



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0005389  
(43) 공개일자 2009년01월13일

(51) Int. Cl.

C07D 211/46 (2006.01) A61K 31/445 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7028589

(22) 출원일자 2008년11월21일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년11월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/009925

국제출원일자 2007년04월24일

(87) 국제공개번호 WO 2007/127196

국제공개일자 2007년11월08일

(30) 우선권주장

60/794,702 2006년04월25일 미국(US)

(71) 출원인

세라밴스 인코포레이티드

미국 캘리포니아 94080 사우쓰 샌프란시스코 게이 트웨이 불리바드 901

(72) 발명자

폴송 피에르-장

미국 캘리포니아 94107 샌프란시스코 브리엔트 스트리트 301번가 #403

휴즈 애덤

미국 캘리포니아 94002 벨몬트 저드슨 스트리트 1221

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

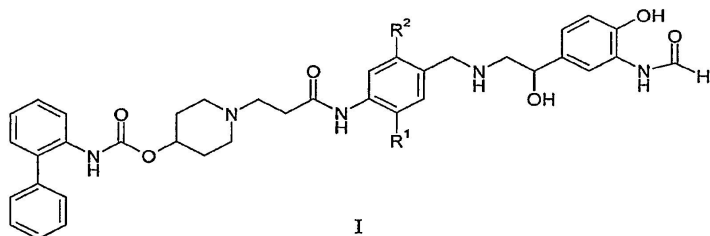
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54)  $\beta 2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성 및 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 갖는 디알킬페닐 화합물

### (57) 요약

본 발명은  $R^1$  및  $R^2$ 가 본 명세서에서 정의된 바와 같은 하기 식 (I)의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 또는 그의 용매화물, 또는 그의 입체이성질체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 화합물을 함유하는 약제학적 조성물 및 배합물, 상기 화합물의 제조 방법 및 상기 화합물을 제조하기 위한 중간체, 및 상기 화합물을 사용하여 예를 들면 만성 폐쇄성 폐질환 및 천식과 같은 폐질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.



(72) 발명자

**휴스펜드, 크레이그**

미국 캘리포니아 94061 레드우드 시티 팜 힐 블러  
바드 3811

**매켄 마타이**

미국 캘리포니아 94025 먼로 파크 벨퍼레이소 애비  
뉴 1852

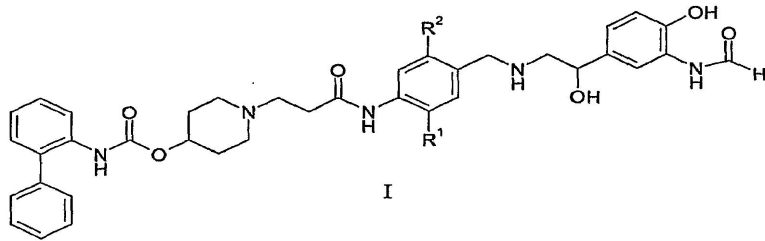
**랍타 미로슬라브**

미국 캘리포니아 94085 써니베일 이. 드웨인 애비  
뉴 411

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물 또는 그의 입체이성질체:



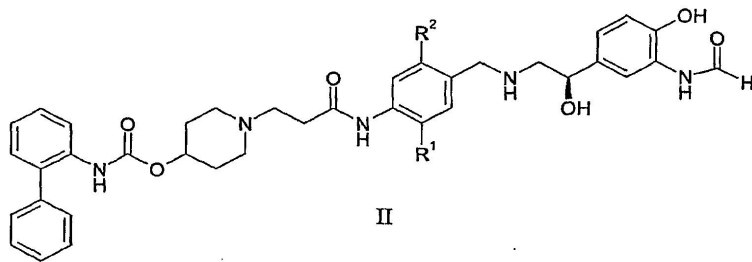
상기에서

R<sup>1</sup>은 메틸 또는 에틸이고;

R<sup>2</sup>는 메틸 또는 에틸이다.

### 청구항 2

하기 식 II를 갖는 제1항의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염:



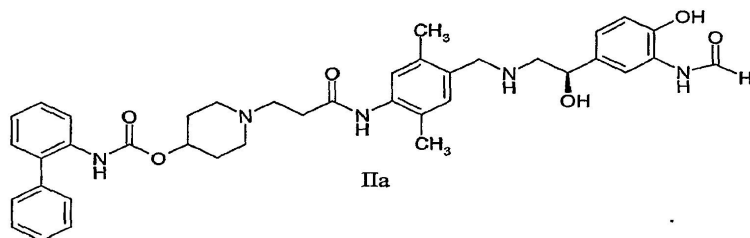
상기에서

R<sup>1</sup>은 메틸 또는 에틸이고;

R<sup>2</sup>는 메틸 또는 에틸이다.

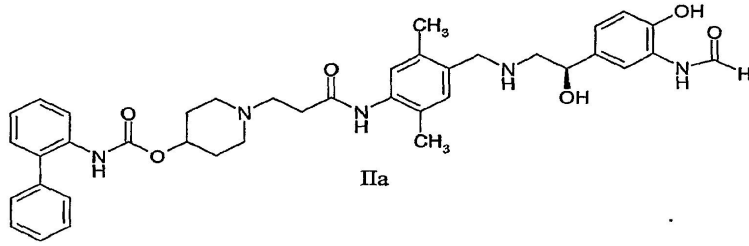
### 청구항 3

하기 식 IIa를 갖는 제1항의 화합물:



### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 식 IIa의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염인 것인 화합물:



#### 청구항 5

약제학적으로 허용가능한 담체 및 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

- (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물;
- (b) 스테로이드계 항-염증제; 및
- (c) 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

- (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물; 및
- (b) 스테로이드계 항-염증제를 포함하는 치료제의 배합물.

#### 청구항 8

- (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물 및 제1 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제1 약제학적 조성물; 및
  - (b) 스테로이드계 항-염증제 및 제2 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제2 약제학적 조성물을 포함하고,
- 상기 제1 및 제2 약제학적 조성물은 개별적인 약제학적 조성물인 것인 키트.

#### 청구항 9

폐 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 폐 질환의 치료 방법.

#### 청구항 10

환자에게 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 만성 폐쇄성 폐질환 또는 천식을 치료하는 방법.

#### 청구항 11

포유 동물에게 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물의 기관지 확장-발생량(bronchodilation-producing amount)을 투여하는 단계를 포함하는, 포유 동물에서 기관지 확장을 발생시키는 방법.

#### 청구항 12

포유 동물에게 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 포유 동물에서 무스카린 수용체를 길항시키고(antagonizing)  $\beta_2$  아드레날린성 수용체를 촉진시키는(agonizing) 방법.

#### 청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물을 사용하여 생물학적 분석을 수행하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물을 연구 도구로 사용하는 방법.

#### 청구항 14

- (a) 테스트 화합물로 생물학적 분석을 수행하여 제1 분석 값을 얻는 단계;  
 (b) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물로 상기 생물학적 분석을 수행하여 제2 분석 값을 얻는 단계; 및  
 (c) 상기 단계 (a)로부터의 제1 분석 값과 상기 단계 (b)로부터의 제2 분석 값을 비교하는 단계를 포함하고,  
 상기 단계 (a)는 상기 단계 (b)의 이전에, 이후에 또는 상기 단계 (b)와 동시에 수행되는 것인, 생물학적 분석에서 테스트 화합물을 평가하는 방법.

#### 청구항 15

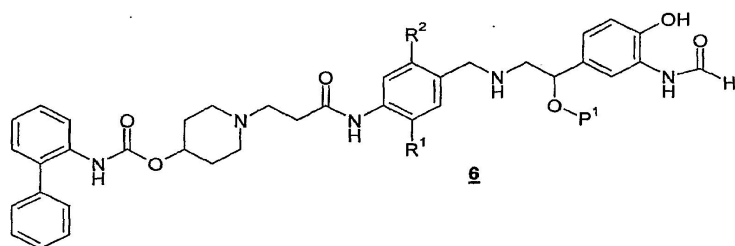
제14항에 있어서, 상기 생물학적 분석은 무스카린 수용체 결합 분석 또는  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 결합 분석인 것인 방법.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 상기 생물학적 분석은 포유 동물에서의 기관지보호(bronchoprotection) 분석인 것인 방법.

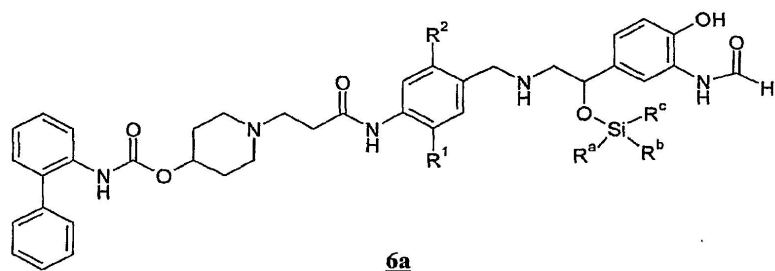
#### 청구항 17

제1항의 화합물의 제조 방법으로서, P<sup>1</sup>이 히드록시-보호기인 하기 식 6의 화합물을 탈보호시켜 식 I의 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 것인 제조 방법:



#### 청구항 18

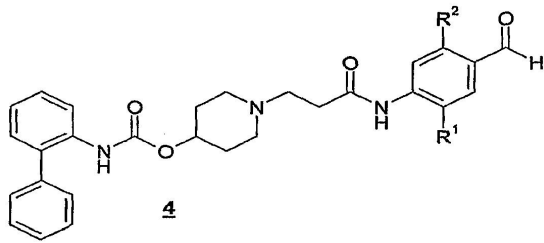
제1항의 화합물의 제조 방법으로서, R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup> 및 R<sup>c</sup>가 C<sub>1-4</sub> 알킬, 페닐, -C<sub>1-4</sub> 알킬-(페닐)로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R<sup>1a</sup>, R<sup>1b</sup> 및 R<sup>1c</sup> 중 하나가 -O-(C<sub>1-4</sub> 알킬)인 하기 식 6a의 화합물을 탈보호시켜 식 I의 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 것인 제조 방법:



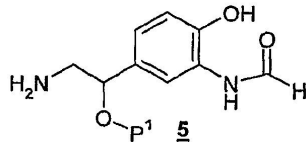
#### 청구항 19

제1항의 화합물의 제조 방법으로서,

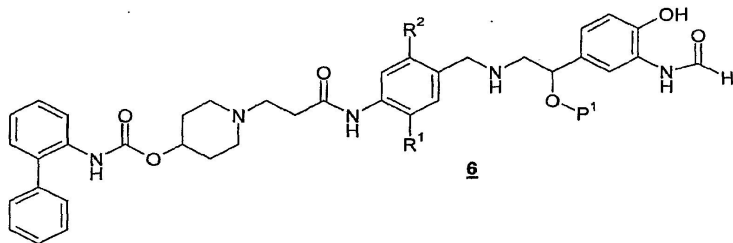
(a) 하기 식 4의 화합물을



$P^1$ 이 히드록시-보호기인 하기 식 5의 화합물과



환원제 존재 하에서 반응시켜 하기 식 6의 화합물을 제공하는 단계



; 및

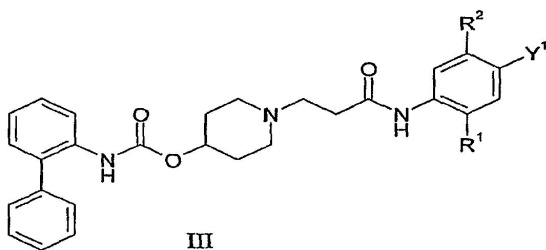
(b) 상기 식 6의 화합물을 탈보호시켜 식 I의 화합물을 제공하는 단계를 포함하는 것인 제조 방법.

#### 청구항 20

식 I의 화합물을 유리 염기 형태로 약제학적으로 허용가능한 산과 접촉시키는 단계를 포함하는, 제1항의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염의 제조 방법.

#### 청구항 21

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물을 제조하기 위한 하기 식 III의 화합물인 중간체 또는 그의 염 또는 그의 입체이성질체;



상기에서

$Y^1$ 은  $-CHO$ ,  $-CN$ ,  $-CH_2OH$ ,  $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)OR^{3c}$ , 브로모 및 요오드로부터 선택되고, 상기  $R^{3a}$  및  $R^{3b}$ 는  $C_{1-6}$  알킬로부터 독립적으로 선택되거나, 또는  $R^{3a}$ 과  $R^{3b}$ 는 연결되어  $C_{2-6}$  알킬렌을 형성하고,  $R^{3c}$ 는  $C_{1-6}$  알킬로부터 선택되고;

$R^1$ 은 메틸 또는 에틸이고;

$R^2$ 는 메틸 또는 에틸이다.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기  $R^1$ 과  $R^2$ 는 메틸인 것인 화합물.

#### 청구항 23

제21항에 있어서, 상기  $Y^1$ 은 -CHO인 것인 화합물.

#### 청구항 24

제21항에 있어서, 상기  $Y^1$ 은 -CHO이고; 상기  $R^1$ 과  $R^2$ 는 메틸인 것인 화합물.

#### 청구항 25

제4항에 있어서, 상기 화합물은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-((R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노)메틸)-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 L-타르타르산 염인 것인 화합물.

#### 청구항 26

치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물.

#### 청구항 27

폐 질환을 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 화합물의 용도.

## 명세서

### 기술분야

- <1> 본 발명은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성 및 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 갖는 신규한 디알킬페닐 화합물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 약제학적 조성물, 상기 화합물을 제조하는 방법 및 상기 화합물을 제조하기 위한 중간체, 및 예를 들면 폐 질환(pulmonary disorder)을 치료하기 위하여 상기 화합물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- <2> 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)을 포함하는 폐 질환은 통상적으로 기관지 확장제(bronchodilator)로 치료된다. 폐 질환을 치료하는데 사용되는 기관지 확장제의 한 유형은 알부테롤, 포르모테롤 및 살메테롤과 같은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체(아드레노셉터, adrenoceptor)로 구성된다. 이러한 화합물은 일반적으로 흡입에 의해 투여된다. 기관지 확장제의 또 다른 유형은 이프라트로피움과 티오토로피움과 같은 무스카린 수용체 안타고니스트(콜린 억제성 화합물)로 구성된다. 이러한 화합물은 또한 통상적으로 흡입에 의해 투여된다.
- <3>  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트와 무스카린 수용체 안타고니스트의 배합을 함유하는 약제학적 조성물은 폐 질환을 치료할 때 사용하기 위해 당업계에서 알려져 있다. 예를 들면, 2002년 8월 13일에 등록된 미국등록특허 제6,433,027호는 티오토로피움 브로마이드와 같은 무스카린 수용체 안타고니스트와, 포르모테롤 푸마레이트와 같은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트를 함유하는 의약 조성물을 개시하고 있다.
- <4> 추가적으로,  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 모두 갖는 화합물이 당업계에서 알려져 있다. 예를 들면, 2006년 11월 28일에 등록된 미국등록특허 제7,141,671호는  $\beta_2$  아드

레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 모두 갖는 비페닐 화합물을 개시하고 있다.  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 모두 갖는 화합물은 매우 바람직하는데, 왜냐하면 이러한 화합물은 단 분자(single molecule) 약동력학을 갖지만 두 개의 독립적인 작용 방식을 통해 기관지 확장을 제공하기 때문이다.

<5> 폐 질환을 치료할 때에는, 흡입에 의해 투여될 때 환자가 하루에 한 번 또는 그보다 적은 횟수로 치료제를 투여할 필요가 있도록 하기 위하여, 긴 작용 지속 시간, 즉 적어도 약 24시간의 지속 시간을 갖는 치료제를 제공하는 것이 특히 유용하다. 당해 분야에서 이전에 개시된 모든 이중-작용성(dual-acting) 화합물 모두가 이러한 바람직한 성질을 갖는 것은 아니다.

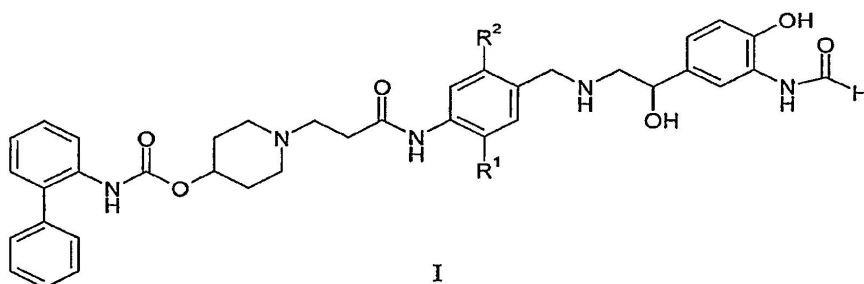
<6> 따라서, 흡입에 의해 환자에게 투여될 때 긴 작용 지속 시간을 가지며  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성 모두를 갖는 신규한 화합물에 대한 필요성이 있어 왔다.

### 발명의 상세한 설명

#### <7> 발명의 요약

<8> 본 발명은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성 모두를 갖는 신규한 디알킬페닐 화합물을 제공한다. 다른 특징들 중에서도, 본 발명의 화합물은 흡입에 의해 포유 동물에 투여되었을 때, 긴 작용 지속 시간 즉 약 24시간 이상의 지속 시간을 갖는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 화합물은 폐 질환을 치료하기 위한 치료제로서 유용하고 편리한 것으로 기대된다.

<9> 따라서, 본 발명의 조성물의 하나의 실시 형태에서, 본 발명은 하기 식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물 또는 그의 입체이성질체를 제공한다:

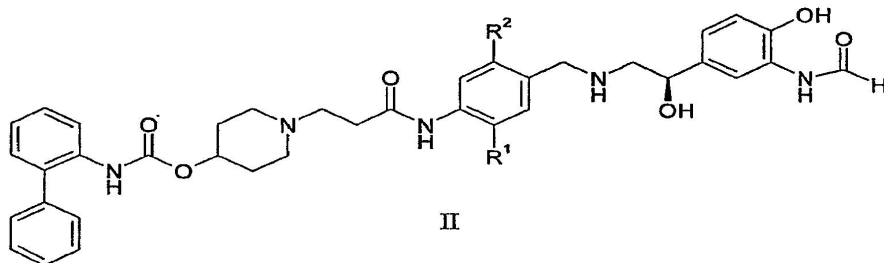


<10>

<11> 상기에서

<12>  $R^1$ 은 메틸 또는 에틸이고;  $R^2$ 는 메틸 또는 에틸이다.

<13> 본 발명의 특정 실시 형태에서, 식 I의 화합물은 하기 식 II를 갖는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물이다:



<14>

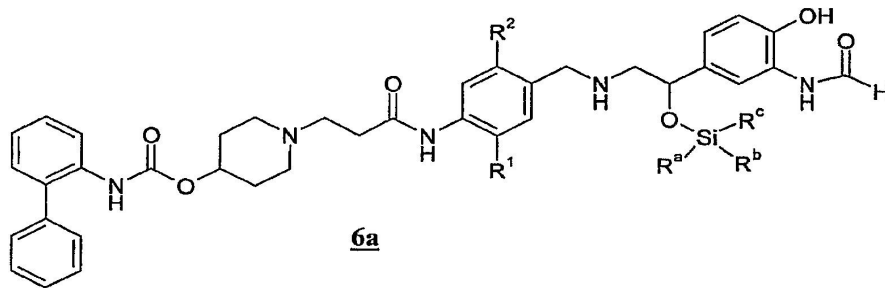
<15> 상기에서  $R^1$ 과  $R^2$ 는 본 명세서(임의의 특정한 또는 바람직한 실시 형태를 포함함)에서 정의된 바와 같다.

<16> 본 발명의 조성물의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체 및 식 I의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

<17> 바람직하다면, 본 발명의 화합물은 스테로이드계 항염증제와 같은 다른 치료제와 배합하여 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 (a) 식 I의 화합물; 및 (b) 제2 치료제를 포함하

는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 (a) 식 I의 화합물; (b) 제2 치료제; 및 (c) 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

- <18> 본 발명의 조성물의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 (a) 식 I의 화합물; 및 (b) 제2 치료제를 포함하는, 치료제의 배합에 관한 것이다. 본 발명의 조성물의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 (a) 식 I의 화합물 및 제1 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제1 약제학적 조성물; 및 (b) 제2 치료제 및 제2 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 제2 약제학적 조성물을 포함하는, 약제학적 조성물의 배합에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 약제학적 조성물을 함유하는 키트에 관한 것이다.
- <19> 본 발명의 화합물은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성 모두를 갖는다. 따라서, 식 I의 화합물은 천식 및 만성 폐쇄성 폐질환과 같은 폐 질환을 치료하기 위한 치료제로서 유용할 것으로 기대된다.
- <20> 따라서, 본 발명 방법의 하나의 실시 형태에서, 본 발명은 폐 질환을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 치료가 필요한 환자에게 식 I의 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 만성 폐쇄성 폐질환 또는 천식을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 환자에게 식 I의 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 추가적으로, 본 발명의 방법의 다른 실시 형태에서, 본 발명은 포유 동물에서 기관지 확장을 발생시키는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 포유 동물에게 식 I의 화합물의 기관지 확장-발생량 (bronchodilation-producing amount)을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 포유 동물에서 무스카린 수용체를 길항시키고(antagonizing)  $\beta_2$  아드레날린성 수용체를 촉진하는(agonizing) 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 포유 동물에게 식 I의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.
- <21> 본 발명의 화합물은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성 모두를 갖고 있으므로, 본 발명의 화합물은 또한 연구 도구로서 유용하다. 따라서, 본 발명의 방법의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 식 I의 화합물을 연구 도구로 사용하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 식 I의 화합물을 사용하여 생물학적 분석을 수행하는 단계를 포함한다.
- <22> 본 발명의 화합물은 또한 신규 화합물을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법의 하나의 실시 형태에서, 본 발명은 생물학적 분석에서 테스트 화합물을 평가하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 (a) 테스트 화합물로 생물학적 분석을 수행하여, 제1 분석값을 얻는 단계; (b) 식 I의 화합물로 상기 생물학적 분석을 수행하여, 제2 분석값을 얻는 단계; 및 (c) 상기 단계 (a)로부터의 제1 분석값과 상기 단계 (b)로부터의 제2 분석값을 비교하는 단계를 포함하고, 단계 (a)는 단계 (b)의 이전에, 이후에 또는 단계 (b)와 동시에 수행된다.
- <23> 본 발명은 또한 식 I의 화합물을 제조하는 방법 및 식 I의 화합물을 제조하는데 유용한 중간체에 관한 것이다. 따라서, 본 발명의 방법의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 식 I의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 식 6의 화합물(본 명세서에서 정의된 바와 같음)을 탈보호하여 식 I의 화합물을 제공하는 단계를 포함한다.
- <24> 본 발명의 방법의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 식 I의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 (a) 환원제 존재 하에서 식 4의 화합물과 식 5의 화합물을 반응시켜 식 6의 화합물을 얻는 단계; 및 (b) 식 6의 화합물을 탈보호하여 식 I의 화합물을 얻는 단계를 포함하고, 식 4, 5 및 6의 화합물은 본 명세서에서 정의된 바와 같다.
- <25> 본 발명의 특정 구체예에서, 식 I의 화합물은 히드록시-보호기가 실릴기인 식 6의 화합물을 탈보호함으로써 제조된다. 따라서, 본 발명의 방법의 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 식 I의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은  $R^a$ ,  $R^b$  및  $R^c$ 는  $C_{1-4}$ 알킬, 페닐,  $-C_{1-4}$ 알킬-(페닐)로부터 독립적으로 선택되거나, 또는  $R^{1a}$ ,  $R^{1b}$  및  $R^{1c}$  중 하나는  $-O-(C_{1-4}$  알킬)인 하기 식 6a의 화합물을 탈보호하여 식 I의 화합물을 얻는 단계를 포함한다.



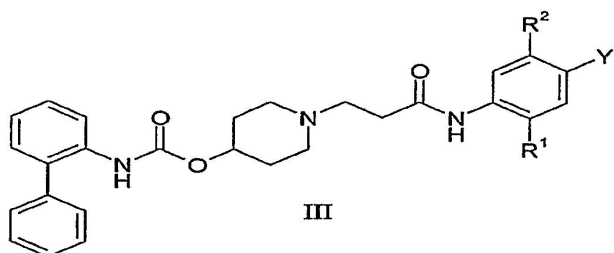
<26>

<27>

다른 구체예에서, 본 명세서에서 기술된 방법은 식 I의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염을 형성하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 그 밖의 다른 방법; 및 본 명세서에서 기술된 방법 중 어느 하나에 의해 제조된 생성물에 관한 것이다.

