

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-107066

(P2012-107066A)

(43) 公開日 平成24年6月7日(2012. 6. 7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 211/62 (2006.01)	C O 7 D 211/62 C S P	4 C O 5 4
A 6 1 K 31/4545 (2006.01)	A 6 1 K 31/4545	4 C O 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	4 C O 8 6
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	4 C 2 O 6

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-48225 (P2012-48225)	(71) 出願人	500154711
(22) 出願日	平成24年3月5日 (2012. 3. 5)		セラヴァンス, インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願2008-500975 (P2008-500975) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80 サウス サン フランシスコ ゲー トウェイ ブルバード 901
原出願日	平成18年3月9日 (2006. 3. 9)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/660, 208		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成17年3月10日 (2005. 3. 10)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	サバイン アクスト
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 85, サニーベール, モールス アベ ニュー 674 ナンバーディー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビフェニル化合物の結晶形

(57) 【要約】

【課題】肺障害の治療に有用であると期待されるビフェニル化合物の新規な結晶形およびその溶媒和物の提供。

【解決手段】本発明は、ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ペリジン-4-イルエステルの結晶形および薬剤として許容されるその溶媒和物を提供する。その結晶形は、遊離塩基、または二リン酸塩、一硫酸塩もしくは二シュウ酸塩などの塩であってよい。本発明は、これらの結晶性化合物を含むかまたはこれらの化合物を用いて調製される医薬品組成物、その結晶性化合物を調製するための方法および中間体、ならびに肺障害を治療するためのこれらの化合物の使用方法も提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、肺障害の治療に有用であると期待されるビフェニル化合物の新規な結晶形およびその溶媒和物に関する。本発明は、結晶性化合物を含むかまたはそうした化合物から調製される医薬品組成物、その結晶性化合物を調製するための方法および中間体、ならびに肺障害を治療するためのその化合物の使用にも関する。

10

【背景技術】

【0002】

(背景技術)

本発明の譲受人に譲渡された Mammen らの特許文献 1 は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) および喘息などの肺障害を治療するのに有用であると期待されている新規なビフェニル化合物を開示している。特に、化合物ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルが、ムスカリン性受容体拮抗薬または抗コリン作用を有していることを本出願で具体的に述べられている。

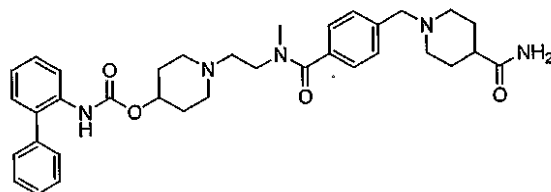
20

【0003】

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの化学構造は式 I で表される。

【0004】

【化 1】



30

I

式 I の化合物は市販されている AutoNom ソフトウェア (MDL, San Leandro, California) を用いて称されている。

【0005】

肺障害または呼吸器障害の治療に有用な治療剤は、吸入によって直接気道中に投与することが有利である。この関連で、吸入によって治療剤を投与するために、乾燥粉末吸入器 (DPI)、計量式吸入器 (MDI) および噴霧型吸入器を含むいくつかの種類の薬剤用吸入装置が開発されている。そうした装置のための医薬品組成物および配合物を調製する場合、吸湿性でも潮解性でもなく、かつ比較的高い融点 (一般に約 150 °C を超える) を有し、それによってそれほど分解を伴うことなくその物質を微粒化することができる治療剤の結晶形を有することが特に望まれる。

40

【特許文献 1】米国特許出願公開第 2005/0203133 号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

式 I の化合物の結晶形はこれまで報告されていない。許容できる程度の吸湿性と比較的

50

高い融点を有する安定した非潮解性の式 I の化合物の結晶形が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(式 I)の結晶形を提供する。結晶形は遊離塩基、ニリン酸塩、一硫酸塩もしくはニシュウ酸塩などの薬剤として許容される塩、またはそうした塩の薬剤として許容される溶媒和物であってよい。

【0008】

驚くべきことに、本発明の結晶形は、大気中の湿気に曝しても潮解性でないことが分かった。さらに、本発明の結晶形は、許容できる程度の吸湿性と約 70°C を超える許容できる融点を有する。例えば、ニリン酸塩は約 150°C の融点を有する。

【0009】

様々な用途の中で、とりわけ、式 I の化合物の結晶形は、肺障害を治療するのに有用性が期待される医薬品組成物を調製するのに有用である。したがって、本発明の一態様は、薬剤として許容される担体と、治療有効量の式 I の化合物の結晶形を含む医薬品組成物に関する。

【0010】

本発明のさらに他の態様は、式 I の化合物の結晶形を 1 種または複数の他の治療剤と合わせて含む組成物に関する。したがって、一実施形態では、本発明は、(a) 薬剤として許容される担体および治療有効量の式 I の化合物の結晶形と、(b) コルチコステロイド； β_2 アドレナリン作動性受容体作用薬；ホスホジエステラーゼ-4 阻害剤；またはその組合せなどのステロイド系抗炎症剤から選択される治療有効量の薬剤とを含む組成物であって、その結晶形と薬剤が一緒かまたは別個に配合される組成物を対象とする。その薬剤を別個に配合する場合、薬剤として許容される担体を含めることができる。

【0011】

本発明の他の態様は、式 I の化合物の結晶形を含む水性の等張性生理食塩水を含む医薬品組成物であって、上記食塩水が約 4~6 の範囲の pH を有する組成物に関する。特定の実施形態では、水性の噴霧型配合物を、クエン酸塩緩衝剤で約 5 の pH に緩衝させる。他の特定の実施形態では、水性の噴霧型配合物は、約 0.5 mg/ml のビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの遊離塩基相当物を含む。

【0012】

一実施形態では、本発明は、薬剤として許容される担体と式 I の化合物の結晶形を含む医薬品組成物を含む乾燥粉末吸入器を備えた薬物送達装置を提供する。

【0013】

式 I の化合物はムスカリン性受容体拮抗活性を有する。したがって、式 I の化合物の結晶形は喘息および慢性閉塞性肺疾患などの肺障害を治療するのに有用である。したがって、本発明の他の態様は、患者に治療有効量の式 I の化合物の結晶形を投与することを含む肺障害を治療するための方法に関する。本発明のさらに他の態様は、気管支拡張をもたらす量の式 I の化合物の結晶形を患者に投与することを含む患者の気管支拡張をもたらす方法に関する。一実施形態では、化合物を吸入により投与する。本発明は、患者に治療有効量の式 I の化合物の結晶形を投与することを含む慢性閉塞性肺疾患または喘息の治療方法を提供する。本発明の他の態様は、哺乳動物に治療有効量の式 I の化合物の結晶形を投与することを含む哺乳動物のムスカリン性受容体を拮抗させるための方法を対象とする。

【0014】

本発明は、式 I の化合物の結晶形を調製するための方法も対象とする。本発明は、ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-

10

20

30

40

50

イルメチル) ベンゾイル] メチルアミノ} エチル) ピペリジン-4-イルエステルの結晶性塩または結晶性遊離塩基を形成させることを含む式 I の化合物を精製するための方法を提供する。本発明は、本明細書で述べる方法によって調製される生成物をさらに対象とする。

【0015】

本発明は、微粒化した形態の式 I の化合物の結晶形、ならびに薬剤として許容される担体と微粒化した結晶形の式 I の化合物を含む医薬品組成物も対象とする。

【0016】

本発明は、治療で用いるためまたは医薬品としての式 I の化合物の結晶形も対象とする。さらに、本発明は、医薬品の製造のため、特に哺乳動物の肺障害を治療するかまたはムスカリン性受容体に拮抗させる医薬品の製造のための式 I の化合物の結晶形の使用に関する。

例えば、本願発明は以下の項目を提供する。

(項目 1)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル) ベンゾイル] メチルアミノ} エチル) ピペリジン-4-イルエステルの結晶形または薬剤として許容されるその溶媒和物。

(項目 2)

前記結晶形がニリン酸塩である、項目 1 に記載の化合物。

(項目 3)

6. 4 ± 0. 2、7. 6 ± 0. 2、8. 6 ± 0. 2、13. 7 ± 0. 2、15. 0 ± 0. 2、19. 4 ± 0. 2、21. 6 ± 0. 2、22. 1 ± 0. 2、22. 9 ± 0. 2 および 23. 7 ± 0. 2 から選択される 2 θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 2 に記載の化合物。

(項目 4)

前記粉末 X 線回折パターンが、15. 0 ± 0. 2、19. 4 ± 0. 2、21. 6 ± 0. 2 および 23. 7 ± 0. 2 の 2 θ 値での回折ピークを含む項目 3 に記載の化合物。

(項目 5)

そのピーク位置が、図 1 に示すパターンのピーク位置と実質的に一致する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 2 に記載の化合物。

(項目 6)

約 154. 5 °C で最大吸熱熱流を示す示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目 2 に記載の化合物。

(項目 7)

図 2 に示す示差走査熱量測定トレースと実質的に一致するトレースを特徴とする、項目 2 に記載の化合物。

(項目 8)

前記結晶形が一硫酸塩である、項目 1 に記載の化合物。

(項目 9)

7. 7 ± 0. 2、8. 4 ± 0. 2、8. 8 ± 0. 2、12. 6 ± 0. 2、13. 7 ± 0. 2、14. 1 ± 0. 2、15. 3 ± 0. 2、16. 0 ± 0. 2、19. 7 ± 0. 2、20. 6 ± 0. 2、23. 0 ± 0. 2 および 24. 4 ± 0. 2 から選択される 2 θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 8 に記載の化合物。

(項目 10)

前記粉末 X 線回折パターンが、12. 6 ± 0. 2、19. 7 ± 0. 2、23. 0 ± 0. 2 および 24. 4 ± 0. 2 の 2 θ 値での回折ピークを含む、項目 9 に記載の化合物。

(項目 11)

そのピーク位置が、図 8 に示すパターンのピーク位置と実質的に一致する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 8 に記載の化合物。

(項目 12)

10

20

30

40

50

約 76.5 °C で最大吸熱熱流を示す示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目 8 に記載の化合物。

(項目 13)

図 10 に示す示差走査熱量測定トレースと実質的に一致するトレースを特徴とする、項目 8 に記載の化合物。

(項目 14)

前記結晶形がニシュウ酸塩である、項目 1 に記載の化合物。

(項目 15)

7.7 ± 0.2、8.7 ± 0.2、13.5 ± 0.2、14.0 ± 0.2、14.8 ± 0.2、15.4 ± 0.2、15.8 ± 0.2、19.4 ± 0.2、22.9 ± 0.2、23.3 ± 0.2 および 24.6 ± 0.2 から選択される 2θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 14 に記載の化合物。

10

(項目 16)

前記粉末 X 線回折パターンが、8.7 ± 0.2、14.0 ± 0.2、19.4 ± 0.2 および 22.9 ± 0.2 の 2θ 値での回折ピークを含む、項目 15 に記載の化合物。

(項目 17)

そのピーク位置が、図 13 に示すパターンのピーク位置と実質的に一致する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 14 に記載の化合物。

(項目 18)

約 73.7 °C で最大吸熱熱流を示す示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目 14 に記載の化合物。

20

(項目 19)

図 15 に示す示差走査熱量測定トレースと実質的に一致するトレースを特徴とする、項目 14 に記載の化合物。

(項目 20)

前記結晶形が遊離塩基である、項目 1 に記載の化合物。

(項目 21)

4.7 ± 0.2、9.6 ± 0.2、12.7 ± 0.2、13.7 ± 0.2、16.7 ± 0.2、17.4 ± 0.2、18.5 ± 0.2、19.4 ± 0.2、20.8 ± 0.2、21.4 ± 0.2、24.2 ± 0.2 および 25.6 ± 0.2 から選択される 2θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 20 に記載の化合物。

30

(項目 22)

前記粉末 X 線回折パターンが、4.7 ± 0.2、18.5 ± 0.2、20.8 ± 0.2 および 25.6 ± 0.2 の 2θ 値での回折ピークを含む、項目 21 に記載の化合物。

(項目 23)

そのピーク位置が、図 18 に示すパターンのピーク位置と実質的に一致する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 20 に記載の化合物。

(項目 24)

約 102.7 °C で最大吸熱熱流を示す示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目 20 に記載の化合物。

40

(項目 25)

図 19 に示す示差走査熱量測定トレースと実質的に一致するトレースを特徴とする、項目 20 に記載の化合物。

(項目 26)

4.6 ± 0.2、9.3 ± 0.2、12.9 ± 0.2、13.6 ± 0.2、14.0 ± 0.2、14.6 ± 0.2、16.5 ± 0.2、18.6 ± 0.2、19.1 ± 0.2、20.9 ± 0.2、22.1 ± 0.2、22.7 ± 0.2 および 25.7 ± 0.2 から選択される 2θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 20 に記載の化合物。

50

(項目 27)

前記粉末 X 線回折パターンが、 4.6 ± 0.2 、 18.6 ± 0.2 、 22.1 ± 0.2 および 22.7 ± 0.2 の 2θ 値での回折ピークを含む、項目 26 に記載の化合物。

(項目 28)

そのピーク位置が、図 23 に示すパターンのピーク位置と実質的に一致する粉末 X 線回折パターンを特徴とする、項目 20 に記載の化合物。

(項目 29)

約 98.6°C で最大吸熱熱流を示す示差走査熱量測定トレースを特徴とする、項目 20 に記載の化合物。

(項目 30)

図 24 に示す示差走査熱量測定トレースと実質的に一致するトレースを特徴とする、項目 20 に記載の化合物。

(項目 31)

薬剤として許容される担体と項目 1 から 30 のいずれか一項に記載の化合物を含む医薬品組成物。

(項目 32)

β_2 アドレナリン作動性受容体作用薬、ステロイド系抗炎症剤、ホスホジエステラーゼ-4 阻害剤およびその組合せから選択される治療有効量の薬剤をさらに含み、前記化合物と前記薬剤を一緒または別個に配合する、項目 31 に記載の組成物。

(項目 33)

治療有効量の β_2 アドレナリン作動性受容体作用薬およびステロイド系抗炎症剤を含む、項目 32 に記載の組成物。

(項目 34)

前記 β_2 アドレナリン作動性受容体作用薬が $\text{N}-\{2-[4-(\text{R})-2\text{-ヒドロキシ}-2\text{-フェニルエチルアミノ})\text{-フェニル}]\text{-エチル}\}-\text{(R)}-2\text{-ヒドロキシ}-2-(3\text{-ホルムアミド}-4\text{-ヒドロキシフェニル})\text{-エチルアミンの一塩酸塩}$ である、項目 32 に記載の組成物。

(項目 35)

前記ステロイド系抗炎症剤が $6\alpha, 9\alpha\text{-ジフルオロ}-17\alpha-[(2\text{-フラニルカルボニル})\text{-オキシ}]-11\beta\text{-ヒドロキシ}-16\alpha\text{-メチル}-3\text{-オキソアンドロスター}-1, 4\text{-ジエン}-17\beta\text{-カルボチオ酸 S-フルオロメチルエステル}$ である、項目 32 に記載の組成物。

(項目 36)

前記化合物と前記薬剤を一緒に配合する、項目 32 に記載の組成物。

(項目 37)

前記化合物と前記薬剤を別個に配合する、項目 32 に記載の組成物。

(項目 38)

前記組成物を吸入で投与するために配合する、項目 31 に記載の組成物。

(項目 39)

前記担体が約 4 ～ 約 6 の pH 範囲を有する水性の等張性生理食塩水である、項目 31 に記載の組成物。

(項目 40)

クエン酸塩緩衝剤を含む、項目 39 に記載の組成物。

(項目 41)

項目 31 に記載の組成物を含む乾燥粉末吸入器を備える薬物送達装置。

(項目 42)

微粒化した形態の項目 1 から 30 のいずれか一項に記載の化合物の結晶形。

(項目 43)

薬剤として許容される担体および項目 42 に記載の化合物を含む医薬品組成物。

(項目 44)

10

20

30

40

50

前記担体がラクトースである、項目 4 3 に記載の組成物。

(項目 4 5)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルをリン酸と接触させることを含む、項目 2 に記載の化合物の調製方法。

(項目 4 6)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルを硫酸と接触させることを含む、項目 8 に記載の化合物の調製方法。

(項目 4 7)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルをシュウ酸と接触させて、ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの結晶性二シュウ酸塩の種晶を形成させるステップと、

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルをシュウ酸と接触させて、ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの二シュウ酸塩を形成させ、前記塩を不活性希釈剤中に溶解して溶液を形成するステップと、

前記種晶を前記溶液に加えるステップと

を含む、項目 1 4 に記載の化合物の調製方法。

(項目 4 8)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルを不活性希釈剤と接触させて、結晶性遊離塩基の種晶を形成させるステップと、

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルを不活性希釈剤と接触させて、結晶性遊離塩基を形成させ、得られた結晶性エステルを溶解させて溶液を形成するステップと、

前記種晶を前記溶液に加えるステップと

を含む、項目 2 0 に記載の化合物の調製方法。

(項目 4 9)

項目 4 5 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法によって調製された生成物。

(項目 5 0)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの結晶性塩または結晶性遊離塩基を形成させることを含む、ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルを精製するための方法における項目 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

(項目 5 1)

治療において、または医薬品として用いるための項目 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 5 2)

医薬品の製造のための項目 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の化合物の使用。

(項目 5 3)

前記医薬品が哺乳動物におけるムスカリン性受容体に拮抗させるためのものである、項目 5 2 に記載の使用。

10

20

30

40

50

(項目 5 4)

前記医薬品が肺障害を治療するためのものである、項目 5 2 に記載の使用。

(項目 5 5)

前記医薬品が気管支拡張をもたらすためのものである、項目 5 2 に記載の使用。

(項目 5 6)

前記医薬品が慢性閉塞性肺疾患または喘息を治療するためのものである、項目 5 2 に記載の使用。

【 0 0 1 7 】

本発明の様々な態様を、添付の図面を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

10

【 0 0 1 8 】

【図 1】図 1 はビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル) ベンゾイル] メチルアミノ} エチル) ピペリジン-4-イルエステル (式 I の化合物) の結晶性ニリン酸塩の粉末 X 線回折 (P X R D) パターンを示す。

【図 2】図 2 は図 1 の結晶性塩の示差走査熱量測定法 (D S C) トレースを示す。

【図 3】図 3 は図 1 の結晶性塩の熱重量分析 (T G A) トレースを示す。

【図 4】図 4 は図 1 の結晶性塩の動的水分収着 (D M S) トレースを示す。

【図 5】図 5 は図 1 の結晶性塩の顕微鏡画像である。

【図 6】図 6 は、より不安定な形態の結晶性ニリン酸塩の P X R D パターンを示す。

20

【図 7】図 7 は、より不安定な形態の結晶性ニリン酸塩の D S C トレースを示す。

【図 8】図 8 は式 I の化合物の結晶性一硫酸塩の P X R D パターンを示す。

【図 9】図 8 の結晶性塩はさらに、図 9 の T G A トレースを特徴とする。

【図 10】図 8 の結晶性塩はさらに、図 10 の D S C トレースを特徴とする。

【図 11】図 8 の結晶性塩はさらに、図 11 の D M S トレースを特徴とする。

【図 12】図 8 の結晶性塩はさらに、図 12 の顕微鏡画像を特徴とする。

【図 13】図 13 は式 I の化合物の結晶性二シュウ酸塩の P X R D パターンを示す。

【図 14】図 13 の結晶性塩はさらに、図 14 の T G A トレースを特徴とする。

【図 15】図 13 の結晶性塩はさらに、図 15 の D S C トレースを特徴とする。

【図 16】図 13 の結晶性塩はさらに、図 16 の D M S トレースを特徴とする。

30

【図 17】図 13 の結晶性塩はさらに、図 17 の顕微鏡画像を特徴とする。

【図 18】図 18 は式 I の化合物の結晶性遊離塩基の形態 I の P X R D パターンを示す。

【図 19】図 18 の結晶性遊離塩基はさらに、図 19 の D S C トレースを特徴とする。

【図 20】図 18 の結晶性遊離塩基はさらに、図 20 の T G A トレースを特徴とする。

【図 21】図 18 の結晶性遊離塩基はさらに、図 21 の D M S トレースを特徴とする。

【図 22】図 18 の結晶性遊離塩基はさらに、図 22 の顕微鏡画像を特徴とする。

【図 23】図 23 は式 I の化合物の結晶性遊離塩基の形態 I I の P X R D パターンを示す。

。

【図 24】図 23 の結晶性遊離塩基はさらに、図 24 の D S C トレースを特徴とする。

【図 25】図 23 の結晶性遊離塩基はさらに、図 25 の T G A トレースを特徴とする。

40

【図 26】図 23 の結晶性遊離塩基はさらに、図 26 の D M S トレースを特徴とする。

【発明を実施するための形態】【 0 0 1 9 】

(発明の詳細な説明)

