리디늄 브로마이드)를 포함한다.

[0034] 일반적으로, 무스카린성 리셉터 길항 물질은 아트로핀, 히오스신(hyoscyne), 글리코피롤레이트(글리코피로늄),



이프라트로프, 티오토로프, 옥시트로프, 피렌제핀, 텔렌제핀, 아클리디늄 또는 유메클리디늄이다. 바람직하게, 무스카린성 리셉터 길항 물질은 아트로핀, 히오스시트, 글리코피롤레이트(글리코피로늄), 이프라트로프 브로마이드, 티오토로프 브로마이드, 옥시트로프 브로마이드, 피렌제핀, 텔렌제핀, 아클리디늄 또는 유메클리디늄이다. 또는, 무스카린성 리셉터 길항 물질은 아트로핀, 히오스신, 글리코피롤레이트, 이프라트로프 브로마이드, 티오토로프 브로마이드, 옥시트로프 브로마이드, 피렌제핀, 또는 텔렌제핀일 수 있다.

[0035] 더욱 바람직하게, 무스카린성 리셉터 길항 물질은 아트로핀, 이프라트로프 브로마이드 또는 티오토로프 브로마이드이다.

[0036] 가장 바람직하게, 무스카린성 리셉터 작용 물질(muscarinic receptor agonist)은 아트로핀 또는 글리코피로늄이다.

[0037] 무스카린성 리셉터 길항 물질은 선택적으로 이들의 라세미 화합물, 이들의 이네티오머, 이들의 다이아스테레오머, 및 이들의 혼합물의 형태이고, 선택적으로 이들의 약제학적으로 허용되는 산 부가 염이다. 무스카린성 리셉터 길항 물질의 산 부가 염의 형성에 적합한 산의 일반적인 예는 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 메타노설폰산(methanosulphonic acid), 아세트산, 푸마르산, 석신산, 말산, 및 트리플루오로아세트산이다. 또한, 상기 염의 혼합물이 이용될 수 있다.

[0038] 조성물, 조합, 약제학적 조성물 및 포물레이션

[0039] 본 발명의 조성물은 (a) 9,10-디메톡시-2-(2,4,6-트리메틸페닐이미노)-3-(N-카르바모일-2-아미노에틸)-3,4,6,7-테트라하이드로-2H-피리미도[6,1-a]이소퀴놀린-4-온 또는 이들의 약제학적으로 허용되는 산 부가 염인 PDE3/PDE4 억제제 및 (b) 무스카린성 리셉터 길항 물질을 포함한다.

[0040] 일반적으로, 본 발명의 조성물은 고정 복합제(fixed combination)이다. 고정 복합제에서, PDE3/PDE4 억제제 및 무스카린성 리셉터 길항 물질은 동일한 조성으로 존재한다. 고정 복합제는 PDE3/PDE4 억제제와 무스카린성 리셉터 길항 물질의 동시 투여에 이용될 수 있다. 일반적으로, 고정 복합제는 건조된 파우더 조성물(건조된 파우더 흡입기로부터 전달에 바람직하게 적합), 네블라이저로부터 전달에 적합한 용액, 또는 정량 분무식 흡입기(pressurised metered dose inhaler)로부터 전달에 적합한 용액 또는 현탁액이다.

[0041] 따라서, 예컨대, 고정 복합제는 바람직하게는 PDE3/PDE4 억제제 및 무스카린성 리셉터 길항 물질을 포함하는 건조된 파우더 조성물이다. 또는, 고정 복합제는 일반적으로 네블라이저로부터 전달에 적합하고, PDE3/PDE4 억제제 및 무스카린성 리셉터 길항 물질을 포함하는 용액, 일반적으로 수용액일 수 있다. 또는, 고정 복합제는 정량 분무식 흡입기로부터 전달에 적합하고, PDE3/PDE4 억제제 및 무스카린성 리셉터 길항 물질을 포함하는 용액 또는 현탁액일 수 있다.

[0042] 고정 복합제의 두 성분은 일반적으로 서로 혼합된다.

[0043] 또는, 본 발명의 조성물은 자유 복합제(free combination)일 수 있다. 자유 복합제에서, 활성 성분 (a) 및 (b)는 일반적으로 서로 분리되고, 동시에, 실질적으로 동시에, 분리되어 또는 순차적으로 투여를 위해 하나의 단위로 패키징된다.

[0044] 일반적으로, 조성물은 PDE3/PDE4 억제제 및 무스카린성 리셉터 길항 물질 이외에 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 첨가제를 더 포함하는 약제학적 조성물이다. 조성물은 필요에 따라 다른 치료제 및/또는 제형제(formulating agent)를 함유할 수 있다. 다른 치료제의 바람직한 예는  $\beta_2$ -교감 신경 리셉터 작용 물질( $\beta_2$ -adrenergic receptor agonist)이다.  $\beta_2$ -교감 신경 리셉터 작용 물질의 예는 살부타몰(salbutamol), 알부테롤(albuterol), 비톨테롤(bitolterol), 페노테롤(fenoterol), 포모테롤(formoterol), 인다카테롤(indacaterol), 이소에타린(isoetharine), 레발부테롤(levabuterol), 메타프로테레놀(metaproterenol), 피부테롤(pirbuterol), 살메파몰(salmefamol), 살메테롤(salmeterol) 및 터부탈린(terbutaline)이다.  $\beta_2$ -교감 신경 리셉터 작용 물질의 바람직한 예는 살부타몰, 살메테롤, 포모테롤, 알부테롤 및 피부테롤이다.

[0045] 본 발명의 조성물은 일반적으로 약제학적 조성물의 형태로 피험자에 투여된다. 이러한 약제학적 조성물은 그것에 한정되지 않지만, 흡입되는, 경구, 비강, 국소(경피를 포함함) 및 비경구 형태의 투여를 포함하는 임의의 허용되는 투여 경로에 의해 피험자에 투여될 수 있다. 흡입에 의한 투여가 바람직하다. 또한, 본 발명의 조성물은, 하루에 여러번 복용, 하루에 한번 복용 또는 일주일에 한번 복용으로, 예컨대 경구 투여될 수 있다. 특정 형태의 투여에 적합한 본 발명의 조성물에 이용되는 임의의 형태의 활성제(즉, 자유 염기, 약제학적으로 허용되

는 염, 용매, 등)는 여기에 논의되는 약제학적 조성물로 사용될 수 있다고 이해해야 할 것이다.

[0046] 본 발명의 약제학적 조성물은 일반적으로 치료학적으로 유효한 양의 활성제를 함유한다. 그러나, 당업자는, 약제학적 조성물은 치료학적으로 유효한 양 초과로 함유할 수 있고, 즉 벌크 조성물, 또는 치료학적으로 유효한 양 미만으로 함유할 수 있고, 즉 치료학적으로 유효한 양을 달성하기 위해 다중 투여하도록 고안되는 개별 단위량일 수 있다고 인지할 것이다. 일 실시형태에서, 조성물은, 그 포물레이션, 투여 경로, 복용 주기 등에 따라 달라지는 실제량으로 약 0.01-30 wt %, 예컨대 약 0.01-10 wt %을 포함하는 약 0.01-95 wt %의 활성제를 함유할 것이다. 다른 실시형태에서, 흡입에 적합한 조성물은, 예컨대 약 0.01-30 wt %의 활성제를 포함하고, 또 다른 실시형태에서, 약 0.01-10 wt %의 활성제를 포함한다.

[0047] 임의의 종래의 담체 또는 첨가제는 본 발명의 약제학적 조성물에 이용될 수 있다. 특정 담체 또는 첨가제의 선택 또는 담체 또는 첨가제의 조합은, 질병 또는 질환 상태의 형태 또는 특정 피험자를 치료하기 위해 이용되는 투여 형태에 따라 달라질 수 있다. 이러한 점에서, 투여의 특정 형태를 위한 적합한 조성물의 제조는 약제학적 기술 분야의 범위 내에서 적절하다. 추가적으로, 이러한 조성물에 이용되는 담체 또는 첨가제는 시판된다. 다른 설명으로, 종래의 포물레이션 기술이 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (2000); and H. C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (1999)에 기재되어 있다.

[0048] 약제학적으로 허용되는 담체로 작용할 수 있는 물질의 대표적인 예는, 그것에 한정되지 않지만 이하를 포함한다: 락토오스, 글루코오스 및 슈크로오스와 같은 설탕, 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 미세결정 셀룰로오스, 및 그 유도체, 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트와 같은 셀룰로오스; 파우더 트래거칸스(powdered tragacanth); 맥아(malt); 탈크; 코코아 버터 및 좌약 왁스(suppository wax)와 같은 첨가제; 피넛 오일, 면실유, 사플라워유(safflower oil), 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일; 프로필렌글리콜과 같은 글리콜; 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 폴리올; 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; 아가; 마그네슘 하이드록사이드 및 알루미늄 하이드록사이드와 같은 완충제; 알긴산; 발열물질 비함유수(pyrogen-free water); 등장액(isotonic saline); 링거액(Ringer's solution); 에틸알콜; 포스페이트 완충액; 클로로플루오로카본 및 하이드로플루오로카본과 같은 압축 추진 가스; 및 약제학적 조성물에 채용되는 다른 비독성 양립 가능 물질. 약제학적 조성물은 일반적으로 약제학적으로 허용되는 담체 및 하나 이상의 선택적 성분과 활성제/활성 성분을 완전히 및 친밀히 혼합 또는 블렌딩함으로써 제조된다. 그 후, 얻어진 균일하게 블렌딩된 혼합물은 종래의 절차 및 기기를 이용하여 타블렛, 캡슐, 필, 캐니스터, 카트리지, 디스펜서 등으로 형성 또는 로딩될 수 있다.

[0049] 일반적으로, 약제학적 조성물은 흡입 투여에 적합하다. 약제학적 조성물은 분말식 흡입기(DPI) 또는 정량 흡입기(MDI)에 의한 투여용일 수 있다.

[0050] 흡입 투여에 적합한 조성물은 일반적으로 에어로졸 또는 파우더의 형태, 예컨대 건조된 파우더 조성물일 것이다. 이러한 조성물은 일반적으로 네블라이저 흡입기, 건조 파우더 흡입기, 또는 정량 흡입기와 같은 잘 알려진 전달 장치를 이용하여 투여되고, 이들의 예는 이하에 기재된다.

[0051] 또는, 활성제/활성 성분을 포함하는 조성물은 네블라이저 흡입기를 이용하는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 네블라이저 장치는 일반적으로 피험자의 기도로 전달되는 미스트와 같이 조성물을 스프레이 하는 고속 공기의 스트림을 생성한다. 따라서, 네블라이저 흡입기에 이용하기 위해 제형되는 경우에, 활성제/활성 성분은 일반적으로 용액을 형성하기 위해 적합한 담체에 용해된다. 또는, 활성제/활성 성분은 미분화되고, 미분화되는 경우에, 입자의 적어도 약 90 퍼센트가 약 10  $\mu\text{m}$  미만의 질량 중앙 지름을 갖는 입자를 갖는 것으로 일반적으로 정의되는 호흡 가능한 크기의 미분화된 입자의 현탁액을 형성하기 위해 적합한 담체와 조합될 수 있다. "질량 중앙 지름(mass median diameter)"은 입자 질량의 반이 더 큰 직경을 갖는 입자에 함유되고, 반이 더 작은 직경 입자에 함유되는 직경을 의미한다.

[0052] 적합한 네블라이저 장치는 Resimat<sup>TM</sup> Soft Mist<sup>TM</sup> 흡입기 (Boehringer Ingelheim), the AERx<sup>TM</sup> Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.), 및 the PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH)을 포함한다. 네블라이저 흡입기에 이용하기 위한 예시적인 조성물은 RPL554를 약 0.05  $\mu\text{g/mL}$  내지 약 10  $\text{mg/mL}$ 를 포함하는 등장성 수용액을 포함한다. 일 실시형태에서, 이러한 용액은 약 3.5-6의 pH를 갖는다.

- [0053] 또는, 활성제/활성 성분을 포함하는 조성물은 건조 파우더 흡입기(DPI)를 이용하여 흡입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 DPI는 일반적으로 흡식(inspiration) 동안 피험자의 기류에 분산되는 자유-유동 파우더(free-flowing powder)로서 활성제를 부여한다. 자유 유동 파우더를 얻기 위해, 활성제/활성 성분은 일반적으로 락토오스, 전분, 만니톨, 텍스트로오스, 폴리락타산, 폴리락타이드-코글리코라이드, 및 이들의 조합과 같은 적합한 첨가제로 제형된다. 일반적으로, 활성제/활성 성분은 흡입에 적합한 블렌드를 형성하기 위해 미분화되고, 첨가제와 조합된다. 따라서, 본 발명의 일 실시형태에서, 활성제/활성 성분은 미분화된 형태이다. 예컨대, DPI에 이용하기 위한 대표적인 조성물은 약 1  $\mu\text{m}$  내지 약 100  $\mu\text{m}$ 의 입자 크기를 갖는 건조된 락토오스(예컨대 건조된 분쇄된 락토오스) 및 활성제의 미분화된 입자를 포함한다. 이러한 건조 파우더 포물레이션은, 예컨대 활성제와 락토오스를 혼합한 후 상기 성분을 건조 블렌딩함으로써 제조될 수 있다. 또는, 필요에 따라, 활성제는 첨가제 없이 제형될 수 있다. 그 후, 조성물은 일반적으로 DPI로, 또는 흡입 카트리지로 또는 DPI와 이용하기 위해 캡슐로 적재된다. DPI는 당업자에게 잘 알려져 있고, 이들 장치의 다수는 시판되며, 대표적인 장치는 Aerolizer<sup>RTM</sup> (Novartis), Airmax<sup>TM</sup> (IVAX), ClickHaler<sup>RTM</sup> (Innovata Biomed), Diskhaler<sup>RTM</sup> (GlaxoSmithKline), Diskus<sup>RTM</sup> or Accuhaler (GlaxoSmithKline), Easyhaler<sup>RTM</sup> (Orion Pharma), Eclipse<sup>TM</sup> (Aventis), FlowCaps<sup>RTM</sup> (Hovione), Handihaler<sup>RTM</sup> (Boehringer Ingelheim), Pulvinal<sup>RTM</sup> (Chiesi), Rotahaler<sup>RTM</sup> (GlaxoSmithKline), Skyehaler<sup>TM</sup> or Certihaler<sup>TM</sup> (SkyePharma), Twisthaler (Schering-Plough), Turbuhaler<sup>RTM</sup> (AstraZeneca), Ultrahaler<sup>RTM</sup> (Aventis), 등을 포함한다.
- [0054] 또는, 활성제를 포함하는 조성물은 정량 흡입기(MDI)를 이용하여 흡입에 의해 투여될 수 있다. 이러한 MDI는 일반적으로 압축 추진 가스를 이용하여 활성제의 정량을 방출한다. 따라서, 정량 포물레이션은 일반적으로 CCl<sub>3</sub>F와 같은 클로로플루오로카본 또는 1,1,1,2-테트라플루오로에탄 (HFA 134a) 및 1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로-n-프로판 (HFA 227)과 같은 하이드로플루오로알칸(HFA)과 같은 액화된 추진제에 활성제의 용액 또는 현탁액을 포함하지만, 오존층에 영향을 미치는 클로로플루오로카본에 대한 문제에 기인하여 HFA가 일반적으로 바람직하다. HFA 포물레이션의 추가적인 선택적 성분은 에탄올 또는 펜탄과 같은 조용매(co-solvent), 및 소르비탄 트리올레이트, 올레산, 레시틴, 및 글리세린과 같은 계면활성제를 포함한다. 예컨대, Purewal 등의 미국 특허 제5,225,183, EP 0717987 A2 (Minnesota Mining and Manufacturing Company), 및 WO 92/22286 (Minnesota Mining and Manufacturing Company)를 참조한다. MDI에 이용하기 위한 대표적인 조성물은 약 0.01-5 wt %의 활성제; 약 0-20 wt %의 에탄올; 및 약 0-5 wt %의 계면활성제를 포함하고; 나머지는 HFA 추진제이다. 이러한 조성물은 일반적으로 활성제, 에탄올(존재하는 경우) 및 계면활성제(존재하는 경우)를 함유하는 적합한 용기에 냉각한 또는 가압한 하이드로플루오로알칸을 추가함으로써 제조된다. 현탁액을 제조하기 위해, 활성제는 미분화되고, 그 후 추진제와 조합된다. 그 후, 포물레이션은 MDI의 부분을 형성하는 에어로졸 캐니스터로 적재된다. MDI는 당업자에 잘 알려져 있고, 다수의 이러한 장치는 시판되고, 대표적인 장치는 AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals), Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer Ingelheim), Flovent<sup>RTM</sup> (GlaxoSmithKline), Maxair Inhaler (3M), Proventil<sup>RTM</sup> Inhaler (Schering), Serevent<sup>RTM</sup> Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline), 등을 포함한다. 또는, 현탁액 포물레이션은 활성제의 미분화된 입자 상에 계면활성제의 코팅을 스프레이 건조함으로써 제조될 수 있다. 예컨대 WO 99/53901 (Glaxo Group Ltd.) 및 WO 00/61108 (Glaxo Group Ltd.)를 참조한다.
- [0055] 호흡 가능한 입자의 제조 공정의 추가적인 예, 및 흡입 복용에 적합한 포물레이션 및 장치는 Briggner 등의 미국 특허 제5,874,063; Trofast의 5,983,956; Jakupovic 등의 6,221,398; Gao 등의 6,268,533; Bisrat 등의 6,475,524; 및 Cooper의 6,613,307에 기재되어 있다.
- [0056] 또는, 약제학적 조성물은 경구 투여에 적합할 수 있다. 경구 투여에 적합한 조성물은 캡슐, 타블렛, 필, 캔디(lozenge), 약제용 캡슐(cachets), 드라제(dragee), 파우더, 과립; 수성 또는 비수성 액체 중 용액 또는 현탁액; 수중유 또는 유중수 액체 에멀전; 엘릭시르제 또는 시럽; 등의 형태일 수 있고; 각각은 소정량의 활성제를 함유한다.
- [0057] 고체 복용 형태(즉, 캡슐, 타블렛, 필 등으로서)의 경구 투여의 경우에, 조성물은 일반적으로 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트와 같은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 및 활성제를 포함한다. 또한, 고체 복용 형태는 전분과 같은 증량제 또는 필러; 미세결정 셀룰로오스, 락토오스, 슈크로오스, 글루코오스, 만니톨, 및/또는 규산; 카르복시메틸셀룰로오스, 알지네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 슈크로오스 및/또는 아카시아와 같은 바인더; 글리세롤과 같은 보습제; 한천, 칼슘 카보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 소정의