<28>

특정 구체예에서, 본 발명은 하기 식 III의 화합물, 또는 그의 염 또는 그의 입체이성질체에 관한 것이다:



<29>

<30>

상기에서  $Y^1$ 은  $-CHO$ ,  $-CN$ ,  $-CH_2OH$ ,  $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)OR^{3c}$ , 브로모 및 요오드로부터 선택되고,  $R^{3a}$ 와  $R^{3b}$ 는  $C_{1-6}$  알킬로부터 독립적으로 선택되거나, 또는  $R^{3a}$ 와  $R^{3b}$ 는 연결되어  $C_{2-6}$  알킬렌을 형성하고,  $R^{3c}$ 는  $C_{1-6}$  알킬로부터 선택되고; 및  $R^1$ 과  $R^2$ 는 본 명세서(임의의 특정한 또는 바람직한 구체예를 포함)에서 정의된 바와 같고, 상기 화합물은 식 I의 화합물을 제조할 때 중간체로 유용하다. 식 III의 특정 구체예에서,  $R^1$ 과  $R^2$ 는 메틸이다. 식 III의 또 다른 특정 구체예에서,  $Y^1$ 은  $-CHO$ 이다. 식 III의 또 다른 특정 구체예에서,  $R^1$ 과  $R^2$ 는 메틸이고,  $Y^1$ 은  $-CHO$ 이다.

<31>

본 발명은 또한 치료를 위한 식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다. 추가적으로, 본 발명은 폐 질환의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 식 I의 화합물의 용도; 및 연구 도구로서 식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 다른 실시 형태와 구체예들이 본 명세서에서 개시되어 있다.

<32>

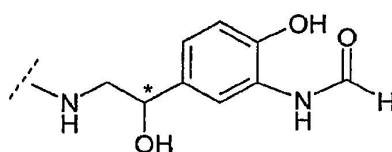
### 발명의 상세한 설명

<33>

본 발명의 조성물의 하나의 실시 형태에서, 본 발명은 신규한 식 I의 화합물에 관한 것이다. 식 I의 화합물은 하나 이상의 키랄 센터를 함유하고 있으므로, 달리 지적되지 않는다면, 본 발명은 라세미체 혼합물; 순수한 입체 이성질체(즉, 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체); 입체이성질체-풍부한 혼합물 및 그 등가물에 관한 것이다. 특정 입체이성질체가 개시되거나 또는 명명될 때, 조성물 전체로서의 유용성이 다른 이성질체의 존재에 의해 제거되지 않는다면, 달리 지적되지 않는 한, 소량의 다른 입체이성질체가 본 발명의 조성물에 존재할 수 있음을 당해 분야의 당업자는 이해할 것이다.

<34>

구체적으로, 식 I의 화합물은 하기 부분 식에서 기호 \*로 표시되는 탄소 원자에서 한 개의 키랄 센터를 포함하고 있다:



<35>

<36>

본 발명의 특정 구체예에서, 기호 \*로 표시된 탄소 원자는 (R) 배열을 갖는다. 이러한 구체예에서, 식 I의 화합물은 기호 \*로 표시되는 탄소 원자에서 (R) 배열을 갖거나 또는 이 탄소 원자에서 (R) 배열을 갖는 입체 이

성질체가 풍부하게 된다.

- <37> 식 I의 화합물은 또한 여러 개의 염기성 기(예를 들면, 아미노기)를 함유하고 있으므로, 식 I의 화합물은 유리 염기(free base) 또는 다양한 염 형태로 존재할 수 있다. 이러한 모든 형태는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 또한, 식 I의 화합물의 용매화물 또는 그의 염은 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- <38> 따라서, 당해 분야의 당업자는 본 명세서에서의 화합물에 대한 언급, 예를 들면, 식 I 또는 식 6의 화합물에 대한 언급은 달리 지적되지 않는다면, 그 화합물의 염, 그 화합물의 입체 이성질체 및 그 화합물의 용매화물에 대한 언급을 포함함을 이해할 것이다.
- <39> 추가적으로, 본 명세서에서 사용된 단수 용어 "하나", "하나", 및 "상기"는 그 사용 문맥이 명백하게 다른 것을 지적하지 않는다면 상응한 복수 형태를 포함한다.
- <40> 본 발명의 화합물과 그의 중간체를 명명하기 위하여 본 명세서에서 사용된 명명법은 일반적으로 상업적으로 이용가능한 AutoNom software(MDL, San Leandro, 캘리포니아)를 사용하여 도출되었다. 통상적으로, 식 I의 화합물은 비페닐-2-일 카르바미산의 피페리딘-4-일 에스테르 유도체로 명명된다.
- <41> 대표적인 구체예
- <42> 하기의 치환기와 의미는 본 발명의 다양한 실시 형태와 구체예의 대표적인 실시예를 제공하는 것을 목적으로 한다. 이러한 대표적인 의미들은 상기 실시 형태와 구체예를 추가로 규정하고 설명하는 것을 목적으로 하고 다른 구체예를 배제하거나 또는 본 발명의 범위를 제한하는 것을 목적으로 하지 않는다. 이와 관련하여, 특정 의미 또는 치환기가 바람직하다는 표현은 특별히 지적되지 않는다면 어떤 방식으로든지 본 발명으로부터 다른 의미 또는 치환기를 배제하는 것을 목적으로 하지 않는다.
- <43> 하나의 구체예에서, R<sup>1</sup>은 메틸이고 R<sup>2</sup>는 메틸이다.
- <44> 다른 구체예에서, R<sup>1</sup>은 에틸이고 R<sup>2</sup>는 에틸이다.
- <45> 다른 구체예에서, R<sup>1</sup>은 메틸이고 R<sup>2</sup>는 에틸이다.
- <46> 다른 구체예에서, R<sup>1</sup>은 에틸이고 R<sup>2</sup>는 메틸이다.
- <47> 따라서, 본 발명의 조성물의 하나의 실시 형태에서, 본 발명은 하기로부터 선택되는 식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:
- <48> 비페닐-2-일카르바미산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIa);
- <49> 비페닐-2-일카르바미산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디에틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIb);
- <50> 비페닐-2-일카르바미산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2-메틸-5-에틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIc);
- <51> 비페닐-2-일카르바미산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2-에틸-5-메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIId).
- <52> 정의
- <53> 본 발명의 화합물, 조성물, 방법 및 제조 방법을 기술할 때, 하기의 용어들은 달리 지적되지 않는다면 하기의 의미를 갖는다.
- <54> 용어 "알킬"은 선형 또는 분지형이 될 수 있는 1가(monovalent) 포화된 탄화수소 기를 의미한다. 달리 정의되지 않는다면, 상기 알킬기는 통상적으로 1개 내지 10개 탄소 원자를 포함한다. 대표적인 알킬기는 예를 들면, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, 이소부틸, tert-부틸, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸, n-노닐, n-데실 및 그 등가물을 포함한다.
- <55> 특정 개수의 탄소 원자가 본 명세서에서 사용된 특정 용어를 위한 것일 때, 탄소 원자의 개수는 상기 용어 앞에 위치한다. 예를 들면, 용어 "C<sub>1-3</sub> 알킬"은 1개 내지 3개 탄소 원자를 갖는 알킬기를 의미하고, 상기 탄소 원자는

임의의 화학적으로-허용가능한 배열로 된다.

- <56> 용어 "알킬렌"은 선형 또는 분지형이 될 수 있는 2가(divalent) 포화된 탄화수소 기를 의미한다. 달리 규정되지 않는다면, 상기 알킬렌 기는 통상적으로 1개 내지 10개 탄소 원자를 포함한다. 대표적인 알킬렌 기는 예를 들면, 메틸렌, 에탄-1,2-디일("에틸렌"), 프로판-1,2-디일, 프로판-1,3-디일, 부탄-1,4-디일, 펜탄-1,5-디일 및 그 등가물을 포함한다.
- <57> 용어 "아미노-보호기"는 아미노 기에서 원하지 않는 반응을 막는데 적절한 보호기를 의미한다. 대표적인 아미노-보호기는 터트-부톡시카르보닐(BOC), 트리틸(Tr), 벤질옥시카르보닐(Cbz), 9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc), 벤질, 포르밀, 트리메틸실릴(TMS), 터트-부틸디메틸실릴(TBS) 및 그 등가물을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- <58> 용어 "카르복시-보호기"는 카르복시기에서 원하지 않는 반응을 막는데 적절한 보호기를 의미한다. 대표적인 카르복시-보호기는 메틸, 에틸, 터트-부틸, 벤질(Bn), p-메톡시벤질(PMB), 9-플루오레닐메틸(Fm), 트리메틸실릴(TMS), 터트-부틸디메틸실릴(TBS), 디페닐메틸(벤즈히드릴, DPM) 및 그 등가물을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- <59> 본 명세서에서 사용된 용어 "본 발명의 화합물" 또는 "식 I의 화합물" 또는 "식 II의 화합물"은 달리 지적되지 않는다면, 열거된 화합물(들) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물 또는 그의 입체이성질체를 의미한다.
- <60> 용어 "할로"는 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도를 의미한다.
- <61> 용어 "히드록시-보호기"는 히드록시기에서 원하지 않는 반응을 막는데 적절한 보호기를 의미한다. 대표적인 히드록시-보호기는 트리메틸실릴(TMS), 트리에틸실릴(TEs), 터트-부틸디메틸실릴(TBS) 및 그 등가물과 같은 트리(C<sub>1-6</sub> 알킬)실릴기를 포함하는 실릴기; 포르밀, 아세틸 및 그 등가물과 같은 C<sub>1-6</sub> 알카노일기를 포함하는 에스테르(아실 기); 벤질(Bn), p-메톡시벤질(PMB), 9-플루오레닐메틸(Fm), 디페닐메틸(벤즈히드릴, DPM) 및 그 등가물과 같은 아릴메틸 기를 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 추가적으로, 두 개의 히드록시기는 또한 예를 들면 아세톤과 같은 케톤과의 반응에 의해 형성된 프로프-2-일리딘과 같은 알킬리덴 기로 보호될 수 있다.
- <62> 용어 "이탈기"는 친핵성 치환 반응과 같은 치환 반응에서 또 다른 작용기 또는 원자에 의해 치환될 수 있는 작용기 또는 원자를 의미한다. 예를 들면, 대표적인 이탈기는 클로로, 브로모 및 요오드 기; 메실레이트, 토실레이트, 브로실레이트, 노실레이트 및 그 등가물과 같은 술폰산 에스테르; 및 아세톡시, 트리플루오로아세톡시 및 그 등가물과 같은 아실옥시기를 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.
- <63> 용어 "질량 중위 직경(mass median diameter)" 또는 "MMD"가 입자를 언급하기 위해 사용될 때, 입자들의 질량의 절반은 더 큰 직경을 갖는 입자에 포함되고 절반은 더 작은 직경을 갖는 입자에 포함되도록 하는 직경을 의미한다.
- <64> 용어 "미분화된(micronized)" 또는 "미분화된 형태"는 달리 지적되지 않는다면 입자들 중 약 90% 이상이 약 10  $\mu$ m 미만의 직경을 갖는 입자를 의미한다.
- <65> 본 명세서에서 사용된 dyddj "또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물 또는 그의 입체이성질체"는 식 I의 화합물의 입체 이성질체의 약제학적으로 허용가능한 염의 용매화물과 같은, 염, 용매화물 및 입체 이성질체의 모든 변형을 포함하도록 한다.
- <66> 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 포유 동물과 같은 환자에게 투여하기 위해 허용가능한 염(예를 들면, 제공된 투여 방식에 대해 허용가능한 포유 동물 안전성을 갖는 염)을 의미한다. 대표적인 약제학적으로 허용가능한 염은 아세트산, 아스코르브산, 벤젠술폰산, 벤조산, 캄포술폰산, 시트르산, 에탄술폰산, 에디실릭산(edisylic acid), 푸마르산, 겐티스산(gentisic acid), 글루콘산, 글루코론산(glucuronic acid), 글루타민산, 마노산(hippuric acid), 브롬화수소산, 염화수소산, 이세티온산(isethionic acid), 젖산, 락토비오닉산(lactobionic acid), 말레산, 말산, 만델산, 메탄술폰산, 점액산(mucic acid), 나프탈렌술폰산, 나프탈렌-1,5-디술폰산, 나프탈렌-2,6-디술폰산, 니코틴산, 질산, 오로토산(orotic acid), 파모인산(pamoic acid), 판토텐산(pantothenic acid), 인산, 숙신산, 황산, 타르타르산, p-톨루엔술폰산 및 시나포익산(xinafoic acid), 및 그 등가물의 염을 포함한다.
- <67> 용어 "그의 보호된 유도체"는 보호기 또는 차단기(blocking group)를 이용하여, 화합물의 하나 이상의 작용기가

원하지 않는 반응을 하는 것으로부터 보호되거나 또는 차단되도록 한 특정 화합물의 유도체를 의미한다. 보호될 수 있는 작용기는 예를 들면, 카르복시기, 아미노기, 히드록시기, 티올기, 카르보닐기 및 그 등가물을 포함한다. 상기 작용기를 위한 적절한 보호기는 T. W. Greene and G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 제3판, Wiley, New York, 1999의 개시 내용 및 본 명세서에서 인용된 참조 문헌에 의해 예로든 바와 같이 당해 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다.

<68> 용어 "그의 염"은 산의 수소가 금속 양이온 또는 유기 양이온 및 그 등가물과 같은 양이온으로 대체되었을 때 생성되는 화합물을 의미한다. 본 발명에서, 양이온은 통상적으로 식 I의 화합물의 양자화된(protonated) 형태, 즉 산에 의해 양자화된 하나 이상의 아미노기가 있는 형태를 포함한다. 환자에게 투여를 목적으로 하지 않는 중간체 화합물의 염을 위해서는 요구되지는 않지만, 바람직하게는, 염은 약제학적으로 허용가능한 염이다.

<69> 용어 "용매화물"은 하나 이상의 용질 분자 즉 식 I의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염과 하나 이상의 용매 분자에 의해 형성된 복합체 또는 집합체를 의미한다. 상기 용매화물은 통상적으로는, 실질적으로 고정된 몰 비율의 용질과 용매를 갖는 결정형 고체이다. 대표적인 용매는 예를 들면, 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 아세트산 및 그 등가물을 포함한다. 용매가 물일때, 생성되는 용매화물은 수화물이다.

<70> 용어 "치료적 유효량"은 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 때 치료를 하는데 충분한 함량을 의미한다.

<71> 본 명세서에서 사용된 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 포유 동물(구체적으로는 인간)과 같은 환자에서 질병 또는 의학적 상태(COPD 또는 천식과 같은 것)를 치료하는 것 또는 치료를 의미하고, 다음을 포함한다:

<72> (a) 질병 또는 의학적 상태가 발생하는 것을 막는 것, 즉 환자의 예방적 치료;

<73> (b) 질병 또는 의학적 상태를 개선하는 것, 즉 환자의 질병 또는 의학적 상태를 제거하거나 또는 역행(regression)을 일으키는 것;

<74> (c) 질병 또는 의학적 상태를 억제하는 것, 즉 환자에서 질병 또는 의학적 상태의 진행을 늦추거나 또는 정지시키는 것; 또는

<75> (d) 환자에서 질병 또는 의학적 상태의 증상을 경감시키는 것.

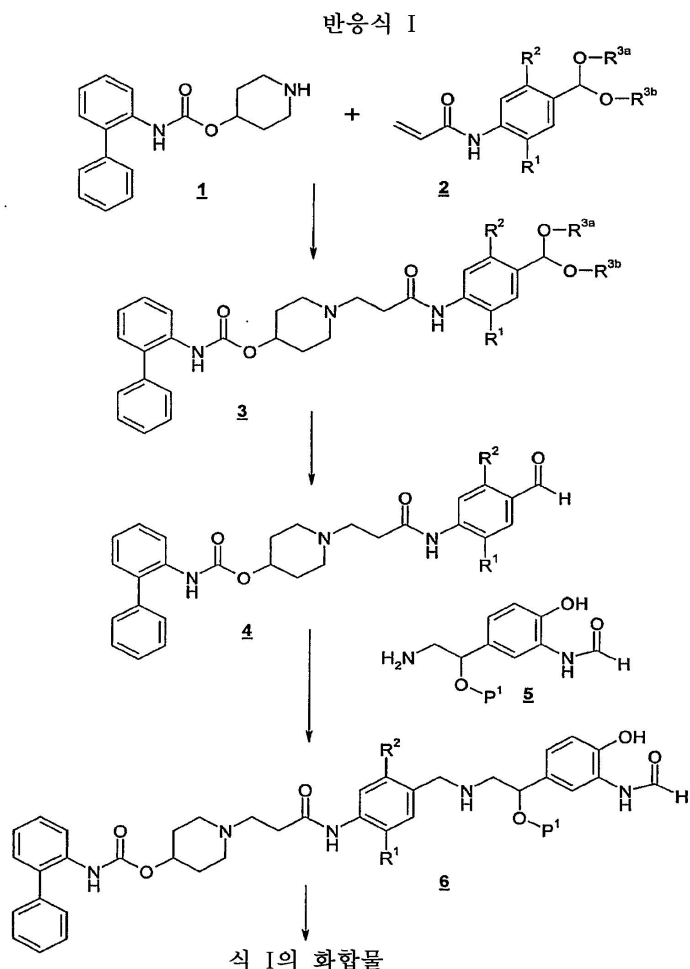
<76> 본 명세서에서 사용된 모든 다른 용어들은 본 발명이 관계하는 당해 분야의 당업자들에 의해 이해되는 바와 같은 통상적인 의미를 갖는 것으로 한다.

#### <77> **일반적인 합성 방법**

<78> 본 발명의 화합물은 하기의 일반적인 방법과 절차를 사용하여 쉽게 입수가 가능한 출발물질로부터 제조될 수 있거나 또는 당해 분야의 당업자에게 쉽게 입수가 가능한 그 밖의 다른 정보 또는 당업자에게 알려져 있는 그 밖의 다른 정보를 사용함으로써 제조될 수 있다. 하기의 절차가 본 발명의 특정 구체예 또는 실시 형태를 설명할 수는 있지만, 당해 분야의 당업자는 본 발명의 다른 구체예 또는 실시 형태는 동일하거나 또는 유사한 방법을 사용함으로써, 또는 당해 분야의 당업자에게 알려져 있는 그 밖의 다른 방법, 시약 및 출발 물질을 사용함으로써 제조될 수 있음을 인식할 것이다. 통상적인 또는 바람직한 방법 조건들(즉, 반응 온도, 시간, 시약의 몰 비율, 용매, 압력 등)이 제공될 때, 달리 지적되지 않는다면 그 밖의 다른 방법 조건들이 또한 사용될 수 있음은 이해될 것이다. 최적의 반응 조건이 사용된 시약, 용매 및 함량과 같은 다양한 반응 변수에 의존하여 통상적으로는 변화하지만, 당해 분야의 당업자는 통상적인 최적화 절차를 사용하여 적절한 반응 조건을 쉽게 결정할 수 있다.

<79> 추가적으로, 당해 분야의 당업자들에게 자명한 바와 같이, 특정 작용기가 원하지 않는 반응을 하는 것을 막기 위하여 통상적인 보호기가 필요하거나 또는 바람직할 수 있다. 특정 작용기를 위한 적절한 보호기 또는 그러한 작용기의 보호 및 탈보호를 위한 적절한 조건 및 시약의 선택은 당해 분야에서 잘 알려져 있다. 바람직하다면, 본 명세서에서 기술된 절차에서 설명된 보호기 이외의 보호기들이 사용될 수 있다.

<80> 일 구체예에서, 식 I의 화합물은 반응식 I에서 설명된 바와 같이 합성된다:



<81>

<82> 상기에서 P<sup>1</sup>은 히드록시-보호기이고; 및 R<sup>3a</sup>와 R<sup>3b</sup>는 C<sub>1-6</sub> 알킬로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R<sup>3a</sup>와 R<sup>3b</sup>는 연결되어 C<sub>2-6</sub> 알킬렌을 형성한다.

<83> 반응식 I에서 도시되는 바와 같이, 화합물 1은 화합물 2 약 0.95 내지 약 1.05 몰 당량과 반응하여, 화합물 3을 제공할 수 있다. 이러한 마이클 반응은 약 0℃부터 약 75℃까지, 통상적으로는 약 40℃부터 약 45℃까지의 온도에서, 약 8시간 내지 약 24시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 수행된다. 일반적으로, 이 반응은 디클로로메탄 또는 디클로로메탄과 메탄올 또는 에탄올의 혼합물, 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 생성물은 통상적으로 분리된다. 택일적으로는 화합물 3을 함유하는 반응 혼합물은 합성 다음 단계에서 바로 사용될 수 있다.

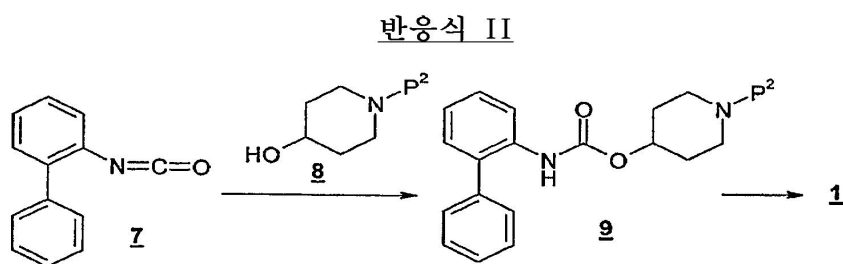
<84> 그런 다음, 화합물 3은 수성 산(aqueous acid)과 반응하여 아세탈기를 가수분해시키고, 알데히드 화합물 4를 제공한다. 예를 들면, 염화수소산, 황산, 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산 및 그 등과물을 포함하는 임의의 적절한 산이 이 반응에서 사용될 수 있다. 가수분해 반응은 통상적으로 약 0℃부터 약 30℃까지, 통상적으로는 약 20℃부터 약 25℃까지의 온도에서, 약 1 시간 내지 약 6시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 수행된다. 일반적으로, 이 반응은 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 디클로로메탄/에탄올, 아세토니트릴, 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 생성물은 통상적으로 분리된다.

<85> 그런 다음, 화합물 4는 환원제 존재 하에서 화합물 5 약 0.95 몰 당량 내지 약 1.5 몰 당량과 반응하여, 화합물 6을 제공한다. 예를 들면, 소듐 보로히드라이드, 소듐 트리아세톡시보로히드라이드, 소듐 시아노보로히드라이드 및 그 등과물과 같은 금속 히드라이드 시약, 또는 탄소상 팔라듐 및 그 등과물과 같은 수소와 금속 촉매를 포함하는 임의의 적절한 환원제가 이 반응에서 사용될 수 있다. 이러한 환원적 알킬화 반응은 통상적으로는 약 -20

℃부터 약 30℃까지, 통상적으로는 0℃부터 약 5℃까지의 온도에서, 약 1시간 내지 약 6시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 통상적으로 수행된다. 일반적으로는, 이 반응은 적절한 희석제와, 디클로로에탄 및 메탄올, 및 그 등과물과 같은 양성자성 용매(protic solvent)에서 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 생성물은 통상적으로 분리된다.