本発明は、ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル) ベンゾイル] メチルアミノ} エチル) ピペリジン-4-イルエステルの結晶形を提供する。結晶形は、遊離塩基、ニリン酸塩、一硫酸塩または二シュウ酸塩などの薬剤として許容される塩、あるいはそうした塩の薬剤として許容される溶媒和物であってよい。特定の実施形態では、結晶形はニリン酸塩である。

定義

50

本発明の化合物、組成物、方法およびプロセスを説明する場合、別段の指定のない限り、以下の用語は以下の意味を有する。

【0020】

「溶媒和物」という用語は、溶質すなわち、式 I の結晶性化合物の 1 個または複数の分子と、溶媒の 1 個または複数の分子によって形成される複合体または凝集物を意味する。そうした溶媒和物は一般に実質的に一定の溶質と溶媒のモル比を有する。この用語は、水との包接化合物を含む包接化合物も意味する。代表的な溶媒には、例として、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、酢酸などが含まれる。溶媒が水である場合、形成される溶媒和物は水和物である。

【0021】

「形態 I」という用語は、不活性希釈剤としての溶媒混合物の一部として水を用いる方法で調製される結晶性遊離塩基を指す。「形態 II」という用語は、不活性希釈剤として有機溶媒混合物を用いる、すなわち水を用いない方法で調製される結晶性遊離塩基を指す。

【0022】

「治療有効量」という用語は、治療を必要とする患者に投与したときに効果的に治療するのに十分な量を意味する。例えば、ムスカリン性受容体に拮抗させるための治療有効量は所望の拮抗効果を実現するその量である。同様に、肺障害を治療するための治療有効量は所望の治療結果を実現するその量であり、それは以下で述べるような疾患の防止、改善、抑制または緩和であってよい。

【0023】

本明細書で用いる「治療する (treating)」または「治療 (treatment)」という用語は、

(a) 疾患または病状の発症を防止する、すなわち、そうした疾患または病状にかかっているかまたはかかる恐れがあると考えられる患者に予防的治療をすること、

(b) 疾患または病状を改善する、すなわち、そうした疾患または病状を有する患者の疾患または病状を排除するかその後退をもたらすこと、

(c) 疾患または病状を抑制する、すなわち、そうした疾患または病状を有する患者の疾患または病状の進行を遅くするかまたは止めること、または、

(d) そうした疾患または病状を有する患者の疾患または病状の症状を緩和することを含む、哺乳動物（特にヒト）などの患者における疾患または病状（COPD など）を治療することすなわち治療を意味する。

【0024】

「薬剤として許容される」という用語は、生物学的にであってもなくても望ましくなくはない材料を指す。例えば、「薬剤として許容される担体」という用語は、組成物中に混ぜ込み、望ましくない生物学的影響を引き起こすことなく、また組成物中の他の成分と有害な形で相互作用することなく患者に投与することができる材料を指す。そうした薬剤として許容される材料は、一般に毒物学的試験および製造上の試験の必要な基準に適合しており、米国食品医薬品局によって適切な非活性成分として認定されている材料を含む。

【0025】

「単位剤形」という用語は、患者に投薬するのに適している物理的に離散した単位を指す。すなわち、各単位が単独で、または 1 つまたは複数の追加的単位と併用して、所望の治療効果をもたらすように計算された所定量の本発明の化合物を含むことを指す。例えば、そうした単位剤形はカプセル剤、錠剤、丸剤などであってよい。

合成

本発明の結晶性化合物は、容易に入手できる出発材料から、以下および実施例に記載のようにして合成することができる。具体的なプロセス条件（すなわち、反応温度、時間、反応物のモル比、溶媒、圧力等）を示すが、別段の指定のない限り、他のプロセス条件も用いることができることを理解されたい。一般に、反応は適切な不活性希釈剤中で実施する。その希釈剤の例には、これらに限定されないが、メタノール、エタノール、イソプロ

10

20

30

40

50

パノール、イソブタノール、酢酸エチル、アセトニトリル、ジクロロメタン、メチルtert-ブチルエーテルなど、および一般に水を含むその混合物が含まれる。上記反応のいずれかが完了したら、結晶性化合物は、沈殿、濃縮、遠心分離などの通常の任意の手段で反応混合物から単離することができる。

【0026】

本発明で用いるビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルは、実施例に記載の手順を用いるか、またはMammenらの米国特許出願第2005/0203133号に記載の手順を用いて市販の出発材料および試薬から容易に調製することができる。

10

【0027】

本発明の方法で述べるモル比は、当業者が利用できる様々な方法で容易に決定できる。例えば、そうしたモル比は、 ^1H NMRによって容易に決定できる。あるいは、モル比を元素分析法およびHPLC法を用いて決定できる。

ニリン酸塩結晶

本発明のニリン酸塩は一般に、式Iの化合物のモル当量当たり約1.9~2.1モル当量のリン酸を含む、式Iの化合物のモル当量当たり約1.8~2.2モル当量のリン酸を含む。

【0028】

一般に、式Iの化合物の結晶性ニリン酸塩または薬剤として許容されるその溶媒和物は、ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルをリン酸と接触させて調製することができる。例えば、エステルを希釈リン酸水溶液と接触させて無定形ニリン酸塩を形成させ、次いでこれを不活性希釈剤と接触させることができる。

20

【0029】

無定形ニリン酸塩を調製するために、通常エステルをリン酸水溶液中に溶解させ、水で希釈し、凍結乾燥により単離する。一般に、この反応は約24℃などの約0~30℃の温度範囲で実施する。エステルのmgと1Mリン酸のmlとの比は約1:3.5を含む約1:3~約1:4である。次いで得られた無定形ニリン酸塩を一般に約15mg/ml~約25mg/mlの不活性希釈剤と接触させる。一般に、この反応は約60℃などの約50~70℃の温度範囲で実施する。

30

【0030】

特定の実施形態では、500mgのエステルを5mlの水および1.5mlの1Mリン酸にとる。1Mリン酸を加えて(2.1モル当量に等しくする)、pHを約pH5.3に調節する。透明溶液をろ過し、凍結させ、凍結乾燥で乾燥させて無定形ニリン酸塩を得る。得られた無定形ニリン酸塩をイソプロパノール:アセトニトリル(1:1)溶液に加え、続いて水を加える。この反応では、無定形のニリン酸塩のmgとイソプロパノール:アセトニトリルのmlの比は、約2:1を含む約2:0.9~約2:2である。

【0031】

あるいは、結晶性ニリン酸塩は、エステルを約2.0~約2.1モル当量のリン酸と接触させて調製することができる。一般に、この反応は、不活性希釈剤中で、約50℃などの約40~60℃の温度範囲で実施する。特定の実施形態では、エステルをイソプロパノール:アセトニトリル(1:1)溶液に加え、続いて水を加える。加熱後、リン酸を加える。この反応では、エステルのmgとリン酸のmlの比は、約5:16を含む約5:14~約5:18である。

40

【0032】

結晶性ニリン酸塩を調製するための上記方法はどちらも、より不安定な離散したニリン酸塩結晶形態の生成をもたらすことができる。図6および図7は、このより不安定な形態のPXRDパターンおよびDSCトレースをそれぞれ示す。より安定であるニリン酸塩結

50

晶が一般的な形態であるが、より不安定な二リン酸塩形態物が存在する場合、溶媒混合物中の水分含量を増大させ、その懸濁液を約 50℃～約 70℃、典型的には約 60℃で約 2～約 6 時間、典型的には約 2 時間予備加熱し、続いて緩やかに攪拌しながら室温に冷却することによって、その二リン酸塩形態物をより安定な結晶に容易に転換させることができる。

一硫酸塩結晶

本発明の一硫酸塩は、一般に、式 I の化合物のモル当量当たり約 0.9～1.1 モル当量の硫酸を含む、式 I の化合物のモル当量当たり約 0.8～1.2 モル当量の硫酸を含む。

【0033】

式 I の化合物の結晶性一硫酸塩または薬剤として許容されるその溶媒和物は、ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル) ベンゾイル] メチルアミノ} エチル) ピペリジン-4-イルエステルを硫酸と接触させて調製することができる。例えば、エステルは、1 N 硫酸水溶液と接触させて一硫酸塩を形成させ、次いでそれを不活性希釈剤と接触させることができる。

【0034】

一硫酸塩を調製するために、通常エステルを 1 : 1 アセトニトリル : 水に溶解させ、硫酸水溶液で希釈し、水で希釈し、凍結乾燥により単離する。一般に、この反応は約 24℃などの約 0～30℃の温度範囲で実施する。エステルの mg と水の中の 1 N 硫酸 ml との比は、約 305 mg / ml を含む約 325 mg / ml ～約 285 mg / ml である。一つの特
20
の特定の実施形態では、442 mg のエステルを 5 ml の 1 : 1 アセトニトリル : 水にとり、pH を監視しながら 1.45 ml の 1 N 硫酸を徐々に加える。次いで、pH を約 pH 3.3 に調節する。透明溶液をろ過し、凍結させ、凍結乾燥で乾燥させて一硫酸塩を得る。次いで、得られた一硫酸塩を一般に約 10 mg / ml ～約 20 mg / ml の不活性希釈剤と接触させる。一実施形態では、この反応を第 1 の温度で実施し、次いでより低い第 2 の温度で実施する。その両方の温度は、60℃～70℃などの約 50～80℃の範囲の温度である。特定の実施形態では、一硫酸塩をイソプロパノール : アセトニトリル (10 : 1) 溶液に加える。この反応では、一硫酸塩の mg とイソプロパノール : アセトニトリルの ml の比は、約 15 : 1 を含む約 15 : 3 ～約 15 : 0.8 である。

【0035】

他の実施形態では、この反応を第 1 の温度で実施し、次いでより低い 2 つの温度サイクルで実施する。第 1 の温度範囲は、約 70℃などを含む約 50～80℃である。第 1 のより低い温度サイクルは約 60℃～30℃の範囲である。第 2 のより低い温度サイクルは約 40℃～30℃である。特定の実施形態では、一硫酸塩をイソプロパノール : アセトニトリル (10 : 1) 溶液に加える。この反応では、一水和物塩の mg とイソプロパノール : アセトニトリルの ml の比は、約 161 : 9 を含む約 161 : 7 ～約 161 : 11 である。

二シュウ酸塩結晶

本発明の二シュウ酸塩は一般に、式 I の化合物のモル当量当たり約 1.9～2.1 モル当量のシュウ酸を含む、式 I の化合物のモル当量当たりの約 1.8～2.2 モル当量のシュウ酸を含む。

【0036】

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル) ベンゾイル] メチルアミノ} エチル) ピペリジン-4-イルエステルの結晶性二シュウ酸塩または薬剤として許容されるその溶媒和物は、ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル) ベンゾイル] メチルアミノ} エチル) ピペリジン-4-イルエステルをシュウ酸と接触させて調製することができる。例えば、エステルを、1 M シュウ酸水溶液と接触させて二シュウ酸塩を形成させ、次いでこれを不活性希釈剤と接触させることができる。

【0037】

10

20

30

40

50

ニシュウ酸塩を調製するために、通常エステルを1：1アセトニトリル：水に溶解させ、シュウ酸水溶液で希釈し、水で希釈し、凍結乾燥により単離する。一般に、この反応は約24℃などの約0～30℃の温度範囲で実施する。エステルのmgと1Mシュウ酸水溶液のmlの比は、約300mg/mlを含む約320mg/ml～約280mg/mlである。一つの特実の実施形態では、510mgのエステルを5mlの1：1アセトニトリル：水にとり、pHを監視しながら、1.7mlの1Mシュウ酸水溶液を徐々に加える。pHを約pH3.0に調節する。透明溶液をろ過し、凍結させ、凍結乾燥で乾燥させてニシュウ酸塩を得る。

【0038】

一実施形態では、次いで得られたニシュウ酸塩を一般に約5mg/ml～約15mg/mlの不活性希釈剤に接触させる。一般に、この反応は約60℃などの約50～70℃の温度範囲で実施する。特実の実施形態では、ニシュウ酸塩をイソプロパノール：水（94：6）溶液に加える。この反応では、ニシュウ酸塩のmgとイソプロパノール：水のmlの比は、約10：1を含む約10：0.8～約10：3である。

【0039】

結晶性ニシュウ酸塩は、エステルの結晶性ニシュウ酸塩（上記のようにして合成）の種晶を形成し、エステルをシュウ酸と接触させることによってエステルのニシュウ酸塩を形成し、その塩を不活性希釈剤中に溶解させて溶液を形成させ、その種晶を溶液に加えることによって調製することもできる。

【0040】

一実施形態では、ニシュウ酸塩は一般に約5mg/ml～約15mg/mlの不活性希釈剤と接触させる。一般に、この反応は約60℃などの約50～70℃の第1の温度範囲で実施する。次いでその混合物を約4℃などの約3～10℃の第2の温度範囲まで冷却する。次いでエステルの結晶性ニシュウ酸塩の種晶を加える。特実の実施形態では、ニシュウ酸塩をイソプロパノール：水（94：6）溶液に加える。この反応では、ニシュウ酸塩のmgとイソプロパノール：水のmlの比は、約150：13を含む約150：10～約150：16である。

遊離塩基結晶

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-（2-（4-（4-カルバモイルペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル）メチルアミノ）エチル）ペリジン-4-イルエステルの結晶性遊離塩基または薬剤として許容されるその溶媒和物は、ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-（2-（4-（4-カルバモイルペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル）メチルアミノ）エチル）ペリジン-4-イルエステルを不活性希釈剤と接触させることによって調製することができる。

【0041】

結晶性遊離塩基の1つの形態物（形態I）を調製するために、エステルを一般に約5mg/ml～約15mg/mlの不活性希釈剤と接触させる。一般に、この反応は約25℃などの約20～30℃の温度範囲で実施する。特実の実施形態では、エステルを水：アセトニトリル（1：1）溶液に加える。この反応では、エステルのmgと水：アセトニトリルのmlの比は、約100：0.5を含む約100：0.3～約100：1である。あるいは、反応を、約25℃などの約20～30℃の範囲の第1の温度で実施し、次いで約4℃などの約3～10℃の範囲の第2の温度に冷却することができる。

【0042】

結晶性遊離塩基は、結晶性遊離塩基（上記のようにして合成）の種晶を形成し、エステルを不活性希釈剤と接触させることによって結晶性遊離塩基を形成し、得られた結晶性エステル中に溶解させて溶液を形成させ、その種晶を溶液に加えることによって調製することもできる。

【0043】

一実施形態では、エステルは一般に約5mg/ml～約15mg/mlの不活性希釈剤と接触させる。一般に、この反応は約60℃などの約50～70℃の第1の温度範囲で実

10

20

30

40

50

施する。次いでその混合物を約 4℃などの約 3～10℃の第 2 の温度範囲まで冷却する。次いでエステルの結晶性遊離塩基の種晶を加え、続いて加熱と冷却のサイクルを数回繰り返す。第 1 の加熱サイクルを、例えば約 30～40℃、次いで約 50℃にし、続いて室温に冷却して行う。第 2、第 3 および第 4 の加熱サイクルは、試料を約 60℃などの約 50～70℃の温度範囲に加熱し、続いて室温に冷却して行う。特定の実施形態では、エステルを水：アセトニトリル（1：1）溶液に加え、続いて水を加え、さらにアセトニトリルを加える。この反応では、エステルの mg とアセトニトリルおよび水の ml の比は、約 230：0.2 を含む約 230：0.1～約 230：0.5 である。

【0044】

結晶性遊離塩基の他の形態物（形態 II）を調製するために、エステルを一般に約 200 mg/ml～約 1000 mg/ml の不活性希釈剤に接触させる。一般に、この反応は約 25℃などの約 20～30℃の温度範囲で実施する。特に適切な不活性希釈剤はアセトニトリルとメチルトーブチルエーテルの組合せである。特定の実施形態では、ピフェニル-2-イルカルバミン酸 1-（2-〔4-（4-カルバモイルペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル〕メチルアミノ）エチル）ペリジン-4-イルエステルをアセトニトリルに加え、続いて、メチルトーブチルエーテルを加え、さらにアセトニトリルを加える。この反応では、エステルの mg とアセトニトリル：メチルトーブチルエーテル（1：2 溶液）の ml の比は、約 70：0.45 を含む約 200 mg/ml～約 1000 mg/ml である。

結晶特性

様々な利点のなかでとりわけ、式 I の結晶性化合物を形成させると、式 I の化合物を精製するのに有用であることが分かった。例えば、結晶性ニリン酸塩は 96% 超、典型的には 98% 超の純度を有する。

【0045】

粉末 x 線回折（PXRD）の分野でよく知られているように、PXRD スペクトルの相対的ピーク高さは、試料調製や装置の形状に関連する多くの要因に依存するが、ピーク位置は実験上の細部の影響を比較的受けない。したがって、一実施形態では、本発明の結晶性化合物は、特定のピーク位置を有する PXRD パターンを特徴とする。

【0046】

一実施形態では、式 I の化合物の結晶性ニリン酸塩は、6.4±0.2、7.6±0.2、8.6±0.2、13.7±0.2、15.0±0.2、19.4±0.2、21.6±0.2、22.1±0.2、22.9±0.2 および 23.7±0.2 から選択される 2θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する PXRD パターンを特徴とする。一つの実施形態では、この結晶形は、15.0±0.2、19.4±0.2、21.6±0.2 および 23.7±0.2 の 2θ 値での回折ピークを含む PXRD パターンを特徴とする。他の実施形態では、結晶性ニリン酸塩はそのピーク位置が図 1 に示すものと実質的に一致する PXRD パターンを特徴とする。図 1 の PXRD パターンと、図 6 に示すようなより不安定なニリン酸塩についての PXRD パターンの間の差に注目されたい。

【0047】

一実施形態では、式 I の化合物の結晶性一硫酸塩は、7.7±0.2、8.4±0.2、8.8±0.2、12.6±0.2、13.7±0.2、14.1±0.2、15.3±0.2、16.0±0.2、19.7±0.2、20.6±0.2、23.0±0.2 および 24.4±0.2 から選択される 2θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する PXRD パターンを特徴とする。一つの実施形態では、この結晶形は、12.6±0.2、19.7±0.2、23.0±0.2 および 24.4±0.2 の 2θ 値での回折ピークを含む PXRD パターンを特徴とする。他の実施形態では、結晶性一硫酸塩はそのピーク位置が図 8 に示すものと実質的に一致する PXRD パターンを特徴とする。

【0048】

一実施形態では、式 I の化合物の結晶性二シュウ酸塩は、7.7±0.2、8.7±0.2、13.5±0.2、14.0±0.2、14.8±0.2、15.4±0.2、1

10

20

30

40

50

5. 8 ± 0. 2、19. 4 ± 0. 2、22. 9 ± 0. 2、23. 3 ± 0. 2 および 24. 6 ± 0. 2 から選択される 2 θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する P X R D パターンを特徴とする。一つの特定の実施形態では、この結晶形は、8. 7 ± 0. 2、14. 0 ± 0. 2、19. 4 ± 0. 2 および 22. 9 ± 0. 2 の 2 θ 値での回折ピークを含む P X R D パターンを特徴とする。他の実施形態では、結晶性ニシュウ酸塩はそのピーク位置が図 13 に示すものと実質的に一致する P X R D パターンを特徴とする。

【0049】

一実施形態では、式 I の化合物の結晶性遊離塩基（形態 I）は 4. 7 ± 0. 2、9. 6 ± 0. 2、12. 7 ± 0. 2、13. 7 ± 0. 2、16. 7 ± 0. 2、17. 4 ± 0. 2、18. 5 ± 0. 2、19. 4 ± 0. 2、20. 8 ± 0. 2、21. 4 ± 0. 2、24. 2 ± 0. 2 および 25. 6 ± 0. 2 の 2 θ 値での回折ピークを含む P X R D パターンを特徴とする。一つの特定の実施形態では、この結晶形は、4. 7 ± 0. 2、18. 5 ± 0. 2、20. 8 ± 0. 2 および 25. 6 ± 0. 2 の 2 θ 値での回折ピークを含む P X R D パターンを特徴とする。他の実施形態では、結晶性遊離塩基（形態 I）はそのピーク位置が図 18 に示すものと実質的に一致する P X R D パターンを特徴とする。