실리카이트(certain silicate), 및/또는 소듐 카보네이트와 같은 붕해제; 파라핀과 같은 용액 완염제(solution retarding agent); 4급 암모늄 화합물과 같은 흡수 가속제; 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트와 같은 습윤제; 카올린 및/또는 벤토나이트 클레이와 같은 흡착제; 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌글리콜, 소듐 라우릴 설페이트, 및/또는 이들의 혼합물과 같은 윤활제; 착색제; 및 완충제를 포함할 수 있다.

[0058] 또한, 이형제, 습윤제, 코팅제, 교미제, 착향료 및 향신제, 보존제 및 산화방지제도 약제학적 조성물에 존재할 수 있다. 타블렛, 캡슐, 필 등의 예시적인 코팅제는 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 프탈레이트, 메타크릴산-메타크릴산 에스테르 공중합체, 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트, 카르복시메틸 에틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스 아세테이트 석시네이트 등과 같은 장용성 제피(enteric coating)를 위해 이용되는 것을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 산화방지제의 예는 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 소듐 비설파이트(sodium bisulfate), 소듐 메타비설파이트 소듐 설파이트(sodium metabisulfate sodium sulfite) 등과 같은 수용성 산화방지제; 아스코르빌 팔미테이트(ascorbyl palmitate), 부틸레이트 하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole), 부틸레이트 하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 지용성 산화방지제; 및 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산, 소르비톨, 타르타르산, 인산 등과 같은 금속-킬레이트제를 포함한다.

[0059] 또한, 조성물은, 예컨대 비율을 변화시킨 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스 또는 다른 폴리머 매트릭스, 리포솜 및/또는 미세구를 이용하여 활성제의 방출이 느리게 또는 조절되도록 제형될 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 불투명화제를 함유할 수 있고, 이들이 선택적으로 지연된 방법으로, 위장관의 소정 부분에서만 또는 우선적으로 활성제를 방출하도록 제형될 수 있다. 사용될 수 있는 임베딩 조성물의 예는 중합성 물질 및 왁스를 포함한다. 또한, 활성제는 적절하다면 하나 이상의 상기 기재된 첨가제를 갖는 미세-캡슐화된 형태(micro-encapsulated form)일 수 있다. 경구 투여에 적합한 액체 복용 형태는, 예로서, 약제학적으로 허용되는 에멀전, 미세에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르제를 포함한다. 액체 복용 형태는 일반적으로 활성제 및 비활성 희석제, 예컨대 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 에멀전화제, 예컨대 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질, 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 오일(예컨대 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸릴 알콜, 폴리에틸렌글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 현탁액은, 현탁제, 예컨대 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미세결정 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천 및 트래가칸스, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0060] 경구 투여하려는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 단위 복용 형태로 패키징될 수 있다. "단위 복용 형태(unit dosage form)"란 피험자의 복용에 적합한 물리적으로 구별되는 단위, 즉 단독으로 또는 하나 이상의 추가 단위와 조합하여 바람직한 치료 효과를 생성하도록 산출된 활성제의 소정의 양을 함유하는 각각의 단위를 말한다. 예컨대, 이러한 단위 복용 형태는 캡슐, 타블렛, 필 등일 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명의 조성물은 비경구적으로 투여될 수 있다(예컨대, 피하, 정맥, 근육내 또는 복강내 주사에 의해). 이러한 투여를 위해, 활성제는 살균 용액, 현탁액 또는 에멀전으로 제공된다. 이러한 포물레이션을 제조하기 위한 예시적인 용매는 물, 염류 용액(saline), 저분자량 알콜, 예컨대 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 오일, 젤라틴, 지방산 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트, 등을 포함한다. 일반적인 비경구 포물레이션은 활성제의 살균된 pH 4-7 수용액이다. 또한, 비경구 포물레이션은 하나 이상의 가용화제, 안정화제, 보존제, 습윤제, 에멀전화제, 및 분산제를 함유할 수 있다. 이러한 포물레이션은 살균 주입 가능한 매체, 살균제, 여과, 조사, 또는 열을 이용함으로써 살균될 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명의 조성물은 공지된 경피 전달 시스템(transdermal delivery system) 및 첨가제를 이용하여 경피 투여될 수 있다. 예컨대, 활성제는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 모노라우레이트, 아자시클로알칸-2-온(azacycloalkan-2-one) 등과 같은 체내침투 촉진제와 혼합될 수 있고, 패치 또는 유사한 전달 시스템으로 도입된다. 겔화제, 에멀전화제 및 완충액을 포함하는 추가적인 첨가제는 필요에 따라 이러한 경피 조성물에 이용될 수 있다.

[0063] 2개의 조성물을 투여하는 일부 경우에, 활성제와 2차제(secondary agent)를 함유하는 단일 조성물을 투여하는 일부 경우에, RPL554와 2차제를 혼합함으로써, 이중 요법, 즉 PDE3/PDE4 억제 활성 및 2차제(무스카린성 리셉터 길항 물질)와 관련된 활성이 수행될 수 있다. 요법의 조합으로, 투여되는 RPL554의 양 및 2차제의 양은 일반적



으로 단일 요법으로 투여되는 양보다 적을 수 있다.

[0064] RPL554는 두 가지 제제를 함유하는 조성물을 형성하기 위해 제2 활성제(무스카린성 리셉터 길항 물질)와 물리적으로 혼합될 수 있거나; 또는 각각의 제제가 동시에 또는 순차적으로 피험자에 투여되는 분리된 및 별개의 조성물로 존재할 수 있다. 예컨대, RPL554는 RPL554 및 제2 활성제를 포함하는 활성제의 조합을 형성하기 위해 종래의 절차 및 기기를 이용하여 제2 활성제와 조합될 수 있다. 추가적으로, 활성제는 RPL554, 제2 활성제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 형성하기 위해 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합될 수 있다. 이 실시형태에서, 조성물의 성분은 일반적으로 물리적 혼합물을 형성하기 위해 혼합 또는 블렌딩된다. 그 후, 물리적 혼합물은 여기에 기재되는 임의의 경로를 이용하여 치료학적으로 유효한 양으로 투여된다.

[0065] 또는, 활성제는 피험자에 투여하기 전에 따로 및 별개로 유지될 수 있다. 이 실시형태에서, 제제는 동시에 또는 분리된 조성물로 분리된 시간에 투여되지만, 투여 전에 함께 물리적으로 혼합되지 않는다. 이러한 혼합물은 따로 패키징되거나 또는 키트로 함께 패키징될 수 있다. 분리된 시간에 투여되는 경우에, 2차제는 일반적으로 RPL554의 투여 후 24시간 미만에 투여될 것이다. 다른 실시형태에서, 이러한 정기적 관계는 12시간 미만, 8시간 미만, 6시간 미만, 4시간 미만, 3시간 미만, 1시간 미만, 30분 미만, 10분 미만, 1분 미만, 또는 RPL554 투여 직후이다. 또한, 이는 연속 투여라고도 한다. 따라서, RPL554는 각각의 활성제에 분리된 칸(예컨대 블리스터 팩)을 적용하는 흡입 전달 장치를 이용하여 다른 활성제와 동시에 또는 순차적으로 흡입에 의해 투여될 수 있고, 여기서 순차적은 RPL554의 투여 직후 또는 소정의 시간 후에 투여되는 것을 의미하는 것일 수 있다(예컨대 1시간 후 또는 3시간 후). 또는, 조합은 분리된 전달 장치, 즉 각각의 제제용 하나의 전달 장치를 이용하여 투여될 수 있다. 추가적으로, 제제는 다양한 투여 경로, 즉 흡입에 의해 및 경구 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0066] 일반적으로, 키트는 본 발명의 방법을 수행하기에 충분한 양으로, RPL554를 포함하는 제1 복용 형태 및 여기에 설명하는 하나 이상의 2차제를 포함하는 적어도 하나의 추가적인 복용 형태를 포함한다. 제1 복용 형태 및 제2(또는 제3 등) 복용 형태는 피험자에 질병 또는 질환의 치료 또는 예방을 위한 활성제의 치료학적으로 유효한 양을 함께 포함한다. 포함되는 경우에, 2차제는 치료학적 유효량으로 존재하고, 즉 일반적으로 RPL554와 함께 투여되는 경우에 치료학적으로 유리한 효과를 생성하는 양으로 투여된다. 2차제는 약제학적으로 허용되는 산부가 염, 용매, 선택적으로 순수한 스테레오이소머 등의 형태일 수 있다. 따라서, 이하에 나열되는 2차제는 이러한 형태 전체를 포함하는 것이고, 시판되거나 또는 종래의 절차 및 시약을 이용하여 제조될 수 있다. 2차제의 적합한 양은 일반적으로 약 0.05  $\mu\text{g/day}$  내지 약 500 mg/day의 범위이다.

[0067] 질병 및 질환

[0068] (a) 여기에 정의된 PDE3/PDE4 억제제 및 (b) 여기에 정의된 무스카린성 리셉터 길항 물질의 조합은 필요로 하는 피험자에, (i) 혈관 또는 기관지의 급성 또는 만성 폐색 또는 (ii) 급성 또는 만성 염증에 기초한 질병 또는 질환의 치료에 유용하다.

[0069] 일반적으로, 질병 및 질환은 이하로부터 선택된다:

[0070] 1. 기도: 기관지, 알러지, 내재적, 외재적, 운동 유발된, 약물-유발된(아스피린 및 NSAID-유발된 것을 포함) 및 먼지-유발된 천식을 포함하고, 간헐적 및 지속적 및 모든 중증도, 및 기도 과민증의 다른 원인을 포함하는 천식; COPD(chronic obstructive pulmonary disease); 감염성 및 호산성 기관지염을 포함하는 기관지염; 폐기종(emphysema); 기관지 확장증(bronchiectasis); 낭성 섬유증(cystic fibrosis); 유육종증(sarcoidosis); 농부폐(farmer's lung) 및 관련 질병; 과민성 폐장염(hypersensitivity pneumonitis); 잠재 섬유성 폐포염(cryptogenic fibrosing alveolitis), 특발성 간질성 폐렴(idiopathic interstitial pneumonias), 항종양 요법을 어렵게 하는 섬유증 및 결핵 및 아스페르길루스증 및 다른 균에 의한 감염을 포함하는 만성 감염을 포함하는 폐 섬유증; 폐 이식 합병증(complications of lung transplantation); 폐 맥관 구조의 혈관 및 혈전증 장애(vasculitic and thrombotic disorders of the lung vasculature), 및 폐고혈압(pulmonary hypertension); 기도의 염증 및 분비 질환과 관련된 만성 기침, 및 의인성 기침(iatrogenic cough)의 치료를 포함하는 진해 활성(antitussive activity); 약물성 비염(rhinitis medicamentosa) 및 혈관 운동성 비염(vasomotor rhinitis)을 포함하는 급성 및 만성 비염; 비염 부진(rhinitis nervosa)(고초열(hay fever))을 포함하는 다년성 및 계절성 알러지 비염; 코의 물혹(nasal polyposis); 일반 감기 및 호흡기 세포 융합 바이러스, 인플루엔자, 코로나바이러스(SARS를 포함함) 및 아데노바이러스에 기인한 감염을 포함하는 급성 바이러스성 감염을 포함하는 기도의 장애 질병.

- [0071] 2. 뼈 및 관절: 예컨대 선천형 고관절 탈구(congenital hip dysplasia)의 1차 및 2차, 골관절염(osteoarthritis)/무릎관절증(osteoarthrosis)을 포함하거나 이와 관련된 관절염; 경신경 및 요추의 척추염(cervical and lumbar spondylitis), 및 요통 및 경부통; 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) 및 스틸병(Still's disease); 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 반응성 관절염(reactive arthritis) 및 미분화 척추관절병(undifferentiated spondarthropathy)을 포함하는 혈청 음성 척추관절증(seronegative spondyloarthropathies); 포즈병 및 풍세 증후군을 포함하는 결핵과 같은 화농성 관절염 및 다른 감염 관련 관절증 및 뼈질환(septic arthritis and other infection-related arthropathies and bone disorders such as tuberculosis, including Potts' disease and Poncet's syndrome); 요산 통풍, 칼슘 피로인산염 증착 질환 및 칼슘 인회석 관련된 힘줄, 점액낭 및 활막 염증을 포함하는 급성 및 만성 결정-유도된 윤활막염; 베체트병; 1차 및 2차 쇼그렌 증후군; 전신 경화증 및 제한된 경피증(systemic sclerosis and limited scleroderma); 전신 홍반 루프스(systemic lupus erythematosus), 혼합 결합 조직병(mixed connective tissue disease), 및 미분화 결합 조직 질환(undifferentiated connective tissue disease); 피부근염(dermatomyositis) 및 다발성 근염(polymyositis)을 포함하는 염증성 근병증(inflammatory myopathies); 류마티스성 다발성 근육통(polymyalgia rheumatica); 임의의 관절 분배의 특발성 염증성 관절염 및 관련 증후군, 및 류마티스 열 및 전신 합병증을 포함하는 청소년 관절염(juvenile arthritis including idiopathic inflammatory arthritides of whatever joint distribution and associated syndromes, and rheumatic fever and its systemic complications); 거대 세포 동맥염(giant cell arteritis), 타카야수 동맥염(Takayasu's arteritis), 처그-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 결정성 다발 동맥염(polyarteritis nodosa), 현미경적 다발성 동맥염(microscopic polyarteritis), 및 바이러스 감염, 과민 반응, 한랭글로불린 및 파라단백질과 관련된 맥관염(vasculitides associated with viral infection, hypersensitivity reactions, cryoglobulins, and paraproteins)을 포함하는 맥관염; 요통; 가족성 지중해 열(Familial Mediterranean fever), 무클-웰스 증후군(Muckle-Wells syndrome), 및 가족성 동면성열(Familial Hibernian Fever), 키쿠치 질환(Kikuchi disease); 약물 유발 관절통(drug-induced arthralgias), 건염(tendonitides) 및 근육 병증(myopathies).
- [0072] 3. 통증[예컨대 선수 상해] 또는 부상으로 인한 근골격 질환의 통증 및 결합 조직의 리모델링: 관절염(예컨대 류마티스 관절염, 골관절염, 통풍 또는 결정 관절증), 다른 관절 질환(예컨대 척추사이원반 변성(intervertebral disc degeneration) 또는 턱관절 변성(temporomandibular joint degeneration)), 뼈 리모델링 질환(예컨대 골다공증(osteoporosis), 파제트병(Paget's disease) 또는 골괴사(osteonecrosis)), 다연골염(polychondritits), 피부 경화증(scleroderma), 혼합 결합 조직 질환, 척추 관절 병증(spondyloarthropathies) 또는 치주 질환(periodontal disease)(예컨대 치주염(periodontitis));
- [0073] 4. 피부: 건선(psoriasis), 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염(contact dermatitis) 또는 기타 습진성 피부염(eczematous dermatoses), 및 지연형 과민 반응(delayed-type hypersensitivity reactions); 식물피부염 및 광 피부염(phyto- and photodermatitis); 지루성 피부염(seborrheic dermatitis), 포진(dermatitis herpetiformis), 편평 태선(lichen planus), 경화성 태선(lichen sclerosus et atrophica), 농피증의 괴저(pyoderma gangrenosum), 피부 사르코이드(skin sarcoid), 원반상 홍반 루푸스(discoïd lupus erythematosus), 천포창(pemphigus), 유사 천포창(pemphigoid), 표피 수포증(epidermolysis bullosa), 두드러기(urticaria), 혈관 부종(angioedema), 혈관염(vasculitides), 독성 홍반(toxic erythemas), 피부 호산 백혈구 증가증(cutaneous eosinophilias), 원형 탈모증(alopecia areata), 남성형 대머리(male-pattern baldness), 스위트 증후군(Sweet's syndrome), 웨버 크리스찬 증후군(Weber-Christian syndrome), 다형 홍반(erythema multiforme); 봉와직염(cellulitis), 감염성 및 비감염성; 지방층염(panniculitis); 피부 림프종(cutaneous lymphomas), 흑색종이 아닌 피부암(non-melanoma skin cancer) 및 기타 이형성 병변(dysplastic lesions); 고정 약물 발진을 포함한 약물 유발 장애(drug-induced disorders including fixed drug eruptions);
- [0074] 5. 눈: 안검염(blepharitis); 다년생 및 봄철 알러지성 결막염을 포함하는 결막염(conjunctivitis); 홍채염(iritis); 전방 및 후방 포도막염(anterior and posterior uveitis); 맥락막염(choroiditis); 자가 면역(autoimmune); 망막에 영향을 미치는 퇴행성 또는 염증성 장애(degenerative or inflammatory disorders affecting the retina); 교감안염을 포함하는 안염(ophthalmitis including sympathetic ophthalmitis); 사르코이드증(sarcoidosis); 바이러스, 곰팡이, 박테리아를 포함하는 감염;
- [0075] 6. 위장관: 설염(glossitis), 치은염(gingivitis), 치주염(periodontitis); 역류성을 포함하는 식도염; 호산구