<86> 그런 다음, 화합물 6은 탈보호되어, 식 I의 화합물을 제공한다. 화합물 6을 탈보호하기 위해 사용되는 특정 조건들은 사용된 보호기에 따라 달라질 것이다. 예를 들면, P<sup>1</sup>이 터트-부틸디메틸실릴, 터트-부틸디페닐실릴, 디페닐메틸실릴, 디-터트-부틸메틸실릴, 터트-부톡시디페닐실릴 및 그 등과물과 같은 실릴 보호기일 때(즉, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 식 6a의 화합물), 이러한 탈보호 반응은 통상적으로는 플루오라이드 이온 공급원과 화합물 6a를 접촉시킴으로써 수행된다. 특정 구체예에서, 플루오라이드 이온 공급원은 트리에틸아민 트리히드로플루오라이드이다. 플루오라이드 이온의 다른 적절한 공급원은 테트라부틸암모늄 플루오라이드, 18-크라운-6 에테르와 포타슘 플루오라이드, 플루오르화 수소(hydrogen fluoride), 피리딘 히드로플루오라이드, 및 그 등과물을 포함한다. 이 반응은 약 0℃부터 약 50℃까지, 통상적으로는 약 10℃부터 약 25℃까지의 온도에서, 약 24시간 내지 약 72시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 수행된다. 일반적으로는, 이 반응은 디클로로에탄과 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 생성물은 통상적으로 분리된다.

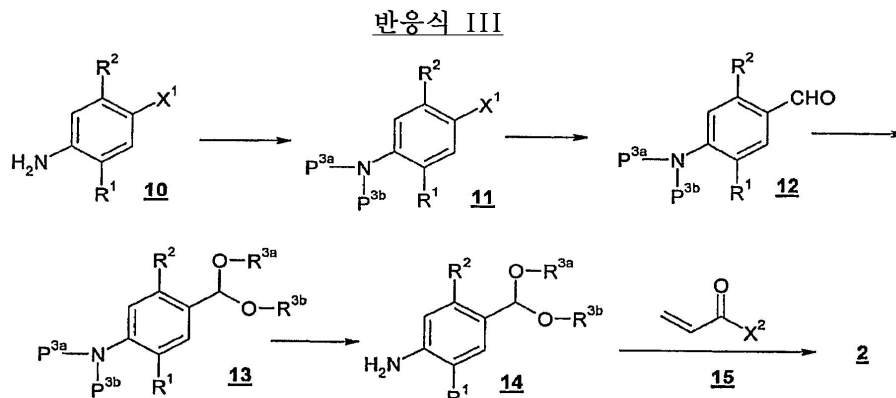
<87> 화합물 1은 당해 분야에서 알려져 있거나 또는 공지된 절차를 사용하여 상업적으로 입수가 가능한 출발 물질과 시약으로부터 제조될 수 있다. 예를 들면, 미국공개특허 제2004/0167167 A1과 R. Naito *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 46(8) 1286-1294 (1998)을 참고한다. 예를 들면, 화합물 1은 하기 반응식 II에서 설명되는 바와 같이 제조될 수 있다:



<88> 반응식 II에서 보여지는 바와 같이, 비페닐-2-이소시아네이트 (7)는 P<sup>2</sup>가 벤질과 같은 아미노-보호기인 N-보호된 4-히드록시피페리딘 8과 반응하여, 카바메이트 중간체 9를 제공한다. 이 반응은 통상적으로는 약 20℃부터 약 100℃까지, 통상적으로는 약 60℃부터 약 80℃까지 범위의 온도에서, 약 6시간 내지 약 24시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 수행된다. 바람직하다면, 이 반응은 디클로로메탄, 톨루엔 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행될 수 있다. 택일적으로는, 이 반응은 희석제 부재 하에서 수행될 수 있다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 생성물 9는 통상적으로 분리된다. 택일적으로는, 화합물 9를 함유하는 반응 혼합물은 합성 다음 단계에서 바로 사용된다.

<89> 그런 다음, 아미노-보호기 P<sup>2</sup>는 통상적인 절차를 사용하여 화합물 9로부터 제거되어, 화합물 1을 제공한다. 예를 들면, P<sup>2</sup>가 벤질기일 때, 화합물 9는 팔라듐 촉매와 같은 촉매 존재 하에서, 수소 또는 암모늄 포르메이트를 사용하여 탈보호될 수 있다. 대표적인 촉매는 예를 들면, 탄소상 팔라듐, 탄소상 팔라듐 히드록시드 및 그 등과물을 포함한다. 이 반응은 약 20℃부터 약 50℃까지, 통상적으로는 약 40℃의 온도에서, 약 6시간 내지 약 24시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 통상적으로 수행된다. 일반적으로는, 이 반응은 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 화합물 1은 통상적으로 분리된다.

<91> 식 2의 화합물은 당해 분야에서 알려져 있거나 또는 공지된 절차를 사용하여 상업적으로 입수가 가능한 출발 물질과 시약으로부터 제조될 수 있다. 예를 들면, 식 2의 화합물은 하기 반응식 III에서 도시되는 바와 같이 제조될 수 있다:



<92>

<93>

반응식 III에서 도시되는 바와 같이,  $X^1$ 이 브로모 또는 요오드인 식 10의 아닐린 화합물은 아미노기에서 먼저 보호되어,  $P^{3a}$ 가 아미노-보호기이고,  $P^{3b}$ 가 수소 또는 아미노-보호기인 식 11의 화합물을 제공한다. 벤질, 4-메톡시벤질, 트리플루오로아세틸 및 그 등과물과 같은 임의의 적절한 아미노-보호기가 사용될 수 있다. 예를 들면, 식 10의 화합물은 벤질 클로라이드, 브로마이드 또는 요오디드와 같은 벤질 할라이드 약 2 몰 당량 이상, 바람직하게는 약 2.5 내지 약 3.0 몰 당량과 반응하여,  $P^{3a}$ 와  $P^{3b}$ 가 모두 벤질인 화합물 11을 얻을 수 있다. 이 반응은 통상적으로는 약 0°C 내지 약 50°C, 통상적으로는 약 30°C의 온도에서, 약 18시간 내지 약 24시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 통상적으로 수행된다. 일반적으로, 이 반응은 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 통상적으로는, 이 반응은 포타슘 카보네이트, 소듐 카보네이트 및 그 등과물과 같은 적절한 염기 존재 하에서 또한 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 화합물 11은 통상적으로 분리된다.

<94>

이 반응에서 사용될 수 있는 식 10의 대표적인 화합물은 2,5-디메틸-4-요오도아닐린, 2,5-디에틸-4-요오도아닐린, 2-에틸-4-요오도-5-메틸아닐린, 5-에틸-4-요오도-2-메틸아닐린, 4-브로모-2,5-디메틸아닐린, 4-브로모-2,5-디에틸아닐린, 4-브로모-2-에틸-5-메틸아닐린, 4-브로모-5-에틸-2-메틸아닐린 및 그 등과물을 포함한다. 이러한 화합물은 상업적으로 입수가가능하거나(예를 들면, Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH) 또는 통상적인 절차를 사용하여 상업적으로 입수가가능한 출발 물질과 시약으로부터 제조될 수 있다.

<95>

그런 다음, 화합물 11은 n-부틸리튬 또는 터트-부틸리튬과 같은 알킬 리튬 시약 약 1 내지 약 2 몰 당량과 접촉되어,  $X^1$ 기가 리튬으로 치환된 상응하는 음이온을 형성하게 된다. 이 반응은 약 -70°C에서부터 약 0°C까지, 통상적으로는 약 -20°C의 온도에서, 약 0.25 시간 내지 약 1시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 수행된다. 일반적으로, 이 반응은 톨루엔, 자일렌, 테트라히드로푸란 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다.

<96>

그 결과 생성된 리튬 음이온은 분리되지 않고, N,N-디메틸포름아미드 몰 초과량과 인 시투(in situ)로 반응하여, 화합물 12를 제공한다. 일반적으로는, N,N-디메틸포름아미드 약 2 내지 약 4 몰 당량이 사용된다. 이 반응은 약 -70°C부터 약 0°C까지, 통상적으로는 약 -20°C 내지 약 0°C의 온도에서, 약 0.5 시간 내지 약 2 시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 화합물 12가 통상적으로 분리된다.

<97>

그런 다음, 산 촉매 존재 하에서 화합물 12를 알코올 또는 디올과 반응시킴으로써 화합물 12의 알데히드기가 아세탈로 보호된다. 임의의 적절한 알코올 또는 디올이 이 반응에서 사용될 수 있다. 예를 들면, 대표적인 알코올과 디올은 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 및 그 등과물을 포함한다. 일반적으로는, 이 반응에서는 알코올 또는 디올 몰 초과량, 바람직하게는 약 2 내지 약 4 몰 당량이 사용된다.

<98>

임의의 적절한 산 촉매가 이 반응에서 사용되어, 아세탈의 형성을 촉진시킬 수 있다. 대표적인 산 촉매는 예를 들면, p-톨루엔술폰산, 벤젠술폰산, 염화수소산 및 그 등과물을 포함한다.

<99>

반응은 약 50°C부터 약 100°C까지, 통상적으로는 약 60°C 내지 약 80°C의 온도에서, 약 12시간 내지 약 24시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 통상적으로 수행된다. 일반적으로, 이 반응은 톨루엔, 자일렌 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 통상적으로는, 이 반응은 공비증류(azeotropic distillation) 또는 분자체(molecular sieve)와 같이, 생성된 물이 제거되도록 하는 방식으로 수행된다. 반응의 완료 후에, 추

출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 화합물 13은 통상적으로 분리된다. 택일적으로는, 화합물 13을 함유하는 반응 혼합물은 합성 다음 단계에서 바로 사용될 수 있다.

<100>

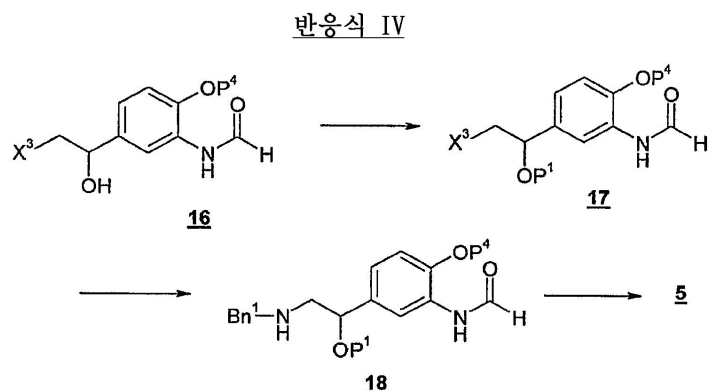
아세트알 형성 후에, 화합물 13의 아미노기는 표준적인 시약 및 조건을 사용하여 탈보호되어, 화합물 14를 형성한다. 예를 들면,  $P^{3a}$ 와  $P^{3b}$ 가 벤질기라면, 화합물 13은 수소와 팔라듐 촉매와 같은 촉매를 사용하여 탈보호될 수 있다. 대표적인 촉매는 예를 들면, 탄소상 팔라듐, 탄소상 팔라듐 히드록시드, 및 그 등과물을 포함한다. 이 반응은 약 20℃부터 약 50℃까지, 통상적으로는 약 25℃ 내지 약 30℃의 온도에서, 약 4시간 내지 약 12시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 통상적으로 수행된다. 일반적으로, 이 반응은 메탄올, 에탄올, 에탄올/에틸 아세테이트 혼합물 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 반응 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 화합물 14가 통상적으로 분리된다.

<101>

그런 다음, 화합물 14는  $X^2$ 가 클로로, 브로모 또는 요오도인 아크릴로일 할라이드 15와 반응하여 화합물 2를 형성한다. 이 반응은 약 -20℃부터 약 25℃까지, 통상적으로는 약 0℃ 내지 약 5℃의 온도에서, 약 0.5 시간 내지 약 6시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 통상적으로 수행된다. 일반적으로, 이 반응은 디클로로메탄 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서, 디이소프로필에틸아민, 트리에틸아민 및 그 등과물과 같은 적절한 염기 존재 하에서 수행된다. 일반적으로는, 이 반응에서는 아크릴로일 할라이드 약 1 내지 1.2 몰 당량과 염기 약 1 내지 약 2 몰 당량이 사용된다. 반응의 완료 후에, 추출, 재결정, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 화합물 2가 통상적으로 분리된다.

<102>

식 5의 화합물은 당해 분야에서 알려져 있거나 또는 알려진 절차를 사용하여 상업적으로 입수가 가능한 출발 물질과 시약으로부터 제조될 수 있다. 예를 들면, 식 5의 화합물은 하기 반응식 IV에서 도시되는 바와 같이 제조될 수 있다:



<103>

<104>

반응식 IV에서 나타나는 바와 같이, 식 5의 화합물은  $P^4$ 가 벤질과 같은 히드록시-보호기이고  $X^3$ 이 클로로, 브로모 또는 요오도와 같은 이탈기인 식 16의 화합물로부터 제조될 수 있다. 식 16의 화합물은 당해 분야에서 알려져 있다. 예를 들면, 2001년 7월 31일에 등록된 미국등록특허 제6,268,533 B1; 및 R. Hett et al., Organic Process Research & Development 1998, 2, 96-99은 그 합성이 K. Murase et al., Chem. Pharm. Bull., 25(6) 1368-1377 (1977)에서 기술된 2-브로모-4'-벤질옥시-3'-니트로아세트페논으로부터 출발하여 N-[2-벤질옥시-5-((R)-2-브로모-1-히드록시에틸)페닐]포름아미드(즉,  $P^4$ 가 벤질이고  $X^3$ 이 브로모인 화합물 16의 (R) 거울상 이성질체)의 제조를 기술하고 있다. 바람직하다면, 화합물 16의 라세미체 형태는 2-브로모-4'-벤질옥시-3'-니트로아세트페논을 환원시키기 위해, 보레인(borane) 디메틸설피드 복합체와 같은 비-키랄성(non-chiral) 환원제를 사용함으로써 제조될 수 있다.

<105>

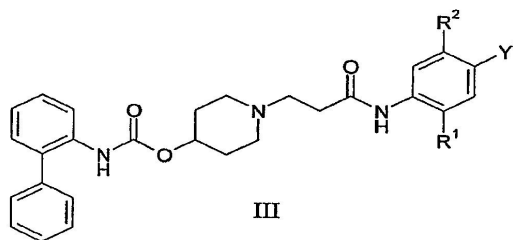
화합물 16의 히드록시기는 통상적인 절차 및 시약을 사용하여 보호되어,  $P^1$ 이 히드록시-보호기인 화합물 17을 제공하게 된다. 특정 구체예에서, 히드록시-보호기는 디메틸이소프로필실릴, 디에틸이소프로필실릴, 디메틸헥실실릴, 터트-부틸디메틸실릴, 터트-부틸디페닐실릴, 디페닐메틸실릴 및 그 등과물과 같은 실릴 보호기이다. 예를 들면, 화합물 16은 이미다졸 약 1.1 내지 약 1.3 몰 당량의 존재 하에서 터트-부틸디메틸실릴 클로라이드 약 0.95 내지 약 1.2 몰 당량과 반응하여,  $P^1$ 이 터트-부틸디메틸실릴인 화합물 17을 제공할 수 있다. 이 반응은 약 0℃부터 약 50℃까지, 통상적으로는 실온에서, 약 24시간 내지 약 48시간 동안, 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 수행된다. 일반적으로는, 이 반응은 N,N-디메틸포름아미드 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행

된다. 반응의 완료 후에, 추출, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여, 화합물 17이 통상적으로 분리된다. 추가적인 설명을 위하여, N-{2-벤질옥시-5-[(R)-2-브로모-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]페닐}포름아미드의 합성은 2004년 12월 9일에 공개된 미국특허공개 US 2004/0248985 A1의 실시예 2에서 기술되어 있다.

<106> 그런 다음, 화합물 17은 벤질 아민(즉,  $Bn^1NH_2$ )과 반응하여, 화합물 18을 제공하고, 이때 상기  $Bn^1$ 은 비치환된 벤질기 또는 벤질기의 페닐 고리에서  $C_{1-4}$  알킬 또는  $C_{1-4}$  알콕시로부터 독립적으로 선택되는 1개 내지 3개 치환기를 갖는 치환된 벤질기이다. 대표적인 벤질 아민은 벤질아민, 3,4-디메톡시벤질아민, 4-메톡시벤질아민, 4-메틸벤질아민 및 그 등과물을 포함한다. 이 반응은 약 40℃ 내지 약 100℃, 통상적으로는 약 80℃ 내지 약 90℃의 온도에서, 약 5시간 내지 약 24시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지, 화합물 17과 벤질 아민 약 2 내지 약 4 몰 당량을 접촉시킴으로써 수행된다. 일반적으로는, 이 반응은 N-메틸-2-피롤리돈(NMP) 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 크로마토그래피, 재결정 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여 화합물 18은 통상적으로 분리된다.

<107> 그런 다음, 통상적인 절차 및 시약을 사용한 벤질기,  $Bn^1$ , 및  $P^4$ 의 제거는 화합물 5를 제공한다. 일 구체예에서,  $Bn^1$ 과  $P^4$  모두는 동일한 반응 혼합물에서 제거되는 벤질기이다. 통상적으로, 이 반응은 팔라듐 촉매와 같은 촉매 존재 하에서 화합물 5와 수소를 접촉시킴으로써 수행된다. 대표적인 촉매는 탄소상 팔라듐 히드록사이드, 탄소상 팔라듐, 및 그 등과물을 포함한다. 일반적으로는, 이러한 탈벤질화 반응(debenzylation)은 아세트산, 포름산 및 그 등과물과 같은 산 존재 하에서 수행된다. 이 반응은 약 10℃ 내지 약 50℃, 통상적으로는 실온의 온도에서, 약 6 시간 내지 약 24 시간 동안 또는 반응이 실질적으로 완료될 때까지 통상적으로 수행된다. 일반적으로는, 이 반응은 메탄올, 에탄올 및 그 등과물과 같은 적절한 희석제에서 수행된다. 반응의 완료 후에, 추출, 크로마토그래피 및 그 등과물과 같은 통상적인 절차를 사용하여 화합물 5는 통상적으로 분리된다. 특정 구체예에서, 화합물 5는 아세트산 염으로서 분리된다.

<108> 당해 분야의 당업자는 식 I의 화합물은 그 밖의 다른 합성 절차에 의해 또한 제조될 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들면, 합성 단계가 수행되는 특정 순서가 바뀔 수 있거나, 또는 다른 치환체들이 사용될 수 있다. 예를 들면,  $Y^1$ 이 -CN, -C(O)OH 또는 -C(O)OR<sup>3c</sup>인 하기 식 III의 화합물은 통상적인 절차와 시약을 사용하여 환원되어, 알데히드 4(즉,  $Y^1$ 이 -CHO임)를 제공할 수 있다.



<109> <110> 추가적으로는, 상기 화합물은 알코올, 즉  $Y^1$ 이 -CH<sub>2</sub>OH인 알코올로 환원될 수 있고, 상기 알코올은 그런 다음 표준적인 절차와 시약을 사용하여 산화되어, 알데히드 4(즉,  $Y^1$ 이 -CHO임)를 제공할 수 있다.

<111> 바람직하다면, 식 I의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염은 식 I의 화합물의 유리 염기 형태와 약제학적으로 허용가능한 산을 접촉시킴으로써 제조될 수 있다.

<112> 본 발명의 대표적인 화합물 또는 그의 중간체를 제조하기 위한 특정 반응 조건 및 그 밖의 다른 절차에 관한 추가적인 상세 내용은 하기에서 설명되는 실시예에서 기술되어 있다.

<113> 약제학적 조성물, 배합 및 제제

<114> 본 발명의 화합물은 통상적으로는 약제학적 조성물 또는 제제의 형태로 환자에게 투여된다. 이러한 약제학적 조성물은 흡입, 경구, 코(nasal), 국소(경피를 포함), 및 비경구 투여 방식을 포함하는 임의의 허용가능한 투여 경로에 의해 환자에게 투여될 수 있지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 특정한 투여 방식에 적절한 본 발명의 화합물의 임의의 형태(즉, 유리 염기, 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물 등)는 본 명세서에서 논의되는 약

제학적 조성물에서 사용될 수 있음은 이해될 것이다.

- <115> 따라서, 본 발명 조성물의 하나의 실시 형태에서, 본 발명은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 식 I의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 선택적으로는, 바람직하다면, 상기 약제학적 조성물은 그 밖의 다른 치료제 및/또는 제제화제(formulating agent)를 함유할 수 있다.
- <116> 본 발명의 약제학적 조성물은 통상적으로는 식 I의 화합물의 치료적 유효량을 함유한다. 그러나, 당해 분야의 당업자는 약제학적 조성물은 치료적 유효량보다 더 많이 포함할 수 있거나 즉 벌크 조성물이거나 또는 치료적 유효량보다 더 적게 포함할 수 있거나 즉 치료적 유효량에 도달하기 위해 복수 회의 투여를 위해 계획된 개개의 단위 투여량을 포함할 수 있음을 인식할 것이다.
- <117> 통상적으로, 약학적 조성물은 치료제 약 0.01 중량 퍼센트 내지 약 10 중량 퍼센트와 같은, 약 0.01 중량 퍼센트 내지 약 30 중량 퍼센트를 포함하는, 약 0.01 중량 퍼센트 내지 약 95 중량 퍼센트를 포함할 것이다.
- <118> 임의의 통상적인 담체 또는 부형제가 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용될 수 있다. 특정한 담체 또는 부형제, 또는 담체 또는 부형제의 배합의 선택은 특정한 환자를 치료하기 위해 사용되는 투여 방식 또는 의학적 상태의 유형 또는 질병 상태에 따라 달라질 것이다. 이와 관련하여, 특정한 투여 방식을 위한 적절한 약제학적 조성물의 제조는 약제학 분야에서 당업자들의 이해 범위 내에 있다.
- <119> 본 발명의 약제학적 조성물에서 사용되는 담체 또는 부형제는 상업적으로 입수가능하다. 예를 들면, 이러한 물질은 시그마(Sigma, (St. Louis, MO))로부터 구입할 수 있다. 추가적인 설명을 위하여, 통상적인 제제 기법들은 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 제20판, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); 및 H.C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 제7판, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999)에서의 개시 내용에서 예시된 바와 같이 당해 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다.
- <120> 약제학적 허용가능한 담체로 도움이 될 수 있는 물질의 대표적인 예는 다음을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다: (1) 락토오스, 글루코스 및 수크로스와 같은 당류; (2) 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; (3) 셀룰로오스, 및 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트와 같은 셀룰로오스 유도체; (4) 분말로 된 트래거컨스; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 탈크; (8) 코코아 버터 및 좌제용 왁스와 같은 부형제; (9) 땅콩 오일, 면실유, 홍화씨유, 참기름, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 콩 기름과 같은 오일; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; (11) 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; (12) 에틸 올리에이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스테르; (13) 아가; (14) 마그네슘 히드록시드와 알루미늄 히드록시드와 같은 완충제(buffering agent); (15) 알긴산; (16) 발열 물질이 없는(pyrogen-free) 물; (17) 등장성 염수(isotonic saline); (18) 링거 용액; (19) 에틸 알코올; (20) 포스페이트 완충 용액; (21) 클로로플루오로카본 및 히드로플루오로카본과 같은 압착된 추진체 가스; 및 (22) 약제학적 조성물에서 사용되는 그 밖의 다른 무-독성 양립가능한 물질.
- <121> 본 발명의 약제학적 조성물은 통상적으로는, 약제학적으로 허용가능한 담체와 임의의 선택적인 성분과 함께 본 발명의 화합물을 완전히 및 직접적으로 혼합하거나 블렌딩(blending)함으로써 제조된다. 필요하다면 또는 바람직하다면, 그 결과 생성된 균일하게 혼합된 혼합물은 통상적인 절차와 장치를 사용하여, 성형되거나 또는 정제, 캡슐, 알약, 깡통(canister), 카트리지, 분배기(dispenser) 및 그 등가물 안에 충전될 수 있다.
- <122> 일 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 흡입 투여를 위해 적절하다. 흡입 투여를 위한 적절한 약제학적 조성물은 통상적으로는 에어로졸 또는 분말의 제형으로 될 것이다. 이러한 조성물은 일반적으로는, 네블라이저 흡입기, 정량 흡입기(metered-dose inhaler, MDI), 건조 분말 흡입기(dry powder inhaler, DPI) 또는 유사한 전달 장치와 같은, 잘-알려진 전달 장치를 사용하여 투여된다.
- <123> 본 발명의 특정 구체예에서, 치료제를 포함하는 약제학적 조성물은 네블라이저 흡입기를 사용하여 흡입에 의해 투여된다. 이러한 네블라이저 장치는 치료제를 포함하는 약제학적 조성물이 환자의 기도로 전달되는 분무제로 분무되도록 하는 고 속력의 공기의 흐름을 생성한다. 따라서, 치료제가 네블라이저 흡입기에서의 사용을 위해 제제화될 때에는, 상기 치료제는 통상적으로는 적절한 담체에 용해되어 용액을 형성한다. 택일적으로는, 치료제는 미분화되고 적절한 담체와 배합되어 미분화된 입자의 현탁액을 형성할 수 있다. 흡입에 의해 치료제를 투여하는데 적절한 네블라이저 장치는 당해 분야의 당업자에게 잘 알려져 있거나, 또는 이러한 장치는 상업적으로 입수가능하다. 예를 들면, 대표적인 네블라이저 장치 또는 제품은 Respimat Softmist Inhaler (Boehringer Ingelheim); AERx Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.); PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari

GmbH); 및 그 등가물을 포함한다.