【0050】

一実施形態では、式 I の化合物の結晶性遊離塩基（形態 I I）は、4. 6 ± 0. 2、9. 3 ± 0. 2、12. 9 ± 0. 2、13. 6 ± 0. 2、14. 0 ± 0. 2、14. 6 ± 0. 2、16. 5 ± 0. 2、18. 6 ± 0. 2、19. 1 ± 0. 2、20. 9 ± 0. 2、22. 1 ± 0. 2、22. 7 ± 0. 2 および 25. 7 ± 0. 2 から選択される 2 θ 値で 2 つ以上の回折ピークを有する P X R D パターンを特徴とする。一つの特定の実施形態では、この結晶形は、4. 6 ± 0. 2、18. 6 ± 0. 2、22. 1 ± 0. 2 および 22. 7 ± 0. 2 の 2 θ 値での回折ピークを含む P X R D パターンを特徴とする。他の実施形態では、結晶性遊離塩基（形態 I I）はそのピーク位置が図 23 に示すものと実質的に一致する P X R D パターンを特徴とする。

【0051】

さらに他の実施形態では、式 I の結晶性化合物はその示差走査熱量測定法（D S C）トレースを特徴とする。したがって、式 I の化合物の結晶性ニリン酸塩は、図 2 で示すように、約 154. 5℃で最大の吸熱熱流を示すその D S C トレースを特徴とする。図 2 の D S C トレースと、図 7 のより不安定なニリン酸塩の D S C トレースの間の差に注目されたい。安定な結晶性ニリン酸塩（図 2）の D S C トレースは典型的な低い温度遷移を示し、続いて約 154. 5℃での比較的シャープなピークを示す。他方、不安定な結晶性ニリン酸塩（図 7）の D S C トレースは、約 150. 3℃でのより小さい融解転移の前にはっきりした肩を示す。

【0052】

同様に、式 I の化合物の結晶性一硫酸塩は、図 10 で示すように、約 76. 5℃で最大の吸熱熱流を示すその D S C トレースを特徴とし、結晶性ニシュウ酸塩は、図 15 で示すように、約 73. 7℃で最大の吸熱熱流を示すその D S C トレースを特徴とし、結晶性遊離塩基（形態 I）は、図 19 で示すように、約 102. 7℃で最大の吸熱熱流を示すその D S C トレースを特徴とし、結晶性遊離塩基（形態 I I）は、図 24 で示すように、約 98. 6℃で最大の吸熱熱流を示すその D S C トレースを特徴とする。

【0053】

本発明の結晶性化合物は許容される適度なレベルの吸湿性を有する可逆的吸着／脱着プロファイルを示す。すなわち、最大で 90%の相対湿度に曝した場合、式 I の化合物の結晶性ニリン酸塩は 2%未満の増量を示し；最大で 90%の相対湿度に曝した場合、結晶性一硫酸塩は 4%未満の増量を示し；最大で 90%の相対湿度に曝した場合、結晶性ニシュウ酸塩は 3%未満の増量を示し；最大で 90%の相対湿度に曝した場合、結晶性遊離塩基（形態 I）は 6%未満の増量を示し；最大で 90%の相対湿度に曝した場合、結晶性遊離塩基（形態 I I）は 4%未満の増量を示すことが実証された。

【0054】

さらに、本発明の結晶性化合物は、高い温度と湿度に曝しても安定であることが分かった。例えば、40℃、75%相対湿度で1か月間保存した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析して、本発明の結晶性化合物について、検出可能な化学的分解は見られなかった（すなわち、0.5%未満の分解）。

【0055】

本発明の結晶性化合物のこれらの特性を以下の実施例でさらに説明する。

医薬品組成物および配合物

式Iの結晶性化合物は一般に医薬品組成物または配合物の形態で患者に投与する。そうした医薬品組成物は、これらに限定されないが、吸入、経口、経鼻、局所（経皮を含む）および非経口方式の投与を含む可能な任意の投与経路で患者に投与することができる。しかし、当業者は、本発明の結晶性塩が配合されると、それはもはや結晶形ではない、すなわちその塩を適切な担体中に溶解させることができることを理解されよう。

【0056】

したがって、一実施形態では、本発明は、薬剤として許容される担体もしくは賦形剤、および結晶性のビフェニル-2-イルカルバミン酸1-（2-〔4-（4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル〕メチルアミノ〕エチル）ピペリジン-4-イルエステルまたは薬剤として許容されるその溶媒和物を含む医薬品組成物を対象とする。医薬品組成物は、必要に応じて、他の治療薬および／または配合剤を含むことができる。

【0057】

本発明の医薬品組成物は一般に、活性剤として、治療有効量の結晶性ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-（2-〔4-（4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル〕メチルアミノ〕エチル）ピペリジン-4-イルエステルまたは薬剤として許容されるその溶媒和物を含む。通常、そうした医薬品組成物は約0.01～約30重量%、例えば約0.01～約10重量%の活性剤を含む約0.01～約95重量%の活性剤を含む。

【0058】

従来の任意の担体または賦形剤を、本発明の医薬品組成物に用いることができる。担体もしくは賦形剤、または担体もしくは賦形剤の組合せの具体的な選択は、具体的な患者を治療するのに用いる投与の方式、または病状または疾患の状態のタイプに応じて変わることになる。この関連では、特定の投与方式のための適切な医薬品組成物の調製は、十分に薬剤業界の技術者の範囲内である。さらに、そうした組成物のための成分は、例えばSigma, P. O. Box 14508, St. Louis, MO 63178から市販されている。従来の配合技術のさらなる説明は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000年)；およびH. C. AnselらのPharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999年)に記載されている。

【0059】

薬剤として許容される担体として作用することができる材料の代表的な例には、これらに限定されないが、以下のもの、すなわち：ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖類；トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロースなどのセルロースおよびその誘導体；粉末トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバターおよび坐薬用ワックス賦形剤；ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油および大豆油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール；グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウムおよび水

酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；非発熱性水；等張性生理食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；リン酸緩衝液；クロロフルオロカーボンおよびヒドロフルオロカーボンなどの圧縮噴射ガス；ならびに医薬品組成物で用いられる他の非毒性の適合物質が含まれる。

【0060】

本発明の医薬品組成物は、一般に、発明の化合物を薬剤として許容される担体および1種または複数の任意選択の成分と、完全にかつ密に混合または配合することによって調製する。必要であるかまたはそれを望む場合、次いで得られた均一に配合した混合物を、従来の手順および装置を用いて錠剤、カプセル剤、丸剤、小型容器、カートリッジ、分注器などに成形するかまたはそれに詰め込むことができる。

10

【0061】

一実施形態では、本発明の医薬品組成物は吸入投与に適している。吸入投与のための適切な医薬品組成物は典型的にはエアロゾルまたは粉末の形態である。そうした組成物は通常、噴霧型吸入器、計量式吸入器（MDI）、乾燥粉末吸入器（DPI）または同様の送達装置などのよく知られた送達装置を用いて投与される。

【0062】

本発明の特定の実施形態では、活性剤を含む医薬品組成物を、噴霧型吸入器を用いて吸入で投与する。そうした噴霧装置は一般に、活性剤を含む医薬品組成物を、患者の気道中に送られる霧状物として、噴霧状にする高速の空気の流れを発生させる。したがって、噴霧型吸入器での使用のために配合する場合、活性剤を適切な担体中に溶解させて溶液を形成させる。適切な噴霧装置は例えばPARI GmbH（Starnberg, Germany）から市販されている。他の噴霧装置には、Respimat（Boehringer Ingelheim）や、例えばLloydらの米国特許第6,123,068号およびWO97/12687（Eicherら）に記載されているものが含まれる。その開示全体を参照により本明細書に組み込む。

20

【0063】

噴霧型吸入器で用いるための代表的な医薬品組成物は、約0.05 μg/mL～約10 mg/mLの式Iの結晶性化合物または薬剤として許容されるその溶媒和物を含む水溶液を含む。一実施形態では、水性配合物は等張性である。一実施形態では、水性配合物は約4～6の範囲のpHである。特定の実施形態では、水性配合物はクエン酸塩緩衝剤で緩衝させて約5のpHにしたものである。他の特定の実施形態では、水性配合物は、約0.1 mg/mL～約1.0 mg/mLのビフェニル-2-イルカルバミン酸1-（2-〔4-（4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル〕メチルアミノ）エチル）ピペリジン-4-イルエステルの遊離塩基相当物を含む。

30

【0064】

本発明の他の特定の実施形態では、活性剤を含む医薬品組成物を、DPIを用いた吸入によって投与する。そうしたDPIは一般に活性剤を、吸気の際に患者の気流中に分散される自由流動性粉末として投与する。自由流動性の粉末を得るために、活性剤は一般にラクトースまたはデンプンなどの適切な賦形剤を用いて配合する。微粒化は、結晶サイズを肺送達に適したサイズに小さくする一般的な方法である。通常、活性剤を微粒化し、適切な担体と混合して吸入できるサイズの微粒化粒子の懸濁液を形成させる。ここで、「微粒化した粒子」または「微粒化した形態」とは、粒子の少なくとも約90%が約10 μm未満の直径を有することを意味する。所望の粒子サイズが得られる限り、微細ミリング、裁断、破碎、粉碎、ミリング、篩別、摩砕、粉状化などの粒子サイズを小さくする他の方法も用いることができる。

40

【0065】

DPIで用いるための代表的な医薬品組成物は、約1 μm～約100 μmの粒子サイズを有する乾燥ラクトースと、Iの結晶性化合物または薬剤として許容されるその溶媒和物の微粒化した粒子を含む。そうした乾燥粉末配合は、例えば、ラクトースを活性剤と混合し、次いでその成分をドライブレンドすることによって作製することができる。あるいは

50

、望むなら、活性剤を賦形剤なしで配合することができる。次いで医薬品組成物は一般に、乾燥粉末送達装置で用いるために、乾燥粉末分注器中か、または吸入カートリッジもしくはカプセル剤に詰め込むことができる。

【0066】

DPI送達装置の例には、Diskhaler (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC; 例えば、Newellらの米国特許第5,035,237号参照); Diskus (GlaxoSmithKline; 例えば、Daviesらの米国特許第6,378,519号参照); Turbuhaler (AstraZeneca, Wilmington, DE; 例えば、Wetterlinの米国特許第4,524,769号参照); Rotahaler (GlaxoSmithKline; 例えば、Hallworthらの米国特許第4,353,365号参照) およびHandihaler (Boehringer Ingelheim) が含まれる。適切なDPI装置の他の例は、Casperらの米国特許第5,415,162号、Evansらの米国特許第5,239,993号ならびにArmstrongらの米国特許第5,715,810号およびその中の引用文献に記載されている。上記特許の開示全体を参照により本明細書に組み込む。

10

【0067】

本発明のさらに他の具体的な実施形態では、活性剤を含む医薬品組成物を、MDIを用いて吸入により投与する。MDIは一般に、圧縮噴射ガスを用いて、一定量の活性剤あるいは薬剤として許容されるその塩もしくは溶媒和物または立体異性体を放出する。したがって、MDIを用いて投与される医薬品組成物は一般に、活性剤の液化噴射剤中の溶液または懸濁液を含む。C₂Cl₃Fなどのクロロフルオロカーボンや、1,1,1,2-テトラフルオロエタン (HFA134a) および1,1,1,2,3,3,3-ヘプタフルオロ-n-プロパン (HFA227) などのヒドロフルオロアルカン (HFA) を含む適切な任意の液化噴射剤を用いることができる。オゾン層への影響を及ぼすクロロフルオロカーボンに対する懸念があるため、HFAを含む配合物が一般に好ましい。HFA配合物の他の任意選択の成分には、エタノールまたはペンタンなどの共溶媒や、トリオレイン酸ソルビタン、オレイン酸、レシチンおよびグリセリンなどの界面活性剤が含まれる。例えば、Purewalらの米国特許第5,225,183号、欧州特許第0717987A2号 (Minnesota Mining and Manufacturing Company) およびWO92/22286 (Minnesota Mining and Manufacturing Company) を参照されたい。その開示全体を参照により本明細書に組み込む。

20

30

【0068】

計量式吸入器で用いるための代表的な医薬品組成物は約0.01~5重量%の式Iの結晶性化合物または薬剤として許容されるその溶媒和物; 約0~20重量%のエタノール; および約0~5重量%の界面活性剤を含み、その残りはHFA噴射剤である。

【0069】

そうした組成物は一般に、冷却または圧縮したヒドロフルオロアルカンを、活性剤、エタノール (存在する場合) および界面活性剤 (存在する場合) を含む適切な容器に加えて調製する。懸濁液を調製するためには、活性剤を微粒化し、次いで噴射剤と一緒にする。次いで配合物を計量式吸入器装置の一部をなすエアロゾル小型容器に詰め込む。HFA噴射剤を用いて使用するために特に開発された計量式吸入器装置の例は、Mareckiの米国特許第6,006,745号およびAshurstらの同第6,143,277号に記載されている。あるいは、懸濁液配合物は、活性剤の微粒化粒子上への界面活性剤のコーティング物を噴霧乾燥することによって調製することができる。例えばWO99/53901 (Glaxo Group Ltd.) およびWO00/61108 (Glaxo Group Ltd.) を参照されたい。上記特許および出願の開示全体を参照により本明細書に組み込む。

40

【0070】

50

吸入投薬に適した呼吸用の粒子の調製方法、および配合物ならびに装置の他の例については、Ga oらの米国特許第6, 268, 533号、Tro f a s tの米国特許第5, 983, 956号；Br i g g n e rらの米国特許第5, 874, 063号；およびJa k u p o v i cらの米国特許第6, 221, 398号；ならびにWO99/55319 (G l a x o G r o u p L t d .) およびWO00/30614 (A s t r a Z e n e c a A B) を参照されたい。その開示全体を参照により本明細書に組み込む。

【0071】

他の実施形態では、本発明の医薬品組成物は経口投与に適している。経口投与のために適した医薬品組成物は、カプセル剤、錠剤、丸剤、トローチ剤、カシェ剤、糖衣錠、粉末、顆粒剤の形態；または、水性もしくは非水性液体中の液剤または懸濁剤として；または、水注油型もしくは油中水型乳剤として；または、エリキシル剤もしくはシロップ剤などとしてであってよい。それぞれ、活性成分として所定量の本発明の塩を含む。医薬品組成物は単位剤形で包装することができる。

【0072】

固体剤形（すなわち、カプセル剤、錠剤、丸剤などとして）で経口投与しようとする場合、本発明の医薬品組成物は一般に、活性成分としての本発明の結晶性化合物と、クエン酸ナトリウムまたは第二リン酸カルシウムなどの1種または複数の薬剤として許容される担体を含む。そうした固体剤形は、任意選択的または代替的に、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトールおよび／またはケイ酸などの充てん剤すなわち増量剤；カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアカシアなどの結合剤；グリセロールなどの保湿剤；寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩および／または炭酸ナトリウムなどの崩壊剤；パラフィンなどの溶解遅延剤；四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤；セチルアルコールおよび／またはグリセロールモノステアレートなどの湿潤剤；カオリンおよび／またはベントナイト粘土などの吸収剤；タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウムおよび／またはその混合物などの滑剤；着色剤ならびに緩衝剤を含むこともできる。

【0073】

離型剤、湿潤剤、コーティング剤、甘味料、香味剤および芳香剤、保存剤ならびに抗酸化剤が本発明の医薬品組成物中に存在してもよい。薬剤として許容される抗酸化剤の例には、アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤；バルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤；ならびにクエン酸、エチレンジアミン4酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤が含まれる。錠剤、カプセル剤、丸剤などのためのコーティング剤には、酢酸フタル酸セルロース（CAP）、ポリビニルアセテートフタレート（PVAP）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸-メタクリル酸エステルコポリマー、セルロースアセテートトリメリート（CAT）、カルボキシメチルエチルセルロース（CMC）、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートスクシネート（HPMCAS）などの腸溶コーティングに用いるものが含まれる。

【0074】

望むなら、本発明の医薬品組成物は、例えば、様々な特性のヒドロキシプロピルメチルセルロースまたは他のポリマーマトリクス、リボソームおよび／またはミクロスフェアを用いて、活性成分の持続放出または制御放出をもたらすように配合することもできる。

【0075】

さらに、本発明の医薬品組成物は任意選択で乳白剤を含むことができ、胃腸管の特定の部位において遅延した形で、活性成分だけかまたはそれを優先的に放出するように配合することができる。用いることができる埋め込み型組成物の例には、ポリマー系物質やワッ

クスが含まれる。適切な場合、1種または複数の上記賦形剤を用いて、活性成分をマイクロカプセル化した形態にすることもできる。

【0076】

経口投与用の適切な液状剤形には、例えば薬剤として許容される乳剤、マイクロエマルジョン、液剤、懸濁剤、シロップ剤およびエリキシル剤が含まれる。そうした液状剤形は一般に、活性成分、不活性希釈剤、例えば水または他の溶媒、可溶化剤、ならび乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジ、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、油類（特に綿実油、ラッカセイ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコール、ソルビタンの脂肪酸エステルおよびその混合物などを含む。懸濁剤は、活性成分に加えて、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタ水酸化物、ベントナイト、寒天およびトラガカント、ならびにその混合物などの懸濁化剤を含むことができる。

10

【0077】

本発明の結晶性化合物は、既知の経皮送達系および賦形剤を用いて経皮的に投与することもできる。例えば、本発明の化合物を、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールモノラウレート、アザシクロアルカン-2-オンなどの浸透促進剤と混合し、パッチまたは類似の送達系に組み込むことができる。望むなら、そうした経皮組成物中に、ゲル化剤、乳化剤および緩衝剤を含む他の賦形剤も用いることができる。

20

【0078】

本発明の結晶性化合物は他の治療剤と併用投与することもできる。この併用療法は、一緒に配合する（例えば、単一の配合物中に一緒に包装する）かまたは別個に配合して（例えば、別個の単位剤形として包装する）、これらの第2の薬剤の1つまたは複数と一緒に本発明の化合物を用いることを含む。複数の薬剤を同一の配合物中に一緒にするか、または別個の単位剤形にする方法は当業界で周知である。

【0079】

他の治療剤は、他の気管支拡張薬（例えば、PDE₃阻害剤、アデノシン2b修飾因子およびβ₂アドレナリン作動性受容体作用薬）；抗炎症剤（例えば、コルチコステロイドなどのステロイド系抗炎症剤；非ステロイド系抗炎症剤（NSAID）およびPDE₄阻害剤）；他のムスカリン性受容体拮抗薬（すなわち、抗コリン剤（anticholinergic agent））；抗炎症薬（例えば、グラム陽性およびグラム陰性抗生物質または抗ウイルス剤）；抗ヒスタミン剤；プロテアーゼ阻害剤ならびに求心性遮断薬（例えば、D₂作用薬およびニューロキニン修飾因子）から選択することができる。

30

【0080】

本発明の1つの特定の実施形態は、（a）薬剤として許容される担体および治療有効量の式Iの化合物の結晶形と、（b）薬剤として許容される担体、およびコルチコステロイド；β₂アドレナリン作動性受容体作用薬；ホスホジエステラーゼ4阻害剤；またはその組合せなどのステロイド系抗炎症剤から選択される治療有効量の薬剤とを含む組成物であって、その式Iの化合物と上記薬剤と一緒にまたは別個に配合する組成物を対象とする。他の実施形態では、（b）は薬剤として許容される担体と、治療有効量のβ₂アドレナリン作動性受容体作用薬およびステロイド系抗炎症剤である。第2の薬剤は、薬剤として許容される塩または溶媒和物の形態で、適切な場合、光学的に純粋な立体異性体として用いることができる。

40

【0081】

本発明の結晶性化合物と併用できる代表的なβ₂アドレナリン作動性受容体作用薬には、これらに限定されないが、サルメテロール、サルブタモール、フォルモテロール、サルメテロール、フェノテロール、テルブタリン、アルブテロール、イソエタリン、メタプロテレノール、ピトルテロール、ピルブテロール、レバルブテロール等、または薬剤として許容されるその塩が含まれる。用いることができる他のβ₂アドレナリン作動性受容体作