성 위장염(eosinophilic gastro-enteritis), 비만 세포증(mastocytosis), 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 직장염(proctitis), 항문 소양증(pruritis ani)을 포함하는 대장염(colitis); 세리악병(coeliac disease), 과민성 대장 증후군(irritable bowel syndrome), 및 위장으로부터 떨어진 효과를 가질 수 있는 음식 관련 알러지(예컨대 편두통, 비염 또는 습진);

[0076] 7. 복부: 자가 면역, 알콜성 및 바이러스성을 포함하는 간염; 섬유화 및 간경화(fibrosis and cirrhosis of the liver); 담낭염(cholecystitis); 급성 및 만성 췌장염(pancreatitis);

[0077] 8. 비뇨 생식기 : 간질과 사구체 신염을 포함하는 신장염(nephritis including interstitial and glomerulonephritis); 신 증후군(nephrotic syndrome); 급성 및 만성 (간질(interstitial)) 방광염과 휴너 궤양(Hunner's ulcer)을 포함하는 방광염(cystitis); 급성 및 만성 요도염(urethritis), 전립선염(prostatitis), 부고환염(epididymitis), 난소염(oophoritis) 및 난관염(salpingitis); 외음부 질염(vulvo-vaginitis); 페이로니병(Peyronie's disease); (남성 및 여성 모두) 발기 부전(erecile dysfunction);

[0078] 9. 동종 이식 거부 반응 : 급성 및 만성 이후(acute and chronic following), 예컨대, 신장, 심장, 간, 폐, 골수, 피부 또는 각막의 이식 또는 이후 수혈; 또는 만성 이식 편대 숙주 반응(chronic graft versus host disease);

[0079] 10. CNS: 알츠하이머병 및 CJD와 nvCJD를 포함하는 다른 치매성 장애(dementing disorder); 아밀로이드증(amyloidosis); 다발성 경화증 및 기타 탈수초성 증후군(demyelinating syndromes); 대뇌 동맥 경화(cerebral atherosclerosis) 및 혈관염(vasculitis); 측두 동맥염(temporal arteritis); 중증 근무력증(myasthenia gravis); 내장 통증(visceral pain), 두통, 편두통, 삼차 신경통(trigeminal neuralgia), 비전형 안면 통증(atypical facial pain), 관절 및 뼈 통증, 암 및 종양 침입으로 발생하는 통증, 당뇨병(diabetic), 대상포진 후(post-herpetic), 및 HIV-관련 신경 장애를 포함하는 신경병증 통증 증후군을 포함하는 급성 및 만성 통증(급성, 간헐적 또는 지속적, 중앙 또는 주변 기원 여부); 신경유육종증(neurosarcoidosis); 악성, 감염 또는 자가면역 프로세스의 중추 및 말초 신경계 합병증;

[0080] 11. 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 그레이브스병(Graves' disease), 애디슨병(Addison's disease), 진성 당뇨병(diabetes mellitus), 특발성 혈소판 감소증(idiopathic thrombocytopaenic purpura), 호산성근막염, 고면역글로블린 E 증후군(hyper-IgE syndrome), 항인지질항체증후군을 포함하는 다른 자가면역 및 알러지 질환;

[0081] 12. 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS), 나병(leprosy), 시자리 증후군(Sezary syndrome), 및 부신 생물 증후군(paraneoplastic syndromes)을 포함하는, 염증 또는 면역학적 요소를 갖는 다른 질환;

[0082] 13. 심혈관: 관상 및 말초 순환에 영향을 미치는 죽상 경화증(atherosclerosis, affecting the coronary and peripheral circulation); 심막염(pericarditis); 심근염(myocarditis), 심근 사르코이드를 포함하는 염증 및 자가면역 심근병증; 허혈성 재관류 손상(ischaemic reperfusion injuries); 심내막염(endocarditis), 판막염(valvulitis) 및 감염을 포함하는 대동맥염(예컨대 매독); 혈관염(vasculitides); 심부정맥 혈전증(deep vein thrombosis) 및 정맥류(varicose veins)의 합병증을 포함하는 정맥염(phlebitis) 및 혈전증(thrombosis)을 포함하는 근위 및 말초 혈관 질환;

[0083] 14. 종양학: 전이성 질환 및 종양의 재발 및 부수종양성 증후군의 예방 및 치료를 포함하는, 전립선, 유방, 폐, 난소, 췌장, 창자 및 결장, 위, 피부 및 뇌 종양을 포함하는 일반적인 암 및 골수(백혈병(leukaemias) 포함) 및 호지킨 및 비호지킨 림프종(Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma)과 같은 림프증식 시스템(lymphoproliferative systems)에 영향을 미치는 악성 종양의 치료; 및

[0084] 15. 위장관: 복강 질환(Coeliac disease), 직장염(proctitis), 호산성 위장염(eosinophilic gastro-enteritis), 비만 세포증(mastocytosis), 크론병, 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 미세 장염(microscopic colitis), 불확정 대장염(indeterminant colitis), 과민성 대장 질환(irritable bowel disorder), 과민성 대장 증후군, 비염증성 설사(non-inflammatory diarrhea), 위장으로부터 떨어진 효과를 가질 수 있는 음식 관련 알러지(예컨대 편두통, 비염 또는 습진).

[0085] 바람직하게, 질병 또는 질환은 천식, 알러지 천식, 고초열, 알러지 비염, 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, COPD, ARDS, 스테로이드 내성 천식(steroid resistant asthma), 심한 천식, 소아 천식, 만성 섬유증, 폐 섬유증(lung fibrosis), 폐 섬유화증(pulmonary fibrosis), 간질성 폐질환, 피부질환, 아토피 피부염, 건선,



눈염증, 대뇌허혈 또는 자가면역 질환이다.

[0086] 더욱 바람직하게, 질병 또는 질환은 천식 또는 COPD이다.

[0087] 다뤄지는 피험자는 일반적으로 인간이다.

[0088] 일반적으로, 활성 성분 (a) 및 (b)는 함께 투여된다(co-administered). 바람직하게, 활성 성분 (a) 및 (b)는 단일 복용 형태로 함유된다.

[0089] 또는 활성 성분 (a) 및 (b)는 따로 투여될 수 있다. 활성 성분 (a) 및 (b)의 투여 사이에 시간의 지연이 있을 수 있다.

[0090] 활성 성분 (a) 및 (b)는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 활성 성분 (a) 및 (b)는 에어로졸에 의해 투여될 수 있다.

[0091] 복용 단위당 투여되는 활성제의 양 또는 하루에 투여되는 총 양은 미리 결정될 수 있거나, 환자 상태의 중증도 및 특성, 치료되는 상태, 환자의 나이, 체중 및 일반적인 건강 상태, 활성 성분 (a) 및 (b)에 대한 환자의 내성, 투여 경로, 활성제의 활성, 효능, 약동학 및 독성학 프로파일 및 어떤 2차제가 투여될 것인지 등을 포함하는 수많은 요소를 고려함으로써 각각의 환자에 대해 결정될 수 있다. 질병 또는 질환(예컨대 COPD)으로 고통 받는 환자의 치료는 소정의 복용량 또는 의사의 치료에 의해 결정되는 복용량으로 시작할 수 있고, 질병 또는 질환의 증상을 예방, 개선, 억제 또는 완화하기 위해 필요한 기간 동안 계속될 것이다. 이러한 치료하에 있는 환자는 일반적으로 치료 요법의 유효성을 결정하기 위해 일상을 기반으로 모니터링될 것이다. 예컨대, COPD의 치료에서, 노력 호기량(forced expiratory volume)의 현저한 개선(1초에 측정되는)은 치료의 유효성을 결정하기 위해 이용될 수 있다. 여기에 기재되는 다른 질병 및 질환을 위한 유사한 지표는 당업자에게 잘 알려져 있고, 의사의 치료에 쉽게 이용 가능하다. 의사에 의한 연속적 모니터링은, 활성제의 최적의 양을 임의의 주어진 시간에 투여할 수 있고, 치료 동안의 결정을 용이하게 하는 것을 보증할 것이다. 이들의 선택, 복용량, 및 요법의 기간도 조절을 필요로 할 수 있기 때문에, 2차제가 투여되는 경우에, 이는 특정값을 갖는다. 이렇게 하여, 치료 요법 및 복용 스케줄은 요법의 코스에 걸쳐 조절되어, 소망한 유효성을 보이는 활성제의 최저량이 투여되고, 또한 질병 또는 질환을 성공적으로 치료하기 위해 필요한 한 투여가 계속될 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 인간 및 이들의 애완동물(예컨대 개, 고양이 등)을 포함하는 포유류의 평활근 질환의 치료에 유용하다. 이러한 평활근 질환은, 예컨대 과민성 방광(overactive bladder), 만성 폐쇄성 폐질환 및 과민성 대장 증후군을 포함한다. 일반적으로, 평활근 질환 또는 무스카린성 리셉터에 의해 조절되는 다른 질환을 치료하기 위해 적합한 양은 약 0.15  $\mu\text{g/kg/day}$  내지 5 mg/kg/day를 포함하는 약 0.14  $\mu\text{g/kg/day}$  내지 약 7 mg/kg/day의 활성제의 범위일 것이다. 평균 70 kg 인간에 대해서, 하루에 약 10  $\mu\text{g}$  내지 하루에 약 500 mg의 양일 것이다.

[0092] 일반적으로, 본 발명의 조성물은, 조성물의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여함으로써, 인간을 포함하는 포유류에서, COPD 또는 천식과 같은 폐 또는 호흡기 질환의 치료에 유용하다. 일반적으로 폐 질환의 치료를 위한 양은 약 10-1500  $\mu\text{g/day}$  범위일 것이다. "COPD"는 Barnes (2000) N. Engl. J. Med. 343:269-78 및 여기에 참조된 문헌에 예시된 바와 같이, 만성 기관지염 및 폐기종을 포함하는 다양한 호흡기 질환을 포함하는 것으로 당업자에게 이해된다.

[0093] 흡입에 의해 투여되는 경우에, 본 발명의 조성물은 일반적으로 기관지 확장(bronchodilation)을 형성하는 효과가 있다. 따라서, 이 방법의 다른 측면에서, 본 발명은, 본 발명의 조성물의 기관지 확장-형성 양을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 환자의 기관지 확장 형성 방법을 가리킨다. 일반적으로, 기관지 확장을 형성하기 위한 치료학적 유효량은 약 10-1500  $\mu\text{g/day}$ 의 범위일 것이다.

[0094] 또는, 본 발명의 조성물은 과민성 방광을 치료하기 위해 이용될 수 있다. 과민성 방광을 치료하기 위해 이용되는 경우에, 일반적인 양은 약 1.0-500 mg/day의 범위일 것이다. 또는, 본 발명의 조성물은 과민성 대장 증후군을 치료하기 위해 이용될 수 있다. 과민성 대장 증후군을 치료하기 위해 이용되는 경우에, 본 발명의 조성물은 일반적으로 경구 또는 직장투여될 것이고, 일반적인 복용량은 약 1.0-500 mg/day의 범위일 것이다.

[0095] 본 발명의 발견은, RPL554는 혈압 또는 심박율에 대해서 무스카린성 리셉터 길항 물질(예컨대 아트로핀)과 반대로 상호 작용하지 않는다는 이하 안전 연구이다. 마찬가지로, 무스카린성 리셉터 길항 물질(예컨대 아트로핀)의 심혈관 효과는 RPL554에 의해 영향받지 않는다.

[0096] 이하 실시예는 본 발명을 설명한다.