- <124> 네블라이저 흡입기에서의 사용을 위한 대표적인 약제학적 조성물은 식 I의 화합물 약 0.05  $\mu\text{g/mL}$  내지 약 10 mg/mL을 포함하는 등장성 수 용액을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 용액은 약 4 내지 약 6의 pH를 갖는다.
- <125> 본 발명의 또 다른 특정 구체예에서, 치료제를 포함하는 약제학적 조성물은 건조 분말 흡입기를 사용한 흡입에 의해 투여된다. 이러한 건조 분말 흡입기는 숨을 들이마시는 동안 환자의 공기-흐름 속에서 분산되는 자유-유동성(free-flowing) 분말로서 치료제를 투여한다. 자유-유동성 분말을 얻기 위해서는, 치료제는 통상적으로는, 락토오스, 전분, 만니톨, 텍스트로스, 폴리락트산(polylactic acid, PLA), 폴리락티드-코-글리콜리드(poly lactide-co-glycolide, PLGA) 또는 이들의 배합과 같은 적절한 부형제와 함께 제제화된다. 통상적으로는, 치료제는 미분화되고 적절한 담체와 배합되어, 흡입을 위해 적절한 혼합물을 형성한다. 따라서, 본 발명의 일 구체예에서, 식 I의 화합물은 미분화된 형태로 된다.
- <126> 건조 분말 흡입기에서 사용하기 위한 대표적인 약제학적 조성물은 건조 상태의 밀링된 락토오스 및 식 I의 화합물의 미분화된 입자를 포함한다.
- <127> 상기 건조 분말 제제는 예를 들면, 치료제와 함께 락토오스를 배합하고 그런 다음 구성 성분들을 건식 혼합(dry blending)시킴으로써 제조될 수 있다. 택일적으로는, 바람직하다면, 치료제는 부형제없이 제제화될 수 있다. 그런 다음, 약제학적 조성물은 통상적으로는, 건조 분말 분배기 안에 충전되거나, 또는 건조 분말 전달 장치에서 사용하기 위해 흡입 카트리지 또는 캡슐 안에 충전된다.
- <128> 흡입에 의해 치료제를 투여하는데 적절한 건조 분말 흡입 전달 장치는 당해 분야의 당업자에게 잘 알려져 있거나 또는 이러한 장치는 상업적으로 입수가능하다. 예를 들면, 대표적인 건조 분말 흡입 전달 장치 또는 제품은 Aeolizer (Novartis); Airmax (IVAX); ClickHaler (Ennovata Biomed); Diskhaler (GlaxoSmithKline); Diskus/Accuhaler (GlaxoSmithKline); Easyhaler (Orion Pharma); Eclipse (Aventis); FlowCaps (Hovione); Handihaler (Boehringer Ingelheim); Pulvinal (Chiesi); Rotahaler (GlaxoSmithKline); Skyehaler/Certihaler (SkyePharma); Twisthaler (Schering-Plough); Turbuhaler (AstraZeneca); Ultrahaler (Aventis); 및 그 등가물을 포함한다.
- <129> 본 발명의 또 다른 특정 구체예에서, 치료제를 포함하는 약제학적 조성물은 정량 흡입기를 사용하여 흡입에 의해 투여된다. 이러한 정량 흡입기는 통상적으로는 압착된 추진체 가스를 사용하여 계량된 함량의 치료제를 방출한다. 따라서, 정량 흡입기를 사용하여 투여되는 약제학적 조성물은 통상적으로는, 액화된 추진체 내에 들어진 치료제 용액 또는 현탁액을 포함한다.  $\text{CCl}_3\text{F}$ 와 같은 클로로플루오로카본, 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄(HFA 134a) 및 1,1,1,2,3,3,3-헵타플루오로-n-프로판(HFA 227)과 같은 히드로플루오로알칸(HFA)을 포함하는 임의의 적절한 액화된 추진체가 사용될 수 있다. 오존 층에 영향을 주는 클로로플루오로카본에 대한 우려로 인하여, HFA를 함유하는 제제가 일반적으로 바람직하다. HFA 제제의 추가적인 선택적 성분은 에탄올 또는 펜탄과 같은 공-용매(co-solvent), 및 소르비탄 트리올리에이트, 올레산, 레시틴 및 글리세린과 같은 계면 활성제를 포함한다.
- <130> 정량 흡입기에서의 사용을 위한 대표적인 약제학적 조성물은 식 I의 화합물 약 0.01 중량% 내지 약 5 중량%; 에탄올 약 0 중량% 내지 약 20 중량%; 및 계면 활성제 약 0 중량% 내지 약 5 중량%, 및 그 나머지로 HFA 추진체를 포함한다.
- <131> 상기 조성물은 통상적으로는, 치료제, 에탄올(존재하는 경우) 및 계면 활성제(존재하는 경우)를 포함하는 적절한 용기에 냉각된 또는 가압된 히드로플루오로알칸을 첨가함으로써 제조된다. 현탁액을 제조하기 위해서는, 치료제는 미분화되고 그런 다음 추진체와 배합된다. 그런 다음, 얻은 제제는 정량 흡입기 장치의 일 부분을 구성하는 에어로졸 깡통에 충전된다.
- <132> 흡입에 의해 치료제를 투여하는데 적절한 정량 흡입기 장치는 당해 분야의 당업자에게 잘 알려져 있거나 또는 상기 장치는 상업적으로 입수가능하다. 예를 들면, 대표적인 정량 흡입기 장치 또는 제품은 AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals); Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer Ingelheim); Flovent (GlaxoSmithKline); Maxair Inhaler (3M); Proventil Inhaler (Schering); Serevent Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline); 및 그 등가물을 포함한다.
- <133> 또 다른 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 투여를 위해 적절하다. 경구 투여를 위한 적절한 약제학적 조성물은 아마도 캡슐, 정제, 알약, 로젠지(lozenge), 교갑(cachet), 당의정(dragee), 분말, 과립의 제형;

또는 수성 또는 비-수성 액체에서의 용액 또는 현탁액; 또는 수중유(oil-in-water) 또는 유중수(water-in-oil) 액체 에멀전; 또는 엘릭시르 또는 시럽; 및 그 등가물의 제형이 될 수 있고, 이들 각각은 활성 성분으로서 본 발명의 화합물의 예정된 함량을 함유한다.

<134> 고체형 투여 제형(즉, 캡슐, 정제, 알약 및 그 등가물)으로 경구 투여를 목적으로 할 때, 본 발명의 약제학적 조성물은 통상적으로는, 활성 성분으로서 본 발명의 화합물과 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트와 같은 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 것이다. 선택적으로는 또는 택일적으로는, 상기 고체형 투여 제형은 또한 다음을 포함할 수 있다: (1) 전분, 락토오스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및/또는 규산과 같은 충전제 또는 증량제(extender); (2) 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아와 같은 결합제(binder); (3) 글리세롤과 같은 보습제(humectant); (4) 아가-아가, 칼슘 카보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 임의의 실리케이트, 및/또는 소듐 카보네이트와 같은 붕해제; (5) 파라핀과 같은 용해 지연제(solution retarding agent); (6) 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수 촉진제(absorption accelerator); (7) 세틸 알코올 및/또는 글리세롤 모노스테아레이트와 같은 습윤제(wetting agent); (8) 카울린 및/또는 벤토나이트 클레이와 같은 흡수제(adsorbent); (9) 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체형 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트, 및/또는 이들의 혼합물과 같은 윤활제; (10) 착색제; 및 (11) 완충제.

<135> 방출제(release agent), 습윤제(wetting agent), 코팅제, 감미제, 향미제 및 향료(perfuming agent), 방부제 및 항산화제가 또한 본 발명의 약제학적 조성물에 존재할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 항산화제의 예는 다음을 포함한다: (1) 아스코르브산, 시스테인 히드록로라이드, 소듐 비술페이트(bisulfate), 소듐 메타비술페이트(metabisulfate), 소듐 술페이트(sulfite) 및 그 등가물과 같은, 수-가용성 항산화제; (2) 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화된 히드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸화된 히드록시톨루엔(BHT), 레시친, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤, 및 그 등가물과 같은 오일-가용성 항산화제; 및 (3) 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산, 및 그 등가물과 같은 금속-킬레이트제. 정제, 캡슐, 알약 및 그 등가물을 위한 코팅제는 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트(CAP), 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(PVAP), 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 프탈레이트, 메타크릴산 메타크릴산 에스테르 공중합체, 셀룰로오스 아세테이트 트리멜리테이트(cellulose acetate trimellitate, CAT), 카르복시메틸 에틸 셀룰로오스(CMEC), 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트(HPMCAS), 및 그 등가물과 같은 장용 코팅(enteric coating)을 위해 사용되는 코팅제를 포함한다.

<136> 바람직하다면, 본 발명의 약제학적 조성물은 예를 들면 다양한 비율로 된 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스; 또는 그 밖의 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구(microsphere)를 사용하여 활성 성분의 서 방출 또는 제어 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.

<137> 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 선택적으로는 불투명화제(opacifying agent)를 포함할 수 있고, 위장관 중 일정한 부분에서만, 또는 일정한 부분에 우위적으로, 선택적으로는 지연된 방식으로 활성 성분을 방출하도록 제제화될 수 있다. 사용될 수 있는 임베딩(embedding) 조성물의 예는 중합체성(polymeric) 물질과 왁스를 포함한다. 활성 성분은 또한 적절하다면, 상기-기술된 하나 이상의 부형제와 함께 마이크로-캡슐화된 제형으로 될 수 있다.

<138> 경구 투여를 위한 적절한 액체 투여 제형은 예를 들면, 약제학적으로 허용가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 이러한 액체 투여 제형은 통상적으로, 활성 성분과, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수 오일, 발아유, 올리브 오일, 캐스터 오일 및 참기름), 글리세롤, 테트라히드로퓨릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르와 같은 물 또는 그 밖의 다른 용매, 가용화제와 유화제, 및 이들의 혼합물과 같은 비활성 희석제를 포함한다. 활성 성분 뿐만 아니라, 현탁액은 예를 들면, 에톡시화된 이소스테aryl 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨과 소르비탄 에스테르, 미세결정형 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토니트, 아가-아가, 및 트래거컨스와 같은 현탁제, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

<139> 경구 투여를 목적으로 할 때, 본 발명의 약제학적 조성물은 단위 투여 제형(unit dosage form)으로 포장될 수 있다. 용어 "단위 투여 제형"은 환자에게 투여하는데 적절한 물리적으로 분리된 단위를 의미하고, 즉, 각각의 단위는 단독으로 또는 하나 이상의 추가적인 단위와 배합되어 목표로 하는 치료 효과를 나타내기 위해 계산된 활성 제제의 예정된 함량을 함유한다. 예를 들면, 이러한 단위 투여 제형은 캡슐, 정제, 알약, 및 그 등가물

이 될 수 있다.

- <140> 또한, 본 발명의 화합물은 공지된 경피 전달 시스템과 부형제를 사용하여 경피로 투여될 수 있다. 예를 들면, 본원 발명의 화합물은 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 아자시클로알칸-2-온 및 그 등과물과 같은 투과 증진제(permeation enhancer)와 배합될 수 있고, 패치 또는 유사한 전달 시스템으로 결합될 수 있다. 바람직하다면, 겔화제, 유화제 및 완충제를 포함하는 추가적인 부형제가 이러한 경피 조성물에서 사용될 수 있다.
- <141> 또한, 본원 발명의 화합물은 비경구로, 즉 정맥 내로, 피하로 또는 근육 내로 투여될 수 있다. 비경구 투여를 위해, 통상적으로 식 I의 화합물은 멸균수, 식염수, 식물성 오일 및 그 등과물과 같은 비경구 투여를 위해 허용 가능한 담체 중에 용해된다. 예를 들면, 정맥내 조성물은 통상적으로 식 I의 화합물의 멸균 수용액을 포함하고, 상기 용액은 약 4 내지 약 7의 pH 범위를 갖는다.
- <142> 바람직하다면, 본 발명의 화합물은 하나 이상의 그 밖의 다른 치료제와 배합하여 투여될 수 있다. 이러한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 그 밖의 다른 치료제와 물리적으로 혼합되어 두 개의 치료제를 포함하는 조성물을 형성하거나; 또는 각각의 치료제는 환자에게 동시에 또는 연속적으로 투여되는, 분리되고 개별적인(separate) 조성물 중에 존재한다.
- <143> 예를 들면, 식 I의 화합물은 통상적인 방법과 장치를 사용하여 제2 치료제와 배합되어, 식 I의 화합물과 제2 치료제를 포함하는 조성물을 형성할 수 있다. 추가로, 치료제는 약제학적으로 허용가능한 담체와 배합되어, 식 I의 화합물, 제2 치료제, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 형성할 수 있다. 이러한 구체예에서, 조성물의 성분들은 통상적으로 혼합되거나 또는 블렌딩(blending)되어, 물리적인 혼합물을 만든다. 그런 다음, 물리적인 혼합물은 본 명세서에서 기술된 경로 중 임의의 하나를 사용하여 치료적 유효량으로 투여된다.
- <144> 택일적으로는, 치료제는 환자에게 투여되기 전에 분리되고 별개로 존재할 수 있다. 이러한 구체예에서, 치료제는 투여되기 전에 물리적으로 함께 혼합되지는 않지만, 개별적인 조성물로서 동시에 또는 연속적으로 투여된다. 예를 들면, 식 I의 화합물은 각각의 치료제를 위해 개별적인 구획(compartment)(예를 들면, 블리스터 팩(blister pack))을 사용하는 흡입 전달 장치를 사용하여, 또 다른 치료제와 함께 동시에 또는 연속적으로 흡입에 의해 투여될 수 있다. 택일적으로는, 배합은 개별적인 전달 장치, 즉, 각각의 치료제에 대해 하나의 전달 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 추가로, 치료제는 서로 다른 투여 경로, 즉 치료제 하나는 흡입에 의해 또 다른 치료제는 경구 투여에 의해 전달될 수 있다.
- <145> 본 발명의 화합물과 양립가능한 임의의 치료제는 본 발명의 화합물과 배합하여 사용될 수 있다. 특정 구체예에서, 제2 치료제는 흡입에 의해 효과적으로 투여되는 것이다. 예를 들면, 본 발명의 화합물과 함께 사용될 수 있는 대표적인 치료제 형태는 스테로이드계 항-염증제(코르티코스테로이드와 글루코코르티코이드를 포함), 비스테로이드계 항-염증제(NSAID), 및 PDE<sub>4</sub> 억제제와 같은 항염증제; PDE<sub>3</sub> 억제제, 아데노신 2b 조절제, 및  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트와 같은 기관지 확장제; 그람-양성 항생물질, 그람-음성 항생물질, 및 항바이러스제와 같은 항감염제(anti-infective agent); 항히스타민제; 프로테아제 억제제; D<sub>2</sub> 아고니스트(D<sub>2</sub> agonist) 및 뉴로키닌 조절제(neurokinin modulator)와 같은 구심성 신경 차단제(afferent blocker); 및 무스카린 수용체 안타고니스트(항콜린성 제제, anticholinergic agent)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 치료제의 수 개의 예는 당업자들에게 잘 알려져 있다. 본 발명의 화합물과 배합되어 투여되는 그 밖의 다른 치료제의 적절한 투여량은 통상적으로 약 0.05  $\mu$ g/일 내지 약 500 mg/일 범위 내에 있다.
- <146> 본 발명의 특정 구체예에서, 식 I의 화합물은 스테로이드계 항-염증제와 배합하여 투여된다. 본 발명의 화합물과 배합하여 사용될 수 있는 스테로이드계 항염증제의 대표적인 예는 베클로메타손 디프로피오네이트(beclomethasone dipropionate); 부데소니드(budesonide); 부티소코르트(butixocort) 프로피오네이트; 20R-16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -[부틸리덴비스(옥시)]-6 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -디플루오로-11 $\beta$ -히드록시-17 $\beta$ -(메틸티오)안드로스타-4-엔-3-온(RPR-106541); 시클레소니드(ciclesonide); 덱사메타손(dexamethasone); 6 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -디플루오로-17 $\alpha$ -[(2-푸라닐카르보닐)옥시]-11 $\beta$ -히드록시-16 $\alpha$ -메틸-3-옥소안드로스타-1,4-디엔-17 $\beta$ -카르보티오산(carbothioic acid) S-플루오로메틸 에스테르; 6 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -디플루오로-11 $\beta$ -히드록시-16 $\alpha$ -메틸-17 $\alpha$ -[(4-메틸-1,3-티아졸-5-카르보닐)옥시]-3-옥소안드로스타-1,4-디엔-17 $\beta$ -카르보티오산 S-플루오로메틸 에스테르; 6 $\alpha$ , 9 $\alpha$ -디플루오로-11 $\beta$ -히드록시-16 $\alpha$ -메틸-3-옥소-17 $\alpha$ -프로피오닐옥시안드로스타-1,4-디엔-17 $\beta$ -카르보티오산 (S)-(2-옥소테트라히드로푸란-3S-일)-에스테르; 플루니솔리드(flunisolide); 플루티카손(fluticasone) 프로피오네이트; 메틸 프레드니솔론

(prednisolone); 모메타손 푸로에이트 (mometasone furoate); 프레드니솔론(prednisolone); 프레드니손(prednisone); 로플레포니드(rofleponide); ST-126; 트리암시놀론 아세토니드(triamcinolone acetonide); 및 그 등가물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 스테로이드계 항염증제는 상업적으로 입수가 가능하거나 또는 통상적인 방법과 시약을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 스테로이드계 항염증제의 제조 방법 및 용도는 2004년 6월 15일에 등록된 미국등록특허 제6,750,210 B2호; 2004년 7월 6일에 등록된 미국등록특허 제6,759,398 B2호; 2003년 3월 25일에 등록된 미국등록특허 제6,537,983호; 2002년 2월 14일에 공개된 미국특허출원 제US 2002/0019378 A1호; 및 본 명세서에서 인용된 참조 문헌에서 기술되어 있다.

<147> 스테로이드계 항염증제가 사용될 때, 스테로이드계 항염증제는 통상적으로는 본 발명의 화합물과 동시에 투여될 경우 치료적 유효 효과를 생성하는 함량으로 투여된다. 통상적으로, 스테로이드계 항염증제는 투여 당 약 0.05  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 을 제공하는데 충분한 함량으로 투여될 것이다.

<148> 하기 실시예는 본 발명의 대표적인 약제학적 조성물을 설명한다.

#### <149> 실시예 A

#### <150> 건조 분말 조성물

<151> 본 발명의 미분화된 화합물(100 mg)을 밀링된 락토오스(25 g)(예를 들면, 입자들 중 약 85% 이하는 약 60 $\mu\text{m}$  내지 약 90 $\mu\text{m}$ 의 MMD를 가지고, 입자들 중 약 15% 이상은 15 $\mu\text{m}$  미만의 MMD를 가지는 락토오스)와 블렌딩한다. 그런 다음, 얻은 블렌딩된 혼합물을 투여 당 본 발명의 화합물 약 10  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 을 제공하는데 충분한 함량으로 박리성(peelable) 블리스터 팩(blister pack)의 개개 블리스터에 충전한다. 블리스터의 내용물을 건조 분말 흡입기를 사용하여 투여한다.

#### <152> 실시예 B

#### <153> 건조 분말 조성물

<154> 본 발명의 미분화된 화합물(1 g)을 밀링된 락토오스(200 g)와 블렌딩하여, 화합물 대 밀링된 락토오스의 중량비를 1:200으로 갖는 벌크 조성물(bulk composition)을 형성한다. 블렌딩된 조성물을 투여 당 본 발명의 화합물 약 10  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 을 전달할 수 있는 건조 분말 흡입 장치에 채운다.

#### <155> 실시예 C

#### <156> 건조 분말 조성물

<157> 본 발명의 미분화된 화합물(100 mg)과 미분화된 스테로이드계 항염증제(500 mg)를 밀링된 락토오스(30 g)와 블렌딩한다. 그런 다음, 얻은 블렌딩된 혼합물을 투여 당 본 발명의 화합물 약 10  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 을 제공하는데 충분한 함량으로 박리성 블리스터 팩의 개개의 블리스터에 충전한다. 블리스터의 내용물을 건조 분말 흡입기를 사용하여 투여한다.

#### <158> 실시예 D

#### <159> 정량-흡입계 조성물

<160> 본 발명의 미분화된 화합물(10 g)을 탈염된 물(200 mL) 중에 레시친(0.2 g)을 용해시킴으로써 제조된 용액 중에 분산시킨다. 그 결과 얻은 현탁액을 분무 건조하고, 그런 다음 미분화하여, 약 1.5  $\mu\text{m}$  미만의 평균 직경을 갖는 입자를 포함하는 미분화된 조성물을 형성한다. 그런 다음, 미분화된 조성물을 정량 흡입계에 의해 투여될 때 투여 당 본 발명의 화합물 약 10  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 을 제공하는데 충분한 함량으로 가압된 1,1,1,2-테트라플루오로에탄을 함유하는 정량-흡입계 카트리지에 충전한다.

#### <161> 실시예 E

#### <162> 네블라이저 조성물

<163> 본 발명의 화합물(25 mg)을 시트레이트로 완충된(pH 5) 등장성 식염수(125 mL)에 용해시킨다. 얻은 혼합물을 본 발명의 화합물이 용해될 때까지 교반하고 소니케이션 시킨다. 얻은 용액의 pH를 체크하고, 필요하다면 1N 소듐 히드록시드 수용액을 천천히 첨가함으로써 pH 5로 맞춘다. 얻은 용액을 투여 당 본 발명의 화합물 약 10  $\mu\text{g}$  내지 약 500  $\mu\text{g}$ 을 제공하는 네블라이저 장치를 사용하여 투여한다.

**실시예 F**

**경질 젤라틴 캡슐**

본 발명의 화합물(50 g), 분무-건조된 락토오스(440 g) 및 마그네슘 스테아레이트(10 g)를 완전히 블렌딩한다. 그 결과 얻은 조성물을 경구로 투여되는 경질 젤라틴 캡슐(캡슐 당 조성물 500 mg)에 충전한다.

**실시예 G**

**경구 현탁액**

하기의 성분들을 완전히 혼합하여, 경구 투여용 현탁액을 생성한다.

| 성분                        | 함량          |
|---------------------------|-------------|
| 본 발명의 화합물                 | 1.0 g       |
| 푸마르산                      | 0.5 g       |
| 소듐 클로라이드                  | 2.0 g       |
| 메틸 파라벤                    | 0.15 g      |
| 프로필 파라벤                   | 0.05 g      |
| 과립화된 당(granulated sugar)  | 25.5 g      |
| 소르비톨(70% 용액)              | 12.85 g     |
| VEEGUM®K(마그네슘 알루미늄 실리케이트) | 1.0 g       |
| 향미제                       | 0.035 ml    |
| 착색제                       | 0.5 mg      |
| 증류수                       | 100 ml까지 채움 |

그 결과 얻은 현탁액은 현탁액 10 ml 당 활성 성분 100 mg을 함유한다. 현탁액을 경구로 투여한다.