50

用薬には、これらに限定されないが、3-（4- { [6-（ {（2R）-2-ヒドロキシ-2- [4-ヒドロキシ-3-（ヒドロキシメチル）-フェニル] エチル} アミノ）-ヘキシル] オキシ} ブチル）ベンゼンスルホンアミドおよび3-（-3- { [7-（ {（2R）-2-ヒドロキシ-2- [4-ヒドロキシ-3-（ヒドロキシメチル）フェニル] エチル} -アミノ）ヘブチル] オキシ} -プロピル）ベンゼンスルホンアミドおよびWO 02/066422に記載の関連化合物（Glaxo Group Ltd.）；3- [3-（4- { [6-（ [（2R）-2-ヒドロキシ-2- [4-ヒドロキシ-3-（ヒドロキシメチル）フェニル] エチル} アミノ）ヘキシル] オキシ} ブチル）-フェニル] イミダゾリジン-2，4-ジオンおよびWO 02/070490（Glaxo Group Ltd.）に記載の関連化合物；3-（4- { [6-（ {（2R）-2- [3-（ホルミルアミノ）-4-ヒドロキシフェニル] -2-ヒドロキシエチル} アミノ）ヘキシル] オキシ} ブチル）-ベンゼンスルホンアミド、3-（4- { [6-（ {（2S）-2- [3-（ホルミルアミノ）-4-ヒドロキシフェニル] -2-ヒドロキシエチル} アミノ）ヘキシル] オキシ} ブチル）-ベンゼンスルホンアミド、3-（4- { [6-（ {（2R/S）-2- [3-（ホルミルアミノ）-4-ヒドロキシフェニル] -2-ヒドロキシエチル} アミノ）ヘキシル] オキシ} ブチル）-ベンゼンスルホンアミド、N-（tert-ブチル）-3-（4- { [6-（ {（2R）-2- [3-（ホルミルアミノ）-4-ヒドロキシフェニル] -2-ヒドロキシエチル} アミノ）-ヘキシル] オキシ} ブチル）ベンゼンスルホンアミド、N-（tert-ブチル）-3-（4- { [6-（ {（2S）-2- [3-（ホルミルアミノ）-4-ヒドロキシフェニル] -2-ヒドロキシエチル} アミノ）-ヘキシル] オキシ} ブチル）-ベンゼンスルホンアミド、N-（tert-ブチル）-3-（4- { [6-（ {（2R/S）-2- [3-（ホルミルアミノ）-4-ヒドロキシフェニル] -2-ヒドロキシエチル} アミノ）-ヘキシル] オキシ} ブチル）ベンゼンスルホンアミドおよびWO 02/076933に記載の関連化合物（Glaxo Group Ltd.）；4- {（1R）-2- [（6- {2- [（2，6-ジクロロベンジル）オキシ] エトキシ} ヘキシル）アミノ] -1-ヒドロキシエチル} -2-（ヒドロキシメチル）フェノールおよびWO 03/024439に記載の関連化合物（Glaxo Group Ltd.）；N- {2- [4-（（R）-2-ヒドロキシ-2-フェニルエチルアミノ）フェニル] エチル} -（R）-2-ヒドロキシ-2-（3-ホルムアミド-4-ヒドロキシフェニル）エチルアミンおよびMoranらの米国特許第6，576，793号に記載の関連化合物；N- {2- [4-（3-フェニル-4-メトキシフェニル）アミノフェニル] エチル} -（R）-2-ヒドロキシ-2-（8-ヒドロキシ-2（1H）-キノリン-5-イル）エチルアミンおよびMoranらの米国特許第6，653，323号に記載の関連化合物；ならびに薬剤として許容されるその塩が含まれる。特定の実施形態では、 β_2 -アドレナリン受容体作用薬は、N- {2- [4-（（R）-2-ヒドロキシ-2-フェニルエチルアミノ）フェニル] エチル} -（R）-2-ヒドロキシ-2-（3-ホルムアミド-4-ヒドロキシフェニル）エチルアミンの結晶性モノ塩酸塩である。用いる場合、 β_2 -アドレナリン受容体作用薬は医薬品組成物中に治療有効量で存在する。一般に、 β_2 -アドレナリン受容体作用薬は、用量当たり約0.05 μ g～500 μ gを提供するのに十分な量で存在する。上記特許および出願の開示全体を参照により本明細書に組み込む。

10

20

30

40

50

【0082】

本発明の結晶性化合物と併用できる代表的なステロイド系抗炎症剤には、これらに限定されないが、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、プロピオン酸フルチカゾン、6 α ，9 α -ジフルオロ-17 α - [（2-フラニルカルボニル）オキシ]-11 β -ヒドロキシ-16 α -メチル-3-オキソアンドロスター-1，4-ジエン-17 β -カルボチオ酸S-フルオロメチルエステル、6 α ，9 α -ジフルオロ-11 β -ヒドロキシ-16 α -メチル-3-オキソ-17 α -プロピオニルオキシ-アンドロスター-1，4-ジエン-17 β -カルボチオ酸S-（2-オキソ-テトラヒドロフラン-3S-イル）エステル、ベクロメタゾンエステル（例えば、17-プロピオン酸エステルまたは

17, 21-ニプロピオン酸エステル)、ブデソニド、フルニソリド、モメタゾンエステル(例えば、フロ酸エステル)、トリアムシノロンアセトニド、ロフレボニド、シクレソニド、ブチクソコートプロピオネート(butixocort propionate)、RPR-106541、ST-126などまたは薬剤として許容されるその塩である。用いる場合、ステロイド系抗炎症剤は組成物中に治療有効量で存在する。一般に、ステロイド系抗炎症剤は、用量当たり約0.05 µg~500 µgを提供するのに十分な量で存在する。

【0083】

組合せの例は、β₂アドレナリン作動性受容体作用薬としてのサルメテロール、およびステロイド系抗炎症剤としてのプロピオン酸フルチカゾンと同時投与される式Iの化合物の結晶形またはその溶媒和物である。他の組合せの例は、β₂-アドレナリン受容体作用薬としてのN-{2-[4-(R)-2-ヒドロキシ-2-フェニルエチルアミノ)フェニル]エチル}-(R)-2-ヒドロキシ-2-(3-ホルムアミド-4-ヒドロキシフェニル)エチルアミン、およびステロイド系抗炎症剤としての6α, 9α-ジフルオロ-17α-[(2-フラニルカルボニル)オキシ]-11β-ヒドロキシ-16α-メチル-3-オキソアンドロスター-1, 4-ジエン-17β-カルボチオ酸S-フルオロメチルエステルの結晶性モノ塩酸塩と同時投与される式Iの化合物の結晶形またはその溶媒和物である。上記のようにこれらの薬剤は一緒に別個にも配合することができる。

【0084】

他の適切な組合せには、例えば、他の抗炎症剤、例えばNSAID(例えば、クロモグリク酸ナトリウム、ネドクロミルナトリウム、ならびにテオフィリンなどのホスホジエステラーゼ(PDE)阻害剤、PDE4阻害剤および混合PDE3/PDE4阻害剤);ロイコトリエン拮抗薬(例えば、モンテルカスト(monteleukast));ロイコトリエン合成の阻害剤; iNOS阻害剤;トリプターゼおよびエラスターゼ阻害剤などのプロテアーゼ阻害剤;β-2インテグリン拮抗薬およびアデノシン受容体作用薬または拮抗薬(例えば、アデノシン2a作用薬);サイトカイン拮抗薬(例えば、インターロイキン抗体(αIL抗体)、特に、αIL-4治療薬、αIL-13治療薬またはその組合せなどのケモカイン拮抗薬);あるいはサイトカイン合成の阻害剤が含まれる。

【0085】

本発明の結晶性化合物と併用できる代表的なホスホジエステラーゼ-4(PDE4)阻害剤または混合PDE3/PDE4阻害剤は、これらに限定されないが、シス4-シアノ-4-(3-シクロペンチルオキシ-4-メトキシフェニル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸、2-カルボメトキシ-4-シアノ-4-(3-シクロプロピルメトキシ-4-ジフルオロメトキシフェニル)シクロヘキサノ-1-オン;シス-[4-シアノ-4-(3-シクロプロピルメトキシ-4-ジフルオロメトキシフェニル)シクロヘキサノ-1-オル];シス-4-シアノ-4-[3-(シクロペンチルオキシ)-4-メトキシフェニル]シクロヘキサノ-1-カルボン酸など、または薬剤として許容されるその塩が含まれる。他の代表的なPDE4または混合PDE4/PDE3阻害剤には、AWD-12-281(elbion);NCS-613(INSERM);D-4418(Chiroscience and Schering-Plough);CI-1018またはPD-168787(Pfizer);WO99/16766に記載のベンゾジオキソール化合物(Kyowa Hakko);K-34(Kyowa Hakko);V-11294A(Napp);ロフルミラスト(roflumilast)(Byk-Gulden);WO99/47505に記載のフタラジノン化合物(Byk-Gulden);プマフェントリン(Pumafentrine)(Byk-Gulden、現在Altanaである);アロフィリン(arofylline)(Almirall-Prodessa);VM554/UM565(Vernalis);T-440(Tanabe Seiyaku);およびT2585(Tanabe Seiyaku)が含まれる。

【0086】

本発明の結晶性化合物と併用できる代表的なムスカリン性拮抗薬(すなわち、抗コリン

10

20

30

40

50

剤)には、これらに限定されないが、アトロピン、硫酸アトロピン、酸化アトロピン、硝酸メチルアトロピン、臭化水素酸ホマトロピン、臭化水素酸ヒヨスチアミン(d、l)、臭化水素酸スコポラミン、臭化イプラトロピウム、臭化オキシトロピウム、臭化チオトロピウム、メタンテリン、臭化プロパンテリン、臭化メチルアニソトロピン、臭化クリジニウム、コピロレート(copyrrolate)(Robinul)、ヨウ化イソプロパミド、臭化メペンゾラート、塩化トリジヘキセチル(Pathilone)、メチル硫酸ヘキソシクリウム、塩酸シクロペントレート、トロピカミド、塩酸トリヘキシフェニジル、ピレンゼピン、テレンゼピン、AF-DX116およびメトクトラミンなど、または薬剤として許容されるその塩；あるいは、塩として挙げた化合物についての、代替の薬剤として許容されるその塩が含まれる。

10

【0087】

代表的な抗ヒスタミン剤(すなわち、 H_1 -受容体拮抗薬)には、これらに限定されないが、マレイン酸カルビノキサミン、フマル酸クレマスチン、塩酸ジフェニルヒドラミンおよびジメンヒドリナートなどのエタノールアミン；マレイン酸ピリラミン、塩酸トリペレナミンおよびクエン酸トリペレナミンなどのエチレンジアミン；クロルフェニラミンおよびアクリバスチンなどのアルキルアミン；塩酸ヒドロキシジン、パモ酸ヒドロキシジン、塩酸シクリジン、乳酸シクリジン、塩酸メクリジンおよび塩酸セチリジンなどのピペラジン；アステミゾール、塩酸レボカバスチン、ロラタジンまたはそのデスカルボエトキシ類似体、テルフェナジンおよび塩酸フェキソフェナジンなどのピペリジン；塩酸アゼラスチン；などまたは薬剤として許容されるその塩；あるいは、塩として挙げた化合物についての、代替の薬剤として許容されるその塩が含まれる。

20

【0088】

別段の指定のない限り、本発明の結晶性化合物と併用投与される他の治療剤の適切な用量の例は、約 $0.05\mu\text{g}/\text{日} \sim 100\text{mg}/\text{日}$ の範囲である。

【0089】

以下の配合は、本発明の代表的な医薬品組成物、ならびに調製方法の例を示す。1種または複数の第2の薬剤を、本発明の結晶性化合物(第1活性剤)と任意選択で配合することができる。あるいは、第2の薬剤を別個に配合し、同時にかまたは逐次的に第1活性剤と共投与することができる。例えば、一実施形態では、単一の乾燥粉末配合物を、本発明の結晶性化合物と1種または複数の第2の薬剤の両方を含むように作製することができる。他の実施形態では、1つの配合物を、本発明の結晶性化合物を含むように作製し、別の配合物を、第2の薬剤を含むように作製する。次いでそうした乾燥粉末配合物を、分離されたブリスターパックに包装し、単一のDPI装置で投与することができる。

30

吸入による投与のための乾燥粉末配合物の例

0.2mg の本発明の結晶性化合物を微粒化し、次いで 25mg のラクトースと配合する。次いで配合混合物をゼラチン吸入カートリッジに詰め込む。カートリッジの内容物を、粉末吸入器を用いて投与する。

乾燥粉末吸入器による投与のための乾燥粉末配合物の例

乾燥粉末を、本発明の微粒化結晶性化合物(活性剤)とラクトースのバルク配合物比が $1:200$ を有するように調製する。その粉末を、用量当たり約 $10\mu\text{g} \sim 100\mu\text{g}$ の活性剤を送達できる乾燥粉末吸入装置に充てんする。

40

計量式吸入器による投与のための配合物の例

200ml の脱塩水中に溶解した 0.2g のレシチンから生成した溶液中に、 10g の活性剤を $10\mu\text{m}$ 未満の平均サイズを有する微粒化粒子として分散させて、5重量%の本発明の結晶性化合物(活性剤)と0.1重量%のレシチンを含む懸濁液を調製する。懸濁液を噴霧乾燥し、得られた材料を $1.5\mu\text{m}$ 未満の平均径を有する粒子に微粒化する。粒子を、加圧された1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタンを用いてカートリッジに充てんする。

【0090】

あるいは、 5g の活性剤を、 100ml の脱塩水中に溶解した 0.5g のトレハロース

50

と0.5 gのレシチンから形成させたコロイド状溶液中に、10 μ m未満の平均サイズを有する微粒化粒子として分散させて、5重量%の活性剤、0.5重量%のレシチンおよび0.5重量%のトレハロースを含む懸濁液を調製する。懸濁液を噴霧乾燥し、得られた材料を、1.5 μ m未満の平均径を有する粒子に微粒化する。粒子を、加圧された1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタンを用いて小型容器に充てんする。

噴霧器による投与のための水性エアロゾル配合物の例

医薬品組成物を、0.5 mgの本発明の結晶性化合物（活性剤）をクエン酸で酸性化させた1 mlの0.9%塩化ナトリウム溶液中に溶解させて調製する。混合液を攪拌し、活性剤が溶解するまで超音波にかける。NaOHを徐々に加えて、溶液のpHを3～8（典型的には約5）の範囲の値に調節する。

経口投与のための硬質ゼラチンカプセル配合物の例

以下の成分、すなわち、250 mgの本発明の結晶性化合物、200 mgのラクトース（噴霧乾燥品）および10 mgのステアリン酸マグネシウムを十分に配合し、次いで硬質ゼラチンカプセル中に充てんする。カプセル当たり合計460 mgの組成物である。

経口投与のための懸濁配合物の例

以下の成分を混合して、懸濁液10 mL当たり100 mgの活性成分を含む懸濁剤を形成させる。

【0091】

【表1】

成分	量
本発明の結晶性化合物	1.0 g
フマル酸	0.5 g
塩化ナトリウム	2.0 g
メチルパラベン	0.15 g
プロピルパラベン	0.05 g
顆粒化した糖	25.5 g
ソルビトール（70%溶液）	12.85 g
ビーガムK (Vanderbilt Co.)	1.0 g
芳香剤	0.035 mL
着色剤	0.5 mg
蒸留水	100 mL まで十分量

注入可能な配合物の例

以下の成分を配合し、0.5 N HClまたは0.5 N NaOHを用いてpHを4±0.5に調節する。

【0092】

【表2】

成分	量
本発明の結晶性化合物	0.2 g
酢酸ナトリウム緩衝溶液 (0.4 M)	2.0 mL
HCl (0.5 N) または NaOH (0.5 N)	pH 4 まで十分量
水（蒸留し、滅菌したもの）	20 mL まで十分量

有用性

式Iの化合物はムスカリン性受容体拮抗活性を有しており、したがって式Iの化合物の結晶形は、ムスカリン性受容体によって媒介される病状、すなわちムスカリン性受容体拮抗薬を用いた治療によって改善される病状を治療するのに有用であると期待される。そうした病状には、例えば、慢性閉塞性肺疾患（例えば、慢性および喘息様の気管支炎、および肺気腫）、喘息、肺線維症、アレルギー性鼻炎、鼻漏などの可逆性気道閉塞に付随する

ものを含む肺障害または疾患が含まれる。ムスカリン性受容体拮抗薬で治療できる他の病状は、過活動膀胱または排尿筋過反射およびその症状などの泌尿生殖器障害；過敏性腸症候群、憩室疾患、アカラシア、胃腸管運動過剰障害および下痢などの胃腸管障害；洞性徐脈などの心不整脈；パーキンソン病；アルツハイマー病などの認識障害；月経困難症（*dismenorrhea*）などである。

【0093】

したがって、一実施形態では、本発明は、肺障害を治療する方法であって、治療有効量の結晶性ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-（2-（4-（4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル）メチルアミノ）エチル）ピペリジン-4-イルエステルまたは薬剤として許容されるその溶媒和物を患者に投与することを含む方法を対象とする。肺障害を治療するのに用いる場合、本発明の結晶性化合物は一般に 1 日当たり複数用量、単一の日量または単一の週量で吸入により投与する。一般に、肺障害を治療するための用量は約 10 μg /日～200 μg /日である。

【0094】

吸入により投与する場合、本発明の結晶性化合物は一般に気管支拡張をもたらす効果を有している。したがって、他の実施形態では、本発明は、患者に気管支拡張をもたらすための方法であって、気管支拡張をもたらす量の結晶性ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-（2-（4-（4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル）メチルアミノ）エチル）ピペリジン-4-イルエステルまたは薬剤として許容されるその溶媒和物を患者に投与することを含む方法を対象とする。一般に、気管支拡張をもたらすための治療有効用量は約 10 μg /日～200 μg /日の範囲である。

【0095】

一実施形態では、本発明は、慢性閉塞性肺疾患または喘息を治療するための方法であって、治療有効量の結晶性ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1-（2-（4-（4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル）ベンゾイル）メチルアミノ）エチル）ピペリジン-4-イルエステルまたは薬剤として許容されるその溶媒和物を患者に投与することを含む方法を対象とする。COPD または喘息を治療するのに用いる場合、本発明の塩は一般に 1 日当たり複数用量または単一の日量で吸入により投与する。一般に、COPD または喘息を治療するための用量は約 10 μg /日～200 μg /日の範囲である。本明細書で用いる COPD は、慢性の閉塞性気管支炎および肺気腫を含む（例えば、*Barnes, chronic Obstructive Pulmonary Disease, N Engl J Med 343:269~78 頁（2000 年）*を参照されたい）。

【0096】

肺障害を治療するのに用いる場合、本発明の結晶性化合物を、任意選択で他の治療剤と併用して投与する。したがって、特定の実施形態では、本発明の医薬品組成物および方法は、治療有効量の β_2 -アドレナリン受容体作用薬、コルチコステロイド、非ステロイド系抗炎症剤またはその組合せをさらに含む。

【0097】

他の実施形態では、本発明の結晶性化合物は、生体系、およびマウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ブタ、ヒトなどの哺乳動物において、ムスカリン性受容体に拮抗させるために用いる。この実施形態では、治療有効量の式 I の結晶性化合物を哺乳動物に投与する。望むなら、次いでムスカリン性受容体を拮抗させる効果を、従来の手順および装置を用いて測定することができる。

【0098】

本発明の結晶性化合物の特性および有用性は、当業者によく知られているインビトロおよびインビボでの様々なアッセイを用いて実証することができる。例えば、代表的なアッセイを以下の実施例でさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0099】

本発明の具体的な実施形態を説明するために以下の調製方法および実施例を示す。しか

10

20

30

40

50

し、別段の指定のない限り、これらの具体的な実施形態は本発明の範囲を限定するものではない。別段の指定のない限り、以下の略語は以下の意味を有しており、本明細書で用いられ、かつ定義されていない他のどの略語もその標準的な意味を有するものとする。

【0100】

A C	アデニルシクラーゼ	
A C h	アセチルコリン	
A C N	アセトニトリル	
B S A	ウシ血清アルブミン	
c A M P	3' - 5' - リン酸環状アデノシン	
C H O	チャイニーズハムスター卵巣由来	10
c M ₅	クローンチンパンジーM5受容体	
D C M	ジクロロメタン（すなわち、塩化メチレン）	
D I P E A	N, N - ジイソプロピルエチルアミン	
d P B S	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水	
D M S O	ジメチルスルホキシド	
E D C	1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド	
E D T A	エチレンジアミン四酢酸	
F B S	ウシ胎仔血清	
F L I P R	蛍光イメージングプレートリーダー	
H B S S	ハンクス緩衝塩溶液	20
H E P E S	4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸	
h M ₁	クローン化ヒトM1受容体	
h M ₂	クローン化ヒトM2受容体	
h M ₃	クローン化ヒトM3受容体	
h M ₄	クローン化ヒトM4受容体	
h M ₅	クローン化ヒトM5受容体	
H O B T	N - ヒドロキシベンゾトリアゾール	
H P L C	高速液体クロマトグラフィー	
I P A	イソプロパノール	
M C h	メチルコリン	30
M T B E	メチル t - ブチルエーテル	
T F A	トリフルオロ酢酸	