- [0097] 실시예
- [0098] 실시예 1
- [0099] 재료 및 방법
- [0100] 조직의 제조
- [0101] 만성 기도 질환의 병력이 없지만, 폐암 수술을 겪은 24 피험자(11 남자 및 13 여자,  $60.1 \pm 1.6$ 세)로부터 절제된 비연관 영역으로부터, 육안으로 보았을 때 보통의 폐의 영역을 채취한다.
- [0102] 기도는 시클로옥시제나아제(COX) 억제제 인도메타신 ( $5.0 \mu\text{M}$ )을 함유하는 산소화된 크랩스-헨셀렛 완충액 (oxygenated Krebs-Henseleit buffer solution (KH) (mM: NaCl 119.0, KCl 5.4,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25.0, 글루코오스 11.7; pH 7.4)에 즉시 넣고, "Regina Elena National Cancer Institute" 또는 "Sant'Andrea Hospital"에서 이태리 로마의 "Tor Vergata University"의 수술 및 의학 학부의 호흡기 연구 실험실로  $4^\circ\text{C}$ 에서 이송했다. 피험자 중 누구도 테오필린,  $\beta_2$ -작용 물질 또는 글루코코르티코스테로이드로 만성 적으로 치료되지 않았다. 수술일에 측정된 혈청 IgE 레벨은 보통의 범위였다. 수술 전 폐 기능 파라미터는 일반적으로 보통이었고, 호흡기 감염의 흔적은 없었다.
- [0103] 실험실에서, 기도는 결합 및 치조의 조직으로부터 해부되었다. 그 후, 단편의 기관지는 분리되고, 밤새 냉장 온도에서 KH 완충액에 저장되었다. 다음날 아침, 기관지를 링( $n=120$ ; 두께: 1-2 mm; 직경: 5-7 mm)으로 자르고, KH 완충액 ( $37^\circ\text{C}$ )을 함유하고, 95:5%  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ 의 혼합물로 가스가 첨가되는 4400 4-챔버 10 ml의 적출 기관 베스(Ugo Basile, VA - 이태리)로 전달했다.
- [0104] 약물의 제조
- [0105] 이하 약물이 사용되었다: 아세틸콜린, 히스타민, 아트로핀, 파파베린 및 인도메타신. 모든 물질은 Sigma-Aldrich (St. Louis, 미국) 제품이다. 약물을 인도메타신 및 퀴닌을 제외하고 증류수에 녹이고, 이를 에탄올에 용해한 후 KH 완충액으로 희석했다. 에탄올(0.02%)의 최대량은 분리된 조직 반응에 영향을 주지 않는다(Freas et al., 1989; Hatake and Wakabayashi, 2000). RPL554는 Verona Pharma PLC, London, UK로부터 제공되었다. 화합물은 사용 시까지  $-80^\circ\text{C}$ 에서 작은 부분 표본으로 저장되었다.
- [0106] 긴장 측정
- [0107] 인간 기관지를 95% $\text{O}_2$ /5% $\text{CO}_2$ 로 버블링되고, 수동 장력( $0.5 - 1.0 \text{ g}$ ) 하에 현탁되는 인도메타신 ( $5.0 \mu\text{M}$ )으로 조 절되는 KH 완충액( $37^\circ\text{C}$ )을 함유하는 기관 베스에 놓았다. 기관지 고리를 기관 베스의 후크에 고정시키고, 하나의 후크는 고정바에 끼워져 부착되고, 다른 후크는 같은 크기의 힘 변위 트랜스듀서에 끼워져 묶인다. 기도는 매 10분 조절된 KH 완충액의 반복 변화로 90분 동안 평형이 되게 하였다. 같은 크기의 장력의 변화는 트랜스듀서로 측정되고(Fort 10 WPI, Basile, Instruments, 이태리), 조직 반응성은 아세틸콜린 ( $100 \mu\text{M}$ )으로 평가했다; 반응이 안정기에 도달하는 경우, 고리를 3번 세정하고, 45분 동안 평형이 되게 하였다.
- [0108] 연구 고안
- [0109] 전기장 자극에 대한 RPL554의 영향
- [0110] 각각의 기관 베스를 전기장 자극(EFS)을 위해 조직 (10mm 조각) 옆에 위치한 2개의 플래티늄판 전극( $1\text{cm}^2$ )을 맞추었다. 실험은, 10Hz EFS(정전류 10V, 0.5ms, 10s의 양극 펄스)의 트레인을 이용하여, 3165 다중화 펄스 부스터(Ugo Basile, VA - 이태리)에 의해 처음 1시간 동안 매 5분 하나의 펄스 후 다음 5시간 동안 30분 간격으로 수행하였다(Binks et al., 2001). EFS 트레인 시작 후, EFS에 대한 수축 반응의 최대 억제가 얻어질 때까지 조직을 RPL554 ( $10$  또는  $100 \mu\text{M}$ )로 배양했다. 그 후, 약물 배양이 종결되고, 조직은 30분에 걸쳐 반복적으로 세정된 후, 약물 투여 후 매 30분 내지 5시간까지 한번 세정되었다.
- [0111] 소극적으로 예민해진 기관지에 대한 RPL554의 이완 효과
- [0112] 인간으로부터 분리된 기관지 고리는, 다른 곳(Watson et al., 1997; Rabe, 1998)에서 기재된 바와 같이, 10% vol $^{-1}$  민감 혈청(민감화된 고리)의 존재 또는 부재(비민감화된 대조군 고리) 하에 KH 완충액을 함유하는 관 내의 실온에서 밤새 회전되었다. 악화(exacerbation) 동안 아토피 천식으로 고통 받는 피험자(일반 공기 알레르겐에

대해 특이적으로 총 IgE  $>250 \text{ U ml}^{-1}$ )는 혈청 기증을 위해 승인된 인가가 제공되었다. 혈청은 전체 혈액의 원심 분리에 의해 제조되고, 혈청 시료는 요구될 때까지 200 ml의 부분 표본 중  $-80^\circ\text{C}$ 에서 동결되었다.

[0113] 다음날 아침, 치조 및 결합 조직의 부작을 제거한 후, 기관지 고리를 KH 완충액 ( $37^\circ\text{C}$ )을 함유하는 기관 배스로 옮기고, 연속적으로 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  가스를 주입했다. 조직을 RPL554 (1, 10 및  $100 \mu\text{M}$ )와 함께 30분 동안 미리 배양한 후, RPL554의 존재 하에 히스타민( $10\text{nM} - 1\text{mM}$ )에 대한 농도 반응 곡선을 작성했다(세정 없이).

[0114] RPL554와 무스카린성 리셉터 길항 물질의 시너지 효과

[0115] RPL554와 무스카린성 리셉터 길항 물질의 조합에 의해 유도되는 가능한 시너지 완화를 시험하기 위해, 기관지 고리를 최대 효과의 70% ( $\text{EC}_{70}$ )를 야기하도록 요구되는 농도에서 아세틸콜린으로 수축시키고, 15분 안정 기간을 부여했다. 그 후, 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 이소볼의 그래프(isobolar graph)를 형성하기 위해, 개별 화합물 RPL554 및 무스카린성 리셉터 길항 물질 단독; 또한 무스카린성 리셉터 길항 물질과의 조합으로 투여되는 RPL554를 시험하기 위해 수축 반응 곡선을 작성했다(Greco et al., 1995; Tallarida, 2001; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010).

[0116] 연속 농도 사이 20분 간격은 다음 농도의 투여 전에 완화의 안정한 레벨에 도달시키기 위해 이용되었다. 실험 완료 후, 조직을 완전히 안정시키고, 각각의 조직의 안정이 비교될 수 있는 표준을 제공하기 위해 파파베린( $500 \mu\text{M}$ )이 첨가되었다.

[0117] 결과의 분석

[0118] EFS 연구의 분석

[0119] EFS에 의해 유도되는 기관지 수축 긴장은 대조군 기관지의 퍼센트로 측정되고, 다른 곳에 기재되는 비선형 회귀를 이용하여 생물학적 데이터의 모델을 피팅함으로써 다항 곡선이 작성되었다(Motulsky and Christopoulos, 2004). EFS 자극에 의해 유도되는 최저 수축력으로 최대 효과( $\text{E}_{\text{max}}$ )를 정의하였고, 오프셋( $t_{1/2}$ , min)은 최대 완화의 반이 되게 하는 시간을 나타낸다. 분리된 기관 배스 시스템에 고정되는 각각의 2개의 기관지 고리에서, 하나는 다른 곳에 기재된 바와 같이 시간 대조군으로 이용된다(Mercier et al., 2002).

[0120] 수축 반응 연구의 분석

[0121] S자 모델로 적절한 곡선 피팅은 효과( $\text{E}$ ),  $\text{E}_{\text{max}}$  및 최대 효과의 50% ( $\text{EC}_{50}$ )를 야기하도록 요구되는 농도를 산출하기 위해 이용된다. 사용되는 방정식은  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / \{1 + 10^{[(\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}]}\}$ 로 나타내는 가변형 슬로프,  $\log[\text{작용 물질}]$  vs. 반응이다(Motulsky and Christopoulos, 2004; Goodman et al., 2008).  $\text{E}/\text{E}_{\text{max}}$ 는 수축 작용제에 의해 끌어내는  $\text{E}_{\text{max}}$ 의 퍼센트로 나타내고;  $\text{EC}_{50}$  값은 통계적 분석을 위해  $\text{pD}_2$ 로 전환되고(Goodman et al., 2008), 이완 반응은 완화로 유도되는 파파베린( $500 \mu\text{M}$ )의 퍼센트로 나타낸다.

[0122] 시너지즘 연구의 분석

[0123] RPL554와 무스카린 리셉터 길항 물질 사이의 잠재적 시너지즘의 분석은 베렌바움법, BI(Bliss Independence) 기준 및 곡선의 이소볼을 통한 LA(Loewe Additivity) 모델을 적용함으로써 측정된다(Berenbaum, 1977; Greco et al., 1995; Grabovsky and Tallarida, 2004; Tallarida, 2006; Goldoni and Johansson, 2007; Tallarida and Raffa, 2010).

[0124] 베렌바움법을 적용하기 위해,  $\text{EC}_{50}$  값의 상호 작용 지표가 평가되었고, 따라서, 만약 상호 작용 지표가  $<1$ 인 경우, 효과는 시너지적이라 간주되었고; 상호 작용 지표가  $>1$ 인 경우, 효과가 길항적이고, 상호 작용 지표가  $= 0$ 인 경우 효과가 추가적인 것으로 간주되었다(Goldoni and Johansson, 2007; Lee, 2010).

[0125] 2가지 제제에 대한 BI 이론은 이하 방정식:  $\text{E}(x,y) = \text{E}_x + \text{E}_y - (\text{E}_x * \text{E}_y)$ 으로 나타내고, 여기서  $\text{E}$ 는 분수 효과(fractional effect)이고,  $x$  및  $y$ 는 조합 실험에서 2가지 화합물의 농도이다. 조합 효과가 상기 방정식으로부터 기대값보다 높은 경우, 상호 작용은 시너지적이라 간주되고, 이 효과가 더 낮은 경우, 상호 작용은 길항적이다. 그 외에는, 효과는 추가적이고, 상호 작용이 없었다(Greco et al., 1995; Meletiadis et al., 2003; Boucher and Tam, 2006; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010). 이 연구에서, BI 방정식은  $X = \text{RPL554}$  및  $Y = \text{무스카린성 리셉터 길항 물질}$ 로 나타낸다.

[0126] 각각의 폐의 기관지로부터 아트로핀 및 RPL554에 대한 대조군 농도 반응 곡선은  $\text{E}_{\text{max}}$ , 슬로프 (nH) 및 효능( $\text{EC}_{50}$ )의 파라미터 추정치를 산출하기 위해 4 파라미터 기호 논리적 방정식을 세웠다. 그 후, 아트로핀( $66 \pm$

14,  $0.912 \pm 0.488$ ,  $1.181 (0.134 - 10.4) \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ , 각각) 및 RPL554( $100 \pm 0$ ,  $2.271 \pm 0.713$ ,  $21.2 (11.5 - 39.1) \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ , 각각)에 대한 이하 파라미터 추정치  $E_{\text{max}}$  및  $nH$  (평균  $\pm$  SD) 및  $EC_{50}$  (기하평균, 95% CI)는 시너지즘을 평가하기 위해 각각의 약물 짝 조합을 위한 추가적 반응을 산출하기 위해 이용되었다 (Tallarida and Raffa 2010)(Grabovsky and Tallarida 2004). 양 등가(dose equivalence)의 개념을 이용하여, 관계식  $a/A + b/B = 1$ 은  $b + \text{beq}(a) = B$ 로 새로 만들어지고, 여기서  $\text{beq}$ 는 등량(dose equivalent)이고, 2개의 각각의 농도 반응 곡선  $E_A=f(A)$  및  $E_B=f(B)$ 를 풀음으로써  $\text{beq}(a)$ 이 풀이된다. 그 후, B에 대한 각각의 양의 조합의 추가 반응( $E_{ab}$ )은  $E_B=f(B)$ 에 B를 넣음으로써 산출된다. 조합 양에 대한 관측된 완화 반응과 추가 반응 사이의 차이가 산출되고, 하나의 시료의 t-시험 및 다중 비교를 이용하여 분석되고, 확률은 본페로니 교정을 이용하여 다중 비교를 위해 조절된다. 설명을 위해, 1:1 양 조합이 시너지를 위해 분석된다.

[0127]

통계적 분석

[0128]

모든 값은 각각의 처리군에 대한 평균 $\pm$ SEM으로 나타낸다. 통계적 유의성은 필요에 따라 학생의 t 시험 또는 ANOVA(analysis of variance)에 의해 평가되고, 통계적 유의성의 레벨은  $P<0.05$ 로 정의된다(Motulsky, 1995). 모든 데이터 분석은 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 수행된다(GraphPad Prism, San Diego California USA; Microsoft Excel, Redmond Washington USA).

[0129]

아트로핀(무스카린 리셉터 길항 물질)과의 조합으로 투여되는 RPL554의 시너지 효과

[0130]

아트로핀과의 조합으로 투여된 RPL554에 의해 유도된 시너지 완화를 시험하기 위해, 기관지 고리를 최대 효과의 70% ( $EC_{70}$ )를 야기하도록 요구되는 농도에서 아세틸콜린으로 수축시키고, 15분 안정 기간을 부여했다. 그 후, 다른 곳에서 기재된 바와 같이, 이소볼의 그래프(isobolar graph)를 형성하기 위해, 개별 화합물 RPL554 및 아트로핀 단독; 또한 아트로핀과의 조합으로 투여되는 RPL554 (아트로핀:RPL554 및 10:1 내지 1:100의 범위)를 시험하기 위해 수축 반응 곡선을 작성했다(Greco et al., 1995; Tallarida, 2001; Goldoni and Johansson, 2007; Boik et al., 2008; Lee, 2010).

[0131]

연속 농도 사이 20분 간격은 다음 농도의 투여 전에 완화의 안정한 레벨에 도달시키기 위해 이용되었다. 실험 완료 시, 조직을 완전히 안정시키고, 각각의 조직의 안정이 비교될 수 있는 표준을 제공하기 위해 파파베린( $500 \mu\text{M}$ )이 첨가되었다.

[0132]

결과

[0133]

기관지 고리의 기준선 특성

[0134]

웨트한 무게( $220.5 \pm 16.5 \text{ mg}$ ), 아세틸콜린( $100 \mu\text{M}$ )에 의해 유도되는 수축 ( $440 \pm 95 \text{ mg}$ ) 및 약물로 처리하기 전 EFS (10Hz)로 유도된 수축( $445 \pm 98 \text{ mg}$ )을 고려한 연구에 적용되는 인간으로부터 분리된 기관지 고리의 기준선 특성 사이의 현저한 차이점은 없었다( $P>0.05$ ).

[0135]

예비 실험에서, 아세틸콜린(1 nM 내지 1 mM)에 대한 농도 반응 곡선은 이후 연구를 위해 준최대 반응(최대 반응의 약 70%;  $1250 \pm 190 \text{ mg}$ ;  $n=5$ )을 확립하기 위해 작성되었다.

[0136]

분리된 인간 기도의 기관지 톤에 대한 RPL554의 영향

[0137]

RPL554는 이 약물에 노출된 후 적어도 5시간 동안 유지되는 인간 기관지 조직의 EFS에 의해 유도되는 수축 반응을 억제했다(도 1). RPL554는 최대 농도  $100 \mu\text{M}$ 에서 이들 수축 반응을 없앴( $E_{\text{max}} 91.33 \pm 3.37\%$ ;  $T_{1/2} 23.7 \pm 12.3 \text{ min}$ ).

[0138]

RPL554는 아세틸콜린으로 미리 수축된 인간으로부터 분리된 기관지 조직의 농도 의존 완화를 야기했다. RPL554는 기관지 완화가 아트로핀보다 효능이 낮지만( $P<0.05$ ), 아트로핀과 반대로, RPL554는 조직을 완전히 완화시켰다( $P<0.001$ ). 각각의 폐의 기관지로부터 아트로핀 및 RPL554에 대한 대조군 농도 반응 곡선은  $E_{\text{max}}$ , 슬로프 ( $nH$ ) 및 효능 ( $EC_{50}$ )의 파라미터 추정치를 산출하기 위해 4 파라미터 기호 논리적 방정식을 세웠다. 이하 파라미터는  $E_{\text{max}}$  및  $nH$  (평균  $\pm$  SD) 및 아트로핀( $66 \pm 14$ ,  $0.912 \pm 0.488$ ,  $1.181 (0.134 - 10.4) \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ , 각각) 및 RPL554( $100 \pm 0$ ,  $2.271 \pm 0.713$ ,  $21.2 (11.5 - 39.1) \mu\text{M}$ ,  $n = 5$ , 각각)에 대한  $EC_{50}$  (기하평균, 95% CI)로 추정된다(도 2).

[0139]

기관지의 소극적인 민감성은 비민감화된 조직과 비교하여 히스타민의 수축 효과를 향상시킨다. 소극적으로 민감화된 기관지에서, 1 및  $10 \mu\text{M}$ 의 RPL554는, 히스타민에 의해 유도되는 수축을 완전히 없애는  $100 \mu\text{M}$ 의 RPL554 및 미처리된 조직과 비교하여 히스타민에 대한 농도 반응 곡선을 왼쪽으로 현저히( $P<0.001$ ) 이동시킨다

(도 3, 표 1).

표 1

표 1: 소극적으로 예민해진 기관지에서 히스타민에 의해 유도된 수축에 대한 RPL554의 효과. 표시한 데이터는 n=5의 다른 피험자의 시료로 수행된 실험으로부터 얻은 것이고, 이들은 평균±SEM으로 \*\*\*P<0.001 vs 소극적으로 예민해진 대조군을 나타낸다.