**실시예 H**

**주사가능한 조성물**

본 발명의 화합물(0.2 g)을 0.4 M 소듐 아세테이트 버퍼 용액(2.0 mL)과 블렌딩한다. 그 결과 얻은 용액의 pH를 필요하다면, 0.5 N 염화수소산 수용액 또는 0.5 N 소듐 히드록시드 수용액을 사용하여 pH를 4로 맞추고, 그런 다음 주사용 물을 첨가하여, 전체 20 ml의 용량을 제공한다. 그런 다음, 얻은 혼합물을 멸균 필터(0.22 미크론(micron))를 통해 여과하여, 주사에 의한 투여에 적절한 멸균 용액을 제공한다.

**유용성**

본 발명의 화합물은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성과 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 모두 갖고 있으므로, 본 발명의 화합물은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 또는 무스카린 수용체에 의해 매개되는 의학적 상태 즉,  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 또는 무스카린 수용체 안타고니스트를 이용한 치료에 의해 개선되는 의학적 상태를 치료하기 위한 치료제로서 유용할 것으로 기대된다. 이러한 의학적 상태는 Eglen et al., Muscarinic Receptor Subtypes: Pharmacology and Therapeutic Potential, DN&P 10(8), 462-469 (1997); Emilien et al., Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists, European J. Clinical Pharm., 53(6), 389-404 (1998); 및 본 명세서에서 인용된 참조 문헌의 개시 내용에 의해 예시된 바와 같이, 당해 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 이러한 의학적 상태는 예를 들면, 만성 폐쇄성 폐질환(예를 들면, 만성 기관지염 및 천명성 기관지염(wheezy bronchitis) 및 폐기종), 천식, 폐섬유증 및 그 등과물과 같은 가역성 기도 폐쇄(reversible airway obstruction)와 관련되는 폐 질환 또는 질병을 포함한다. 그 밖의 다른 상태는 조숙 분만 진통(premature labor), 우울증, 울혈성 심장 기능 상실증(congestive heart failure), 피부 질환(예를 들면, 염증성, 알레르기성, 건선성(psoriatic) 및 증식성(proliferative) 피부 질환), 소화 산도를 저하시키는 것이 바람직한 상태(예를 들면, 소화 궤양(peptic peptic) 및 위 궤양(gastric ulceration)) 및 근육 소모성 질환(muscle wasting disease)을 포함한다.

따라서, 일 구체예에서, 본 발명은 폐 질환을 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 치료를 필요로 하는 환자에게 식 I의 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 화합물이 폐 질환을 치료하기 위해 사용될 때, 본 발명의 화합물은 통상적으로는, 하루 당 복수회의 투여로, 하루 당 일회의 투여 또

는 1주 당 일회 투여로, 흡입에 의해 투여될 것이다. 일반적으로, 폐 질환을 치료하기 위한 투여량은 약 10  $\mu\text{g}$ /일 내지 약 500  $\mu\text{g}$ /일의 범위에 있을 것이다.

<178> 본 발명 방법의 실시 형태 중 하나에서, 본 발명은 만성 폐쇄성 폐 질환 또는 천식을 치료하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 환자에게 식 I의 화합물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 일반적으로, COPD 또는 천식을 치료하기 위한 투여량은 약 10  $\mu\text{g}$ /일 내지 약 500  $\mu\text{g}$ /일의 범위에 있을 것이다. 용어 "COPD"는 Barnes, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, N. Engl. J. Med., 2000: 343:269-78, 및 본 명세서에서 인용된 참조 문헌에 의해 예시된 바와 같이, 만성 폐쇄성 기관지염 및 폐기종을 포함하는 다양한 호흡기 상태를 포함한다.

<179> 본 발명의 화합물이 흡입에 의해 투여될 때, 본 발명의 화합물은 통상적으로 기관지 확장을 일으키는 효과를 갖고 있다. 따라서, 본 발명의 방법 실시 형태 중 또 다른 하나에서, 본 발명은 포유 동물에서 기관지 확장을 일으키는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 포유 동물에게 식 I의 화합물의 기관지 확장을 일으키는 함량을 투여하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 기관지 확장을 일으키기 위한 투여량은 약 10  $\mu\text{g}$ /일 내지 약 500  $\mu\text{g}$ /일 범위에 있을 것이다.

<180> 본 발명의 화합물이 치료제로 사용될 때, 본 발명의 화합물은 선택적으로는 또 다른 치료제 또는 치료제들과 함께 배합되어 투여된다. 특히, 본 발명의 화합물을 스테로이드계 항-염증제와 함께 투여함으로써, 단지 두 개의 치료제만을 사용하여, 3중 치료(triple therapy), 즉  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 활성화, 무스카린 수용체 안타고니스트 활성화 및 항-염증 활성을 얻을 수 있다. 두 개의 치료제를 함유하는 약제학적 조성물(및 배합물)은 세 개의 치료제를 함유하는 조성물과 비교할 때 통상적으로는 제형화하고 및/또는 투여하기에 더 쉽기 때문에, 이러한 두 개 성분으로 된 조성물은 세 개의 치료제를 함유하는 조성물에 비해 유의성 있는 좋은 점을 제공한다. 따라서, 특정 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물, 배합물 및 방법은 스테로이드계 항-염증제를 더 포함한다.

<181> 본 발명의 화합물은  $\beta_2$  아드레날린성 아고니스트 활성화와 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 모두 갖고 있으므로, 또한 본 발명의 화합물은  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 또는 무스카린 수용체를 갖는 생물학적 시스템 또는 시료를 조사하거나 또는 연구하기 위한 연구 도구로서 유용하다. 추가적으로, 본 발명의 화합물은 예를 들면,  $\beta_2$  아드레날린성 아고니스트 활성화와 무스카린 수용체 안타고니스트 활성을 모두 갖는 신규 화합물을 개발하기 위한 스크리닝 분석(screening assay)에서 유용하다. 이러한 생물학적 시스템 또는 시료는  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 및/또는 무스카린 수용체를 포함할 수 있다.  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 및/또는 무스카린 수용체를 갖는 임의의 적절한 생물학적 시스템 또는 시료는 인 비트로 또는 인 비보에서 수행될 수 있는 연구에서 사용될 수 있다. 이러한 연구를 위해 적절한 대표적인 생물학적 시스템 또는 시료는 세포, 세포 추출물, 원형질막, 조직 시료, 포유 동물(마우스, 랫트, 기니아 피그, 토끼, 개, 돼지 등), 및 그 등가물을 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다.

<182>  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 및/또는 무스카린 수용체를 포함하는 생물학적 시스템 또는 시료가 연구 도구로서 사용될 때, 이러한 생물학적 시스템 또는 시료는 통상적으로 본 발명의 화합물의  $\beta_2$  아드레날린성 수용체-작용하는(agonizing) 함량 또는 무스카린 수용체-길항하는(antagonizing) 함량과 접촉된다. 그런 다음, 본 발명의 화합물에 의해 야기되는 생물학적 시스템 또는 시료에 대한 효과는 방사성리간드 결합 분석(radioligand binding assay)에 있어서의 결합 또는 기능성 분석(functional assay)에 있어서의 리간드-매개된(ligand-mediated) 변화를 측정함으로써 또는 포유 동물에 대해 기관지 보호 분석(bronchoprotection assay)에 있어서 화합물에 의해 제공된 기관지 보호량을 결정하는 것과 같은 통상적인 방법과 장치를 사용하여 결정되거나 또는 측정된다. 기능성 분석에 있어서의 대표적인 리간드-매개된 변화는 세포내 시클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP)의 리간드-매개된 변화; 효소 아데닐릴 시클라제(cAMP를 합성함)의 활성화에 있어서 리간드-매개된 변화; [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S와 GDP의 수용체 촉매화된 교환을 통한 분리된 막 내부로 구아노신 5'-O-(티오)트리포스페이트 ([ $^{35}\text{S}$ ]GTP S)의 통합에 있어서 리간드-매개된 변화; 유리된 세포내 칼슘 이온에 있어서 리간드-매개된 변화(예를 들면, 형광-연결된 이미징 플레이트 리더(fluorescence-linked imaging plate reader) 또는 Molecular Devices, Inc.로부터의 FLJPR<sup>®</sup>을 가지고 측정됨)를 포함한다. 본 발명의 화합물은 본 명세서에서 열거된 기능성 분석 또는 유사한 성질을 갖는 분석에서  $\beta_2$  아드레날린성 수용체를 작용화하거나 또는 그의 활성화를 일으키고, 무스카린 수용체를 길항하

거나 또는 그의 활성화를 감소시킬 것으로 기대된다. 본 발명의 화합물은 이러한 연구에서 통상적으로 약 0.1 나노몰 내지 약 100 나노몰 범위의 농도로 사용될 것이다.

<183> 추가적으로, 본 발명의 화합물은 그 밖의 다른 화합물을 평가하기 위한 연구 도구로서 사용될 수 있다. 본 발명의 이러한 실시 형태에서, 식 I의 화합물은 분석에서 기준 물질(standard)로 사용되어, 테스트 화합물 및 식 I의 화합물로 얻어진 결과의 비교를 가능하게 한다. 예를 들면, 테스트 화합물 또는 테스트 화합물 그룹에 대한  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 및/또는 무스카린 수용체 결합 데이터(예를 들면, 인 비트로 방사성 리간드 치환 분석(in vitro radioligand displacement assay)에 의해 결정됨)는 식 I의 화합물의  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 및/또는 무스카린 수용체 결합 데이터와 비교되어, 만약 있다면, 목표로 하는 결합을 갖는 테스트 화합물, 즉, 식 I의 화합물과 동등하거나 또는 식 I의 화합물보다 뛰어난 결합을 갖는 테스트 화합물을 확인할 수 있게 한다. 택 일적으로는, 예를 들면, 기관지 보호 효과는 포유 동물에 있어서의 기관지 보호 분석에서 테스트 화합물과 식 I의 화합물에 대해 결정될 수 있고, 얻은 데이터는 비교되어, 거의 동일하거나 또는 더 뛰어난 기관지 보호 효과를 갖는 테스트 화합물을 확인할 수 있다. 별개의 구체예로서, 본 발명의 이러한 실시 형태는 (i) 비교 데이터의 생성(적절한 분석을 사용함) 및 (ii) 대상 테스트 화합물을 확인하기 위한 테스트 데이터의 분석을 모두 포함한다.

<184> 본 발명의 화합물의 특징 및 용도는 당해 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있는 다양한 인 비트로 및 인 비보 분석을 사용하여 입증될 수 있다. 예를 들면, 대표적인 분석들이 하기 실시예에서 추가로 상세하게 기술된다.

## 실시예

<185> 하기 제조예 및 실시예들이 본 발명의 특정 구체예 및 실시 형태를 설명하기 위해 제공된다. 그러나, 특정 구체예 및 실시 형태에 대한 설명은 특별히 지시되지 않는다면, 어떠한 형태로든지 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다.

<186> 하기 실시예에서 사용된 모든 시약, 출발 물질 및 용매는 상업적 공급원(Aldrich, Fluka, Sigma 및 그 등가물)로부터 구입되었고, 달리 지적되지 않는다면 추가적인 정제 없이 사용되었다.

<187> 하기 실시예에서, HPLC 분석은 Agilent에 의해 공급되고 3.5 미크론의 입자 크기를 갖는 Zorbax Bonus RP 2.1 x 50 mm 컬럼(C14 컬럼)이 있는 Agilent (Palo Alto, CA) Series 1100 장치를 사용하여 통상적으로 수행되었다. 검출은 214 nm에서 UV 흡광도에 의했다. 이동상 "A"는 2% 아세트니트릴, 97.9% 물, 및 0.1% 트리플루오로아세트산(v/v/v)이고; 이동상 "B"는 89.9 % 아세트니트릴, 10% 물, 및 0.1% 트리플루오로아세트산(v/v/v)이었다. HPLC (10-70) 데이터는 6분 기간 동안 10%에서 70%의 이동상 B 농도 구배로 0.5 mL/분의 유속으로 취득되었고; HPLC (5-35) 결과는 5분 기간 동안 5%에서 35% 이동상 B 농도 구배로 0.5 mL/분의 유속으로 취득되었고; 및 HPLC (10-90) 결과는 5분 기간 동안 10%에서 90% 이동상 B 농도 구배로 0.5 mL/분의 유속으로 취득되었다.

<188> 액체 크로마토그래피 질량 스펙트로메트리(LCMS) 결과는 통상적으로 Applied Biosystems (Foster City, CA) Model API-150EX 장치를 사용하여 취득되었다. LCMS 10-90 결과는 5분 기간 동안 10%에서 90% 이동상 B 농도 구배로 취득되었다.

<189> 소-규모 정제는 통상적으로 Applied Biosystems의 API 150EX Prep Workstation system을 사용하여 수행되었다. 이동상 "A"는 0.05% 트리플루오로아세트산을 포함하는 물이었(v/v); 이동상 "B"는 0.05% 트리플루오로아세트산을 포함하는 아세트니트릴이었다(v/v). 소량의 시료(약 3 내지 50 mg이 회수된 시료 크기)에 대해서는 하기의 조건들이 통상적으로 사용되었다: 20 mL/유속; 15분 농도 구배, 및 5 미크론 입자의 20 mm x 50 mm Prism RP 컬럼(Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA). 대량의 시료(즉, 약 100 mg보다 더 많은 미정제된 시료)에 대해서는, 하기의 조건들이 통상적으로 사용되었다: 60 mL/분 유속; 30분 농도 구배, 및 10 미크론 입자의 41.4 mm x 250 mm Microsorb BDS 컬럼(Varian, Palo Alto, CA).

<190> 실시예 1

<191> 비페닐-2-일카르바산 피페리딘-4-일 에스테르

<192> 비페닐-2-이소시아네이트(97.5 g, 521 mmol)와 4-히드록시-1-벤질피페리딘(105 g, 549 mmol)을 70°C에서 12시간 동안 함께 가열하였고(두 개 물질 모두 Aldrich, Milwaukee, WI으로부터 상업적으로 입수 가능함), 그 시간

동안에 비페닐-2-일카르바산 1-벤질피페리딘-4-일 에스테르의 생성이 LCMS에 의해 모니터되었다. 그런 다음, 얻은 반응 혼합물을 50℃까지 냉각시켰고, 에탄올(1 L)을 첨가하였고, 그런 다음 6M 염화수소산(191 mL)을 천천히 첨가하였다. 그런 다음, 얻은 반응 혼합물을 실온까지 냉각시켰고, 암모늄 포르메이트(98.5 g, 1.56 mol)를 첨가하였고, 20분 동안 용액을 통해 격렬하게 질소를 버블링하였다. 그런 다음, 팔라듐(활성탄에서 10 wt. % (건조량 기준))(20g)을 첨가하였다. 얻은 반응 혼합물을 40℃에서 12시간 동안 가열하였고, 그런 다음 셀라이트(Celite) 패드를 통해 여과하였다. 그런 다음, 감압 하에서 용매를 제거하였고, 얻은 정제되지 않은 잔여물에 1M 염화수소산(40 mL)을 첨가하였다. 그런 다음, 소듐 히드록시드(10N)를 첨가하여, pH를 12로 맞추었다. 수용액 층을 에틸 아세테이트로 추출하였고(2 x 150 mL), 물을 제거하였고(마그네슘 술페이트), 그런 다음, 감압 하에서 용매를 제거하여, 비페닐-2-일카르바산 피페리딘-4-일 에스테르(155 g, 100%)를 얻었다. HPLC (10-70) Rt = 2.52; MS m/z: [M+H]<sup>+</sup> C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계산값, 297.15; 측정값, 297.3.

<193> 실시예 2

<194> 3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피온산

<195> 디클로로메탄(500 mL)에 넣은 비페닐-2-일카르바산 피페리딘-4-일 에스테르(50 g, 67.6 mmol)의 용액에, 아크릴산(15.05 mL, 100 mmol)을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 50℃에서 환류 상태에서 18시간 동안 가열하였고, 그런 다음 용매를 제거하였다. 메탄올(600 mL)을 첨가하였고, 얻은 혼합물을 75℃에서 2시간 동안 가열하였고, 실온까지 냉각시켜, 걸쭉한 슬러리를 생성하였다. 얻은 고체를 여과에 의해 포집하였고, 메탄올로 수세하였고, 공기 중에서 건조시켜, 백색 분말로서, 3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피온산(61g, 96% 순도)을 얻었다.

<196> 실시예 3

<197> N-{5-[(R)-2-아미노-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-2-히드록시페닐}-포름아미드 아세트산 염

<198> 단계 A - N-{5-[(R)-2-벤질아미노-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-2-벤질옥시페닐}포름아미드

<199> 500 mL의 목이 세 개인 둥근 바닥 플라스크에, N-{2-벤질옥시-5-[(R)-2-브로모-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]페닐}포름아미드(100 g, 215 mmol)와 N-메틸-2-피롤리돈(300 mL)을 첨가하였다. 벤질아민(69.4 mL, 648 mol)을 첨가하였고, 얻은 반응 혼합물을 질소로 충전하였다. 그런 다음, 얻은 반응 혼합물을 90℃까지 가열하였고, 약 8시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 얻은 반응 혼합물을 실온까지 냉각시켰고, 물(1.5 L)과 에틸 아세테이트(1.5 L)를 첨가하였다. 층 분리를 하였고, 유기 층을 물(500 mL), 물과 포화된 브라인(brine)의 1:1 혼합물(전체 500 mL), 및 그런 다음 다시 물(500 mL)로 수세하였다. 그런 다음, 얻은 유기 층에서 무수 마그네슘 설페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 감압 하에서 농축하여, 오렌지색-갈색의 걸쭉한 오일로 정제되지 않은 N-{5-[(R)-2-벤질아미노-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-2-벤질옥시페닐}포름아미드(100 g, 90% 수득물, 75-80% 순도)를 얻었다.

<200> 단계 B - N-{5-[(R)-2-아미노-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-2-히드록시페닐}-포름아미드 아세트산 염

<201> 정제되지 않은 상태의 N-{5-[(R)-2-벤질아미노-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-2-벤질옥시페닐}포름아미드(100 g, 194 mmol)를 메탄올(1 L)과 아세트산(25 mL, 291 mmol)에 용해시켰다. 그 결과 얻은 혼합물에 건조 상태의 질소를 충전하였고, 그런 다음 탄소상 팔라듐 히드록시드(20 g, 20 wt. %, 약 50% 물)를 첨가하였다. 실온에서 약 10시간 동안 반응 혼합물을 통해 수소를 버블링시켰다. 그런 다음, 얻은 반응 혼합물에 건조 상태의 질소를 충전하였고, 얻은 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 얻은 여과액을 회전식 용매 증발기에서 농축시켰고, 얻은 잔여물에 에틸 아세테이트(600 mL)를 첨가하였다. 얻은 혼합물을 약 2시간 동안 교반하였고, 이 시간 동안에 흐린 노란색의 슬러리가 나타났다. 슬러리를 여과하였고, 침전물을 공기 중에서 건조시켜, 노란색-흰색 고체로 N-{5-[(R)-2-아미노-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-2-히드록시페닐}-포름아미드 아세트산 염(48 g, 98% 순도)을 얻었다. LCMS (10-70) Rt= 3.62; [M+H]<sup>+</sup> 측정값, 311.3.

<202> 실시예 4

<203> 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르

<204> 단계 A - 메틸 2,5-디메틸-4-니트로벤조에이트

<205> 0℃에서 건조 상태의 질소 하에서 건조 상태의 메탄올(8.2 mL)에 넣은 2,5-디메틸-4-니트로벤조산(480 mg, 2.4 mmol)의 교반된 용액에, 티오닐 클로라이드(0.538 mL, 7.38 mmol)를 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 실온까지 가온하였고, 약 7시간 동안 교반하였다. 추가량의 티오닐 클로라이드(0.300 mL)를 첨가하였고, 실온에서 밤새 교반을 계속하였다. 용매를 감압 하에서 제거하였고, 얻은 잔여물을 에틸 아세테이트에 용해시켰다. 얻은 용액을 포화된 탄산수소나트륨 수용액으로 수세하였고, 무수 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 감압 하에서 농축하여, 옅은 노란색 고체로 메틸 2,5-디메틸-4-니트로벤조에이트(578 mg)를 얻었다. HPLC (10-70) R<sub>4</sub> = 4.61; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.57 (3H, s), 2.61 (3H, s), 3.94 (3H, s), 7.82 (1H, s), 7.87 (1H, s).

<206> 단계 B - 메틸 4-아미노-2,5-디메틸벤조에이트

<207> 0℃에서 메탄올과 물의 9:1 혼합물(전체 25 mL)에 넣은 메틸 2,5-디메틸-4-니트로벤조에이트(523 mg, 2.5 mmol)의 교반된 용액에, 암모늄 클로라이드(401 mg, 7.5 mmol)를 첨가하였다. 아연(1.63 g, 25 mmol)을 부분 부분으로 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그런 다음, 얻은 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였고, 셀라이트 패드를 메탄올로 수세하였다. 여과액을 감압 하에서 농축하였고, 그 결과 얻은 잔여물을 에틸 아세테이트에 용해시켰다. 얻은 용액을 포화된 탄산수소나트륨 수용액으로 수세하였고, 무수 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 감압 하에서 농축하여, 노란색 오일로서 메틸 4-아미노-2,5-디메틸벤조에이트(450 mg)를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.14 (3H, s), 2.53 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.85 (2H, br s), 6.48 (1H, s), 7.72 (1H, s).

<208> 단계 C - 메틸 4-{3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피오닐아미노}-2,5-디메틸벤조에이트

<209> 디클로로메탄(3.6 mL)과 디이소프로필에틸아민(0.413 mL)에 넣은 3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피온산(670 mg, 1.82 mmol)과 메틸 4-아미노-2,5-디메틸벤조에이트(390 mg, 2.18 mmol)의 교반된 용액에, 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸유로늄 헥사플루오로포스페이트(HATU) (829 mg, 2.18 mmol)를 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 그런 다음, 얻은 혼합물을 포화된 탄산수소나트륨 수용액으로 수세하였고, 무수 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 감압 하에서 농축하였다. 얻은 잔여물을 3%에서 5% 메탄올을 함유하는 디클로로메탄으로 용리하는 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여, 메틸 4-{3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피오닐아미노}-2,5-디메틸벤조에이트(568 mg, 59% 수득률)를 얻었다. LCMS (10-70) R<sub>t</sub> = 4.55; [M + H]<sup>+</sup> 측정값 530.4.

<210> 단계 D - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-히드록시메틸-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르

<211> 0℃에서 THF에 넣은 1M 리튬 알루미늄 히드라이드(1.52 mL, 1.52 mmol)의 교반된 용액에, 메틸 4-{3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피오닐아미노}-2,5-디메틸벤조에이트(400 mg, 0.76 mmol)를 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하였고, 그런 다음 1M 소듐 히드록시드 수용액(5 mL)과 물(5 mL)의 1:1 혼합물을 첨가하였고, 2시간 동안 교반을 계속하였다. 디클로로메탄을 첨가하였고, 유기 층을 분리하였고, 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 감압 하에서 용매를 제거하였다. 얻은 잔여물을 5% 메탄올을 함유하는 디클로로메탄으로 용리시키는 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-히드록시메틸-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르를 얻었다. LCMS (10-70) R<sub>t</sub> = 3.94; [M + H]<sup>+</sup> 측정값 502.5.

<212> 단계 E - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르

<213> 0℃에서 디클로로메탄(3 mL)에 넣은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-히드록시메틸-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(151 mg, 0.3 mmol)의 용액에, 디메틸 술폭시드(128 μL, 1.8 mmol)와 디이소프로필에틸아민(157 μL, 0.9 mmol)을 첨가하였다. 15분 후에, 술포트리옥시드 피리딘 복합체(143 mg, 0.9 mmol)를 첨가하였고, 0℃에서의 교반을 1시간 동안 계속하였다. 물을 첨가하여 반응을 중지시켰고, 층 분리를 하였다. 유기 층에서 무수 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 감압 하에서 용매를 제거하여, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(150 mg, 100% 수득률)를 얻었고, 이것은 추가로 정제하지 않고 사용하였다.[M + H]<sup>+</sup> 측정값 500.4.