本明細書で用いる定義されていない他のどの略語も、標準的な一般に受け入れられている意味を有する。別段の言及のない限り、試薬、出発材料および溶媒は供給業者（S i g m a - A l d r i c h, F l u k a など）から購入したものであり、さらに精製することなくそれらを用いた。

【0101】

別段の指定のない限り、H P L C 分析は3.5ミクロンの粒子サイズを有するZ o r b a x B o n u s R P 2. 1 × 50mmカラム（A g i l e n t）を備えたA g i l e n t（P a l o A l t o, C A）S e r i e s 1100装置を用いて実施した。吸収は214nmでのUV吸収によった。用いた移動相は以下のものである（容積で）：AはA C N（2%）、水（98%）およびT F A（0.1%）であり、Bはアセトニトリル（90%）、水（10%）およびT F A（0.1%）である。H P L C 10 - 70データは、6分間にわたる勾配で0.5mL/分の流速の10～70% B（残りはA）を用いて得た。同様に、H P L C 5 - 35データおよびH P L C 10 - 90データは5分間にわたる勾配で5～35% B；または10～90% Bを用いて得た。

【0102】

液体クロマトグラフィー質量分析（L C M S）データはA p p l i e d B i o s y s t e m s（F o s t e r C i t y, C A）M o d e l A P I - 150 E X装置を用いて得た。

【0103】

LCMS10-90データは5分間にわたる勾配で10～90%移動相Bを用いて得た。

【0104】

(調製1)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸ピペリジン-4-イルエステル

ビフェニル-2-イソシアネート (97.5 g、521ミリモル) と4-ヒドロキシ-N-ベンジルピペリジン (105 g、549ミリモル) を70℃で12時間一緒に加熱した。次いで反応混合物を50℃に冷却し、エタノール (1 L) を加え、次いで6 M HCl (191 mL) を徐々に加えた。次いで得られた混合物を周囲温度に冷却し、ギ酸アンモニウム (98.5 g、1.56モル) を加え、溶液を通して窒素ガスを20分間強力にバブリングさせた。次いで活性炭担持パラジウム (20 g、10重量%乾燥ベース) を加え、反応混合物を40℃で12時間加熱し、次いでセライト (Celite) 充填物を通してろ過した。次いで溶媒を減圧下で除去し、1 M HCl (40 mL) を粗製残留物に加えた。次いで、10 N NaOHで混合物のpHをpH12に調節した。水層を酢酸エチル (2×150 mL) で抽出し、有機層を脱水し (硫酸マグネシウム)、ろ過し、溶媒を減圧下で除去して155 gの標記中間体 (100%収率) を得た。HPLC (10-70) $R_t = 2.52$; m/z : $[M+H^+]$ $C_{18}H_{20}N_2O_2$ について計算して297.15; 結果297.3。

10

【0105】

(調製2)

N-ベンジル-N-メチルアミノアセトアルデヒド

3口の2 Lフラスコに、N-ベンジル-N-メチルエタノールアミン (30.5 g、0.182モル)、DCM (0.5 L)、DIPEA (95 mL、0.546モル) およびDMSO (41 mL、0.728モル) を加えた。氷浴を用いて、混合物を約-10℃に冷却し、三酸化硫黄ピリジン錯体 (87 g、0.546モル) を4分割して5分間隔で加えた。反応液を-10℃で2時間攪拌した。氷浴を取り外す前に、水 (0.5 L) を加えて反応をクエンチした。水層を分離し、有機層を水 (0.5 L) とブライン (0.5 L) で洗浄し、次いで硫酸マグネシウムで脱水し、ろ過して標記化合物を得た。さらに精製することなくこれを使用した。

30

【0106】

(調製3)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-[2-(ベンジルメチルアミノ)エチル]ピペリジン-4-イルエステル

DCM (0.5 L) 中に調製2の生成物を含む2 Lフラスコに、調製1の生成物 (30 g、0.101モル) を加え、続いてナトリウムトリアセトキシボロヒドリド (45 g、0.202モル) を加えた。反応混合物を終夜攪拌し、次いで、激しく攪拌しながら1 N塩酸 (0.5 L) を加えてクエンチした。3つの層が認められ、水層を除去した。1 N NaOH (0.5 L) で洗浄した後、均一な有機層を得た。次いでこれをNaClの飽和水溶液 (0.5 L) で洗浄し、硫酸マグネシウムで脱水し、ろ過し、溶媒を減圧下で除去した。残留物を最少量のイソプロパノールに溶解して精製し、この溶液を0℃に冷却して固体が生成した。これを集め、冷イソプロパノールで洗浄して42.6 gの標記化合物 (95%収率) を得た。 $MS m/z$: $[M+H^+]$ $C_{28}H_{33}N_3O_2$ について計算して444.3; 結果444.6。 $R_f = 3.51$ 分 (10-70 ACN: H₂O、逆相HPLC)。

40

【0107】

(調製3A)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-[2-(ベンジルメチルアミノ)エチル]ピペリジン-4-イルエステル

標記化合物を、N-ベンジル-N-メチルエタノールアミンをメシル化し、次いでこれ

50

をアルキル化反応でビフェニル-2-イルカルバミン酸ピペリジン-4-イルエステルと反応させて調製した。

【0108】

500 mL フラスコ（反応器フラスコ）に、N-ベンジル-N-メチルエタノールアミン（24.5 mL）、DCM（120 mL）、NaOH（80 mL；30 wt %）およびテトラブチルアンモニウムクロライドを入れた。反応を通して低速で混合しながら、混合物を-10℃（冷却浴）に冷却し、添加漏斗でDCM（30 mL）および塩化メシル（15.85 mL）を入れた。これを、一定速度で30分間かけて滴下した。添加は発熱的であった。攪拌を15分間続行し、その間温度は-10℃に戻って平衡に達した。反応を少なくとも10分間保持して、過剰の塩化メシルを確実にかつ完全に加水分解させた。

10

【0109】

250 mL フラスコに、ビフェニル-2-イルカルバミン酸ピペリジン-4-イルエステル（26 g；調製1に記載のようにして調製した）とDCM（125 mL）を入れ、室温で15分間攪拌し、混合物を短時間冷却して10℃にするとスラリーが生成した。次いで、スラリーを添加漏斗で反応器フラスコに入れた。冷却浴を取り外し、反応混合物を5℃に加熱した。混合物を分液漏斗に移し、各層を静置し、水層を除去した。有機層を反応器フラスコに戻し、攪拌を再開し、混合物を室温に保持し、反応をHPLCで合計3.5時間監視した。

【0110】

反応器フラスコにNaOH（1 M 溶液；100 mL）を入れ、攪拌し、各層を静置した。有機層を分離し、洗浄し（NaCl 飽和溶液）、真空下で容積を一部減らし、IPAによる反復洗浄にかけた。固形分を集め、空気乾燥させた（25.85 g、98%純度）。母液をさらに処理して追加の固形分を得た（容積削減、IPA、冷却）。

20

【0111】

（調製4）

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-（2-メチルアミノエチル）ピペリジン-4-イルエステル

Parrr型水素化フラスコに、調製3の生成物（40 g、0.09モル）とエタノール（0.5 L）を加えた。フラスコを窒素ガスでフラッシュし、酢酸（20 mL）と一緒に活性炭担持パラジウム（15 g、10重量%（乾燥ベース）、37%重量/重量）を加えた。混合物を、水素雰囲気（約50 psi）下で3時間Parrr型水素化器に保持した。次いで、混合物をろ過し、エタノールで洗浄した。ろ液を濃縮し、残留物を最少量のDCMに溶解した。酢酸イソプロピル（10容積）を徐々に加えて固形物を形成させ、これを集めて22.0 gの標記化合物（70%収率）を得た。MSm/z：[M+H⁺] C₂₁H₂₇N₃O₂について計算して 354.2；結果354.3。R_f = 2.96分（10-70 ACN：H₂O、逆相HPLC）。

30

【0112】

（調製5）

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-〔2-〔（4-ホルミルベンゾイル）メチルアミノ〕エチル〕ピペリジン-4-イルエステル

40

3口の1 L フラスコに、4-カルボキシベンズアルデヒド（4.77 g、31.8ミリモル）、EDC（6.64 g、34.7ミリモル）、HOBT（1.91 g、31.8ミリモル）およびDCM（200 mL）を加えた。混合物が均一である場合、DCM（100 mL）中の調製4の生成物（10 g、31.8ミリモル）の溶液を徐々に加えた。反応混合物を室温で約16時間攪拌し、次いで水（1×100 mL）、1 N HCl（5×60 mL）、1 N NaOH（1×100 mL）ブライン（1×50 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過し、濃縮して12.6 gの標記化合物（92%収率；HPLCにより85%純度）を得た。MSm/z：[M+H⁺] C₂₉H₃₁N₃O₄について計算して 486.2；結果486.4。R_f = 3.12分（10-70 ACN：H₂O、逆相HPLC）。

50

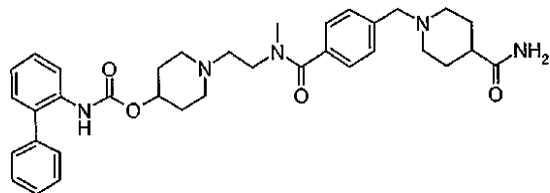
【0113】

(実施例1)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル

【0114】

【化2】



10

3口の2Lフラスコに、イソニペコタミド(5.99g、40.0ミリモル)、酢酸(2.57mL)、硫酸ナトリウム(6.44g)およびイソプロパノール(400mL)を加えた。反応混合物を氷浴で0~10℃に冷却し、イソプロパノール(300mL)中のビフェニル-2-イルカルバミン酸1-{2-[(4-ホルミルベンゾイル)メチルアミノ]エチル}ピペリジン-4-イルエステル(11g、22.7ミリモル;調製5に記載のようにして調製した)の溶液を徐々に加えた。反応混合物を室温で2時間攪拌し、次いで0~10℃に冷却した。ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド(15.16g、68.5ミリモル)を分割して加え、この混合物を室温で16時間攪拌した。次いで反応混合物を減圧下で約50mLの容積まで濃縮し、この混合物を1N HCl(200mL)で酸性化してpH3にした。得られた混合物を室温で1時間攪拌し、次いでDCM(3×250mL)で抽出した。次いで水相を氷浴で0~5℃に冷却し、50%NaOH水溶液を加えて混合物のpHを10に調節した。次いでこの混合物を酢酸イソプロピル(3×300mL)で抽出し、一緒にした有機層を水(100mL)、ブライン(2×50mL)で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水し、ろ過し、濃縮して10.8gの標記化合物(80%収率を得た。MS m/z: [M+H⁺] C₃₅H₄₃N₅O₄について計算して 598.3;結果 598.6。R_f=2.32分(10-70ACN:H₂O、逆相HPLC)。

20

【0115】

(実施例2)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの結晶性二リン酸塩

500mgのビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(0.826ミリモルの96%純度の材料;実施例1に記載のようにして調製した)を5mLの水および1.5mLの1Mリン酸にとった。0.25mLの1Mリン酸(2.1モル当量に等しい)を追加してpHを約pH5.3に調節した。0.2ミクロンフィルターで透明溶液をろ過し、凍結させて、凍結乾燥して無定形の二リン酸塩を得た。

40

【0116】

20mgの無定形の二リン酸塩を2mLのIPA:ACN(1:1)中に溶解した。0.1mLの水を加え、混合物を攪拌下で60℃に加熱した。固体のほとんどすべてが溶解した。この懸濁液を、攪拌しながら終夜置いて周囲温度にした。得られた結晶をろ取し、20分間空気乾燥して標記化合物(18.5mg、93%収率)を白色結晶性固体として得た。偏光を用いて顕微鏡で検査して、結晶はいくらかの複屈折性を示した。

【0117】

(実施例3)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-

50

1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの結晶性二リン酸塩

5. 0 g のビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル (遊離塩基; 実施例 1 に記載のようにして調製した) を 80 ml の IPA : ACN (1 : 1) と混合した。4. 0 ml の水を加え、混合物を攪拌下で 50 °C に加熱して透明溶液が形成された。これに、50 °C で 16 ml 1 M リン酸を滴下した。得られた濁った溶液を 50 °C で 5 時間攪拌し、次いで終夜緩やかに攪拌しながら周囲温度にした。得られた結晶をろ過し、1 時間空気乾燥し、次いで真空下で 18 時間乾燥して標記化合物 (5. 8 g、75 % 収率) を白色結晶性固体 (HPLC により 98. 3 % 純度) として得た。

10

【0118】

(実施例 4)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの結晶性一硫酸塩

442 mg のビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル (0. 739 mmol の 96 % 純粋な材料; 実施例 1 に記載のようにして調製した) を 5 ml の H₂O : ACN (1 : 1) にとり、pH を監視しながら、1. 45 ml の 1 N 硫酸を徐々に加えた。pH を約 pH 3. 3 に調節した。透明溶液を 0. 2 ミクロンフィルターでろ過し、凍結し、凍結乾燥して一硫酸塩を得た。

20

【0119】

30. 3 mg の一硫酸塩を 1. 65 ml の IPA : ACN (10 : 1) に溶解させた。懸濁液を、バイアルを予め加熱した 60 °C の水浴中に 30 分間置いて加熱した。粘性材料が形成された。30 分間加熱して 70 °C に昇温した。材料が粘性のまま保持されたので、加熱を 60 °C に低下させ、混合物を 1 時間さらに加熱した。加熱を停止し、混合物を室温に冷却した。4 日後、その材料は固体状になり、試料をさらに 9 日間置いた。次いでこの固体をろ過し、真空ポンプを用いて 1 時間乾燥して標記化合物 (23 mg、76 % 収率) を得た。

30

【0120】

(実施例 5)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの結晶性一硫酸塩

161 g の一硫酸塩 (実施例 4 に記載のようにして調製した) を 8. 77 ml の IPA : ACN (10 : 1) に溶解させた。懸濁液を、バイアルを予め加熱した 70 °C の水浴中に 1. 5 時間置いて加熱した。5 分以内に油滴が形成された。加熱を 60 °C に低下させ、続いて、50 °C で 40 分間、40 °C で 40 分間、次いで 30 °C で 45 分間加熱した。加熱を停止し、混合物を室温に徐々に冷却した。翌日、顕微鏡下で材料を観察し、それは針状や平板状の形態であった。次いで材料を 40 °C で 2 時間、35 °C で 30 分間、次いで 30 °C で 30 分間に加熱した。加熱を停止し、混合物を室温に徐々に冷却した。次いでこの固体をろ過し、真空ポンプを用いて 1 時間乾燥して標記化合物 (117 mg、73 % 収率) を得た。

40

【0121】

(実施例 6)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの結晶性二シュウ酸塩

510 mg のビフェニル-2-イルカルバミン酸 1- (2- { [4- (4-カルバモイ

50

ルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(0.853ミリモルの96%純粋な材料;実施例1に記載のようにして調製した)を5mlのH₂O:ACN(1:1)にとり、pHを監視しながら、1.7mlの1Mシュウ酸水溶液を徐々に加えた。pHを約pH3.0に調節した。透明溶液を0.2ミクロンフィルターでろ過し、凍結し、凍結乾燥凍結乾燥してニシュウ酸塩を得た。

【0122】

31.5mgのニシュウ酸塩を2.76mlの94%IPA/6%H₂Oに溶解させた。混合物を、予め加熱した60℃の水浴中で2.5時間攪拌した。25分間後、試料のすべてが溶解していた。加熱を停止し、混合物を室温に冷却した。翌日、少量の粘性材料が見られた。バイアルを4℃で冷蔵した。4日後、その粘性材料が依然として見られた。次いでバイアルを室温に置き、1か月後に観察した。この材料は固体状の見掛けをしており、顕微鏡下で結晶性であることが観察された。次いで固形物をろ過し、真空ポンプで1時間乾燥して結晶性の標記化合物(20mg、63.5%収率)を得た。

【0123】

(実施例7)

ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステルの結晶性ニシュウ酸塩

150mgのニシュウ酸塩(実施例6に記載のようにして調製した)を13.1mlの94%IPA/6%H₂Oに溶解させた。混合物を、予め加熱した60℃の水浴中で2.5時間攪拌した。加熱を停止し、混合物を室温に冷却した。バイアルを4℃で冷蔵した。6日後、油状の材料が観察され、バイアルの側部に結晶が認められた。次いでバイアルを室温に冷却し、その時点で種晶(実施例6からの結晶性材料)を加え16日間置いた。その間、溶液からのより多くの結晶の析出が観察された。次いで固体をろ過し、真空ポンプを用いて14時間乾燥して標記化合物(105mg、70%収率)を得た。

【0124】

(実施例8)

結晶性遊離塩基 ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(形態I)

109mgのビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(実施例1に記載のようにして調製した)を0.56mlのH₂O:ACN(1:1)に溶解させた。懸濁液をバイアル(キャップはその頂部に緩めに置いた)中に保持して、より時間をかけて蒸発させた。バイアルを窒素気流雰囲気下に置いた。しかし、窒素はその雰囲気下に置くためだけであって、蒸発させるために用いたものではない。1日以内に沈殿物が認められた。顕微鏡下でこれは結晶性であると認められた。次いでこの固体を高真空系にかけ、すべての溶媒を除去して標記化合物を得た。HPLCにより定量的回収の97.8%純度であった。

【0125】

代替の手順では、H₂O:ACN(1:1)(約350mg/mL)中に溶解後、バイアルを5℃で保存し、2日間で沈殿物が認められた。固体をろ過し、水で濯ぎ、高真空で終夜乾燥した。回収率は55%であった。固体は98.2%の純度を有しており、液体は92.8%の純度を有していた。

【0126】

(実施例9)

結晶性遊離塩基 ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(形態I)

50.4mgのビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモ

10

20

30

40

50

イルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(実施例1に記載のようにして調製した)を0.144mlのH₂O:ACN(1:1)に溶解させた。懸濁液をバイアル(キャップはその頂部に緩めに置いた)中に保持して、より時間をかけて蒸発させた。バイアルを4℃で6日間冷蔵した。2日後に沈殿物が認められた。固体をろ過し、これを高真空系にかけ、すべての溶媒を除去して標記化合物を白色固体(27.8mg、55.2%収率)として得た。

【0127】

(実施例10)

結晶性遊離塩基 ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(形態I)

230mgのビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(実施例1に記載のようにして調製した)を若干加熱して0.2mlのH₂O:ACN(1:1)に溶解させた。次いで混合物を70℃の水浴で2時間加熱した。加熱を停止し、混合物を室温に冷却し、次いで4℃で1時間冷蔵した。次いで50μlの水を加え(オイルを排除し(oiled out))、続いて40μlのACNを加えて、試料を再び溶液に戻した。室温で徐々に攪拌しながら種晶(実施例8からの結晶性材料)を加えた。結晶が形成され始め、緩やかに攪拌しながら、混合物を終夜置いた。翌日、加熱冷却サイクル(30℃で10分間、40℃で10分間、次いで50℃で20分間)を施した。加熱を停止し、緩やかに攪拌しながら混合物を終夜冷却した。翌日、第2の加熱/冷却サイクル(60℃で1時間、70℃で溶解が観察された)を施した。加熱を停止し、緩やかに攪拌しながら混合物を終夜冷却した。翌日、結晶が認められ、第3の加熱冷却サイクル(60℃で3時間)を施した。加熱を停止し、緩やかに攪拌しながら混合物を終夜冷却した。翌日、加熱冷却サイクル(60℃で3時間、緩やかな冷却、次いで60℃で3時間)を施した。加熱を停止し、緩やかに攪拌しながら混合物を終夜冷却した。3日後、固体をろ過し、高真空系にかけ、すべての溶媒を除去して標記化合物を得た。

【0128】

(実施例11)

結晶性遊離塩基 ビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(形態II)

70mgのビフェニル-2-イルカルバミン酸1-(2-{[4-(4-カルバモイルピペリジン-1-イルメチル)ベンゾイル]メチルアミノ}エチル)ピペリジン-4-イルエステル(実施例1に記載のようにして調製した)を0.1mL ACNに溶解させた。0.3mL MTBEを加えた後、溶液は濁っていた。50μlのACNをさらに加えると、溶液は透明になった(155mg/mL ACN:MTBE=1:2)。混合物をバイアル中に入れふたをかぶせた。翌日までには結晶が認められた。次いで固体をろ過し、これを高真空系にかけ、すべての溶媒を除去して標記化合物を得た。