	예민해지지	소극적으로 예민해진			
	없음	대조군	RPL554 1uM	RPL554 10uM	RPL554 100uM
E <sub>max</sub>	100.7±1.7	101.8±1.4	70.3±2.7 ***	58.1±2.2 ***	nd
pD <sub>2</sub>	4.82±0.03 ***	5.29±0.03	4.97±0.07 ***	4.98±0.07 ***	nd

[0140]

[0141] 인간 기관지 톤에 대한 RPL554와 아트로핀의 시너지 이완 효과

[0142] RPL554와 아트로핀의 상호 작용은 1nM 내지 10 μM(1 nM: P<0.05; 10 nM 및 1 μM: P<0.01; 100 nM 및 10 μM: P<0.001)의 농도 범위에 걸쳐 RPL554의 현저한 시너지 효과를 형성하고, 최대 시너지점은 RPL554 1 μM 및 아트로핀 10 nM (BI 델타 효과: 0.54±0.09)의 교차 농도에서 검출된다. 더 낮은 농도의 RPL554 및 아트로핀은, 단독으로 제공되는 각각의 약물에 의해 유도되는 효과의 합과 비교하여, 4.85배 기관지 고리의 완화를 증가시킴으로써 시너지적으로(10 nM, P<0.05 및 100 nM, P<0.01) 상호 작용한다(도 4).

[0143] 아세틸콜린으로 미리 수축된 인간 기관지 톤에 대한 RPL554와 아트로핀의 동물 관계(1:1)의 결과는 완화 효능의 향상에 기초하여 통계학적으로 현저한 BI 상호 작용(P<0.01)을 나타낸다(표 2).

표 2

	RPL554 + 아트로핀	
	관측값	기대값
E <sub>max</sub>	97.87±1.50	98.68±7.91
pD <sub>2</sub>	7.54±0.31	5.55±0.33
델타 효능 (관측-기대)	1.99±0.10**	

표 2: 아세틸콜린에 의해 유도되는 준최대 수축에 대한 RPL554와 아트로핀(동물, 1:1)의 이완 시너지 효과. 표시한 데이터는 n=5의 다른 피험자의 시료로 수행된 실험으로부터 얻은 것이고, 이들은 평균±SEM으로 나타낸다. 제로-인터랙션 가설 델타 효과에 대해서 \*\*P<0.01 (관측값 vs 기대값).

[0144]

[0145] 또한, 베렌바움 분석은, RPL554와 아트로핀은 1 nM 내지 10 μM의 농도 범위에 걸쳐 RPL554의 시너지적 상호 작용을 끌어내고(상호 작용 지표: 0.09±0.07), RPL554는 2.91±0.44 로그(P<0.05)의 아트로핀에 대한 이완 농도 반응 곡선의 왼쪽으로의 이동을 야기하는 것을 설명한다. 시너지의 증거를 나타내는 아트로핀과 RPL554의 1:1 양의 조합에 대한 관측된 및 추가적인 완화 반응 사이에 통계적 유의한 차이가 있다.



- [0146] 마지막으로, BI법을 이용하는 3D 표면 분석은, RPL554와 함께 투여되는 경우에, 아트로핀은 모든 농도에서 확장되는 현저히 높고, 넓은 시너지 상호 작용을 유도하는 것을 설명한다(도 5).
- [0147] RPL554에 의한 PDE3/PDE4의 선택적 억제, 기니피그로부터 분리된 기도에 이전에 보고된 관측을 확장 및 지지하는 인간으로부터 분리된 기도의 기관지 톤의 완화를 끌어낸다는 것이 설명된다(Boswell-Smith et al., 2006b). 이러한 억제 효과는 인간의 기도에서 이러한 화합물의 작용의 지속 기간이 확인되는 약물 노출 종료 후 5시간까지 유지된다. 또한, RPL554는 히스타민 또는 아세틸콜린으로 수축되는 기도를 완화하는 작용을 한다. 또한, RPL554로의 조직의 예비 배양은 소극적으로 예민해진 기관지에 외인성으로 투여되는 히스타민의 수축 작용에 대해 조직을 현저히 보호하게 된다. 또한, 무스카린성 리셉터 길항 물질(아트로핀)과 관련된 PDE3/4의 억제는 ASM의 완화에 대한 시너지 효과를 설명한다. 이들 결과는, RPL554가 인간 기관지 조직의 수축 작용제에 대해 우수한 기능적 길항 물질이고, 무스카린 리셉터와 조합되는 경우에 더한 시너지적 기관지 확장을 제공하기 위한 능력을 가질 수 있다는 것을 보여준다.
- [0148] RPL554는, 다른 PDE4 억제제보다 EFS-유도된 수축 반응에 대해 상당히 긴 기간 작용을 가지고 EFS에 의해 유도되는 수축 반응의 농도 및 시간 의존 억제를 야기한다(Spina et al., 1998; Boswell-Smith et al., 2006b).
- [0149] RPL554는 히스타민으로 수축된 소극적으로 예민해진 인간 기관지에서 수축 반응의 억제에 특히 효과적이고, 다수의 선택적 PDE3 및 PDE4 억제제는 민감해진 기니피그의 항원에 의해 유도된 급성 기관지 경련을 상당히 악화시키는 것이 보고되었다(Boswell-Smith et al., 2006a).
- [0150] 또한, RPL554는 소극적으로 예민해진 기관지에 히스타민에 대한 최대 반응의 눈에 띄는 감소를 유도한다.
- [0151] 본 발명의 복합제의 안전성 연구
- [0152] 이 연구는 RPL554가 무스카린성 길항 물질(아트로핀)과 심혈관 상호 작용을 갖는지 결정하기 위해 수행되었다.  $\beta_2$  작용 물질(살부타몰)은 완성도를 위해 포함되었다. RPL554는 가능한 항염증 작용을 갖는 흡입되는 기관지 확장제로서 COPD 및 천식의 치료를 위해 개발된 이중 PDE3/PDE4 억제제이다. 정맥 볼루스 주사(intravenous bolus injection)로 제공되는 RPL554, 살부타몰 및 아트로핀에 대한 심혈관 반응은 심혈관 변화로 평가되고, 혈압 및 심박율의 피크 주사후 변화로 측정된다. 연구 고안은 교차 방법으로, 예컨대 RPL554 후 살부타몰 및 반대로 5분 간격의 짝으로 제공된 약물로 블라인드 및 랜덤이다. 연구를 위해 선택되는 복용량은 심혈관 효과, 및 아마 흡입으로 이용되는 것보다 매우 많이 플라즈마 농도를 생성한다. 대신에, 이들은 앞선 치료 상태 하에서 가능한 상호 작용을 위한 시험을 위해 선택된다.
- [0153] 요약
- [0154] 이 연구에서, 정맥으로 투여되는 RPL554, 살부타몰 및 아트로핀 단독 및 조합의 효과는, 마취시킨 레트의 혈압 및 심박율에 대해 랜덤화된 디자인에 따라 측정된다. 평균 혈압(MBP)의 15-30 mmHg 증가 및 심박율(HR)의 분당 30-60 beat의 증가를 형성하는 양은 RPL554 및 살부타몰의 최초 양-반응 연구로부터 선택된다. 혈압 또는 심박율에 대한 더 낮은 효과를 생성하는 아트로핀에 있어서, 투여되는 최대 복용량은 다른 연구를 위해 선택된다. 이후, 선택된 복용량은 5분 파트로 투여되는 쌍으로 측정된다. 연구로부터 얻어지는 데이터는, 마취시킨 레트의 MBP 또는 HR에 대한 효과의 관점에서 RPL554와 아트로핀 사이 또는 RPL554와 살부타몰 사이에 심혈관 기간(cardiovascular term)에 상호 작용이 없다는 것을 제안한다. 가능한 상호 작용을 엄격히 시험하기 위해, 연구에 선택되는 투여량 및 경로는 보통의 치료적 양으로 보이지 않는 심혈관 효과를 생성한다. 또한, 볼루스 정맥 경로는, 아마 흡입에 의해 제공되는 더 낮은 치료적 양으로 보이지 않는 것보다 매우 높은 플라즈마 농도를 야기한다. 연구의 의도는 앞선 치료 상태 하에서 가능한 상호 작용에 도전하기 위해 앞선 보통의 상태를 이용하는 것이다.
- [0155] 프로토콜
- [0156] 연구는 200-250grms 무게의 Charles River에서 입수한 수컷 레트(Sprague-Dawley male rat)에 수행했다. 레트가 실험실에 전달되면, 이들은 1-3시간 동안 음식과 물을 금지한다. 실험의 목적을 위해, 동물은 정맥 경로로 제공된 100mg/kg 양의 티오부타바비탈(thiobutabarbitol)로 마취된다. 추가 마취는 필요 없고, 실험 기간 마지막에, 각각의 레트는 희생된다. 연구는 두가지 파트를 갖는다: (I) 최초 복용-범위 연구(Initial dose-ranging study) 및 (II) 상호 작용 연구. 약물 연구는 식염에 RPL554 (R), 살부타몰 (S), 아트로핀 (A) 모두 용해된다.

- [0157] (I) 최초 복용-범위 연구
- [0158] 최초 복용-범위 연구는 다음과 같이 수행된다: 전체 연구를 위해 3가지 약물의 각각의 적절한 양을 결정하기 위해, 3가지 약물의 정맥 볼루스 양의 누계 양-반응 곡선이 수행되었다. 평균 혈압(MBP)의 15-30 mmHg 증가 및 심박율(HR)의 분당 30-60 beat의 증가를 생성하는 RPL554 또는 살부타몰의 복용량은 이러한 최초 복용-반응 연구로부터 선택된다. 아트로핀 생성된 제한된 심혈관 효과 및 높은 복용량은 깊은 무스카린성 리셉터 차단이 문헌적 증거가 있는 것 중 하나로 선택된다. 이러한 복용-범위 연구는 3가지 약물 각각의 누적 복용량이 복용-이중 기초 상에 제공되는 4마리 레트와 관련된다. 약물 각각의 복용량은 다양한 약물 사이에 1시간에 매 5분 정맥 볼루스 주사로 제공된다. 주사의 순서는 동물 1- S, R, A; 동물 2 - R, A, S; 동물 3- A, S, R 및 동물 4 - R, A, S이다. 상기 나타낸 바와 같이, 비범한 및 상기 복용량으로 선택되는 경우에, 주사의 양 및 경로는, 흡입에 의해 제공되는 경우에 효과를 생성한다.
- [0159] 이 연구로부터, 이하 상호 작용 연구를 위해 이하 복용량이 선택된다:
- [0160] R = 0.9% 식염 중 8  $\mu\text{g/kg}$  - 8  $\mu\text{g/mL}$
- [0161] S = 0.9% 식염 중 2  $\mu\text{g/kg}$  - 2  $\mu\text{g/mL}$
- [0162] A = 0.9% 식염 중 32  $\mu\text{g/kg}$  - 32  $\mu\text{g/mL}$
- [0163] (II) 상호 작용 연구
- [0164] 이 연구에서, 모든 약물은 체적 1 mL/kg로, 목정맥 캐놀러를 통해 정맥 볼루스 주사에 의해 단일 복용량으로 제공된다. 연구 디자인은 총 12마리 동물에 대해 4마리 동물을 함유하는 각각의 3 라인을 갖도록 블라인드 및 랜덤화된다.
- [0165] 약물의 짝은, 각각의 라인이 다음과 같이 주사된 4마리 레트가 함유되는 라인 디자인에 의한 라인을 이용하여 랜덤화된 블라인드에 기초하여 개별 동물에 제공된다: R1S2, S1R2, R1A2 및 A1R2 (임의의 순서로, 1은 제공된 첫번째 약물을 가리키고, 2는 첫번째 약물 후 5분에 제공된 두번째 약물을 가리킴). 3 라인 전체가 연구되고, 따라서 총 12마리 레트가 사용되고, 동물 중 어느 것도 대체되어서는 안된다. 연구는, 다른 연구가 정당하고, 만일 그렇다면 더 많은 라인 니/또는 복용 조절이 요구되는 경우에 결정하기 위해 일시적 분석의 목적을 위해 12 동물 후에 중단된다(적용할 수 있는 디자인).
- [0166] 혈압은 AD Instruments PowerLab 26T에 의해 출력이 가공되는 트랜스듀서를 이용하여 목동맥으로부터 측정된다. 심박율은 ECG 및 혈압 추적으로부터 비트를 기초로 비트를 산출한다. 분석은 LabChart 6에 의한다. 측정은 LabChart 6의 함수를 이용하여 수행된다.
- [0167] 모든 약물의 효과는 약물 각각의 주사에 대한 피크 반응 시간으로 측정된다. 살부타몰의 피크 반응 시간은 혈압 약 20초 및 심박율 60초이다. RPL554에 있어서, 대응하는 시간은 혈압 60-80초 및 심박율 2-4.5분이다. 아트로핀에 있어서, 혈압 및 심박율은 4분이다.
- [0168] 데이터는 수축, 확장으로 기록되고, 평균 혈압은 mmHg로 산출되지만 심박율은 beats/min로 기록된다. 기록된 값은 2개의 대조군 값으로부터 혈압 및 심박율의 약물 유도된 변화를 제공하기 위해 가공된다. 이들 중 하나는 첫번째 주사 전에 및 두번째 주사 전에 두번째이다. 또한, 산출된 변화는 이들 2가지 대조군 값에 정상화되고, 대조군 값으로부터 떨어지는 음의 값 또는 대조군 값으로부터 증가하는 양으로 나타낸다.
- [0169] 결과
- [0170] 최초 약리학



표 3

표 3. 마취시킨 레트(n=3 의 각각의 평균값)의 대조군( $\Delta$ ) 평균 동맥 혈압 및 평균 심박율의 변화에 대한 RPL554, 살부타몰 및 아트로핀 단독 및 이후 다른 약물의 효과

살부타몰 또는 아트로핀과 짝지어지는 경우에 RPL554 의 효과				
	$\Delta$ MBP (mmHg and %)		$\Delta$ HR (bpm and %)	
살부타몰* 전에 RPL554	-15	-15%	36	10%
살부타몰** 후에 RPL554	-17	-16%	29	7%
아트로핀* 전에 RPL554	-17	-16%	30	8%
아트로핀** 후에 RPL554	-19	-20%	33	10%
RPL554 와 짝지어지는 경우에 살부타몰의 효과				
	$\Delta$ MBP (mmHg and %)		$\Delta$ HR (bpm and %)	
RPL554* 전에 살부타몰	-32	-30%	58	18%
RPL554*** 후에 살부타몰	-23	-24%	43	11%
RPL554 와 짝지어지는 경우에 아트로핀의 효과				
	$\Delta$ MBP (mmHg and %)		$\Delta$ HR (bpm and %)	
RPL554* 전에 아트로핀	-5.0	-5%	6.3	1%
RPL554**** 후에 아트로핀	-2.7	-3%	21	5%

[0171]

[0172] 약물은 5분 간격으로 쌍에 정맥 볼루스 주사로 제공된다. 값은 예비 약물 값(pre-drug value)으로부터의 피크 효과의 차이이고, 예비 약물 값에 대한 변화 또는 퍼센트 변화로 나타낸다.

[0173] \*=예비 약물 처리를 하지 않은 약물에 대한 대조군의 반응

[0174] 측정되는 주요 약물학적 변수는 평균 혈압으로 계산되는 수축 및 확장 혈압, 및 심박율이다. 보이는 변화의 요인은 상기 표 3에 나타났다.

[0175] 모든 경우에 보이는 바와 같이, 복용량 연구에서, 수축, 확장 또는 평균 압력인지에 관계 없이, 혈압을 떨어지게 하는 RPL554는 실질적 변화로 표현되거나 예비 약물 값으로 정상화된다. 살부타몰 또는 아트로핀의 예비 투여 전후에 측정되는 경우, RPL554 주사로 혈압의 변화는, 변화가 예비 약물로부터의 변화로 표현되는지 또는 퍼센트로 정상화되는지는 표 3에 나타내는 것과 다르지 않다(changes in blood pressure to RPL554 injection were not different, as can be seen in Table 3, whether changes were expressed as changes from pre-drug, or were normalized as a percentage).

[0176] 첫번째 후 5분에 두번째 약물의 투여가 고려되는 약물에 따라 달라지는 방법으로 예비-약물 값을 변화시키지만, 심박율 반응은 다른 약물의 예비 투여에 의해 유사하게 영향받지 않는다.