<214> 단계 F - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페

**닐)에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<215> 디클로로메탄과 메탄올의 1:1 혼합물(전체 3.0 mL)에 넣은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐 카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(150 mg, 0.30 mmol)와 N-{5-[(R)-2-아미노-1-(터트-부틸디메틸실라닐 옥시)에틸]-2-히드록시페닐}포름아미드(112 mg, 0.36 mmol)의 용액을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 소듐 트리 아세톡시보로히드라이드(191 mg, 0.9 mmol)를 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 아세트산을 첨가하여 반응을 중지시켰고, 얻은 혼합물을 감압 하에서 농축시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카 르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르를 얻었고, 이것은 추가로 정제하지 않고 사용되었다. LCMS (10-70)  $R_t$  = 4.55;  $[M + H]^+$  측정값 794.6.

<216> **단계 G - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<217> 디클로로메탄(3.0 mL)에 넣은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀 아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(238 mg, 0.30 mmol)의 현탁액에, 트리에틸아민 트리히드로플루오라이드(147  $\mu$ l, 0.90 mmol)를 첨가하였다. 얻은 혼합물을 실 온에서 밤새 교반하였고, 그런 다음 얻은 혼합물을 감압 하에서 농축시켰다. 얻은 잔여물을 프랩-RP-HPLC(preparation RP-HPLC)(농도 구매: 0.05% TFA를 포함하는 물에서 2%부터 50%의 아세토니트릴)로 정제하였다. 적절한 분획들을 포집하였고, 합하였고, 동결 건조시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르를 디트리플 루오로아세테이트 염(50 mg, 97% 순도)으로 얻었다. LPLC (2-90)  $R_t$  = 2.76;  $[M + H]^+$  측정값 680.8.

<218> **실시예 5**

<219> **비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<220> **단계 A - 디벤질-(4-요오도-2,5-디메틸페닐)아민**

<221> 오버헤드 교반기(overhead stirrer), 온도 조절기 및 첨가용 깔때기가 장착된 2-리터 둥근-바닥 플라스크에, 4-요오도-2,5-디메틸아닐린(100.0 g, 0.405 mol)(Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH)을 첨가하였다. 에 탄올(1 L) 및 고체형 포타슘 카보네이트(160 g, 1.159 mol)를 첨가하였고, 그런 다음 원액 상태의 순수한 벤질 브로마이드(140 mL, 1.179 mol)를 한 번의 분량으로 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 30°C에서 약 18시간 동안 교반하였고, 그 동안에 HPLC는 98% 보다 많이 전환되었음을 보여주었다. 그런 다음, 얻은 혼합물을 실온까지 냉각시켰고, 헥산(1 L)을 첨가하였다. 얻은 혼합물을 15분 동안 교반하였고, 그런 다음 종이 여과지를 통해 여 과하여 고체를 제거하였고, 얻은 필터 케이크(filter cake)를 헥산(200 mL)으로 수세하였다. 회전식 증발기를 사용하여, 여과액의 부피를 약 500 mL로 감소시켰고, 농축된 염화수소산(30 mL)을 첨가하였다. 그런 다음, 남아 있는 용매를 회전식 증발기를 사용하여 제거하였다. 그 결과 얻은 잔여물에 헥산(500 mL)을 첨가하였고, 얻은 혼합물을 약 30분 동안 교반하였고, 그 시간 동안 유리-유동성(free-flowing) 슬러리가 생성되었다. 얻은 슬러 리를 여과하였고, 얻은 필터 케이크를 헥산(200 mL)으로 수세하였고, 건조시켜, 녹색 고체로서 디벤질-(4-요오 도-2,5-디메틸페닐)아민 히드로클로라이드(115 g, 62% 수득률, 97.5% 순도)를 얻었다.

<222> 얻은 디벤질-(4-요오도-2,5-디메틸페닐)아민 히드로클로라이드를 3 L 플라스크로 옮겼고, 톨루엔(1 L)과 1 M 소듐 히드록시드 수용액(1 L)을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 1시간 동안 교반하였고, 그런 다음 층 분리를 하였다. 유기 층을 회석된 브라인(500 mL)으로 수세하였고, 회전식 증발에 의해 용매를 제거하여, 반-고체형의 흐린 오일로서 디벤질-(4-요오도-2,5-디메틸페닐)아민(80 g)을 얻었다(택일적으로는, 이 단계에서는 톨루엔 대신에 디클로로메탄이 사용될 수 있다).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2.05 (3H, s), 2.19 (3H, s), 3.90 (4H, s), 6.91 (1H, s), 7.05-7.20 (10H, m), 7.42 (1H, s); MS  $[M + H]^+$  측정값 428.

<223> **단계 B - 4-디벤질아미노-2,5-디메틸벤즈알데히드 히드로클로라이드**

<224> 오버헤드 교반기, 온도 조절기 및 첨가용 깔때기가 장착된 1-리터의 목이 세개인 둥근 바닥 플라스크에, 디벤질 -(4-요오도-2,5-디메틸페닐)아민(15 g, 35 mmol)을 첨가하였다. 톨루엔(300 mL)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼

합물을 약 15분 동안 교반하였다. 반응 플라스크에 건조 상태의 질소를 충전하였고, 약 -20℃까지 냉각시켰고, 헥산에 넣은 1.6 M n-부틸리튬(33 mL, 53 mmol)을 첨가용 깔때기를 통해 적가하였다. 적가하는 동안에, 반응 혼합물의 내부 온도는 -10℃보다 낮게 유지하였다. 적가가 완료되었을 때, 그 결과 얻은 혼합물을 약 -15℃에서 15분 동안 교반하였다. 그런 다음, N,N-디메틸포름아미드(10 mL, 129 mmol)를 적가하였고, 그 동안에 내부 반응 온도는 0℃보다 낮게 유지하였다. 그런 다음, 그 결과 얻은 혼합물을 -20℃ 내지 0℃에서 약 1시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 1 M 염화수소산 수용액(200 mL)을 5분 동안 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 15분 동안 교반하였다. 그런 다음, 층 분리를 하였고, 유기 층을 희석된 브라인(100 mL)으로 수세하였다. 그런 다음, 유기 층을 무수 소듐 술페이트로 건조시켰고, 여과하였고, 감압 하에서 용매를 제거하여, 4-디벤질아미노-2,5-디메틸벤즈알데히드 히드로클로라이드(11.5 g, 90% 수득률, 95% 순도)를 진한 오일로 얻었고, 이것은 정제된 후 고체화되었다. 생성물은 데스-요오도(des-iodo) 부산물 약 3% 내지 5%를 포함하였다.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.42 (3H, s), 2.50 (3H, s), 4.25 (4H, s), 6.82 (1H, s), 7.10-7.30 (10H, m), 7.62 (1H, s), 10.15 (1H, s); MS  $[\text{M} + \text{H}]^+$  측정값 330.3.

#### <225> 단계 C - 4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐아민

<226> 500 mL 둥근 바닥 플라스크에, 4-디벤질아미노-2,5-디메틸벤즈알데히드 히드로클로라이드(11.5 g, 31.4 mmol) 및 톨루엔(150 mL)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 염이 완전히 용해될 때까지 교반하였다. 그런 다음, 반응 플라스크에 건조 상태의 질소를 5분 동안 충전하였다. 에틸렌 글리콜(5.25 mL, 94.2 mmol)과 p-톨루엔술폰산(760 mg, 6.2 mmol)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 60℃ 내지 80℃에서 약 20시간 동안 가열하였다. 그런 다음, 회전식 증발기에서 40℃에서 용매를 천천히 제거하였다(약 40분 동안). 얻은 잔여물에 톨루엔(100 mL)을 첨가하였고, 회전식 증발기에서 40℃에서 다시 천천히 용매를 제거하였다. 톨루엔 또 다른 분량(100 mL)을 사용하여, 이러한 과정을 반복하였고, 얻은 혼합물을 건조될 때까지 용매를 증발시켰다. 얻은 잔여물에 에틸 아세테이트(150 mL)와 포화된 탄산수소나트륨 수용액(100 mL)을 첨가하였고, 층 분리를 하였다. 유기 층을 브라인(50 mL)으로 수세하였고, 무수 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 감압 하에서 농축시켜, 정제되지 않은 상태의 디벤질-(4-[1,4]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐)아민(11.4 g)을 얻었다.

<227> 정제되지 않은 상태의 디벤질-(4-[1,4]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐)아민을 에탄올과 물의 2:1 혼합물(전체 150 mL)에 용해시켰고, 그 결과 얻은 혼합물에 건조 상태의 질소를 5분 동안 충전시켰다. 탄소상 팔라듐(2.3 g, 10 Wt. %, 약 50%의 물을 포함)과 고체 상태의 탄산수소나트륨(1.0 g)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 수소 약 1 atm에서 25℃ 내지 30℃에서 약 8시간 동안 수소화반응시켰다. 그런 다음, 그 결과 얻은 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였고, 얻은 여과액을 회전식 증발기에서 농축시켜, 진한 오일로서 정제되지 않은 상태의 4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐아민(5.6 g, 92% 수득률)을 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2.05 (3H, s), 2.22 (3H, s), 3.7-3.9 (4H, m), 3.95 (4H, s), 5.59 (1H, s), 6.72 (1H, s), 7.0-7.25 (1H, m).

#### <228> 단계 D - N-(4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐)아크릴아미드

<229> 500 mL 둥근 바닥 플라스크에, 정제되지 않은 상태의 4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐아민(5.6 g, 29 mmol), 디클로로메탄(100 mL), 디이소프로필에틸아민(7.6 mL, 43.5 mmol)을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물들을 성분들이 용해될 때까지 실온에서 교반시켰고, 그런 다음 얻은 혼합물을 0℃까지 냉각시켰다. 그런 다음, 아크릴로일 클로라이드(2.35 mL, 29 mmol)를 5분 기간 동안 적가하였다. 그 결과 얻은 반응 혼합물을 0℃ 내지 5℃에서 1시간 동안 교반하였고, 그런 다음 물(50 mL)을 첨가하였고, 약 30분 동안 교반을 계속하였고, 그 동안에 미세한 고체가 생성되었다. 얻은 혼합물을 여과하여 고체를 포집하였다. 그런 다음, 여과액 층을 분리하였고, 유기 층을 감압 하에서 건조 상태가 될 때까지 농축시켰다. 얻은 잔여물에 디클로로메탄(50 mL)을 첨가하였고, 얻은 혼합물을 유리-유동성 슬러리가 생성될 때까지 교반하였다. 얻은 슬러리를 여과하였고(상기 미세한 고체를 포집하기 위해 사용된 것과 동일한 깔때기를 사용함), 얻은 필터 케이크를 디클로로메탄(10 mL)으로 수세하였고, 건조시켜, N-(4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐)아크릴아미드(3.1 g, 97% 순도)를 흰색 내지 회백색 고체로 얻었다.

<230> 그런 다음, 상기로부터 얻은 여과액을 건조 상태가 될 때까지 용매를 증발시켰고, 얻은 잔여물에 메탄올(10 mL)을 첨가하였다. 얻은 혼합물을 15분 동안 교반하였고, 그런 다음, 얻은 침전물을 여과에 의해 포집하였고, 메탄올(5 mL)로 수세하였고, 건조시켜, N-(4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐)아크릴아미드 두 번째 수확물(0.8 g, 95% 순도)을 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  2.10 (3H, s), 2.23 (3H, s), 3.85-4.10 (4H, m),

5.60-6.40 (3H, m), 5.59 (1H, s), 7.18 (1H, s), 7.23 (1H, s).

<231> 단계 E - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 히드로클로라이드

<232> 50 mL 둥근 바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 피페리딘-4-일 에스테르(1.2 g, 4.04 mmol)와 N-(4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐)아크릴아미드(1.0 g, 4.04 mmol)를 첨가하였다. 에탄올(10 mL)과 디클로로메탄(10 mL)을 첨가하여, 슬러리를 생성하였다. 얻은 반응 혼합물을 45℃ 내지 50℃에서 약 18시간 동안 가열하였고, 실온까지 냉각시켰다. 1M 염화수소산 수용액(10 mL)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 약 3시간 동안 격렬하게 교반하였다. 디클로로메탄(10 mL)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 약 5분 동안 교반하였다. 그런 다음, 층 분리를 하였고, 무수 소듐 술페이트로 유기층에서 물을 제거하였고, 여과하였고, 회전식 증발기에서 농축시켜, 정제되지 않은 상태의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 히드로클로라이드(1.9 g)를 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.2-1.4 (2H, m), 1.58-1.75 (2H, m), 2.0-2.17 (2H, m), 2.19 (3H, s), 2.38 (3H, s), 2.41-2.50 (4H, m), 2.5-2.75 (2H, m), 4.31-4.42 (1H, m), 7.10-7.35 (9H, m), 7.55 (1H, s), 7.75 (1H, s), 8.59 (1H, s), 9.82 (1H, s), 9.98 (1H, s); MS [M + H]<sup>+</sup> 측정값 500.2.

<233> 단계 F - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르

<234> 2 L 목이 세개인 둥근 바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 히드로클로라이드(38 g, 70 mmol)와 N-{5-[(R)-2-아미노-1-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-2-히드록시페닐}포름아미드 아세트산 염(33.6 g, 91 mmol)을 첨가하였다. 디클로로메탄(500 mL)과 메탄올(500 mL)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 실온에서, 건조 상태의 질소 하에서, 약 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 얻은 반응 혼합물을 0℃ 내지 5℃까지 냉각시켰고, 고체형 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드(44.5 g, 381 mmol)를 20분 기간에 걸쳐 부분으로 나누어 첨가하였다. 얻은 반응 혼합물을 0℃ 부터 실온까지 약 2시간 기간 동안 천천히 가온하였고, 그런 다음 0℃까지 냉각시켰다. 포화된 탄산수소나트륨 수용액(500 mL)과 디클로로메탄(500 mL)을 첨가하였다. 얻은 반응 혼합물을 완전히 교반하였고, 그런 다음 층 분리를 하였다. 유기 층을 브라인(500 mL)으로 수세하였고, 무수 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 감압 하에서 농축시켜, 정제되지 않은 상태의 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(55 g, 86% 순도)를 노란색 고체로 얻었다.

<235> 정제되지 않은 상태의 생성물(30 g)을 2% 메탄올을 함유하는 디클로로메탄(전체 150 mL)에 용해시켰고, 팩킹되어 있고 2% 메탄올과 0.5% 암모늄 히드록시드를 포함하는 디클로로메탄으로 평형화된 실리카 겔 컬럼(300 g)에 로딩(loading)하였다. 2% 메탄올과 0.5% 암모늄 히드록시드를 함유하는 디클로로메탄(1 L); 4% 메탄올과 0.5% 암모늄 히드록시드를 함유하는 디클로로메탄(1 L); 및 5% 메탄올과 0.5% 암모늄 히드록시드를 함유하는 디클로로메탄(약 3 L)를 사용하여, 컬럼으로부터 생성물을 용리시켰다. 분획(200 mL)들을 포집하였고, 90%보다 높은 순도를 갖는 분획들을 합하였고, 감압 하에서 농축시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(21.6 g, 96.5% 순도)를 노란색 고체로 얻었다. MS [M + H]<sup>+</sup> 측정값 794.6.

<236> 단계 G - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 히드로플루오라이드 염

<237> 1 L 둥근-바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(21.5 g, 27.1 mmol)와 디클로로메탄(200 mL)을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물들을 성분들이 용해될 때까지 실온에서 교반하였고, 그런 다음 트리에틸아민 트리히드로플루오라이드(8.85 mL, 54.2 mmol)를 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 25℃에서 약 48시간 동안 교반하였다. 회전식 증발기에서 용매를 제거하여, 진한 페이스트를 얻었다. 얻은 페이스트에 디클로로메탄(100 mL)과 에틸 아세테이트(200 mL)를 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 그 결과 얻은 슬러리를 건조 상태의 질소 하에서 천천히 여과하였고, 얻은 필터 케이크를 디클로로메탄과 에틸 아세테이트의 1:2 혼합물(전체 100 mL)로 수세하였고, 질소 하에서 2시간 동안 건조시켰고, 감압 하에서 밤새 건조시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시

에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르를 딱딱한 점토-유사 고체형인 히드로플루오라이드 염(25 g, 96.9% 순도)으로 얻었다. MS  $[M + H]^+$ . 측정값 680.8.

<238> **단계 H - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<239> 이동상으로 1% 트리플루오로아세트산을 함유하는 물 중 아세토니트릴 10%에서 50%까지의 혼합물을 사용하는 세 개의 동일한 배치의 6-인치 역상 컬럼(Microsorb solid phase)에서 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 히드로플루오라이드 염(25 g)을 정제하였다. 99%보다 높은 순도를 갖는 분획들을 합하였고, 그런 다음 1배의 물로 희석하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 0℃까지 냉각시켰고, 얻은 혼합물의 pH가 약 7.5 내지 8.0이 될 때까지 고체형 탄산수소나트륨을 첨가하였다. 약 5분 이내에, 하얀색 슬러리가 생성되었다. 얻은 슬러리를 30분 동안 교반하였고, 그런 다음 여과하였다. 얻은 필터 케이크를 물(500 mL)로 수세하였고, 약 4시간 동안 공기 중에서 건조시켰고, 진공 하에서 밤새 건조시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐카르바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르(12 g, 99% 순도)를 반-결정질(semi-crystalline) 유리 염기로 얻었다.

<240> **실시예 6**

<241> **비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<242> **단계 A - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<243> 500 mL 둥근-바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 피페리딘-4-일 에스테르(17.0 g, 58 mmol)와 N-(4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐)아크릴아미드(13.1 g, 52.9 mmol)를 첨가하였다. 에탄올(150 mL)과 디클로로메탄(150 mL)을 첨가하여, 슬러리를 형성하였다. 얻은 반응 혼합물을 50℃ 내지 55℃에서 약 24시간 동안 가열하였고, 그런 다음 실온까지 냉각시켰다. 회전식 증발기에서 대부분의 용매를 제거하여, 진한 슬러리를 얻었다. 에탄올(시약 등급)을 첨가하여, 전체 부피를 약 200 mL로 만들었고, 그 결과 얻은 혼합물을 80℃까지 가열하였고, 그런 다음 실온까지 천천히 냉각시켰다. 그 결과 얻은 진한 농도의 백색 슬러리를 여과하였고, 에탄올(20 mL)로 수세하였고, 진공 하에서 건조시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(23.8 g, 약 98% 순도)를 백색 고체로 얻었다.

<244> **단계 B - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<245> 500 mL 둥근-바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[1,3]디옥솔란-2-일-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(15 g, 27.6 mmol)와 아세토니트릴(150 mL)을 첨가하여, 슬러리를 생성하였다. 2 M 염화수소산 수용액(75 mL)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 30℃에서 1시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 얻은 혼합물을 실온까지 냉각시켰고, 에틸 아세테이트(150 mL)를 첨가하였다. 2 M 소듐 히드록시드 수용액(75 mL)을 첨가하였고, pH를 체크하였고, 그런 다음 용액의 pH가 9 내지 10의 범위에 있을 때까지 2 M 소듐 히드록시드를 추가로 첨가하였다. 층 분리를 하였고, 유기 층을 희석된 브라인(75 mL; 1:1 브라인/물)으로 수세하였고, 무수 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 회전식 증발기에서 용매를 제거하여, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(12.5 g, 약 98% 순도)를 얻었다. 바람직하다면, 얻은 중간체의 순도는 에탄올(3배 분량의 에탄올)로 슬러리를 생성하고, 얻은 슬러리를 80℃까지 가열하고, 그런 다음 실온까지 천천히 냉각시키고, 여과에 의해 분리함으로써, 높일 수 있다.

<246> **단계 C - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸-페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<247> 250 mL 둥근 바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(7.1 g, 14.2 mmol)와 N-{5-[(R)-2-아미노-1-(tert-부틸디메틸실라닐옥시)에틸]-2-히드록시페닐}포름아미드 아세트산 염(5.8 g, 15.6 mmol)을 첨가하였다. 메탄올(100 mL)을 첨가하여 슬러리를 형성하고, 얻은 혼합물을 45℃ 내지 50℃에서 질소 하에서 1시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 얻은 혼합물을 실온까지 냉각시켰고, 톨루엔(50 mL)을 첨가하였고, 회전식 증발기에서 35℃ 내지 45℃ 범위의 온도에서 용매를 제거하였다. 얻은 잔여물에 톨루엔(50 mL)을 첨가하였고, 용매를 제거하여, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-

{[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸-페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(12 g)를 노란-오렌지 색 고체로 얻었다.

<248> **단계 D - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<249> 수소화반응용 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸-페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(4.6 g)와 2-메틸테트라히드로푸란(50 mL)을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 고체가 용해될 때까지 교반하였고(약 5분), 그런 다음 얻은 혼합물에 질소를 충전하였다. 탄소상 백금(920 mg, 5 wt. %, 활성탄 지지체)을 첨가하였고, 얻은 혼합물을 50 psi(Parr shaker)에서 6시간 동안 수소화반응시켰다. 그런 다음, 얻은 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였고, 셀라이트를 2-메틸테트라히드로푸란(10 mL)으로 수세하였다. 얻은 여과액에 티오포로필-개조된 실리카 겔(용액의 20 중량%, Silicycle)을 첨가하였고, 얻은 혼합물을 25℃ 내지 30℃에서 3시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 얻은 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였고, 농축시켜 용매를 제거하였다. 얻은 잔여물을 메탄올(잔여물 1 그램 당 5 mL)에서 용해시켰고, 그런 다음 그 결과 얻은 용액을 포화된 탄산수소나트륨 수용액과 물의 1:1 혼합물의 격렬하게 교반되는 용액(잔여물 1 그램 당 40 mL)에 천천히 첨가하였다. 그 결과 얻은 회백색 슬러리를 20분 동안 교반하였고, 그런 다음 여과하였다. 얻은 필터 케이크를 물(20 배)로 수세하였고, 3시간 동안 공기 중에서 건조시켰고, 진공 하에서 실온에서 밤새 건조시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(80% 회수율, 약 96% 순도)를 얻었다.

<250> **단계 E - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 L-타르타레이트 염**

<251> 200 mL 둥근-바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(터트-부틸디메틸실라닐옥시)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(3.8 g, 4.8 mmol)와 2-메틸테트라히드로푸란(40 mL)을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 성분들이 용해될 때까지 실온에서 교반하였고(약 15분), 그런 다음 트리에틸아민 트리히드로플루오라이드(0.94 mL, 5.76 mmol)를 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 25℃에서 약 24시간 동안 교반하였다. 얻은 혼합물에 포화된 탄산수소나트륨 수용액과 물의 1:1 혼합물 (40 mL) 및 2-메틸테트라히드로푸란을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 고체가 용해될 때까지 교반하였다(용액의 pH 약 8). 층 분리를 하였고, 유기 층을 브라인(30 mL)으로 수세하였고, 무수 소듐 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 회전식 증발기에서 농축하였다. 얻은 잔여물을 2-메틸테트라히드로푸란(50 mL)에 용해시켰고, 고체형 L-타르타르산(650 mg)을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 25℃ 내지 30℃에서 18시간 동안 교반하였고, 그런 다음 여과지를 통해 여과하였다. 얻은 필터 케이크를 2-메틸테트라히드로푸란(10 mL), 이소프로판올(10 mL)로 수세하였고, 즉시 진공 상태 속에 넣어, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 L-타르타르산 염(3.7 g, > 97% 순도)을 얻었다.

<252> **단계 F - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르**

<253> 250 mL 둥근-바닥 플라스크에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 L-타르타르산 염(3.5 g)과 메탄올(35 mL)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 15분 동안 교반하였다. 포화된 탄산수소나트륨 수용액과 물의 1:1 혼합물(70 mL)을 5분 동안 첨가하였고, 2시간 동안 교반을 계속하였다. 그 결과로 얻은 회백색 슬러리를 여과하였고, 얻은 필터 케이크를 물(20 mL)로 수세하였고, 2시간 동안 공기 중에서 건조시켰고, 진공 상태에서 밤새 건조시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(2.3 g)를 반-결정질 유리 염기로 얻었다.