【0129】

(実施例12)

粉末X線回折

粉末X線回折パターンを、Cu Kα(30.0kV、15.0mA)放射線を用いてRigaku回折計で得た。分析は、ゴニオメーターを用いて、2~45°の範囲にわたって0.03°の刻み幅で、1分間当たり3°の連続的スキャン方式で稼働して実験した。試料を、石英製の試料ホルダー上に粉末材料の薄層として作製した。装置は金属ケイ素標準物を用いて校正した。

【0130】

実施例2のニリン酸塩の試料のPXRDパターンは、材料が結晶性であることを示した。実施例3の結晶性ニリン酸塩の試料の代表的なPXRDパターンを図1に示す。実施例

10

20

30

40

50

4の一硫酸塩の試料のPXRDパターンは、材料が結晶性であることを示した。実施例5の結晶性一硫酸塩の試料の代表的なPXRDパターンを図8に示す。実施例6の二シュウ酸塩の試料のPXRDパターンは、材料が結晶性であることを示した。実施例7の結晶性二シュウ酸塩の試料の代表的なPXRDパターンを図13に示す。実施例8および9の遊離塩基（形態I）の試料のPXRDパターンは、材料が結晶性であることを示した。実施例10の遊離塩基（形態I）の試料の代表的なPXRDパターンを図18に示す。実施例11の遊離塩基（形態II）の試料の代表的なPXRDパターンを図23に示す。

【0131】

（実施例13）

熱分析

示差走査熱量測定法（DSC）はThermal Analyst controllerを備えたTA Instruments Model Q-10モジュールを用いて実施した。TA Instruments Thermal Solutions softwareを用いてデータを取り、分析した。約1～4mgの試料を、アルミ製の蓋付きの皿の中に正確に計り込んだ。試料は、周囲温度から約300℃まで、10℃/分の線形加熱傾斜で評価した。使用の間、DSCセルを乾燥窒素でパージした。

【0132】

図2に示すように、実施例3の結晶性ニリン酸塩の試料の代表的なDSCトレースは約63.8℃と154.3℃で2つの転移を示した。このDSCトレースは、この結晶性ニリン酸塩が、約154.5℃で溶融ピークを有し、かつ150℃より低い温度で熱分解することなく満足できる良好な熱安定性を有していることを実証している。DSCトレースは、約135℃での吸熱的熱流の開始も示している。

【0133】

実施例4の一硫酸塩の試料の代表的なDSCトレースは、約57℃と73.2℃で2つの転移を示した。図10に示すように、実施例5の結晶性一硫酸塩の試料の代表的なDSCトレースは76℃で転移を示した。これは、この結晶性一硫酸塩が約76.5℃で溶融ピークを有していることを実証している。

【0134】

実施例6の結晶性二シュウ酸塩の試料の代表的なDSCトレースは、69.2℃と122.8℃で2つの転移を示した。図15に示すように、実施例7の結晶性二シュウ酸塩の試料の代表的なDSCトレースは73℃で転移を示した。このDSCトレースは、この結晶性二シュウ酸塩が約73.7℃で溶融ピークを有していることを実証している。

【0135】

実施例8の結晶性遊離塩基（形態I）の試料の代表的なDSCトレースは、90.4℃で転移を示した。実施例9の結晶性遊離塩基（形態I）の試料のDSCトレースは、86.1℃と103.6℃で2つの転移を示した。図19に示すように、実施例10（形態I）の結晶性遊離塩基の試料の代表的なDSCトレースは、閉じた皿の中では2つの転移を示したが（83.9℃と102.1℃）、開放した皿の中では102.5℃で転移を示した（早期のピークは水および／または溶媒によるものである）。このDSCトレースは、この結晶性遊離塩基が約102.7℃で溶融ピークを有し、かつ80℃より低い温度で熱分解することなく良好な熱安定性を有していることを実証している。DSCトレースは、約90℃での吸熱的熱流の開始も示している。

【0136】

図24に示すように、実施例11の結晶性遊離塩基（形態II）の試料のA代表的なDSCトレースは98.6℃で転移を示した。これは、この結晶性遊離塩基が約98.6℃で溶融ピークを有し、かつ75℃より低い温度で熱分解することなく良好な熱安定性を有していることを実証している。DSCトレースは、75℃での吸熱的熱流の開始も示している。

【0137】

熱重量分析（TGA）を、高分解能を有するTA Instruments Mode

10

20

30

40

50

1 Q-50モジュールを用いて実施した。TA Instruments Thermal Solutions softwareを用いてデータを取り、分析した。約10mgの重量の試料を白金皿上の置き、高分解能—加熱速度で、周囲温度から300℃までスキャンした。使用の間、天秤と炉室を窒素気流でパージした。

【0138】

図3に示すように、実施例3の結晶性二リン酸塩の試料の代表的なTGAトレースは155℃未満の温度で溶媒および／または水（8.2%）の減量を示した。

【0139】

実施例4の結晶性一硫酸塩の試料のTGAトレースは、116℃未満の温度で溶媒および／または水（12.6%）の減量を示した。図9に示すように、実施例5の結晶性一硫酸塩の試料の代表的なTGAトレースは150℃未満の温度で溶媒および／または水（13.7%）の減量を示した。

【0140】

実施例6の結晶性二シュウ酸塩の試料のTGAトレースは、125℃未満の温度で溶媒および／または水（15.4%）の減量を示した。図14に示すように、実施例7の結晶性二シュウ酸塩の試料の代表的なTGAトレースは125℃未満の温度で溶媒および／または水（12.7%）の減量を示した。

【0141】

実施例8の結晶性遊離塩基（形態I）の試料のTGAトレースは、75℃より低い温度で溶媒および／または水（7.3%）の減量を示した。実施例9の結晶性遊離塩基（形態I）の試料のTGAトレースは、70℃より低い温度で溶媒および／または水（5.2%）の減量を示した。図20に示すように、実施例10の結晶性遊離塩基（形態I）の試料の代表的なTGAトレースは98℃より低い温度で溶媒および／または水（3.8%）の減量を示した。

【0142】

図25に示すように、実施例11の結晶性遊離塩基（形態II）の試料の代表的なTGAトレースは98℃より低い温度で溶媒および／または水（3.0%）の減量を示した。

【0143】

これらのTGAトレースは、本発明の結晶性化合物が、室温からある程度高い高温（例えば、75～150℃）で若干重量を減少することを示している。その量は、残留する水分または溶媒の減量と一致する。

【0144】

（実施例14）

動的水分吸着評価

動的水分吸着（DMS）の評価（水分吸着—脱着プロファイルとしても知られている）を、VTI大気圧微量天秤（atmospheric microbalance）、SGA-100システム（VTI Corp., Hialeah, FL 33016）を用いて実施した。約10mgの試料サイズを用い、湿度は分析開始時点の周囲値に設定した。典型的なDMS分析は3つのスキャンからなる。すなわち、5%RH／ステップのスキャン速度で、周囲値から2%の相対湿度（RH）へ、2%RHから90%RHへ、90%RHから5%RHである。2分毎に質量を計り、5連続点について0.01%以内で試料の質量が安定したら、RHを次の値（+／-5%RH）へ変化させた。

【0145】

図4に示すように、実施例3の結晶性二リン酸塩の試料の代表的なDMSトレースは、2～90%のRHに曝して3.3%の増量で、40～75%RHの湿度範囲で0.6%の増量という低い吸湿性を有する可逆的吸着／脱着プロファイルを示した。

【0146】

図11に示すように、実施例5の結晶性一硫酸塩の試料の代表的なDMSトレースは、2～90%のRHに曝して10%の増量で、40～75%RHの湿度範囲で1.8%の増量という低い吸湿性を有する可逆的吸着／脱着プロファイルを示した。

【0147】

図16に示すように、実施例7の結晶性二シュウ酸塩の試料の代表的なDMSトレースは、2～90%のRHに曝して5.3%の増量で、40～75%RHの湿度範囲で1.1%の増量という低い吸湿性を有する可逆的吸着／脱着プロファイルを示した。

【0148】

図21に示すように、実施例10の結晶性遊離塩基（形態I）の試料の代表的なDMSトレースは、2～90%のRHに曝して10%の増量で、40～75%RHの湿度範囲で1.2%の増量という低い吸湿性を有する可逆的吸着／脱着プロファイルを示した。

【0149】

図26に示すように、実施例11の結晶性遊離塩基（形態II）の試料の代表的なDMSトレースは、2～90%のRHに曝して9%の増量で、40～75%RHの湿度範囲で1.3%の増量という低い吸湿性を有する可逆的吸着／脱着プロファイルを示した。

10

【0150】

これらのDMSトレースは、本発明の結晶性化合物が、低い吸湿性の可逆的吸着／脱着プロファイルを有することを実証している。広い湿度範囲に曝しても、結晶性化合物の増量は許容されるものである。可逆的水分吸着／脱着プロファイルは、本発明の結晶性化合物が、許容される吸湿性を有しており、潮解性でないことを実証している。

【0151】

（実施例15）

固体状態の安定性評価

20

実施例3の結晶性三リン酸塩の試料約1～2mgをそれぞれ、-20℃（密封容器）および40℃／75%RH（開放容器および密封容器）で複数の3mLホウケイ酸塩バイアル中に保存した。特定の間隔で、代表的なバイアルの全内容物を以下のHPLC法で分析した。

【0152】

カラム：Xterra Ms C18、4.6×250mm、5μm（Part NO. 186000494）；移動相A：0.1M NH₄AC、pH7.0；移動相B：100%ACN；流速：1mL／分；注入容積：10μL；検出器：240nm；勾配時間〔分で〕（%移動相B）：0.0（8）；5.00（28）；22.00（42）；30.00（100）；35.00（100）；35.10（8）；および45.00（8）。試料を、pH5の10mMクエン酸塩緩衝剤生理食塩水中の0.5mg／mLストック溶液として調製した。

30

【0153】

実施例3の結晶性三リン酸塩について、試料の初期純度は、HPLCで測定して98.3面積%であった。6週間保存後、どの条件下に保持した試料も、化学的純度に検出可能な変化はなく、材料の見掛けに目に見える変化はなく、またDSCおよびTGAによる分析でも検出可能な差は示されなかった。

【0154】

（実施例16）

元素分析

40

Flash EA1112元素分析計（CE Elantech, Lakewood, NJ）を用いた燃焼分析によって、本発明の結晶性化合物の試料について、以下の元素割合が測定された。

【0155】

実施例5の結晶性一硫酸塩では：52.88%炭素、7.10%水素、8.81%窒素、27.17%酸素および4.03%イオウ（予測）であり、52.11%炭素、6.90%水素、8.42%窒素、24.94%酸素および4.06%イオウ（結果）であった。

。

【0156】

実施例7の結晶性二シュウ酸塩では：54.54%炭素、6.57%水素、8.15%

50

窒素、および 30.74% 酸素（予測）であり、56.33% 炭素、6.90% 水素、8.22% 窒素および 26.32% 酸素（結果）であった。

（実施例 17）

微粒化

実施例 3 の結晶性二リン酸塩の 13 g の試料をジェットミルで微粒化して、顕微鏡検査による観察で複屈折性を有する 8.7 g の自由流動性の白色粉末を得た（回収率 67%）。予備微粒化では、結晶性二リン酸塩は HPLC で測定して 98.1 面積% の初期純度を有していた。微粒化した材料の純度は同じであった。予備微粒化した材料の水分含量は 6.54 重量% であり、微粒化した材料の水分含量は 6.23 重量% であった。

【0157】

微粒化の過程で特に問題はなかった。粒径分布は以下の通りであった。

【0158】

【表 3】

	微粒化前	微粒化後
D(v, 0.9)	38.6 μm	5.2 μm
D(v, 0.5)	9.9 μm	2.2 μm
D(v, 0.1)	1.7 μm	0.4 μm

微粒化していない材料と比べて、微粒化した材料は、粉末 X 線回折パターン、TGA、DSC、DMS、化学的純度、キラル純度および水分含量に有意の変化は認められなかった。例えば、実施例 14 で示したように、実施例 3 の結晶性二リン酸塩の試料の代表的な DMS トレースは、40~75% RH の湿度範囲で 0.6% の増量を示し、微粒化した材料はこの湿度範囲で 0.7% の増量を示した。

【0159】

（実施例 18）

吸入用溶液の安定性

pH 5 の 10 mM クエン酸塩緩衝生理食塩水中に 0.5 mg/mL 遊離塩基相当物（実施例 3 に記載のようにして調製した結晶性二リン酸塩を用いて）の溶液を調製した。結晶性塩の溶解度は、緩衝剤中に 40 mg/mL 超の遊離塩基相当物より大きかった。40°C / 75% RH で 1 か月保存して、0.5% 未満の分解が観察された。

【0160】

（アッセイ 1）

放射性リガンド結合アッセイ

hM₁、hM₂、hM₃ および hM₄ ムスカリン性受容体サブタイプを発現する細胞からの膜調製

クローン化したヒト hM₁、hM₂、hM₃ および hM₄ ムスカリン性受容体サブタイプを安定的に発現する CHO 細胞系をそれぞれ、10% FBS および 250 $\mu\text{g/mL}$ ジェネティシンで補足した HAM's F-12 からなる培地中でコンフルエンス近傍まで増殖させた。細胞をインキュベーター中で、5% CO₂ 下、37°C で増殖させ、dPBS 中の 2 mM EDTA でリフトした。細胞を 650 $\times g$ で遠心分離に 5 分間かけて収集し、細胞ペレットを -80°C で凍結保存するか、または直ちに膜を作製した。膜の作製のために、細胞ペレットを溶解緩衝液中に再懸濁させ、Polytron PT-2100 組織破碎机（Kinematica AG; 20 秒間 $\times$ 2 パースト）で再びホモジナイズした。粗製膜を 40,000 $\times g$ 、4°C で 15 分間遠心分離機にかけた。次いで、膜ペレットを再懸濁緩衝液で再懸濁させ、Polytron 組織破碎机でホモジナイズした。膜懸濁液のタンパク質濃度は、Lowry, O. らの Journal of Biochemistry 193:265 (1951 年) に記載されされている方法で測定した。すべての膜を一定分量 -80°C で凍結保存するか、または直ちに使用した。一定分量の調製ずみ hM₅ 受容体膜は Perkin Elmer から直接購入し、使用するまで -80°C

10

20

30

40

50

で保存した。

ムスカリン性受容体サブタイプ hM_1 、 hM_2 、 hM_3 、 hM_4 および hM_5 についての放射性リガンド結合アッセイ

放射性リガンド結合アッセイを、合計 $100\ \mu\text{L}$ のアッセイ容積で 96 ウェルマイクロタイタープレートを用いて実施した。 hM_1 、 hM_2 、 hM_3 、 hM_4 または hM_5 ムスカリン性サブタイプのいずれかを安定的に発現する CHO 細胞膜を、アッセイ緩衝剤中で、以下の特定の標的タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ウェル}$)、すなわち、 hM_1 については $10\ \mu\text{g}$ 、 hM_2 については $10\sim15\ \mu\text{g}$ 、 hM_3 については $10\sim20\ \mu\text{g}$ 、 hM_4 については $10\sim20\ \mu\text{g}$ 、 hM_5 については $10\sim12\ \mu\text{g}$ に希釈した。アッセイプレートへ加える前に、Polytron 組織破碎機 (10 秒間) を用いて膜を簡単にホモジナイズした。放射性リガンドの K_D 値を決定するための飽和結合の検討を、 $L-[N\text{-メチル-}^3\text{H}]\text{スコポラミンメチルクロリド}$ ($[^3\text{H}]-\text{NMS}$) (TRK666, $84.0\ \text{Ci}/\text{ミリモル}$, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) を $0.001\ \text{nM}\sim20\ \text{nM}$ の範囲で用いて実施した。試験化合物の K_i 値を決定するための置換アッセイを、 $1\ \text{nM}$ の $[^3\text{H}]-\text{NMS}$ を用いて、 11 の異なる試験化合物濃度で実施した。最初に、試験化合物を、希釈緩衝液中に $400\ \mu\text{M}$ の濃度に希釈し、次いで希釈緩衝液で連続的に $5\times$ 希釈し $10\ \text{pM}\sim100\ \mu\text{M}$ の範囲の最終濃度にした。アッセイプレートへの希釈順と容積は以下の通りである： $25\ \mu\text{L}$ 放射性リガンド、 $25\ \mu\text{L}$ 希釈された試験化合物および $50\ \mu\text{L}$ 膜である。アッセイプレートを 37°C で 60 分間インキュベートした。 1% BSA で事前処置した GF/B ガラス繊維フィルタープレート (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) を用いて急速ろ過して、結合反応を終了させた。フィルタープレートを洗浄用緩衝液 ($10\ \text{mM}$ HEPES) で 3 回濯いで未結合の放射性物質を除去した。次いでプレートを空気乾燥し、各ウェルに $50\ \mu\text{L}$ Microscint-20 液体用シンチレーション流体 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) を加えた。次いでプレートを、PerkinElmer Topcount 液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) でカウントした。結合データを、ワンサイト競合モデル (one-site competition model) を用いて、GraphPad Prism ソフトウェアパッケージ (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) での非線形回帰分析により分析した。試験化合物の K_i 値を、Cheng-Prusoff 式 (Cheng Y; Prusoff W. H. Biochemical Pharmacology 22 (23): 3099~108 頁 (1973 年)) を用いて、観測 IC_{50} 値および放射性リガンドの K_D 値から計算した。幾何平均および 95% 信頼区間を得るために K_i 値を pK_i 値に変換した。次いでこれらの要約統計量 (summary statistics) を、データ処理のため K_i 値に変換して戻した。

【0161】

このアッセイでは、より小さい K_i 値は、試験した受容体について、試験化合物がより高い結合親和力を有することを示している。このアッセイまたは同様のアッセイで試験した場合、式 I の化合物は M_3 ムスカリン性受容体サブタイプについて、約 $5\ \text{nM}$ 未満の K_i 値を有することが分かった。

【0162】

(アッセイ 2)

ムスカリン性受容体の機能的な能力アッセイ

cAMP 蓄積の作用薬媒介阻害の遮断

このアッセイでは、試験化合物の機能的な能力を、 hM_2 受容体を発現する CHO-K1 細胞において、試験化合物がホルスコリン仲介性 cAMP 蓄積のオキソトレモリン阻害を遮断する能力を測定することによって決定した。

【0163】

cAMP アッセイは、 ^{125}I -cAMP を用いたフラッシュプレートアデニリルシク

ラーゼ活性化アッセイシステム (NEN SMP004B、PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) によるラジオイムノアッセイ法で、メーカーの説明書にしたがって実施した。

【0164】

細胞をdPBSで1回濯ぎ、上記の細胞培養および膜の作製の部で説明したようにして、トリプシン-EDTA溶液 (0.05%トリプシン/0.53mM EDTA) でリフトした。脱離した細胞を、50mL dPBS中で、 $650\times g$ で5分間遠心分離にかけて2回洗浄した。次いで、細胞ペレットを10mL dPBS中に再懸濁し、Coulter Z1デュアル式粒子カウンター (Beckman Coulter, Fullerton, CA) で細胞をカウントした。細胞を $650\times g$ で5分間、再度遠心分離にかけて、刺激緩衝液中に再懸濁して $1.6\times 10^6\sim 2.8\times 10^6$ 細胞/mLのアッセイ濃度にした。試験化合物を最初に希釈緩衝液 (1mg/mL BSA (0.1%)) で補充されたdPBS) 中に400 μ Mの濃度で希釈し、次いで希釈緩衝液で連続的に希釈して100 μ M $\sim$ 0.1nMの範囲の最終モル濃度にした。同じような仕方でオキソトレモリンを希釈した。

10

【0165】

AC活性のオキソトレモリン阻害を測定するために、25 μ Lホルスコリン (dPBS中に希釈して25 μ Mの最終濃度)、25 μ L希釈オキソトレモリンおよび50 μ L細胞を作用薬アッセイウェルに加えた。試験化合物がオキソトレモリン阻害AC活性を遮断する能力を測定するために、25 μ Lのホルスコリンおよびオキソトレモリン (dPBS中に希釈して、それぞれ25 μ Mおよび5 μ Mの最終濃度)、25 μ L希釈試験化合物ならびに50 μ L細胞を残るアッセイウェルに加えた。