- [0177] 2차 약력학 및 안전성 약리학
- [0178] 2차 약력학 변수는 ECG, 호흡률 및 부정맥이다. ECG, 호흡률에 유의한 변화가 보이지 않았고, 부정맥은 보이지 않았다.
- [0179] 약력학적 약물의 상호 작용
- [0180] 3가지 약물 사이의 가능한 심혈관 상호 작용은 연구의 주요 목적이다. 약물 사이의 주요 상호 작용은 표 3에 나타난 바와 같이 보이지 않고, 또는 실제 실험 기록의 관찰에 의해 보이지 않는다.
- [0181] **실시예 2**
- [0182] 아트로핀(무스카린성 리셉터 길항 물질)과의 조합으로 RPL554 투여의 생체내 시너지 효과
- [0183] 이러한 실시예는 RPL554가 아트로핀과 조합으로 투여되는 경우에 봄베신(bombesin) 및 강력한 시너지 효과에 의해 유도되는 기관지 수축(bronchoconstriction)을 뒤집는 RPL554의 능력을 조사한다.
- [0184] 기니피그는 마취 및 환기된다. 기도 차단은 봄베신( $2\mu\text{g/ml}$ ;  $5\text{ ml/hr}$ )의 정맥 투여에 의해 유도된다. 기도 확장은 아트로핀의 준최대 복용량( $2\mu\text{g/kg}$ )과의 조합으로 또는 다양한 복용량으로 RPL554 단독 정맥 투여에 의해 유발된다. 복용량은, 기도 차단 감소가 약 20%가 되는 복용량을 선택하도록 아트로핀에 대한 복용-반응 곡선을 형성하는 이하 연구에서 선택된다. 총 폐 저항( $R_L$ ) 및 평균 동맥 혈압이 측정된다. 데이터는 기도 차단 감소% 또는 혈압으로 나타낸다.
- [0185] RPL554는  $10\text{--}80\mu\text{g/kg}$ 로부터 기니피그의 기도의 복용-의존 완화를 야기한다. 아트로핀  $2\mu\text{g/kg}$ 과의 조합으로(기도 차단 감소가  $22.3 \pm 4.9\%$ 인 복용량), RPL554 ( $20\mu\text{g/kg}$ )의 준최대 복용량은 단독으로 투여되는 RPL554의 복용량보다 기도를 더 완화시킨다(표 4).  $20\mu\text{g/kg}$  RPL554의 정맥 투여(서로 함께 투여되는 경우에 잠재적이지 않은)는, 평균 동맥 혈압의 감소를 야기한다(대조군:  $37.3 \pm 6.7\%$ ,  $+ 2\mu\text{g/kg}$  아트로핀:  $35.3 \pm 4.3\%$ ). 결과는 도 7 내지 10에 도시된다.

**표 4**

표 4	% 기도 차단 감소율	
	RPL554 대조군	RPL554 + 아트로핀 ( $2\mu\text{g/kg}$ )
$10\mu\text{g/kg}$	$7.4 \pm 1.9$	$41.7 \pm 1.2$
$20\mu\text{g/kg}$	$24.6 \pm 4.3$	$76.5 \pm 8.8$
$40\mu\text{g/kg}$	$55.2 \pm 6.2$	$84.3 \pm 9.1$
$80\mu\text{g/kg}$	$65.1 \pm 5.3$	$81.9 \pm 4.7$

- [0186]
- [0187] 결과는 RPL554가 무스카린성 리셉터 길항 물질 아트로핀과 조합되는 경우에 효과적인 기관지 확장제이고, 기관지 확장제로서 시너지 활성을 갖지만 혈압에 약물 클래스(drug class)와 상호 작용하지 않는다는 증거를 제공한다.
- [0188] **실시예 3**
- [0189] 인간으로부터 분리된 기관지에 대한 글리코피로늄 브로마이드(무스카린성 리셉터 길항 물질)와의 조합으로 RPL554 투여의 시너지 효과
- [0190] 인간으로부터 분리된 기관지에서 RPL554와 글리코피로늄 사이의 오래 지속되는 상호 작용이 조사되었다.
- [0191] 방법
- [0192] 6명의 환자의 기관지 고리는  $0.5\text{--}1.0\text{ g}$ 의 긴장 하에  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  ( $95/5\%$ )의 가스가 첨가되는 Krebs-Henseleit 용액( $37^\circ\text{C}$ )에서 배양했다. RPL554 및 글리코피로늄의 작용 기간(최대 완화의 30%,  $\text{EC}_{30}$ )은 3, 10 또는 25 Hz의 전기장 자극(EFS)으로 수축된 조직에 연구되었다. 기관지 톤은 파파베린에 대한 최대 반응( $\text{E}_{\text{max}}$ )로 나타내고, 수

축 반응의 곡선(AUC) 하의 면적이 평가되었다. 약물 혼합물의 효과는 블리스 의존 이론(Bliss Independence theory)에 의해 분석되었다. 값(n=3)은 평균±SEM이다.

[0193] 결과

[0194] 단독으로 투여된 RPL554 및 글리코피로늄은 각각  $160 \pm 20$  min 및  $50 \pm 10$  min에서 최대 완화를 유도하고, 효과는 4시간 동안 검출 가능하였다. 최대 시너지 이완 상호 작용은 세정 기간 동안 약 2 hrs ( $71.4 \pm 5.1\%$ )이고, EFS-조절된 수축 반응이 여전히  $41.2 \pm 8.5\%$ 인 경우, 약물의 조합은 6 hrs 이완 효과로 확장된다. 관측된 AUC ( $44.9 \pm 3.1\%$ )는 3Hz에서 EFS의 주요 효과를 갖는 연구의 6 hrs 동안 기대되는 ( $65.8 \pm 3.3\%$ )보다 현저히 낮다( $-35.8 \pm 2.5\%$ ,  $P < 0.001$ ). 결과는 도 11 내지 16에 도시된다.

[0195] 결론

[0196] 저농도에서 RPL554 및 글리코피로늄은 인간으로부터 분리된 기관지에서 EFS에 의해 유도되는 수축 톤이 시너지 적으로 억제되고, 6 hrs 동안 이완 효과를 확대한다.

[0197] 실시예 4

[0198] 작은 인간 기도 상에 글리코피로늄 브로마이드(무스카린성 리셉터 길항 물질)와의 조합으로 투여되는 RPL554의 시너지 효과

[0199] 인간으로부터 분리된 기관지에서 RPL554 및 글리코피로늄 사이의 상호 작용이 조사되었다.

[0200] 방법

[0201] 6명의 환자로부터 정확하게 잘린 폐 조각(PCLSs)은  $O_2/CO_2$  (95:5%)의 가스가 첨가되는 Krebs-Henseleit 용액 ( $37^\circ C$ )에서 배양했다. 단독으로 및 동일한 효과를 나타내는 농도의 조합으로 투여되는, RPL554 및 글리코피로늄의 농도 반응은 카바콜(CCh)에 의해 유도되는 준최대 수축(최대의 70%,  $EC_{70}$ )에서 평가된다. 작은 기관지 (<1mm 직경)의 완화는 파파베린에 의해 유도되는 최대 반응( $E_{max}$ )으로 나타내고, 효능은  $IC_{50}$  ( $pD_2$ )의 네거티브 로그로 나타낸다. 약물 혼합물의 효과는 블리스 의존 이론에 의해 분석되었다. 값(n=3)은 평균±SEM이다.

[0202] 결과

[0203] 글리코피로늄은 RPL554와 비교하여 기관지의 더욱 강력한 농도-의존 완화를 유도하고( $pD_2$ : 글리코피로늄  $9.2 \pm 0.4$ , RPL554  $6.0 \pm 0.1$ ,  $P < 0.001$ ), 둘다는 CCh-수축을 없앤다. 저-중 농도에서(low-to-middle concentrations) 글리코피로늄 및 RPL554는 기대된 반응과 비교하여  $+21.1 \pm 4.0\%$ 까지 완화를 향상시키는 작은 기도 상의 시너지 적 이완 반응을 갖는다( $P < 0.05$ ). 글리코피로늄 및 RPL554의 저농도( $EC_{30}$ )는 기대된 반응( $51.0 \pm 5.4\%$ )과 비교하여 현저한( $P < 0.05$ )  $69.1 \pm 2.4\%$ 의 루멘 영역 향상(lumen area enhancement)이 유도된다. 결과는 도 17 내지 19에 도시된다.

[0204] 결론

[0205] RPL554 및 글리코피로늄은 주로 저-중 농도에서 기관지의 루멘 영역 향상에 대한 시너지적 상호 작용을 갖는다.

[0206] 실시예 5

[0207] 티오토로프 브로마이드(무스카린성 리셉터 길항 물질)와의 조합으로 투여된 RPL554의 시너지 효과

[0208] RPL554 및 아트로핀의 조합의 시너지 효과를 평가하기 위한 실시예 1의 방법이 무스카린성 리셉터 길항 물질 티오토로프 브로마이드에 반복된다. 농도 반응 곡선은 RPL554 단독, 티오토로프 브로마이드 단독, 및 티오토로프 브로마이드와의 조합으로 투여되는 RPL554를 시험하도록 작성된다. 베렌바움법 및 블리스 의존 기준이 티오토로프 브로마이드와 RPL554 사이의 시너지 작용을 평가하기 위해 이용되었다. 시너지 효과는 RPL554 및 티오토로프 브로마이드의 조합에서 관측되었다.

[0209] 실시예 6

[0210] 옥시트로프 브로마이드(무스카린성 리셉터 길항 물질)와의 조합으로 투여되는 RPL554의 시너지 효과

[0211] RPL554 및 아트로핀의 조합의 시너지 효과를 평가하기 위한 실시예 1의 방법이 무스카린성 리셉터 길항 물질 옥시트로프 브로마이드에 반복된다. 농도 반응 곡선은 RPL554 단독, 옥시트로프 브로마이드 단독, 및 옥시트로프

브로마이드와의 조합으로 투여되는 RPL554를 시험하도록 작성된다. 베렌바움법 및 블리스 의존 기준이 옥시트로핀 브로마이드와 RPL554 사이의 시너지 작용을 평가하기 위해 이용되었다. 시너지 효과는 RPL554 및 옥시트로핀 브로마이드의 조합에서 관측되었다.

[0212] **실시예 7**

[0213] 아클리디늄(무스카린성 리셉터 길항 물질)과의 조합으로 투여되는 RPL554의 시너지 효과

[0214] RPL554 및 아트로핀의 조합의 시너지 효과를 평가하기 위한 실시예 1의 방법이 무스카린성 리셉터 길항 물질 아클리디늄에 반복된다. 농도 반응 곡선은 RPL554 단독, 아클리디늄 단독, 및 아클리디늄과의 조합으로 투여되는 RPL554를 시험하도록 작성된다. 베렌바움법 및 블리스 의존 기준이 아클리디늄과 RPL554 사이의 시너지 작용을 평가하기 위해 이용되었다. 시너지 효과는 RPL554 및 아클리디늄의 조합에서 관측되었다.

[0215] **포물레이션 실시예 1-DPI에 의한 투여**

[0216] RPL554 조합 (0.2 mg)은 미분화된 후, 락토오스(25 mg)와 블랜딩된다. 그 후, 블랜딩된 혼합물은 젤라틴 흡입 카트리지로 적재된다. 카트리지의 함량은 예컨대 DPI를 이용하여 투여된다.

[0217] 미분화된 RPL554 조합 (100 mg)은 분쇄된 락토오스(25 g)(예컨대, 입자의 약 85%보다 크지 않은 약 60  $\mu$ M 내지 약 90  $\mu$ M의 MMD를 가지고, 입자의 약 15%보다 적지 않은 15  $\mu$ M 미만의 MMD를 갖는 락토오스)와 블랜딩된다. 그 후, 블랜딩된 혼합물은 복용 단위 당 RPL554의 약 10-500  $\mu$ g를 제공하기에 충분한 양으로 박리 가능한 블리스터 팩의 각각의 블리스터로 적재된다. 블리스터의 함량은 DPI를 이용하여 투여된다.

[0218] 또는, 미분화된 RPL554 조합 (1 g)은 분쇄된 락토오스에 대한 화합물의 중량비를 1:200로 갖는 벌크 조성물을 형성하기 위해 분쇄된 락토오스(200 g)와 블랜딩된다. 블랜딩된 조성물은 복용 단위 당 RPL554의 약 10-500  $\mu$ g를 전달할 수 있는 DPI로 패킹된다.

[0219] 또는, 미분화된 RPL554 (100 mg) 및 미분화된 무스카린성 리셉터 길항 물질(500 mg)은 분쇄된 락토오스(30 g)와 블랜딩되었다. 그 후, 블랜딩된 혼합물은 복용 단위 당 RPL554의 약 10  $\mu$ g 내지 약 500  $\mu$ g를 제공하기에 충분한 양으로 박리 가능한 블리스터 팩의 각각의 블리스터로 적재된다. 블리스터의 함량은 DPI를 이용하여 투여된다.

[0220] **포물레이션 실시예 2-MDI를 이용한 조성물**

[0221] 미분화된 RPL554 조합 (10 g)은 탈염수 (200 mL) 중 레시틴(lecithin)(0.2 g)을 용해함으로써 제조되는 용액에 분산된다. 얻어진 현탁액은 스프레이 건조된 후, 약 1.5  $\mu$ M 미만의 평균 직경을 갖는 입자를 포함하는 미분화된 조성물을 형성하기 위해 미분화된다. 그 후, 미분화된 조성물은 MDI에 의해 투여되는 경우에 복용 단위 당 RPL554의 약 10  $\mu$ g 내지 약 500  $\mu$ g를 제공하기에 충분한 양으로 가압된 1,1,1,2-테트라플루오로에탄을 함유하는 MDI 카트리지에 적재된다.

[0222] 또는, 5 wt % RPL554 조합, 0.5 wt % 레시틴, 및 0.5 wt % 트레할로오스(trehalose)를 함유하는 현탁액은 탈염수 100 mL 중 용해되는 0.5 g의 레시틴 및 0.5 g의 트레할로오스로부터 형성된 콜로이드 용액에서 평균 크기가 10  $\mu$ M 미만인 미분화된 입자로서 5 g의 RPL554 조합을 분산시킴으로써 제조된다. 현탁액은 스프레이 건조된 후, 1.5  $\mu$ M 미만의 평균 직경을 갖는 입자로 미분화된다. 입자는 가압된 1,1,1,2-테트라플루오로에탄을 갖는 캐니스터로 적재된다.

[0223] **포물레이션 실시예 3-네블라이저 흡입기를 이용하는 조성물**

[0224] RPL554 조합 (25 mg)은 시트레이트 완충된 (pH 5) 등장액 (125 mL)에 용해되었다. 혼합물을 교반되고, 화합물이 용해될 때까지 소니케이팅되었다. 용액의 pH는 필요에 따라 수성 1N 소듐 하이드록사이드를 천천히 첨가함으로써 pH 5까지 체크 및 조절되었다. 용액은 복용 단위 당 약 10  $\mu$ g 내지 약 500  $\mu$ g의 RPL554를 제공하는 네블라이저 장치를 이용하여 투여되었다.

[0225] **포물레이션 실시예 4-경구 투여를 위한 경질의 젤라틴 캡슐**

[0226] RPL554 조합 (50 g), 스프레이 건조된 락토오스 (440 g) 및 마그네슘 스테아레이트 (10 g)는 완전히 블랜딩되었다. 그 후, 얻어진 조성물은 경질의 젤라틴 캡슐에 적제되었다(캡슐 당 500 mg의 조성물).