<254> <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 시료(DMSO-d<sub>6</sub> 약 0.75 mL에서 22.2 mg)에 대해 실온에서 JEOL ECX-400 NMR 분광기를 사용하여 얻었다:

<255> <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 다수 이성질체(major isomer), δ 9.64 (br, 1H), 9.54 (br s, 1H), 9.43 (s,

1H), 8.67 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.03 (d, J = 1.9, 1H), 7.25-7.45 (m, 9H), 7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.88 (dd, J = 8.2, 1.9, 1H), 6.79 (d, J = 8.2, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.53 (dd, J = 7.3, 4.7, 1H), 4.47 (m, 1H), ~3.65 및 ~3.60 (AB pair, 2H), 2.68 (br m, 2H), ~ 2.59 (nd, 4H), 2.44 (br t, J = 6.5, 2H), 2.20 (s, 3H), ~ 2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, J = ~9.0, 2H).

<256> <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 소수 이성질체(minor isomer), δ 9.64 (br, 1H), 9.43 (s, 1H), 9.26 (br d, J = -7.0, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.50 (br d, J = -7.0, 1H), 7.25-7.45 (m, 9H), -7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), -7.07 (nd, 1H), 6.95 (dd, J = 8.3, 1.8, 1H), 6.83 (d, J = 8.3, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.47 (m, 1H), -3.65 및 -3.60 (AB pair, 2H), 2.68 (br m, 2H), -2.59 (nd, 2H), 2.44 (br t, J = 6.5, 2H), 2.20 (s, 3H), -2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, J = -9.0, 2H).

<257> <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 다수 이성질체, δ 170.0, 159.9, 153.9, 145.5, 139.3, 137.6, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 127.0, 126.1, 125.7, 125.6, 121.7, 118.6, 114.5, 71.4, 70.0, 57.4, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5.

<258> <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 소수 이성질체, δ 170.0, 163.4, 153.9, 147.8, 139.3, 137.6, 135.7, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 127.0, 126.1, 125.7, 123.0, 119.6, 115.6, 71.0, 70.0, 57.3, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5.

<259> <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 -NH-C(O)H 결합 주위의 방해받는 회전으로 인한 회전 이성질체(rotational isomer)로 여겨지는 다수 이성질체(약 82 몰 퍼센트)와 소수 이성질체(약 18 몰 퍼센트)의 존재를 보여주었다. 페닐기는 다수 이성질체에서는 카르보닐 산소에 대해 syn으로, 소수 이성질체에서는 카르보닐 산소에 대해 anti인 것으로 여겨진다.

## <260> 실시예 7

<261> 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 형태 II(Form II)의 시드 결정(seed crystal)

<262> 반-결정질인 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐-카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(500 mg)를 메탄올(50 mL)에 용해시켰고, 담점(cloud point)에 도달할 때까지 물을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반하였고, 그 결과 얻은 결정질 물질을 여과에 의해 분리하여, 결정질 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(420 mg)를 얻었다. 이 결정질 유리 염기는 약 142℃ 내지 약 150℃에서 흡열성 열 흐름(endothermic heat flow) 피크를 나타내는 시차 주사 열량계 자취(differential scanning calorimetry (DSC) trace); 그 밖의 다른 피크들 중에서도, 약 20.7±0.3, 21.6±0.3, 22.5±0.3 및 23.2±0.3 2θ 값에서 유의성 있는 회절 피크를 갖는 분말 X-선 회절(powder x-ray diffraction, PXRD) 패턴을 갖는 것으로 결정되었다. 이러한 결정질 유리 염기 형태를 형태 II(Form II)로 지정한다. 형태 II에 대한 추가적인 정보 및 상기 화합물의 그 밖의 다른 결정질 유리 염기 형태에 대한 추가적인 정보는 공동으로-양수된, 본 출원과 같은 날짜에 출원된 미국출원 제( )호(Attorney Docket No. P-222-US 1), 및 2006년 4월 25일에 출원된 미국 가출원 제60/794,709호에서 기재되어 있고; 그 개시 내용은 전문으로 참조에 의해 본 명세서에 통합되어 있다.

## <263> 실시예 8

<264> 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르의 형태 II의 결정화

<265> 오버헤드 교반기, 온도 조절기 및 첨가용 깔때기가 장착된 3 L 목이 세개인 둥근 바닥 플라스크에, 반-결정질인 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(14 g)와 메탄올(1.4 L)을 첨가하였다. 물(500 mL)을 한 번의 분량으로 첨가하였고, 그런 다음 담점에 도달할 때까지 추가적인 물(200 mL)을 천천히 첨가하였다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르 형태 II의 시드 결정(50 mg)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 25℃에서

3시간 동안 교반하였고, 그 동안에 유리-유동성 슬러리가 생성되었다. 물(300 mL)을 15분 기간 동안 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 25℃에서 밤새 교반하였다. 그런 다음, 얻은 혼합물을 여과하였고, 얻은 필터 케이크를 물(100 mL)로 수세하였고, 공기 중에서 약 2시간 동안 건조시켰고, 그런 다음 진공 속에서 실온에서 48시간 동안 건조시켜, 결정질 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸)-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(12.5 g, 99.6% 순도)를 얻었다. 이 결정질 염은 형태 II인 것으로 결정되었다.

#### <266> 실시예 9

#### <267> 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]-피페리딘-4-일 에스테르

##### <268> 단계 A - 4-요오도-2,5-디메틸페닐아민

<269> 디클로로메탄과 메탄올의 1:1 혼합물(400 mL)에 넣은 2,5-디메틸아닐린(20g, 165 mmol) 용액에, 탄산수소나트륨(20.8g, 250 mmol)과 테트라메틸암모늄 디클로로오요테이트(dichloroiodate)(I)(44.7g, 165 mmol)를 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였고, 그런 다음 물(500 mL)을 첨가하였다. 유기 층을 제거하였고, 유기 층을 5% 티오황산나트륨 수용액(500 mL)과 브라인(500 mL)으로 수세하였다. 그런 다음, 얻은 유기 층을 무수 마그네슘 술페이트로 물을 제거하였고, 여과하였고, 진공 하에서 농축시켜, 4-요오도-2,5-디메틸페닐아민(39.6 g, 98% 수득률)을 얻었다. 생성물을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

##### <270> 단계 B - N-(4-요오도-2,5-디메틸페닐)아크릴아미드

<271> 디클로로메탄(500 mL)에 넣은 4-요오도-2,5-디메틸페닐아민(37.2 g, 151 mmol)의 용액에, 탄산수소나트륨(25.4 g, 302 mmol)을 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 0℃까지 냉각시켰고, 아크릴로일 클로라이드(12.3 mL, 151 mmol)를 25분 기간 동안 천천히 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였고, 그런 다음 여과하였다. 여과액의 부피를 약 100 mL까지 줄였고, 침전물이 생성되었다. 얻은 침전물을 여과하였고, 건조시켰고, 물(100 mL)로 수세하였고 그런 다음 다시 건조시켜, N-(4-요오도-2,5-디메틸페닐)아크릴아미드(42.98g, 95% 순도, 90% 수득률)를 얻었다. 생성물을 추가로 정제하지 않고 사용하였다.

##### <272> 단계 C - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-요오도-2,5-디메틸페닐카르바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르

<273> N,N-디메틸포름아미드와 이소프로판올의 6:1 v/v 혼합물(700 mL)에 넣은 N-(4-요오도-2,5-디메틸페닐)아크릴아미드(32.2 g, 107 mmol)의 용액에, 비페닐-2-일카르바산 피페리딘-4-일 에스테르(36.3 g, 123 mmol)를 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 50℃에서 24시간 동안 가열하였고, 그런 다음 80℃에서 24시간 동안 가열하였다. 그런 다음, 얻은 반응 혼합물을 실온까지 냉각시켰고, 진공 하에서 농축시켰다. 얻은 잔여물을 디클로로메탄(1 L)에 용해시켰고, 얻은 용액을 1N 염화수소산 수용액(500 mL), 물(500 mL), 브라인(500 mL), 및 포화된 탄산수소나트륨 수용액(500 mL)으로 수세하였다. 그런 다음, 무수 마그네슘 술페이트로 유기 층에서 물을 제거하였고 여과하였다. 에탄올(400 mL)을 첨가하였고, 그 결과 얻은 혼합물을 진공 하에서 약 400 mL의 부피까지 농축시켰고, 그 동안에 침전물이 생성되었다. 얻은 침전물을 여과하였고, 건조시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-요오도-2,5-디메틸페닐카르바모일)-에틸]피페리딘-4-일 에스테르(59.6g, 84% 순도, 79% 수득률)를 얻었다. m/z: [M + H<sup>+</sup>] C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>I<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> 계산값, 598.49; 측정값, 598.5.

##### <274> 단계 D - 4-{3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피오닐아미노}-2,5-디메틸벤조산 메틸 에스테르

<275> N,N-디메틸포름아미드와 메탄올의 5:1 v/v 혼합물(600 mL)에 넣은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-요오도-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(56 g, 94 mmol)의 용액에, 디이소프로필에틸아민(49 mL, 281 mmol), 1,3-비스(디페닐포스피노)프로판(3.9 g, 9.4 mmol) 및 팔라듐(II) 아세테이트(2.1 g, 9.4 mmol)를 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물에 일산화탄소를 충전하였고, 그런 다음 일산화탄소 분위기 하에서(풍선 압력) 70℃ 내지 80℃에서 밤새 교반하였다. 그 결과 얻은 반응 혼합물을 진공 하에서 농축시켰고, 얻은 잔여물을 디클로로메탄(500 mL)에서 용해시켰다. 얻은 혼합물을 1N 염화수소산 수용액(500 mL), 물(500 mL) 및 브라인(500 mL)으로 수세하였다. 그런 다음 무수 마그네슘 술페이트로 유기 층에서 물을 제거하였고, 여과하였고, 진공 하에서 농축시켰다. 얻은 잔여물을 에탄올과 혼합하였고(에탄올 대 잔여물 약 5:1 v/w), 얻은 혼합물을 모든 고체 물질이 용해될 때까지 가열하였다. 얻은 용액을 실온까지 천천히 냉각시켰고, 그 결과 얻은 침전물을 여과에 의해 분리하여, 4-{3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피오닐아미노}-2,5-디메틸벤조산 메틸 에

스테르(47.3 g, 97% 순도, 92% 수득률)를 얻었다.  $m/z$ :  $[M + H]^+$   $C_{31}H_{35}N_3O_5$  계산값, 530.63; 측정값, 530.4.

<276> 단계 E - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-히드록시메틸-2,5-디메틸-페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르

<277> 테트라히드로푸란(200 mL)에 넣은 4-{3-[4-(비페닐-2-일카르바모일옥시)피페리딘-1-일]프로피오닐아미노}-2,5-디메틸벤조산 메틸 에스테르(49.8 g, 93.9 mmol)의 용액을 0°C까지 냉각시켰고, 리튬 알루미늄 히드라이드(10.7 g, 281.7 mmol)를 부분-부분으로 적가하였다(10 x 1.07 g). 그 결과 얻은 혼합물을 3 시간 동안 교반하였고, 그런 다음 물(10.7 mL)을 첨가하였고, 1N 소듐 히드록시드 수용액(10.7 mL)을 첨가하였고, 추가량의 물(32.1 mL)을 첨가하였다. 얻은 혼합물을 밤새 교반하였고, 그런 다음 여과하였다. 유기 층을 진공 하에서 농축시켰고, 얻은 잔여물을 에틸 아세테이트와 혼합하였다(에틸 아세테이트 대 잔여물 약 5:1 v/w). 얻은 혼합물을 고체 물질이 용해될 때까지 가열하였고, 그런 다음 얻은 용액을 실온까지 냉각시켰다. 그 결과 얻은 침전물을 여과하였고, 건조시켜, 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-히드록시메틸-2,5-디메틸-페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(24.6 g, 95% 순도, 47.5% 수득률)를 얻었다. 이 물질은 추가로 정제하지 않고 사용하였다.  $m/z$ :  $[M + H]^+$   $C_{30}H_{35}N_3O_4$  계산값, 502.62; 측정값, 502.5.

<278> 단계 F - 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르

<279> 디클로로메탄(200 mL)에 넣은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-히드록시메틸-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(5.0 g, 10 mmol)의 용액에, 디이소프로필에틸아민(8.7 mL, 50 mmol)과 디메틸설폭시드(5.6 mL, 100 mmol)를 첨가하였다. 그 결과 얻은 혼합물을 0°C까지 냉각시켰고, 숄퍼 트리옥시드 피리딘 복합체(8.0 g, 50 mmol)를 첨가하였다. 얻은 반응 혼합물을 1 시간 동안 0°C에서 교반하였고, 그런 다음 물(300 mL)을 첨가하였다. 유기 층을 제거하였고, 1N 염화수소산 수용액(300 mL)과 브라인(300 mL)으로 수세하였다. 그런 다음, 무수 마그네슘 술페이트로 유기층에서 물을 제거하였고, 여과하였다. 그 결과 얻은 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-포르밀-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르를 함유하는 용액은 추가로 정제하지 않고 사용하였다. $m/z$ :  $[M + H]^+$   $C_{30}H_{33}N_3O_4$  계산값, 500.60; 측정값, 500.4.

<280> 실시예 10

<281> 인간  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  및  $M_4$  무스카린 수용체를 발현하는 세포의 세포 배양과 그로부터 막 제조

<282> 각각 클로닝된 인간  $hM_1$ ,  $hM_2$ ,  $hM_3$ , 및  $hM_4$  무스카린 수용체 서브타입을 안정하게 발현하는 CHO 세포 주를 10% FBS 및 250  $\mu$ g/mL 제네티신(Geneticin)이 보충된 Hams F-12 배지에서 순수한 컨플루언시(neat confluency)까지 길렀다. 세포들을 5%  $CO_2$ , 37°C 배양기에서 길렀고, dPBS 중 2 mM EDTA로 들어올렸다. 세포들을 650 x g에서 5 분 원심분리함으로써 세포들을 포집하였고, 얻은 세포 펠렛을 -80°C에서 동결시켜 보관하거나 또는 사용을 위해 막을 즉시 제조하였다. 막 제조를 위해서는, 세포 펠렛을 용해 버퍼(lysis buffer)에서 다시 현탁하였고, Polytron PT-2100 조직 파괴기(tissue disrupter)(Kinematica AG; 20초 x 2 burst)로 균질화하였다. 정제되지 않은 상태의 막을 40,000 x g에서 15분 동안 4°C에서 원심분리시켰다. 그런 다음, 얻은 막 펠렛을 재-현탁 버퍼(re-suspension buffer)에서 다시 현탁시켰고, Polytron 조직 파괴기로 다시 균질화시켰다. 막 현탁액 중의 단백질 농도는 Lowry et al., 1951, Journal of Biochemistry, 193, 265에서 기술된 방법에 의해 결정되었다. 모든 막을 -80°C에서 분취된 상태로 동결시켜 보관하거나 또는 즉시 사용하였다. 제조된  $hM_5$  수용체 막의 분취된 상태를 PerkinElmer, Inc. (Wellesley, MA)으로부터 직접 구입하였고, 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

<283> 실시예 11

<284> 무스카린 수용체에 대한 방사성 리간드 결합 분석

<285> 클로닝된 무스카린 수용체에 대한 방사성 리간드 결합 분석은 전체 분석 부피 100  $\mu$ l로 96-웰 마이크로티터 플레이트(microtiter plate)에서 수행되었다.  $hM_1$ ,  $hM_2$ ,  $hM_3$ ,  $hM_4$  또는  $hM_5$  무스카린 서브타입을 안정하게 발현하는 CHO 세포 막을 하기의 특정한 표적 단백질 농도( $\mu$ g/웰)로 분석 버퍼에서 희석하였다: 유사한 시그널(signal)(cpm)을 얻도록  $hM_1$ 에 대해서는 10 $\mu$ g,  $hM_2$ 에 대해서는 10-15 $\mu$ g,  $hM_3$ 에 대해서는 10-20 $\mu$ g,  $hM_4$ 에 대해서는 10-20 $\mu$ g, 및  $hM_5$ 에 대해서는 10-12 $\mu$ g. 막을 분석 플레이트에 첨가하기 전에, 막을 Polytron 조직 파괴기를 사용하여 짧게 균질화시켰다(10 초). 방사성 리간드의  $K_D$  값을 결정하기 위한 포화 결합 연구(saturation

binding study)는 0.001 nM 내지 20 nM 범위의 농도에서 L-[N-메틸-<sup>3</sup>H]스코폴아민 메틸 클로라이드([<sup>3</sup>H]-NMS)(TRK666, 84.0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, 영국)를 사용하여 수행되었다. 테스트 화합물의 K<sub>i</sub> 값의 결정을 위한 치환 분석(displacement assay)은 1 nM [<sup>3</sup>H]-NMS 및 11개의 서로 다른 테스트 화합물 농도에서 수행되었다. 테스트 화합물을 처음에는 희석 버퍼(dilution buffer)에서 400 μM의 농도까지 용해시켰고, 그런 다음 희석 버퍼로 10 pM 내지 100 μM 범위의 최종 농도까지 5배 계대 희석(serially dilution)하였다. 분석 플레이트로 첨가하는 순서와 부피는 다음과 같다: 25 μl 방사성 리간드, 25 μl 희석된 테스트 화합물, 및 50 μl 막. 분석 플레이트를 37°C에서 60분 동안 배양하였다. 결합 반응은 1% BSA에서 미리 처리된 GF/B 유리 섬유 필터 플레이트(glass fiber filter plate)(PerkinElmer, Inc.)를 통한 급속 여과에 의해 종결되었다. 필터 플레이트를 수세 버퍼(wash buffer)(10 mM HEPES)로 3회 수세하여, 결합되지 않은 방사성 활성을 제거하였다. 그런 다음 플레이트를 공기 중에서 건조시켰고, 50 μl Microscint-20 액체 신타레이션 유액(liquid scintillation fluid)(PerkinElmer, Inc.)을 각각의 웰에 첨가하였다. 그런 다음, 플레이트를 PerkinElmer Topcount 액체 신타레이션 계측기(liquid scintillation counter) (PerkinElmer, Inc.)에서 계수하였다. 결합 데이터는 1-부위 경쟁 모델(one-site competition model)을 사용하여 GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)로 비선형 회귀 분석법에 의해 분석되었다. 테스트 화합물의 K<sub>i</sub> 값은 첵-프루소프 식(Cheng-Prusoff equation)(Cheng Y; Prusoff WH. (1973) Biochemical Pharmacology, 22(23):3099-1 08)을 사용하여, 관찰된 IC<sub>50</sub> 값 및 방사성 리간드의 K<sub>D</sub> 값으로부터 계산되었다. K<sub>i</sub> 값은 기하 평균과 95% 신뢰 구간을 결정하기 위해 pK<sub>i</sub> 값으로 변환되었다. 그런 다음, 이러한 요약 통계 결과는 데이터 기록을 위해 K<sub>i</sub> 값으로 다시 변환되었다.

<286> 이 분석에서, 더 낮은 K<sub>i</sub> 값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에 대해 더 높은 결합 친화도(binding affinity)를 갖고 있음을 나타낸다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIa)는 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> 및 M<sub>5</sub> 무스카린 수용체 서브타입에 대해 10 nM보다 낮은 K<sub>i</sub> 값을 가진 것으로 밝혀졌다.

<287> **실시예 12**

<288> **인간 β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> 또는 β<sub>3</sub> 아드레날린성 수용체를 발현하는 세포의 세포 배양과 그로부터 막 제조**

<289> 클로닝된 인간 β<sub>1</sub> 및 β<sub>2</sub> 아드레날린성 수용체를 안정하게 발현하는 인간 태생기 신장(Human embryonic kidney)(HEK-293) 세포 주 또는 클로닝된 인간 β<sub>3</sub> 아드레날린성 수용체를 안정하게 발현하는 중국 햄스터 난소(Chinese hamster ovarian)(CHO) 세포 주를 500 μg/mL 제네티신 존재 하에서 10% FBS를 갖는 DMEM 또는 Hams F-12 배지에서 순수한 컨플루언시까지 길렀다. 세포 단일층을 PBS 중 2 mM EDTA로 들어올렸다. 세포를 1,000 rpm에서 원심 분리에 의해 펠렛으로 만들었고, 얻은 세포 펠렛을 -80°C에서 동결시켜 보관하거나 또는 사용을 위해 즉시 막을 제조하였다. 막을 발현하는 β<sub>1</sub> 및 β<sub>2</sub> 수용체의 제조를 위해, 세포 펠렛을 용해 버퍼(10 mM HEPES/HCl, 10 mM EDTA, 4°C에서 pH 7.4)에서 다시 현탁시켰고, 얼음 상에서 단단히 고정된 Dounce glass homogenizer(30 storke)를 사용하여 균질화시켰다. 막을 발현하면서 프로테아제에 보다 민감함 β<sub>3</sub> 수용체에 대해서는, 세포 펠렛을 버퍼 50 mL 당 "Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets with 2 mM EDTA"(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 정제 한 개가 보충된 용해 버퍼(10 mM Tris/HCl, pH 7.4)에서 균질화시켰다. 얻은 균질화물을 20,000 x g에서 원심분리시켰고, 그 결과 얻은 펠렛을 상기와 같이 재-현탁 및 원심 분리한 다음 용해 버퍼로 1회 수세하였다. 그런 다음, 최종으로 얻은 펠렛을 얼음으로-냉각시킨 결합 분석 버퍼(binding assay buffer)(75 mM Tris/HCl pH 7.4, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA)에서 다시 현탁시켰다. 막 현탁액의 단백질 농도를 Lowry et al., 1951, Journal of Biological Chemistry, 193, 265; 및 Bradford, Analytical Biochemistry, 1976, 72, 248-54에서 기술된 방법에 의해 결정하였다. 모든 막을 분취된 상태로 -80°C에서 동결시켜 보관하거나 또는 즉시 사용하였다.

<290> **실시예 13**

<291> **인간 β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>, 및 β<sub>3</sub> 아드레날린성 수용체에 대한 방사성 리간드 결합 분석**

<292> 결합 분석은 분석 버퍼(75 mM Tris/HCl, 25°C에서 pH 7.4, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.2% BSA) 중 인간 β<sub>1</sub>,

$\beta_2$ , 또는  $\beta_3$  아드레날린성 수용체를 함유하는 막 단백질 10-15  $\mu\text{g}$ 을 갖고 전체 분석 부피가 100  $\mu\text{l}$ 인 96-웰 마이크로티터 플레이트에서 수행되었다. 방사성 리간드의  $K_D$  값을 결정하기 위한 포화 결합 연구는  $\beta_1$  및  $\beta_2$  수용체를 위한 [ $^3\text{H}$ ]-디히드로알프레놀올(NET-720, 100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) 및 0.01 nM 내지 20 nM 범위의 10개 또는 11개의 서로 다른 농도의 [ $^{125}\text{I}$ ]-(-)-요오도시아노핀돌올(NEX-189, 220 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA)을 사용하여 수행되었다. 테스트 화합물의  $K_i$  값의 결정을 위한 치환 분석은 1nM의 [ $^3\text{H}$ ]-디히드로알프레놀올 및 10 pM 내지 10  $\mu\text{M}$  범위의 테스트 화합물 10개 또는 11개의 서로 다른 농도에 대해 0.5 nM의 [ $^{125}\text{I}$ ]-(-)-요오도시아노핀돌올을 가지고 수행되었다. 비-특이적 결합은 10  $\mu\text{M}$  프로프라놀올 존재 하에서 결정되었다. 분석물은 1시간 동안 37°C에서 배양되었고, 그런 다음 결합 반응은  $\beta_1$  및  $\beta_2$  수용체 대해서는 GF/B, 또는  $\beta_3$  수용체에 대해서는 0.3% 폴리에틸렌이민에서 미리 침지시킨 GF/C 유리 섬유 필터 플레이트(Packard BioScience Co., Meriden, CT) 상에서 빠른 여과에 의해 종결되었다. 필터 플레이트를 여과 버퍼(filtration buffer)(75 mM Tris/HCl, 4°C에서 pH 7.4, 12.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA)로 3회 수세하여, 결합되지 않은 방사성 활성을 제거하였다. 그런 다음, 플레이트를 건조시켰고, Microscint-20 액체 신틸레이션 유액(Packard BioScience Co., Meriden, CT) 50 $\mu\text{l}$ 를 첨가하였고, Packard Topcount 액체 신틸레이션 계측기(Packard BioScience Co., Meriden, CT)에서 플레이트를 계수하였다. 결합 데이터를 1-부위 경쟁에 대해 3-파라미터 모델을 사용하는 GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 가지고 비선형 회귀 분석법에 의해 분석되었다. 곡선 최소값은 10  $\mu\text{M}$  프로프라놀올 존재 하에서 결정된 바와 같이 비특이적 결합을 위한 값으로 고정시켰다. 테스트 화합물의  $K_i$  값은 쉹-프루소프 식(Cheng Y, and Prusoff WH., Biochemical Pharmacology, 1973, 22, 23, 3099-108)을 사용하여 관찰된  $\text{IC}_{50}$  값 및 방사성 리간드의  $K_D$  값으로부터 계산하였다.