20

【0166】

反応物を37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、100 μ Lの氷冷検出用緩衝液を加えて反応を停止させた。プレートを密封し、室温で終夜インキュベートし、翌朝、PerkinElmer TopCount液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) でカウントした。産生したcAMPの量 (pモル/ウェル) を、メーカーのユーザーマニュアルに記載のようにして、試料およびcAMP標準品について測定されたカウント数をもとに計算した。データを非線形回帰、ワンサイト競合式を用いて、GraphPad Prismソフトウェアパッケージ (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) による非線形回帰分析によって分析した。 K_i を計算するためにCheng-Prusoff式を用いた。ここで、オキソトレモリン濃度-応答曲線の EC_{50} と、それぞれ K_D および $[L]$ としてのオキソトレモリン濃度を用いた。幾何平均および95%信頼区間を得るために K_i 値を pK_i 値に変換した。次いでこれらの要約統計量を、データ処理のため K_i 値に変換し戻した。

30

【0167】

このアッセイでは、より小さい K_i 値は、試験した受容体で試験化合物がより高い機能活性を有していることを示している。このアッセイまたは同様のアッセイで試験した場合、式Iの化合物は、 hM_2 受容体を発現するCHO-K1細胞において、ホルスコリン仲介性cAMP蓄積のオキソトレモリン阻害の遮断について、約5nM未満の K_i 値を有していることが分かった。

40

作用薬媒介 [3H] GTP γ S結合の遮断

第2の機能アッセイでは、試験化合物の機能的能力は、 hM_2 受容体を発現するCHO-K1細胞において、化合物がオキソトレモリン刺激 [3H] GTP γ S結合を遮断する能力を測定して決定することができる。

【0168】

使用の時点で、凍結した膜を解凍し、次いでウェル当たり5 $\sim$ 10 μ gタンパク質の最終目的の組織濃度でアッセイ緩衝液中に希釈した。膜を、Polytron PT-2100組織破碎機で簡単にホモジナイズし、次いでアッセイプレートに加えた。作用薬オキ

50

ソトレモリンによる $[^3\ ^5\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合の刺激についての EC_{90} 値 (90% 最大反応のための有効濃度) を各実験で測定した。

【0169】

試験化合物がオキソトレモリン刺激 $[^3\ ^5\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合を阻害する能力を測定するために 96 ウェルプレートの各ウェルに以下のもの、すなわち、 $25\ \mu\text{L}$ の $[^3\ ^5\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ($0.4\ \text{nM}$) を有するアッセイ緩衝液、 $25\ \mu\text{L}$ のオキソトレモリン (EC_{90}) および GDP ($3\ \mu\text{M}$)、 $25\ \mu\text{L}$ の希釈試験化合物ならびに $25\ \mu\text{L}$ の hM_2 受容体を発現する CHO 細胞膜を加えた。次いで、アッセイプレートを 37°C で 60 分間インキュベートした。アッセイプレートを、PerkinElmer 96 ウェル収穫器を用いて 1% BSA-事前処理 GF/B フィルターにかけてろ過した。プレートを、氷冷洗浄緩衝液で 3×3 秒間濯ぎ、次いで空気乾燥または真空乾燥した。Microscint-20 シンチレーション液 ($50\ \mu\text{L}$) を各ウェルに加え、各プレートを密封し、トップカウンター (PerkinElmer) で放射能を計った。データを非線形回帰、ワンサイト競合式を用いた GraphPad Prism ソフトウェアパッケージ (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) による非線形回帰分析によって分析した。 K_i を計算するために Cheng-Prusoff 式を用いた。ここで、試験化合物についての濃度-応答曲線の IC_{50} と、それぞれ K_D および $[L]$ 、リガンド濃度としてのアッセイにおけるオキソトレモリン濃度を用いた。

10

【0170】

このアッセイでは、より小さい K_i 値は、試験した受容体で試験化合物がより高い機能活性を有していることを示している。このアッセイまたは同様のアッセイで試験した場合、式 I の化合物は、 hM_2 受容体を発現する CHO-K1 細胞において、オキソトレモリン刺激 $[^3\ ^5\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合の遮断について、約 $5\ \text{nM}$ 未満の K_i 値を有していることが分かった。

20

FLIPR アッセイによる作用薬媒介カルシウム放出の遮断

G_q タンパク質と共役するムスカリン性受容体サブタイプ (M_1 、 M_3 および M_5 受容体) は、受容体との作用薬結合によってホスホリパーゼ C (PLC) 経路を活性化する。その結果、活性化された PLC は、ホスファチルイノシトール二リン酸塩 (PIP_2) を加水分解して、ジアシルグリセロール (DAG) とホスファチジル-1, 4, 5-三リン酸塩 (IP_3) にし、次いでこれは細胞内貯蔵、すなわち小胞体および筋小胞体からのカルシウムの放出をもたらす。FLIPR (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) アッセイは、遊離カルシウムと結合して蛍光を発するカルシウム感受性染料 (Fluo-4AM 、Molecular Probes, Eugene, OR) を用いて、細胞内カルシウムのこの増加を利用する。この発光現象は、ヒト M_1 および M_3 ならびにチンパンジー M_5 受容体でクローン化した細胞の単層からの発光の変化を検出する FLIPR を用いてリアルタイムで測定される。拮抗薬効能は、拮抗薬が作用薬媒介による細胞内のカルシウムの増大を阻害する能力で判定することができる。

30

【0171】

FLIPR カルシウム刺激アッセイのために、アッセイを行う前の晩に、 hM_1 、 hM_3 および cM_5 受容体を安定的に発現する CHO 細胞を 96 ウェル FLIPR プレートに播種する。播種した細胞を、FLIPR 緩衝液 ($10\ \text{mM}$ HEPES、 $\text{pH} 7.4$ 、 $2\ \text{mM}$ 塩化カルシウム、カルシウムおよびマグネシウムを有していない HBSS 中の $2.5\ \text{mM}$ プロベネシド) を用いて Cell wash (MTX Lab systems, Inc.) で 2 回洗浄して培養基を除去し、 $50\ \mu\text{L}$ /ウェルの FLIPR 緩衝液が残る。次いで細胞を、 $50\ \mu\text{L}$ /ウェルの $4\ \mu\text{M}$ FLUO-4AM (2X 溶液を作製) で、 37°C 、5% 二酸化炭素のもとで 40 分間インキュベートする。染料インキュベーション期間に続いて、細胞を FLIPR 緩衝剤で 2 回洗浄して $50\ \mu\text{L}$ /ウェルの最終容積を得た。

40

【0172】

拮抗薬効能を測定するために、拮抗薬効能を後で、 EC_{90} 濃度でのオキソトレモリン刺激に対して測定することができるよう、オキソトレモリンについての細胞内の Ca^{2+}

50

+ 放出の用量依存刺激をまず測定する。細胞をまず、化合物希釈緩衝液を用いて20分間インキュベートし、続いて作用薬を加える。これはFLIPRを用いて実施する。オキソトレモリンについての EC_{50} 値は、式 $EC_F = ((F/100 - F) \wedge 1/H) * EC_{50}$ とあわせて、FLIPR測定および以下のデータ換算の部で詳細に示す方法によって得る。刺激プレートにおいて $3 \times EC_F$ のオキソトレモリン濃度を調製し、 EC_{50} 濃度のオキソトレモリンを拮抗薬阻害アッセイプレート中の各ウェルに加える。

【0173】

FLIPRに用いたパラメータは：0.4秒の曝露時間、0.5ワットのレーザー強度、488nmの励起波長および550nmの発光波長である。ベースラインは、作用薬を加える前に、蛍光の変化を10秒間測定して決定する。作用薬刺激に続いて、FLIPRにより蛍光の変化を0.5～1秒毎に1.5分間連続的に測定して最大の蛍光変化を捕える。

10

【0174】

蛍光の変化は、各ウェルについて最大の蛍光からベースライン蛍光を減じたものとして表わされる。生データを、シグモイド用量応答のための組込みモデルを用いて、GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) で非線形回帰により薬物濃度の対数に対して分析する。拮抗薬 K_i 値は、 K_D としてのオキソトレモリン EC_{50} 値、およびCheng-Prusoff式 (Cheng & Prusoff, 1973年) によるリガンド濃度についてのオキソトレモリン EC_{90} を用いてPrismにより測定する。

20

【0175】

このアッセイでは、より小さい K_i 値は、試験した受容体で試験化合物がより高い機能活性を有していることを示している。このアッセイまたは同様のアッセイで試験した場合、式Iの化合物は、 hM_3 受容体を安定的に発現するCHO細胞において、作用薬媒介カルシウム放出の遮断について、約5nM未満の K_i 値を有していることが分かった。

(アッセイ3)

モルモットモデルでのアセチルコリ誘発気管支収縮の気管支保護期間の測定

このインビボでのアッセイは、ムスカリン性受容体拮抗活性を示す試験化合物の気管支保護効果を評価するために用いられる。250～350gの体重の6匹のオスのモルモット (Duncan-Hartley (HsdPoc:DH) Harlan, Madison, WI) のグループを、かごのカードで個別に識別する。試験を通して、その動物が食料および水に自由にアクセスできるようにしておく。

30

【0176】

試験化合物は、全身曝露式投薬チャンバー (R&S Molds, San Carlos, CA) 中で10分かけて吸入投与する。投薬チャンバーは、中央マニホールドから6つの個々のチャンバーにエアロゾルが同時に送達されるよう配置する。モルモットを、試験化合物または媒体 (WFI) のエアロゾルに曝す。これらのエアロゾルは、22psiの圧力のガス混合物 ($CO_2 = 5\%$ 、 $O_2 = 21\%$ および $N_2 = 74\%$) によって駆動されるLC Star式噴霧器セット (Model 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA) を用いて、水溶液から発生させる。噴霧器を通るガス流量は、この動作圧力で約3L/分である。発生したエアロゾルは陽圧によってチャンバー中に押し込まれる。エアロゾル化溶液の送達の際には希釈空気は使用しない。10分間噴霧すると、約1.8mLの溶液が噴霧される。これは、充てんした噴霧器の噴霧前後の重量を比較して重量法で測定される。

40

【0177】

吸入により投与された試験化合物の気管支保護効果は、投与後1.5、24、48および72時間での全身のプレチスモグラフィを用いて評価する。

【0178】

肺での評価の開始45分間前に、ケタミン (43.75mg/kg)、キシラジン (3.50mg/kg) およびアセプロマジン (1.05mg/kg) を筋肉注射して各モル

50

モットを麻酔する。手術部位を剃り、70%アルコールで清浄化した後、首の腹側面を2～3cm正中切開した。次いで、頸静脈を単離し、生理食塩水を満たしたポリエチレンカテーテル（PE-50、Becton Dickinson, Sparks, MD）を用いてカニユーレを挿入して、生理食塩水中のACh（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）の静脈内注射を行った。次いで、気管を切り裂き、14Gテフロン（登録商標）チューブ（#NE-014、Small Parts, Miami Lakes, FL）を用いてカニユーレを挿入した。必要に応じて、上記麻酔薬混合物をさらに筋肉注射して麻酔を維持させる。麻酔の深さを監視し、その足をつまんでも動物が応答しないかまたは呼吸速度が100呼吸/分より大きい場合にはそれを調節する。

【0179】

カニユーレ挿入が完了したら、動物をプレチスモグラフ（#PLY3114、Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT）中に入れ、食道圧力式カニユーレ（PE-160、Becton Dickinson, Sparks, MD）を挿入して肺駆動圧（圧力）を測定する。テフロン（登録商標）製気管チューブをプレチスモグラフの開口部に取り付けて、モルモットがチャンバー外部の大気を吸えるようにする。次いでチャンバーを密封する。体温を維持させるために加熱灯を用い、10mLの較正シリンジ（#5520シリーズ、Hans Rudolph, Kansas City, MO）を用いて、モルモットの肺を4mLの空気で3回膨らませて、確実に、より低位の気道がつぶれず、かつ動物が過呼吸に苦しまないようにする。

【0180】

ベースライン値が、コンプライアンスについて0.3～0.9mL/cmH₂Oの範囲内であり、抵抗について1秒当たり0.1～0.199cmH₂O/mLであると判断されたら肺の評価を開始する。Buxco肺測定コンピュータプログラムによって肺の値の収集と導出が可能になる。

【0181】

このプログラムを開始すると、実験手順とデータ収集が開始される。各呼吸によりプレチスモグラフ内で発生する容積の経時的变化をBuxco圧力変換器で測定する。この信号を時間で積分し、各呼吸について流量を計算する。Sensym圧力変換器（#TRD4100）を用いて収集した肺駆動圧力変化と合わせて、この信号を、Buxco（MAX2270）前置増幅器を介してデータ収集インターフェース（#'s SFT3400およびSFT3813）に接続する。他のすべての肺パラメータはこの2つの入力によって得られる。

【0182】

ベースライン値を5分間集め、その後、モルモットにAChを投与する。ACh（0.1mg/mL）を、以下の実験開始からの規定時間および用量、すなわち：5分で1.9μg/分、10分で3.8μg/分、15分で7.5μg/分、20分で15.0μg/分、25分で30μg/分、および30分で60μg/分でシリンジ型ポンプ（sp210iw、World Precision 装置s, Inc., Sarasota, FL）から1分間静脈内に注入する。各ACh投与の後、3分間で抵抗またはコンプライアンスがベースライン値がに戻らない場合は、モルモットの肺を、10mLの較正シリンジからの4mLの空気で3回膨らませる。記録される肺のパラメータは、呼吸数（呼吸/分）、コンプライアンス（mL/cmH₂O）および肺抵抗（1秒当たりcmH₂O/mL）を含む。この手順の35分時点で肺機能の測定が完了したら、モルモットをプレチスモグラフから取り出し、二酸化炭素で窒息させて安楽死させる。

【0183】

データは以下の方法の1つまたはその両方で評価する：

（a）肺抵抗（R_L、1秒当たりcmH₂O/mL）は「圧力の変化」と「流量の変化」の比から計算する。ACh（60（g/分、IH）に対するR_L応答を媒体および試験化合物グループについて算出する。媒体処置した動物の各事前処置時間での平均ACh応答を計算し、各試験化合物用量での対応する事前処置時間のACh応答の阻害%を算出

10

20

30

40

50

するのに用いる。Graph Pad Prism、ウィンドウズ（登録商標）用バージョン3.00（Graph Pad Software, San Diego, California）を用いて、「 R_L 」の阻害用量応答曲線を、4つのパラメータのロジスティック方程式で当てはめて、気管支保護の ID_{50} （ACh（60（g／分）気管支収縮剤応答を50％阻害するのに要する用量）を推定する。用いた方程式は以下の通りである：

$$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{-(\log ID_{50} - X) * \text{傾斜}})$$

（式中、Xは用量の対数であり、Yは応答（ R_L のACh誘発増大の阻害％）である）
Yは最小でスタートし、シグモイド形で漸近的に最大に近づく。

【0184】

（b）ベースライン肺抵抗を倍加させるのに必要なAChまたはヒスタミンの量と定義される量 PD_2 は、AChまたはヒスタミン投与の間にわたる流量と圧力から誘導される肺抵抗値を用いて、以下の式（これは、American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing—1999年. Am J Respir Crit Care Med. 161:309～329頁（2000年）に記載されている PC_{20} 値を計算するために用いられる式から誘導される）：

【0185】

【数1】

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

（式中、 C_1 は C_2 に先行するAChまたはヒスタミンの濃度； C_2 は少なくとも2倍の肺抵抗（ R_L ）の増加をもたらすAChまたはヒスタミンの濃度； R_0 はベースライン R_L 値； R_1 は C_1 の後の R_L 値であり、 R_2 は C_2 の後の R_L 値である）
から計算される。効果的な用量は、50（g／mL用量のAChへの気管支制限応答をベースライン肺抵抗（ $PD_{2(50)}$ ）の倍量に制限する用量と定義する。

【0186】

データの統計的分析は、両側スチューデントt検定を用いて実施する。P値＜0.05は有意であるとみなす。一般に、このアッセイで、ACh誘発気管支収縮について投与後1.5時間で約200 μ g／mL未満の $PD_{2(50)}$ を有する試験化合物が好ましい。このアッセイまたは同様のアッセイで試験した場合、式Iの化合物は、ACh誘発気管支収縮について投与後1.5時間で約200 μ g／mL未満の $PD_{2(50)}$ を有する推定される。

【0187】

（アッセイ4）

吸入モルモット唾液分泌アッセイ

体重200～350gのモルモット（Charles River, Wilmington, MA）を、到着後少なくとも3日間室内モルモットコロニーに順応させる。試験化合物または媒体を、パイ型をした投薬チャンバー（R&S Molds, San Carlos, CA）内で、10分間かけて吸入（IH）により投与する。試験溶液を滅菌水中に溶解し、5.0mLの投与溶液を充てんした噴霧器を用いて送達する。モルモットを30分間吸入チャンバーに収容する。その間、モルモットを約110平方cmの面積内に拘束する。これは、動物が自由に体を回し、体位を変え、身動きするのに十分な空間である。20分間順応させた後、モルモットを、22psiの圧力の室内用空気で駆動するLSS Star式噴霧器セット（Model 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA）から発生されたエアロゾルに曝す。噴霧が完了したら、モルモットを処置後、1.5、6、12、24、48または72時間で評価する。

【0188】

試験の1時間前に、ケタミン43.75mg／kg、キシラジン3.5mg／kgおよ

10

20

30

40

50

びアセプロマジン 1.05 mg/kg の混合物を 0.88 mL/kg 容積で筋肉内 (IM) 注射してモルモットを麻酔する。動物を、加熱した (37 (C)) ブランケット上に腹側を上にし、頭を 20° 下方に傾けて配置する。4 層の 2×2 インチのガーゼのパッド (Nuガーゼ汎用スポンジ (Nu-Gauze General-use sponges)、Johnson and Johnson, Arlington, TX) を、モルモットの口内に挿入する。5 分後、ムスカリン性作用薬ピロカルピン (3.0 mg/kg、SC) を投与し、直ちにガーゼパッドを廃棄し、予め計量した新たなガーゼパッドに取り換える。10 分間唾液を集め、その時点でガーゼパッドを計量し、重量の差を記録して蓄積された唾液の量 (mg で) を決定する。媒体および各用量の試験化合物を受け入れた動物について集めた唾液の平均量を計算する。媒体グループの平均を 100% 唾液分泌とする。結果の平均 (n=3 以上) を用いて結果を計算する。双方向 ANOVA を用いて各時点での各用量について、信頼区間 (95%) を計算する。このモデルは、Rechter、
 “Estimation of anticholinergic drug effects in mice by antagonism against pilocarpine-induced salivation” *Ata Pharmacol Toxicol* 24:243~254 頁 (1996 年) に記載されている手順の修正版である。

10

【0189】

各事前処置時間での媒体処置動物の唾液の平均重量を計算し、各用量の対応する事前処置時間での唾液分泌の阻害%を算出するのに用いる。阻害用量応答データを、Graph Pad Prism、ウィンドウズ (登録商標) 用バージョン 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, California) を用いて、4 パラメータロジスティック方程式に当てはめて抗催唾薬 ID₅₀ (ピロカルピン誘発唾液分泌の 50% を阻害するのに必要な用量) を推定する。以下の式を用いる：

20

$$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{((\log ID_{50} - X) * \text{傾斜})})$$

(式中、X は用量の対数であり、Y は応答 (唾液分泌の阻害%) である)

Y は最小でスタートし、シグモイド形で漸近的に最大に近づく。

【0190】

抗催唾薬 ID₅₀ と気管支保護の ID₅₀ の比を用いて、試験化合物の見掛けの肺選択指数を算出する。一般に、約 5 を超える見掛け肺選択指数を有する化合物が好ましい。このアッセイまたは同様のアッセイで試験した場合、式 I の化合物は約 5 を超える見掛け肺選択指数を有すると推定される。

30

【0191】

(アッセイ 5)

覚醒モルモットにおけるメタコリン誘発降圧応答

この検討では、200~300 g の体重の健常なオスの成体 SD モルモット (Harlan, Indianapolis, IN) を用いる。イソフルラン麻酔 (をもたらす) のもとで、動物に、通常の頸動脈カテーテルおよび頸静脈カテーテル (PE-50 チュービング) を取り付け。肩甲下領域への皮下トンネルを利用して、カテーテルを体外に出す。外科的切開部はすべて、4-0 Ethicon Silk とヘパリン (1000 単位 / mL) でロックしたカテーテルを用いて縫合する。外科処置の最後に、各動物に生理食塩水 (3 mL、SC) とブプレノルフィン (0.05 mg/kg、IM) を投与する。加熱パッド上で動物を回復させ、次いで収容室へ戻す。