[0227] **포물레이션 실시예 5-경구 투여를 위한 현탁액**

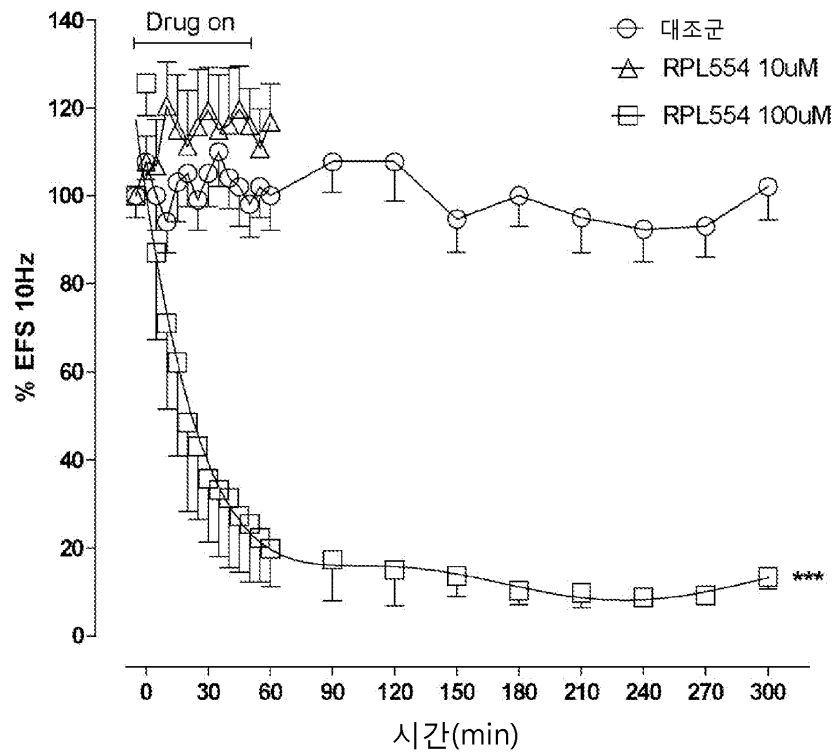
- [0228] 이하 성분은 현탁액 10 mL당 화합물 100 mg을 함유하는 현탁액을 형성하도록 혼합되었다.
- |        |                                           |           |
|--------|-------------------------------------------|-----------|
| [0229] | 성분                                        | 양         |
| [0230] | RPL554 조합                                 | 1.0 g     |
| [0231] | 푸말산                                       | 0.5 g     |
| [0232] | 소듐 클로라이드                                  | 2.0 g     |
| [0233] | 메틸 파라벤                                    | 0.15 g    |
| [0234] | 프로필 파라벤                                   | 0.05 g    |
| [0235] | 과립 설탕                                     | 25.5 g    |
| [0236] | 소르비톨 (70% 용액)                             | 12.85 g   |
| [0237] | Veegum <sup>RTM</sup> K (마그네슘 알루미늄 실리케이트) | 1.0 g     |
| [0238] | 향료                                        | 0.035 mL  |
| [0239] | 착색제                                       | 0.5 mg    |
| [0240] | 증류수 q.s.                                  | 100 mL 까지 |
- [0241] **포플레이션 실시예 5-주사에 의한 투여를 위한 주입 가능한 포플레이션**
- [0242] RPL554 조합 (0.2 g)은 0.4 M 소듐 아세테이트 완충액 (2.0 mL)과 블렌딩되었다. 얻어진 용액의 pH는 필요에 따라 0.5 N 수성 염산 또는 0.5 N 수성 소듐 하이드록사이드를 이용하여 pH 4까지 조절된 후, 총 체적 20 mL을 제공하도록 주입을 위한 충분한 물이 첨가되었다. 그 후, 혼합물은 주입에 의한 투여에 적합한 살균 용액을 제공하기 위해 살균 필터 (0.22 마이크론)를 통해 여과했다.
- [0243] **참조**
- [0244] Berenbaum MC (1977) Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. Clin Exp Immunol 28:1-18.
- [0245] Binks AP, Paydarfar D, Schachter SC, Guz A and Banzett RB (2001) High strength stimulation of the vagus nerve in awake humans: a lack of cardiorespiratory effects. Respir Physiol 127:125-133.
- [0246] Boik JC, Newman RA and Boik RJ (2008) Quantifying synergism/antagonism using nonlinear mixed-effects modeling: a simulation study. Stat Med 27:1040-1061.
- [0247] Boswell-Smith V, Cazzola M and Page CP (2006a) Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? J Allergy Clin Immunol 117:1237-1243.
- [0248] Boswell-Smith V, Spina D, Oxford AW, Comer MB, Seeds EA and Page CP (2006b) The pharmacology of two novel long-acting phosphodiesterase 3/4 inhibitors, RPL554 [9,10-dimethoxy-2(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl) -3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-(2,6-diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-4H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one]. J Pharmacol Exp Ther 318:840-848.
- [0249] Boucher AN and Tam VH (2006) Mathematical formulation of additivity for antimicrobial agents. Diagn Microbiol Infect Dis 55:319-325.
- [0250] Freas W, Hart JL, Golightly D, McClure H and Muldoon SM (1989) Contractile properties of isolated vascular smooth muscle after photoradiation. Am J Physiol 256:H655-664.
- [0251] Goldoni M and Johansson C (2007) A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. Toxicol In Vitro 21:759-769.
- [0252] Goodman LS, Gilman A and Brunton LL (2008) Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics.

McGraw-Hill Medical, New York.

- [0253] Grabovsky Y and Tallarida RJ (2004) Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. *J Pharmacol Exp Ther* 310:981-986.
- [0254] Greco WR, Bravo G and Parsons JC (1995) The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* 47:331-385.
- [0255] Hatake K and Wakabayashi I (2000) Ethanol suppresses L-arginine-induced relaxation response of rat aorta stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 35:61-68.
- [0256] Meletiadis J, Mouton JW, Meis JF and Verweij PE (2003) In vitro drug interaction modeling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 47:106-117.
- [0257] Mercier FJ, Naline E, Bardou M, Georges O, Denjean A, Benhamou D and Advenier C (2002) Relaxation of proximal and distal isolated human bronchi by halothane, isoflurane and desflurane. *Eur Respir J* 20:286-292.
- [0258] Motulsky H (1995) *Intuitive biostatistics*. Oxford University Press, New York ; Oxford.
- [0259] Motulsky H and Christopoulos A (2004) *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression : a practical guide to curve fitting*. Oxford University Press, Oxford.
- [0260] Rabe KF (1998) Mechanisms of immune sensitization of human bronchus. *Am J Respir Crit Care Med* 158:S161-170.
- [0261] Spina D, Ferlenga P, Biasini I, Moriggi E, Marchini F, Semeraro C and Page CP (1998) The effect duration of selective phosphodiesterase inhibitors in the guinea pig. *Life Sci* 62:953-965.
- [0262] Tallarida RJ (2001) Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 298:865-872.
- [0263] Tallarida RJ (2006) An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther* 319:1-7.
- [0264] Tallarida RJ and Raffa RB (2010) The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations. *Pharmacol Ther* 127:165-174.
- [0265] Watson N, Bodtke K, Coleman RA, Dent G, Morton BE, Ruhlmann E, Magnussen H and Rabe KF (1997) Role of IgE in hyperresponsiveness induced by passive sensitization of human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 155:839-844.