40

【0192】

外科処置の後、約 18~20 時間して、動物の体重を計り、動脈圧を記録するために、各動物の頸動脈カテーテルを変換器に連結する。Biopac MP-100 Acquisition System で動脈圧と心拍数を記録する。動物を 20 分間順応させ安定化させる。

【0193】

各動物に、頸静脈系を通して与薬して MCh (0.3 mg/kg、IV) を投与し、心

50

臓血管応答を10分間監視する。次いで動物を、試験化合物または媒体溶液を含む噴霧器に連結されている全身用投薬チャンバーの中に置く。呼吸可能な空気と5%二酸化炭素のガス混合物を用いて3リットル／分の流速で、溶液を10分間噴霧する。次いで、動物を全身用チャンバーから取り出し、それぞれのかごに戻す。投与後、1.5時間および24時間で、動物に、MCh(0.3mg/kg、IV)を再投与し、血行力学的応答を測定する。その後、ペントバルビタールナトリウム(150mg/kg、IV)で動物を安楽死させる。

【0194】

MChは平均動脈圧(MAP)の低下と心拍数(徐脈)の低下をもたらす。MAP(降圧応答)における、ベースラインからのピークの低下を、各MChの投与(IH投与の前後)について測定する。MCh応答に対する処置の効果を、コントロール降圧応答の阻害%(平均+/-SEM)として表わす。適切なポストホック試験での双方向ANOVAを用いて、処置および事前処置時間の効果を試験する。媒体を吸入投与した後1.5時間および24時間で、MChに対する降圧応答はそれほど変わらないと推定される。

10

【0195】

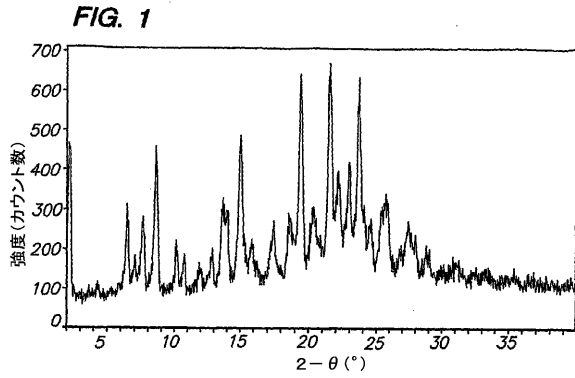
試験化合物の見掛け肺選択性を算出するために、抗降圧ID₅₀と気管支保護ID₅₀の比を用いる。一般に、5を超える見掛け肺選択指数を有する化合物が好ましい。このアッセイまたは同様のアッセイで試験した場合、式Iの化合物は5を超える見掛け肺選択指数を有すると推定される。

【0196】

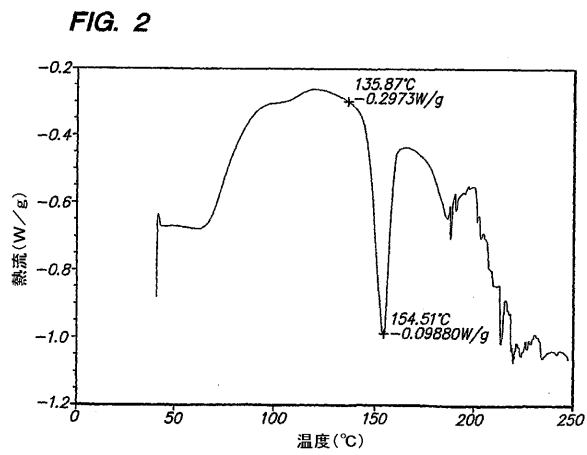
本発明を、特定の態様またはその実施形態を参照して説明したが、当業者は、本発明の趣旨と範囲を逸脱することなく、様々な変更を行うかまたは等価物を置き換えることができることを理解されよう。さらに、適用できる特許法および特許に関する規則の許容する範囲で、本明細書で引用したすべての出版物、特許および特許出願の全体を、各文書が参照により本明細書に個別に組み込まれているのと同じ程度に参照により本明細書に組み込む。

20

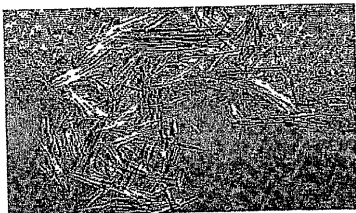
【図 1】



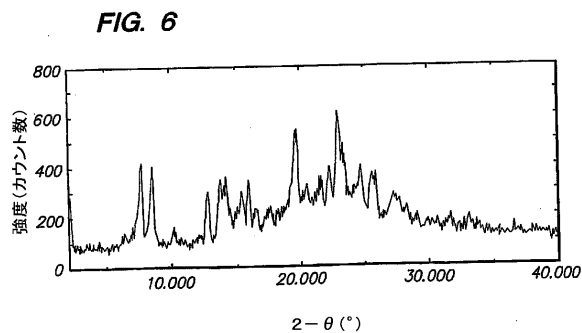
【図 2】



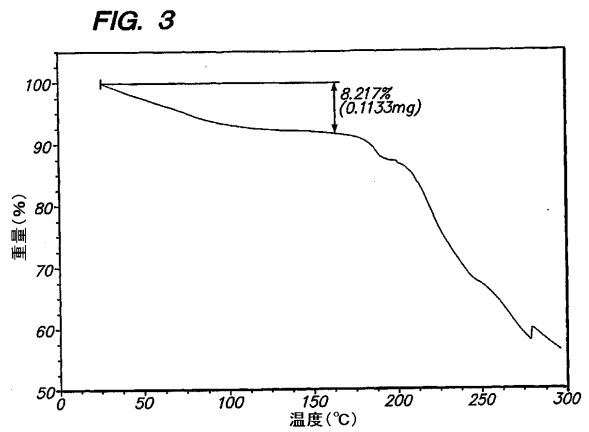
【図 5】

FIG. 5

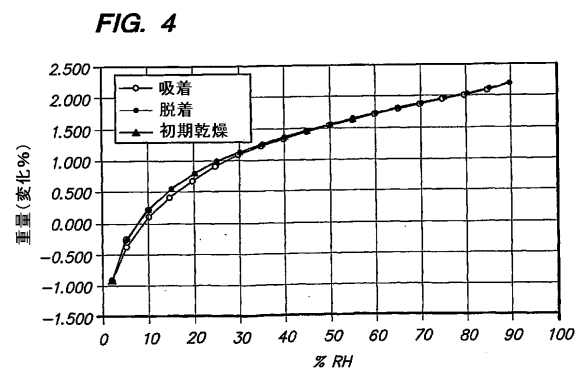
【図 6】



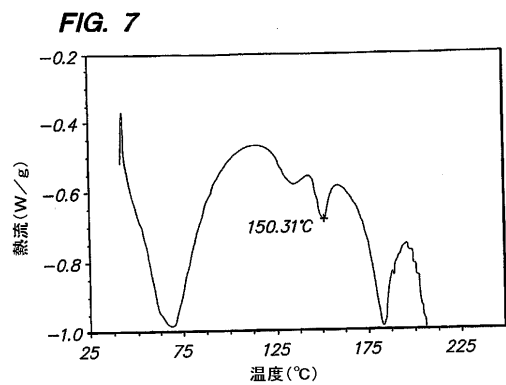
【図 3】



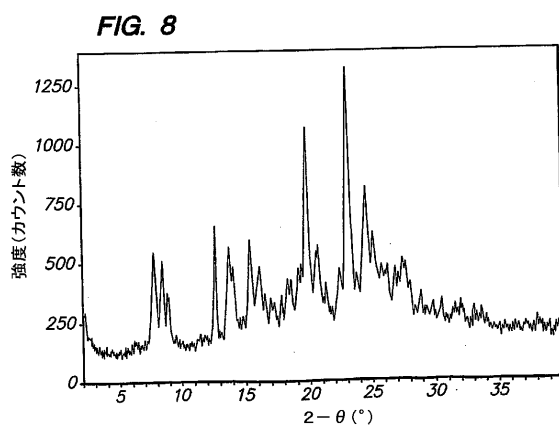
【図 4】



【図 7】

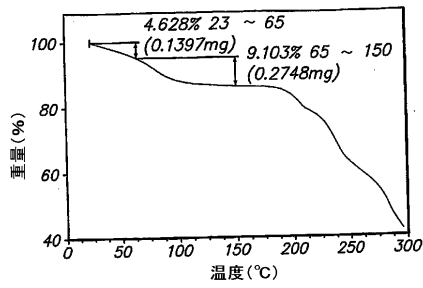


【図 8】



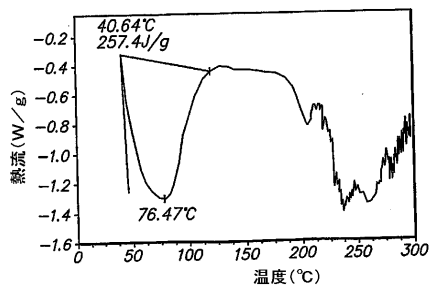
【図 9】

FIG. 9



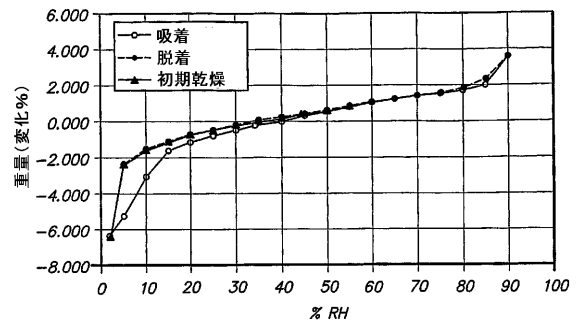
【図 10】

FIG. 10



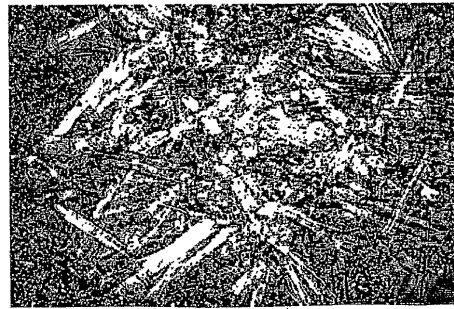
【図 11】

FIG. 11



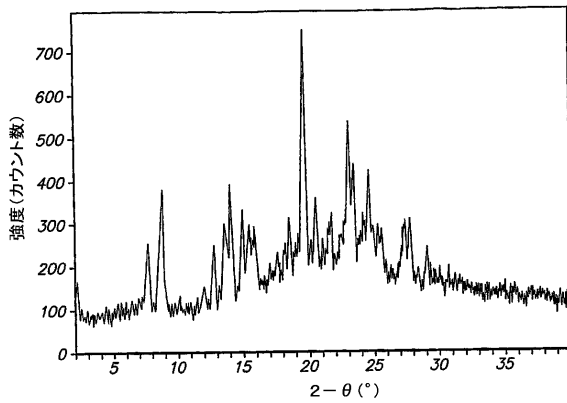
【図 12】

FIG. 12



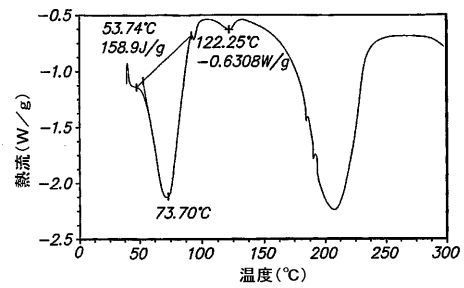
【図 13】

FIG. 13



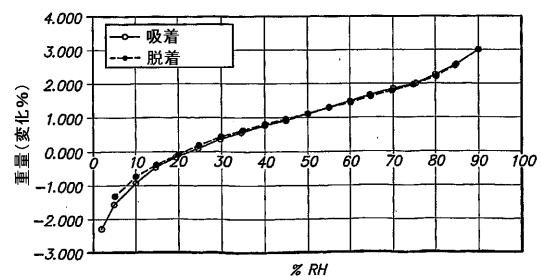
【図 15】

FIG. 15



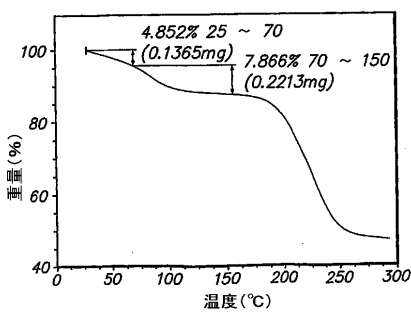
【図 16】

FIG. 16



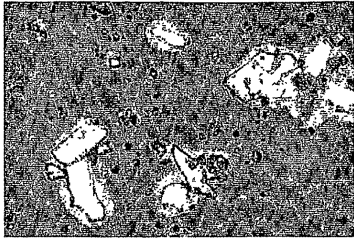
【図 14】

FIG. 14



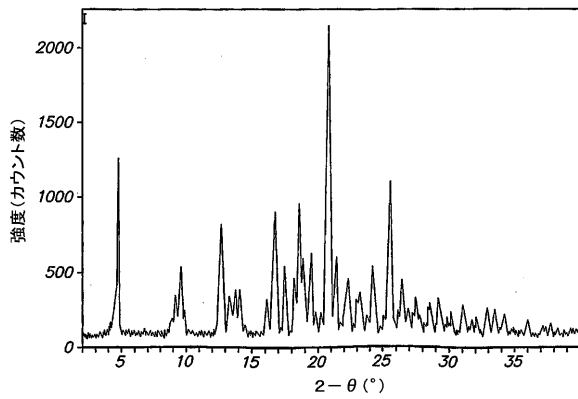
【図 17】

FIG. 17



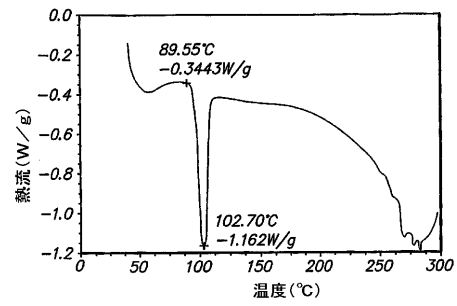
【図 18】

FIG. 18



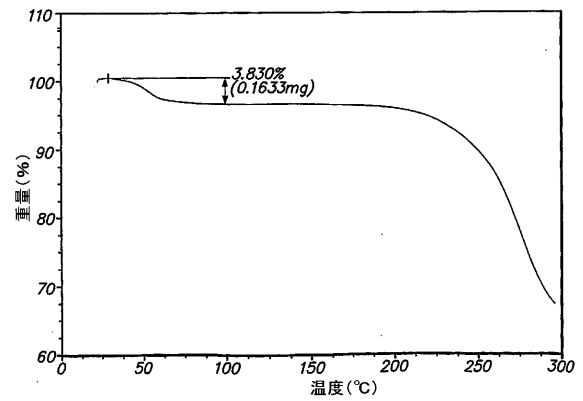
【図 19】

FIG. 19



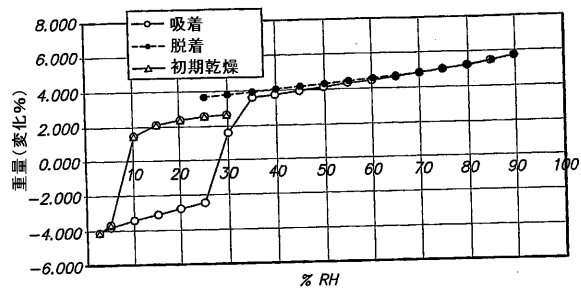
【図 20】

FIG. 20



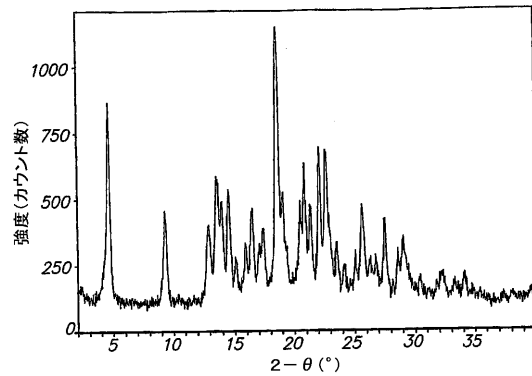
【図 21】

FIG. 21



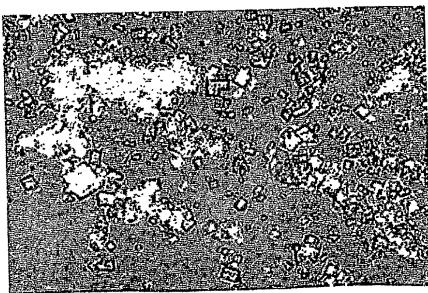
【図 23】

FIG. 23

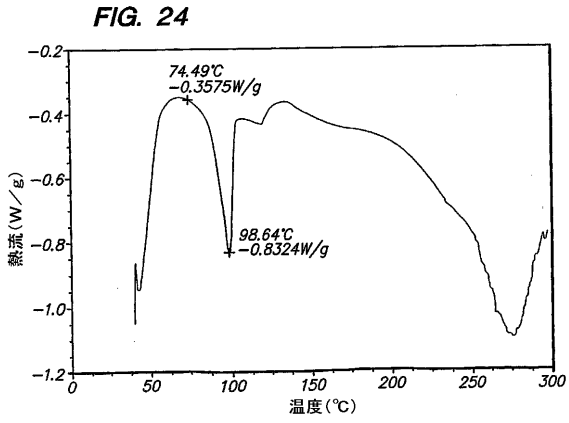


【図 22】

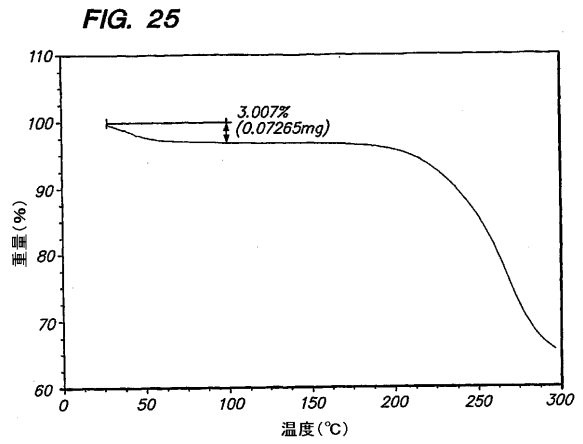
FIG. 22



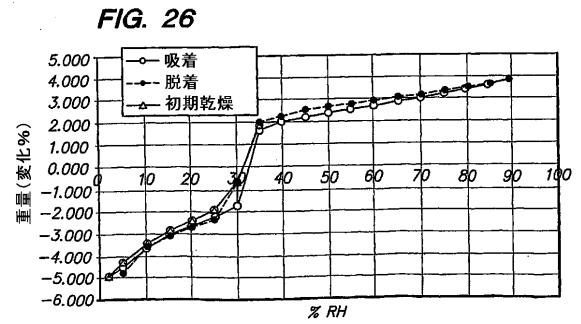
【図 24】



【図 25】



【図 26】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K 47/12
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P	11/08	(2006.01)	A 6 1 P 11/08
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K	31/573	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K	31/58	(2006.01)	A 6 1 K 31/573
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K 31/58
A 6 1 K	31/167	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 K	9/12	(2006.01)	A 6 1 K 31/167
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K 9/12
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K 9/08
			A 6 1 K 9/14

(72)発明者 ティモシー ジェイ. チャーチ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 3, サン マテオ, パサディナ ドライブ 3 9
1 3

(72)発明者 ビアンカム マラソン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 1 7, アーバイン, パロ ベルデ ロード 2 2 0
9

Fターム(参考) 4C054 AA02 CC04 CC07 DD01 EE01 FF26 FF38
4C076 AA12 AA24 AA30 AA93 BB21 BB27 CC15 DD23D DD43Z DD67A
FF04 FF11 FF14 FF61 FF68
4C084 AA19 MA13 MA17 MA43 MA55 NA05 NA10 ZA591 ZA611 ZB111
ZC201 ZC421 ZC751
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BC21 DA10 DA12 GA07 GA13 GA14
GA15 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05 MA07 MA09 MA10 MA13
MA17 MA43 MA55 NA05 NA10 NA14 ZA59 ZA61 ZB11 ZC20
ZC42 ZC75
4C206 AA01 AA02 GA01 GA31 KA01 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05
MA14 MA21 MA28 MA33 MA37 MA63 MA75 NA05 NA10 NA14
ZA59 ZA61 ZB11 ZC20 ZC42 ZC75

【外国語明細書】
2012107066000001.pdf