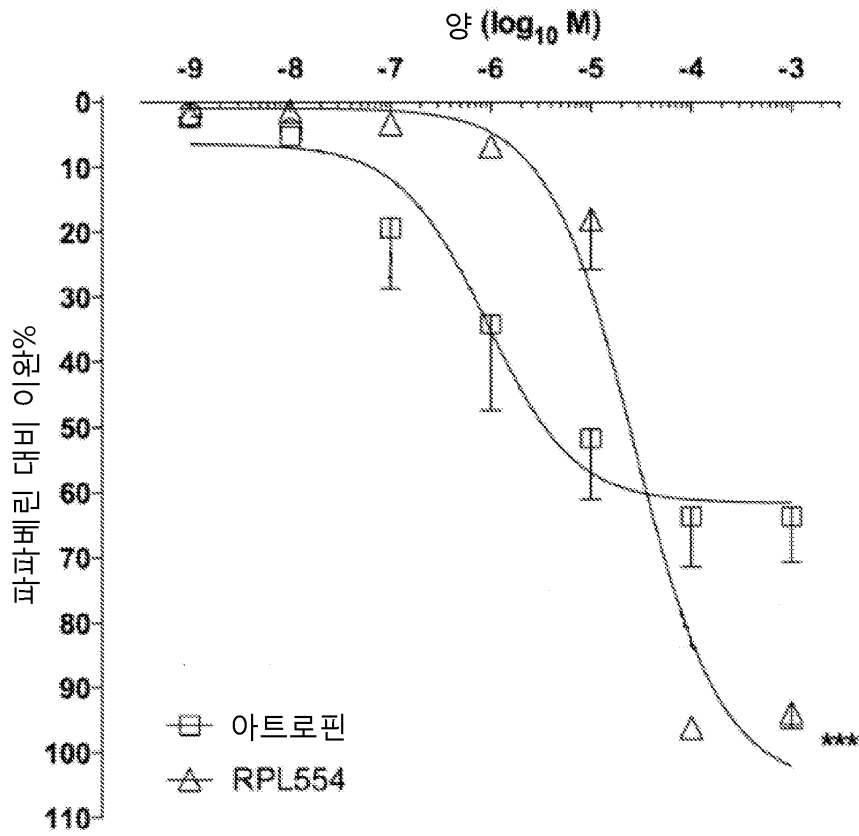
도면

도면1

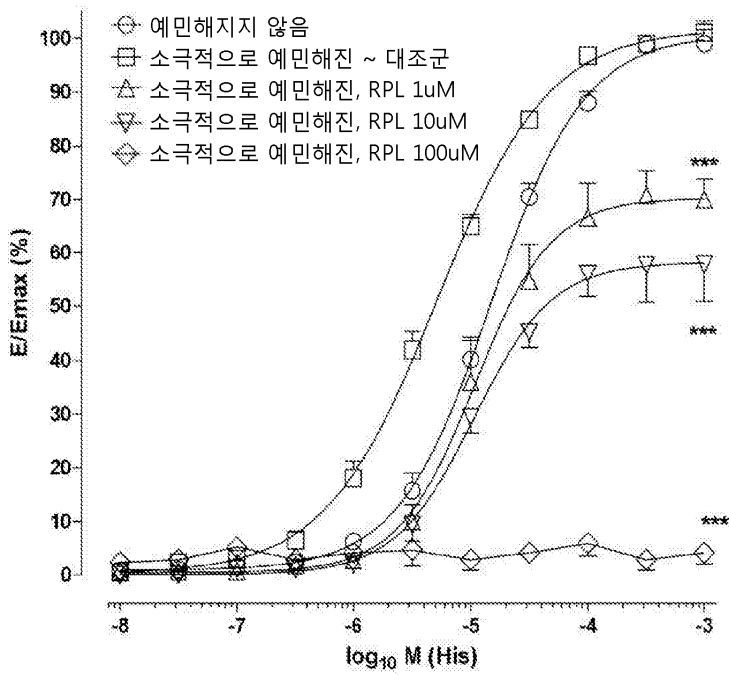




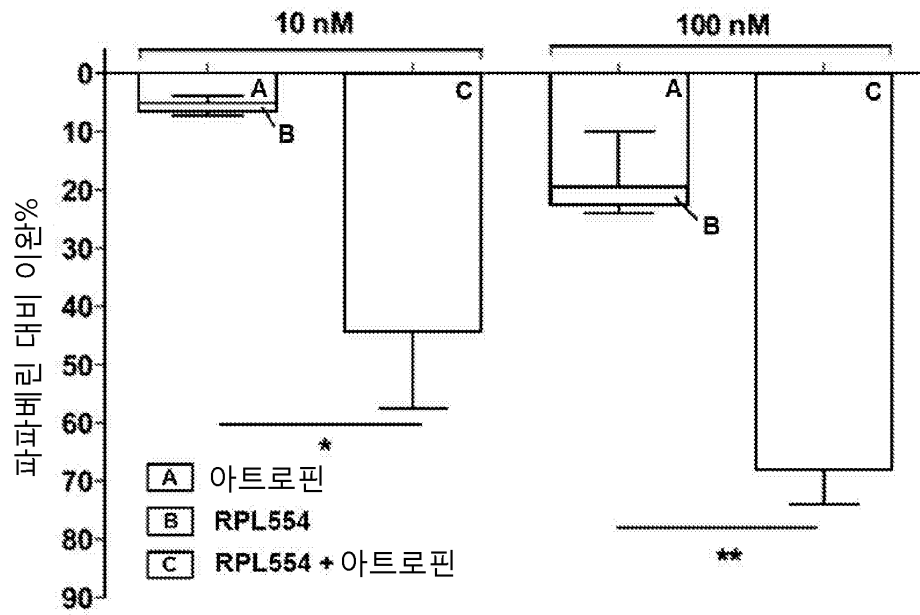
도면2



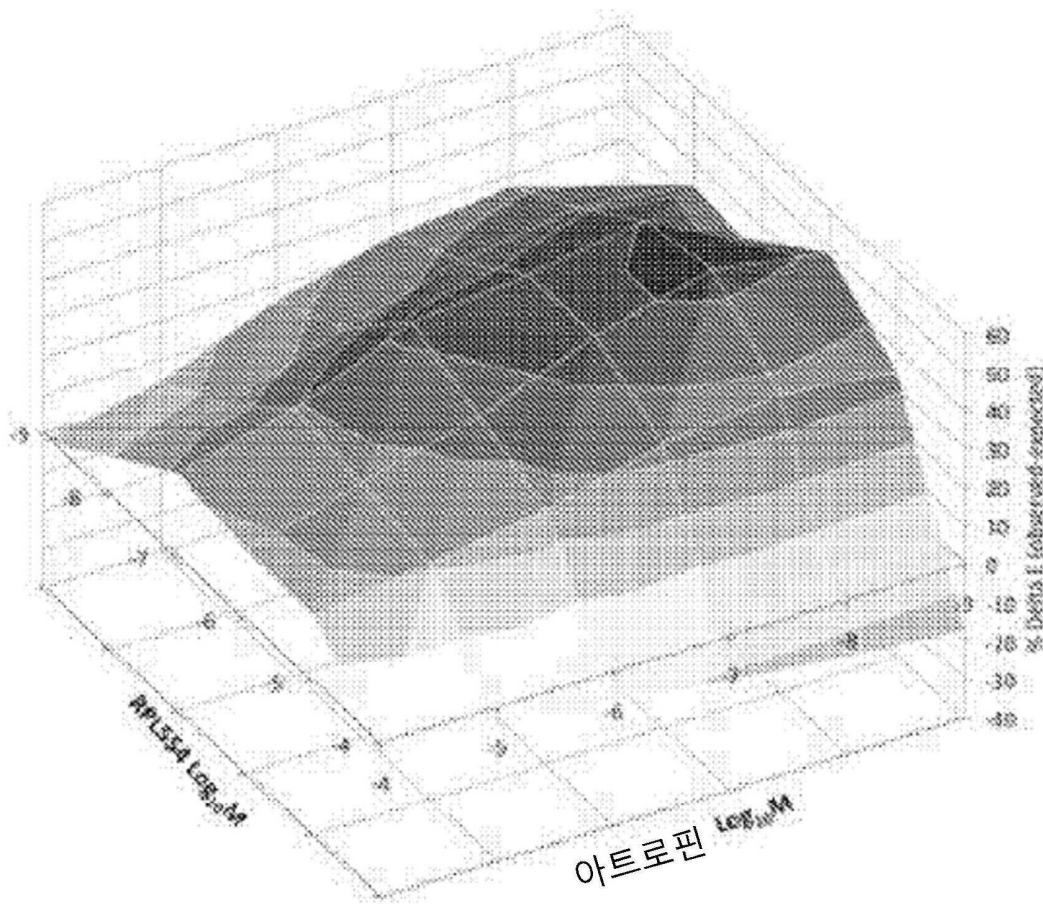
도면3



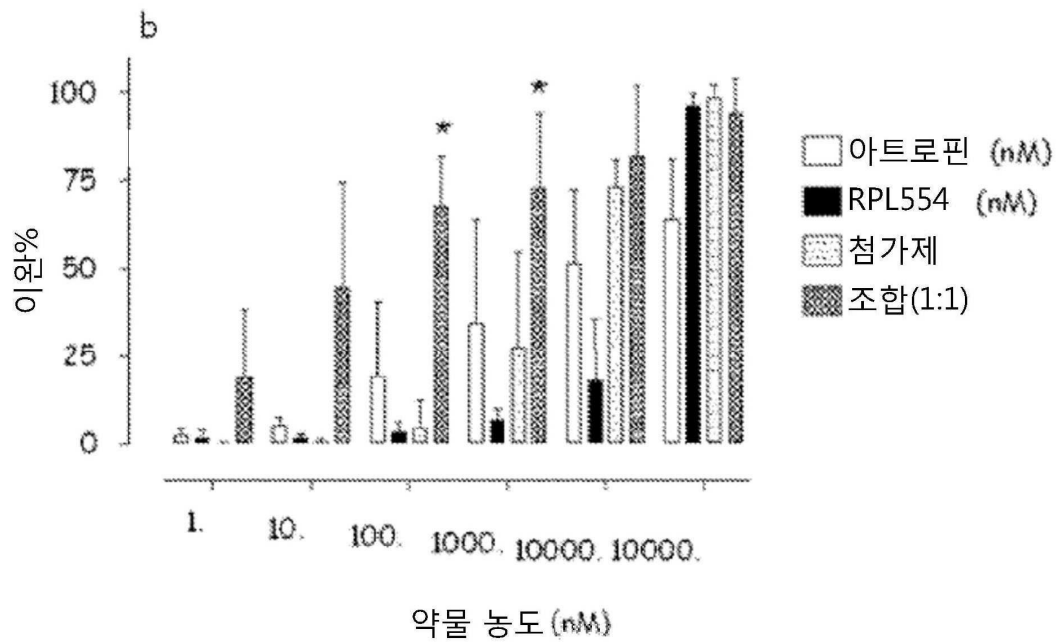
도면4



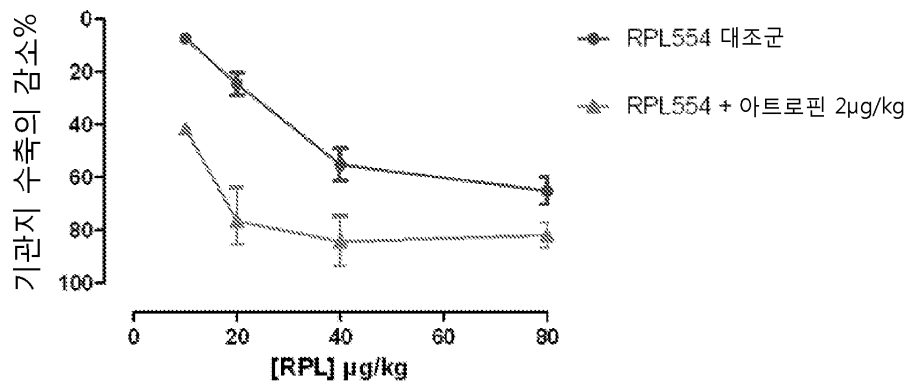
도면5



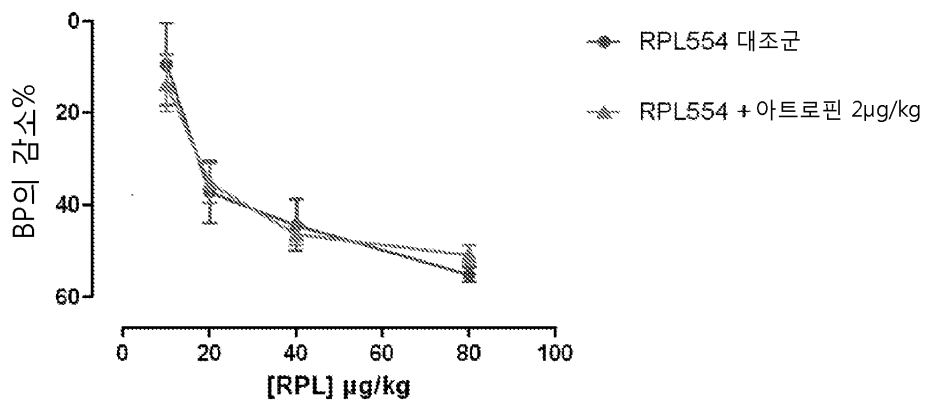
도면6



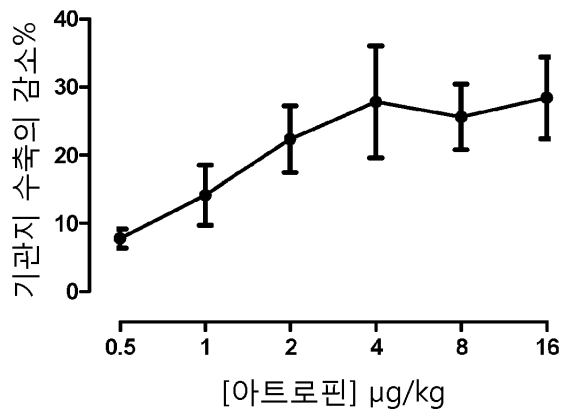
도면7



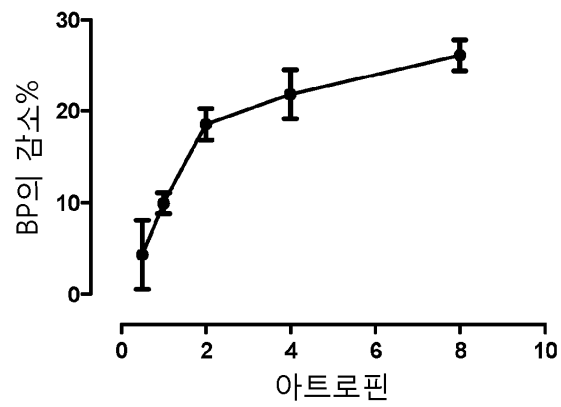
도면8



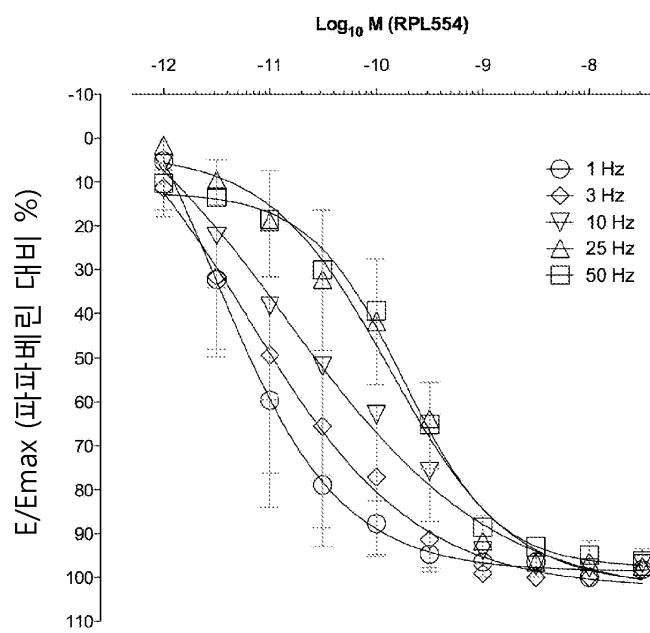
도면9



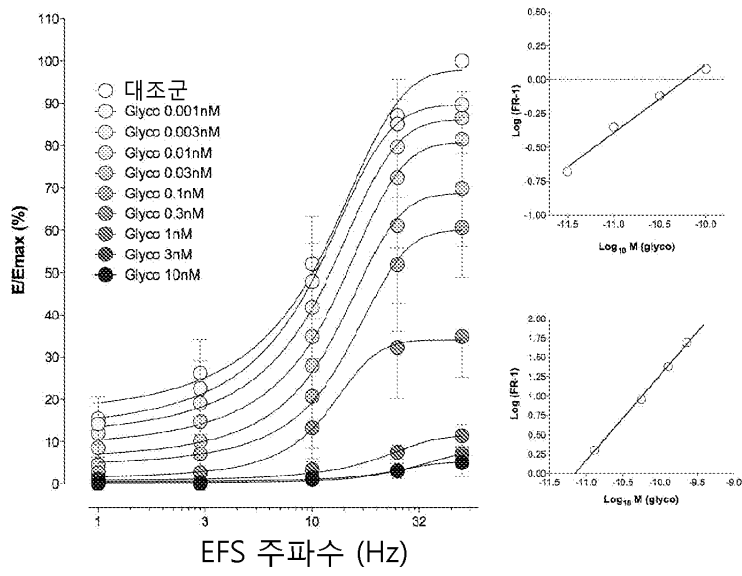
도면10



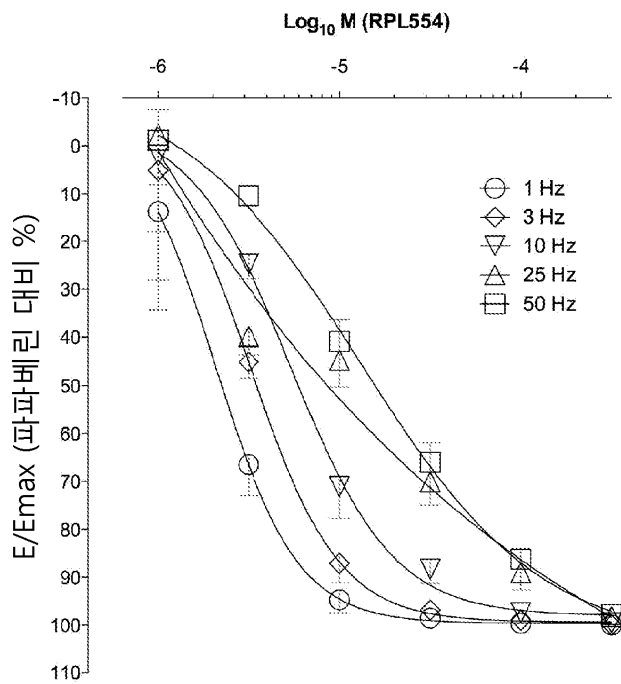
도면11



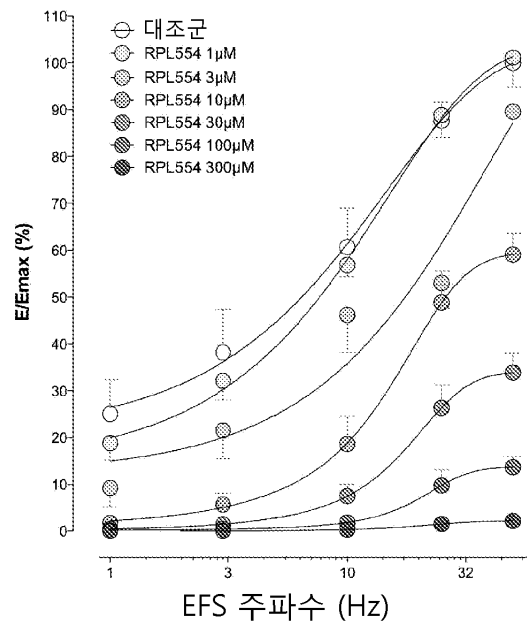
도면12



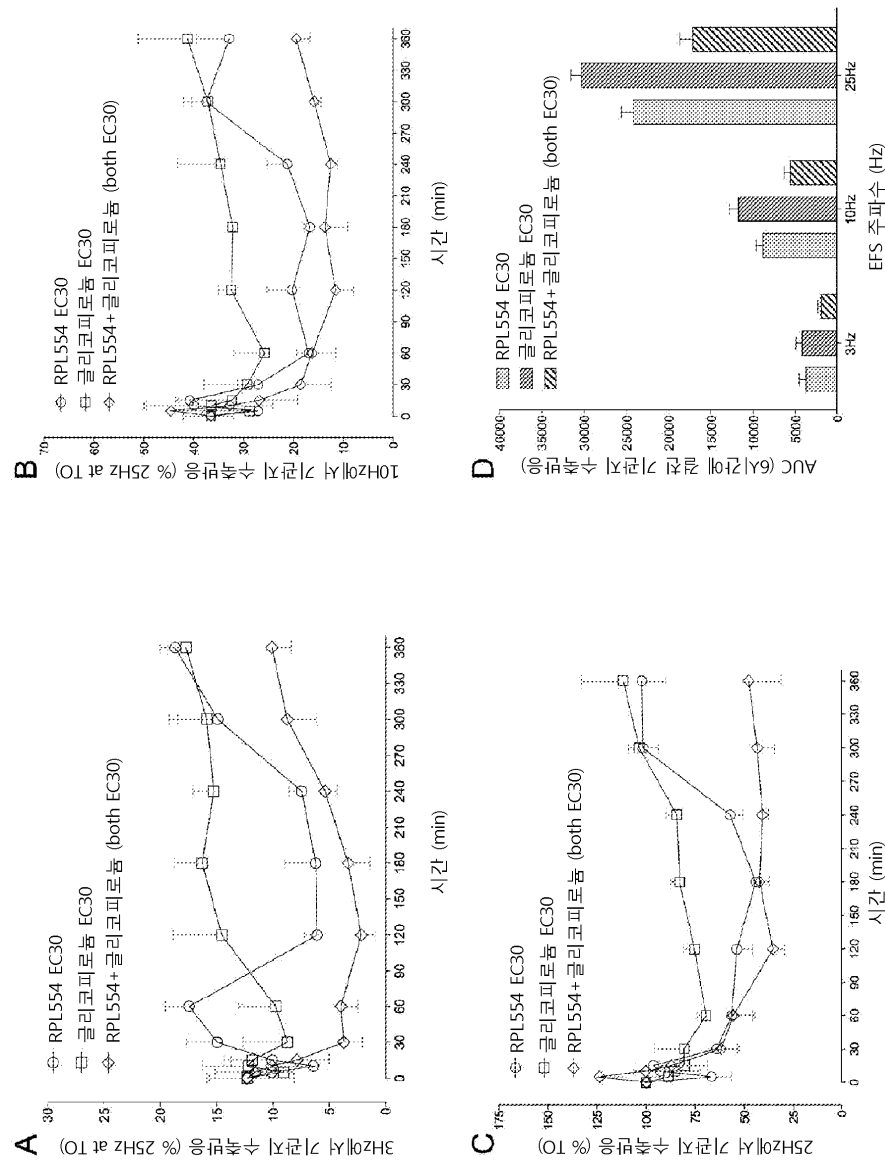
도면13



도면14

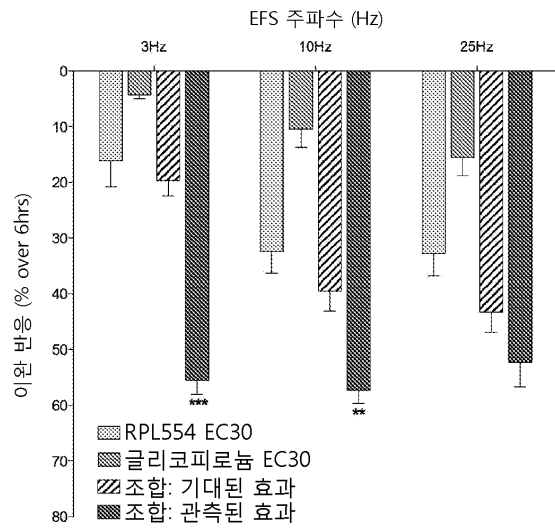


도면15

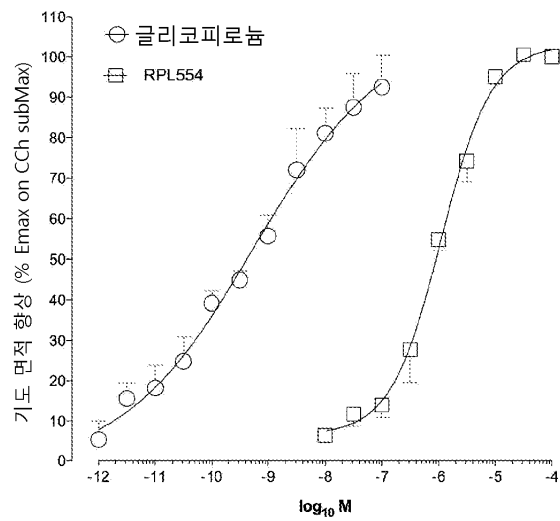




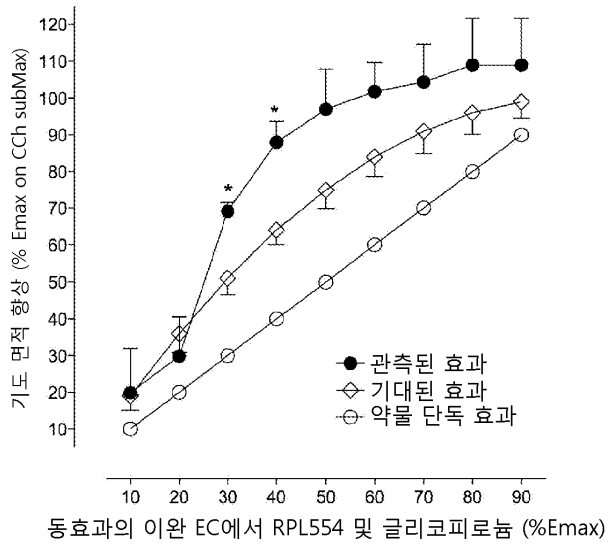
도면16



도면17



도면18



도면19