<293> 이 분석법에서, 더 낮은  $K_i$  값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에 대해 더 높은 결합 친화도를 갖고 있음을 나타낸다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIa)는  $\beta_2$  아드레날린성 수용체에 대해서는 10 nM보다 낮은  $K_i$  값을,  $\beta_1$  및  $\beta_3$  아드레날린성 수용체에 대해서는 1000 nM보다 높은  $K_i$  값을 가진 것으로 밝혀졌다.

<294> 실시예 14

<295> 무스카린 수용체 서브타입에 대한 길항 작용(antagonism)의 기능성 분석

<296> 분석 A - cAMP 축적의 아고니스트-매개된 억제제의 차단

<297> 이 분석법에서,  $\text{hM}_2$  수용체에 대한 안타고니스트로서 테스트 화합물의 기능성 역가(functional potency)는  $\text{hM}_2$  수용체를 발현하는 CHO-K1 세포에서 포르스콜린-매개된 cAMP 축적의 옥스트레몰린-매개된 억제를 테스트 화합물이 차단하는 능력을 측정함으로써 결정되었다. cAMP 분석은 제조자의 지시 사항에 따라, [ $^{125}\text{I}$ ]-cAMP를 갖는 플래쉬플레이트 아데닐일 시클라제 활성화 분석 시스템(Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System)(NEN SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA)을 사용하는 방사성 면역 분석 포맷(radioimmunoassay format)에서 수행되었다. 상기 세포 배양 및 막 제조 부분에서 기술한 바와 같이, 세포들을 dPBS로 1회 수세하였고, 세포들을 Trypsin-EDTA 용액 (0.05% trypsin/0.53 mM EDTA)으로 들어올렸다. 떨어져 나간 세포들을 50 mL dPBS 중에서 650 x g에서 5분 동안 원심분리함으로써 2회 수세하였다. 그런 다음, 얻은 세포 펠렛을 10 mL dPBS에서 다시 현탁하였고, 세포들을 Coulter ZI Dual Particle Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA)로 계수하였다. 세포들을 650 x g에서 5분 동안 다시 원심분리하였고, 자극 버퍼(stimulation buffer)에서  $1.6 \times 10^6$  내지  $2.8 \times 10^6$  세포/mL의 분석 농도까지 다시 현탁하였다.

<298> 테스트 화합물을 처음에는 희석 버퍼(dPBS 1 mg/mL BSA(0.1%))가 보충된 dPBS에서 400  $\mu\text{M}$ 의 농도까지 용해시켰고, 그런 다음 100  $\mu\text{M}$  내지 0.1 nM 범위의 최종 물 농도까지 희석 버퍼로 계대 희석하였다. 옥스트레몰린을 유사한 방식으로 희석하였다.

<299> 아데닐일 시클라제 활성의 옥스트레몰린 억제를 측정하기 위하여, 포르스콜린(dPBS에서 희석된 최종 농도 25  $\mu\text{M}$

M) 25  $\mu$ l, 희석된 옥소트레몰린 25  $\mu$ l, 및 세포 50  $\mu$ l를 아고니스트 분석 웰에 첨가하였다. 테스트 화합물이 옥소트레몰린-억제된 아데닐일 시클라제 활성을 차단하는 능력을 측정하기 위하여, 포르스콜린 및 옥소트레몰린 (dPBS에서 희석됨, 각각 최종 농도는 25  $\mu$ M 및 5  $\mu$ M) 25  $\mu$ l, 희석된 테스트 화합물 25  $\mu$ l, 및 세포 50  $\mu$ l를 남아있는 분석 웰에 첨가하였다. 반응물을 37°C에서 10분 동안 배양하였고, 얼음으로-차가워진 검출 버퍼 (detection buffer) 100  $\mu$ l를 첨가하여 중지시켰다. 플레이트를 밀봉하였고, 실온에서 밤새 교반하였고, 그 다음날 아침 PerkinElmer TopCount 액체 신틸레이션 계측기(PerkinElmer Inc., Wellesley, MA)에서 계수하였다. 생성된 cAMP의 함량(pmol/웰)은 제조자의 사용법 매뉴얼에서 기술된 바와 같이, 시료 및 cAMP 표준 물질에 대해 관찰된 계수에 기초하여 계산하였다. 데이터를 비-선형 회귀, 1-부위 경쟁 식을 사용하는 GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 사용한 비선형 회귀 분석법에 의해 분석하였다. 쉐-프루소프 식에 따라, 각각  $K_D$  및  $[L]$ 로서 나타나는 옥소트레몰린 농도-반응 곡선의  $EC_{50}$  및 옥소트레몰린 분석 농도를 사용하여,  $K_{obs}$ 를 계산하였다.

<300> 이 분석법에서는, 더 낮은  $K_{obs}$  값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에서 더 높은 기능성 활성을 갖고 있음을 나타낸다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIa)는 hM<sub>2</sub> 수용체를 발현하는 CHO-K1 세포에서 포르스콜린-매개된 cAMP 축적의 옥소트레몰린-억제의 차단을 위해 약 10 nM보다 낮은  $K_{obs}$  값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

<301> **분석 B - 아고니스트-매개된 [<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$  S 결합의 차단**

<302> 이 기능성 분석에서, hM<sub>2</sub> 수용체의 안타고니스트로서 테스트 화합물의 기능성 역가는 테스트 화합물이 hM<sub>2</sub> 수용체를 발현하는 CHO-K1 세포에서 옥소트레몰린-촉진된 [<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$  S 결합을 차단하는 능력을 측정함으로써 결정되었다.

<303> 동결된 막을 사용할 때에는, 동결된 막을 해동시켰고, 그런 다음 웰 당 5 내지 10  $\mu$ g 단백질의 최종 표적 농도로 분석 버퍼에서 희석하였다. 막을 Polytron PT-2100 조직 파괴기를 사용하여 잠시동안 균질화시켰고 그런 다음 분석 플레이트에 첨가하였다.

<304> 아고니스트 옥소트레몰린에 의한 [<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$  S의 결합에 대한  $EC_{90}$  값(90% 최대 반응을 위한 유효 농도)은 각각의 실험에서 결정되었다.

<305> 테스트 화합물이 옥소트레몰린-촉진된 [<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$  S 결합을 억제하는 능력을 결정하기 위하여, 96 웰 플레이트의 각각의 웰에 하기 물질들이 첨가되었다: [<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$  S가 있는 분석 버퍼(0.4nM) 25  $\mu$ l, 옥소트레몰린( $EC_{90}$ )과 GDP(3  $\mu$ M) 25  $\mu$ l, 희석된 테스트 화합물 25  $\mu$ l, 및 hM<sub>2</sub> 수용체를 발현하는 CHO 세포 막 25  $\mu$ l. 그런 다음, 분석 플레이트를 37°C에서 60분 동안 배양하였다. 분석 플레이트를 1% BSA-미리 처리된 GF/B 필터 상에서 PerkinElmer 96-웰 수확기(harvester)를 사용하여 여과하였다. 플레이트를 얼음으로-차갑게 만든 수세 버퍼로 3초 동안 3회 수세하였고, 그런 다음 공기 중에서 또는 진공 하에서 건조시켰다. Microscint-20 신틸레이션 액체(50  $\mu$ l)를 각각의 웰에 첨가하였고, 각각의 플레이트를 밀봉하였고, Topcounter (PerkinElmer) 상에서 방사성 활성을 계수하였다. 비-선형 회귀, 1-부위 경쟁 식을 사용하는 GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)로 비선형 회귀 분석법에 의해 데이터를 분석하였다. 분석법에서 테스트 화합물에 대해 농도-반응 곡선의  $IC_{50}$  값 및 옥소트레몰린 농도를 각각  $K_D$  및  $[L]$ , 리간드 농도로 사용하는 쉐-프루소프 식을 사용하여  $K_{obs}$ 를 계산하였다.

<306> 이 분석법에서는, 더 낮은  $K_{obs}$  값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에서 더 높은 기능성 활성을 갖고 있음을 나타낸다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIa)는 hM<sub>2</sub> 수용체를 발현하는 CHO-K1 세포에서 옥소트레몰린-촉진된 [<sup>35</sup>S]GTP  $\gamma$  S 결합의 차단을 위해 약 10 nM보다 낮은  $K_{obs}$  값을 갖는 것으로 밝혀졌다.

<307> **분석 C - FLIPR 분석을 통한, 아고니스트-매개된 칼슘 방출의 차단**

- <308> 이 기능성 분석에서, hM<sub>1</sub>, hM<sub>3</sub>, 및 cM<sub>5</sub> 수용체의 안타고니스트로서 테스트 화합물의 기능성 역가는 세포내 칼슘에 있어서 아고니스트-매개된 증가를 테스트 화합물이 억제하는 능력을 측정함으로써 결정되었다.
- <309> 상기 수용체들을 안정하게 발현하는 CHO 세포들을 분석하기 전날 밤에 96-웰 FLIPR 플레이트에 시딩(seeding)하였다. 시딩된 세포들을 Cellwash (MTX LabSystems, Inc.)를 사용하여 FLIPR 버퍼(FLIPR buffer)(칼슘 및 마그네슘이 없는 Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)에서 10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM 칼슘 클로라이드, 2.5 mM 프로베네시드)로 2회 수세하여, 성장 배지(growth media)를 제거하였다. 각각의 웰을 수세한 후에, 각각의 웰은 FLIPR 버퍼 50  $\mu$ l를 포함하였다. 그런 다음, 세포들을 4  $\mu$ M FLUO-4AM (2배 용액이 제조됨) 50  $\mu$ l/웰과 함께 37 °C에서 5% 이산화탄소 하에서 40분 동안 배양시켰다. 염색 배양 기간 다음에, 세포들을 FLIPR 버퍼로 2회 수세하여, 각각의 웰에 최종 부피 50  $\mu$ l를 유지하였다.
- <310> 테스트 화합물이 EC<sub>90</sub> 농도에서 옥스트레몰린 촉진에 대해 측정될 수 있도록 하기 위하여, 옥스트레몰린에 대한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 방출의 용량-의존성 촉진을 결정하였다. 먼저, 세포들을 화합물 희석 버퍼와 함께 20분 동안 배양하였고, 그런 다음 옥스트레몰린을 첨가하였다. 옥스트레몰린에 대한 EC<sub>90</sub> 값은 식  $EC_F = ((F/100-F)^{1/H}) * EC_{50}$ 과 관련하여, FLEPR 측정법 및 하기 데이터 정리 부분에서 열거된 방법에 따라 산출하였다. EC<sub>F</sub>의 3배인 옥스트레몰린 농도를 촉진 플레이트에서 제조하여, 옥스트레몰린의 EC<sub>90</sub> 농도를 테스트 분석 플레이트에 있는 각각의 웰에 첨가하였다.
- <311> FLIPR을 위해 사용된 파라미터는 다음과 같다: 0.4 초의 노출 시간, 0.5 와트의 레이저 세기, 488 nm의 여기 파장(excitation wavelength), 및 550 nm의 발광 파장. 기준선은 옥스트레몰린의 첨가 전에 10초 동안 형광의 변화를 측정함으로써 결정되었다. 옥스트레몰린 촉진 다음에, FLIPR는 1.5분 동안 0.5 내지 1 초 간격으로 형광의 변화를 연속적으로 측정함으로써 최대 형광 변화를 포착하였다. 형광의 변화는 각각의 웰에 대해 최대 형광 마이너스 기준 형광으로 표시하였다. 미가공 데이터를 테스트 화합물 농도의 로그 값에 대해 분석하였다.
- <312> S자형(sigmoidal) 용량-반응에 대해 빌트-인 모델(built-in model)을 사용하는 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)에 의해 테스트 화합물 농도의 로그값에 대해 미가공 데이터를 분석하였다. 안타고니스트 K<sub>obs</sub> 값은 첵-프루소프 식(Cheng & Prusoff, 1973)에 따라 K<sub>D</sub> 값으로서 옥스트레몰린 EC<sub>50</sub> 값을, 리간드 농도를 위해서는 옥스트레몰린 EC<sub>90</sub> 값을 사용하는 Prism에 의해 결정되었다.
- <313> 이 분석에서, 더 낮은 K<sub>obs</sub> 값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에서 더 높은 기능성 활성을 갖고 있음을 나타낸다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노}메틸)-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIa)는 hM<sub>1</sub>, hM<sub>3</sub> 및 cM<sub>5</sub> 수용체를 안정하게 발현하는 CHO 세포에서 아고니스트-매개된 칼슘 방출을 차단에 대해 약 10 nM 보다 낮은 K<sub>obs</sub> 값을 갖는 것으로 밝혀졌다.
- <314> **실시예 15**
- <315> **인간  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  또는  $\beta_3$  아드레날린성 수용체를 이중 발현하는 HEK-293 및 CHO 세포주에서 전체-세포 cAMP 플래쉬플레이트 분석(Whole-cell cAMP Flashplate Assay)**
- <316> cAMP 분석은 [<sup>125</sup>I]-CAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA)을 갖는 플래쉬플레이트 아데닐일 시클라제 활성화 분석 시스템(Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System)을 사용하는 방사성 면역 분석 포맷에서 제조자의 지침에 따라 수행되었다.  $\beta_1$  및  $\beta_2$  수용체 아고니스트 역가(potency)(EC<sub>50</sub>)의 결정을 위해서, 클로닝된 인간  $\beta_1$  및  $\beta_2$  수용체를 안정하게 발현하는 HEK-293 세포주를 10% FBS와 제네티신(500  $\mu$ g/mL)이 보충된 DMEM에서 거의 컨플루언시(confluency) 상태로 길렀다.  $\beta_3$  수용체 아고니스트 역가(EC<sub>50</sub>)의 결정을 위해서, 클로닝된 인간 또는  $\beta_3$  아드레날린성 수용체를 안정하게 발현하는 CHO-K1 세포주를 10% FBS와 제네티신(250  $\mu$ g/mL)이 보충된 Hams F-12 배지에서 거의 컨플루언시 상태로 길렀다. 세포들을 PBS로 수세하였고, 2 mM EDTA를 함유하는 dPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, CaCl<sub>2</sub> 및 MgCl<sub>2</sub>가 없음) 또는 트립신-EDTA 용액(0.05% 트립신/0.53 mM EDTA)에서 떼어내었다. Coulter 세포 계수기에서 세포를 계수한 후에, 1,000 rpm에서 원심분리하여 세포들을 펠렛으로 만들었고, 실온까지 미리 데운 IBMX (PerkinElmer Kit)를 함유

하는 촉진 버퍼에서  $1.6 \times 10^6$  내지  $2.8 \times 10^6$  세포/mL로 재-현탁시켰다. 이 분석에서는 웰당 약 40,000 내지 80,000 세포들을 사용하였다. 테스트 화합물(DMSO에서 10 mM)을 Beckman Biomek-2000에서 0.1% BSA를 함유하는 PBS로 희석하였고, 100  $\mu$ M 내지 1 pM 범위의 11개의 서로 다른 농도로 테스트시켰다. 반응물을 37°C에서 10분 동안 배양시켰고, [ $^{125}$ I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA)을 함유하는 차가운 검출 버퍼 100  $\mu$ l를 첨가함으로써 중지시켰다. 생성된 cAMP의 함량(pmol/웰)은 제조자의 사용자 지침에서 기술된 바와 같이 시료 및 cAMP 기준 물질에 대해 관찰된 카운트에 기초하여 계산되었다. 데이터를 S 자형 식에 의한 the GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)로 비선형 회귀 분석에 의해 분석하였다. 쉹-프루소프 식(Cheng Y, and Prusoff WH., Biochemical Pharmacology, 1973, 22, 23, 3099-108)을  $EC_{50}$  값을 계산하기 위해 사용하였다.

<317> 이 분석에서, 더 낮은  $EC_{50}$  값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에서 더 높은 기능성 활성을 갖고 있음을 나타낸다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIa)는  $\beta_2$  아드레날린성 수용체에 대해서는 약 10 nM보다 낮은  $EC_{50}$  값을 갖고 있고;  $\beta_1$  아드레날린성 수용체에 대해서는 약 30 nM보다 낮은  $EC_{50}$  값을 갖고 있고; 및  $\beta_3$  아드레날린성 수용체에 대해서는 약 700 nM보다 낮은  $EC_{50}$  값을 갖고 있는 것으로 밝혀졌다.

# <318> 실시예 16

## <319> 인간 $\beta_2$ 아드레날린성 수용체를 내생 발현하는 폐 상피세포 주로 전체-세포 cAMP 플래쉬플레이트 분석

<320> 이 분석에서는, 테스트 화합물의 아고니스트 역가 및 고유 활성(intrinsic activity)을  $\beta_2$  아드레날린성 수용체의 내생 수준(endogenous level)을 발현하는 세포주를 사용하여 결정하였다. 인간 폐 상피 세포주(BEAS-2B) (ATCC CRL-9609, American Type Culture Collection, Manassas, VA) (January B, et al., British Journal of Pharmacology, 1998, 123, 4, 701-11)로부터의 세포들을 완전한 무혈청 배지(에피네프린 및 레티노산을 함유하는 LHC-9 배지, Biosource International, Camarillo, CA)에서 75-90% 컨플루언시까지 길렀다. 분석하기 전날에, 배지들을 LHC-8(에피네프린 또는 레티노산이 없음, Biosource International, Camarillo, CA)로 바꾸었다. cAMP 분석은 [ $^{125}$ I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA)을 갖는 플래쉬플레이트 아데닐일 시클라제 활성화 분석 시스템을 사용하는 방사성면역 분석 포맷에서 제조자의 지시사항에 따라 수행되었다. 분석 당일에, 세포들을 PBS로 수세하였고, PBS에 넣은 5mM EDTA로 굼어냄으로써 들어올렸고, 계수하였다. 세포들을 1,000 rpm에서 원심분리하여 펠렛으로 만들었고, 37°C까지 미리 데운 촉진 버퍼에서 최종 농도 600,000 세포/mL가 되도록 다시-현탁시켰다. 이 분석에서는 100,000 내지 120,000 세포/웰의 최종 농도에서 세포들을 사용하였다. 테스트 화합물을 Beckman Biomek-2000에서 분석 버퍼(75 mM Tris/HCl 25°C에서 pH 7.4, 12.5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, 0.2% BSA)로 계대 희석하였다. 테스트 화합물을 10  $\mu$ M 내지 10 pM 범위의 11개의 서로 다른 농도로 분석에서 테스트하였다. 반응물을 37°C에서 10분 동안 배양시켰고, 얼음으로-차갑게 만든 검출 버퍼 100  $\mu$ l를 첨가하여 중지시켰다. 플레이트를 밀봉하였고 4°C에서 밤새 배양하였고, 그 다음날 아침 Topcount 신틸레이션 계측기(Packard BioScience Co., Meriden, CT)에서 계수하였다. 반응물 1 mL 당 생성된 cAMP의 함량은 제조자의 사용자 지침에서 기술된 바와 같이, 시료 및 cAMP 기준 물질에 대해 관찰된 카운트에 기초하여 계산되었다. S 자형 용량-반응에 대해 4개-파라미터 모델을 사용하는 GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)으로 비선형 회귀 분석에 의해 데이터를 분석하였다.

<321> 이 분석법에서는 더 낮은  $EC_{50}$  값은 테스트 화합물이 테스트된 수용체에서 더 높은 기능성 활성을 갖고 있음을 나타낸다. 비페닐-2-일카르바산 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(화합물 IIa)는 완전한  $\beta_2$  아고니스트인 이소프로테레놀(1.0)과 비교할 때 0.3보다 더 큰 고유 활성 값을 갖고 10 nM보다 낮은  $EC_{50}$  값을 갖고 있음이 밝혀졌다.

# <322> 실시예 17

## <323> 기관지보호 효능 및 지속 시간을 결정하기 위한 에인트호벤 분석(Einthoven Assay)

<324> 이 분석법에서는, 기니아 피그를 사용하여 테스트 화합물의 기관지보호 효능 및 지속 시간을 결정하였다. 이 분석법은 Einthoven (1892) Pfugers Arch. 51: 367 - 445; and Mohammed et al. (2000) Pulm Pharmacol Ther.

13 (6):287-92에서 기술된 방법으로부터 도출되었다. 이 분석법에서는, 폐 환기 압력(ventilation pressure)의 변화가 기도 저항(airway resistance)의 대체 측정치를 나타낸다. 테스트 화합물을 예비-처리한 다음에, 프로프라놀롤 존재 하에서 정맥내 메타콜린(methacholine)에 대한 기관지 수축제 용량-반응 곡선을 사용하여, 무스카린 안타고니스트 역가를 결정하였다. 마찬가지로,  $\beta_2$  아고니스트 기관지보호 역가를 히스타민을 사용하여 결정하였다. 합한 기관지보호 효능은 프라과놀롤 부재 하에서 메타콜린을 사용하여 결정되었다.

<325> 분석은 250 내지 450 g의 무게가 나가는 수컷 Duncan-Hartley 기니아 피그(Harlan, Indianapolis, IN)를 사용하여 수행되었다. 투여 용액 5 mL를 사용하고 신체 전체가 노출되는 투여 챔버(R+S Molds, San Carlos, CA)에서 10분 기간동안 흡입(inhalation, IH)에 의해 테스트 화합물 또는 비히클(즉, 멸균수)을 투여하였다. 22 psi의 압력으로 Bioblend(5% CO<sub>2</sub>; 21% O<sub>2</sub>; 및 74% N<sub>2</sub>의 혼합물)에 의해 추진되는 LC Star Nebulizer Set (Model 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA)로부터 생성되는 에어로졸에 동물들을 노출시켰다.

<326> 분석을 시작하기 75분 전에, 기니아 피그를 케타민(43.7 mg/kg)/크실라진(xylazine)(3.5 mg/kg)/아세프로마진(acepromazine)(1.05 mg/kg) 혼합물의 근육내(intramuscular, IM) 주입으로 마취시켰다. 이 혼합물의 추가 투여량(최초 투여량의 50%)은 필요할 때마다 투여되었다. 경정맥과 경동맥을 분리하였고 식염수로-채운 폴리에틸렌 카테터(각각 마이크로-레나탄(micro-renathane) 및 PE-50, Beckton Dickinson, Sparks, MD)로 캐놀러를 꽂았다. 혈압 측정을 하기 위해 경동맥을 압력 변환기(pressure transducer)에 연결하였고, 메타콜린(methacholine) 또는 히스타민의 IV 주입을 위해 경정맥 캐놀라를 사용하였다. 그런 다음, 기관을 유리 상태로 절개하였고, 14G 니들(#NE-014, Small Parts, Miami Lakes, FL)로 캐놀러를 꽂았다. 일단 캐놀레이션이 완료되면, 1 mL의 일회 박출량(stroke volume)/100 g 체중으로 그러나 2.5 mL 일회 박출량을 초과하지 않고, 1분 당 100회 박출의 속도로 고정된 인공 호흡 장치(Model 683, Harvard Apparatus, Inc., MA)를 사용하여 기니아 피그에 산소를 공급하였다. 환기 압력(ventilation pressure, VP)은 Biopac (TSD 137C) 전치 증폭기에 연결된 Biopac 전환기를 사용하여 기관 캐놀라에서 측정되었다. 체온은 히팅 패드(heating pad)를 사용하여 37°C에서 유지하였다. 데이터 수집을 개시하기 전에, 충동적인 호흡을 억제하고 안정한 기준선을 얻기 위하여, 펜토바비탈(25 mg/kg)을 복강내로(intraperitoneally, IP) 투여하였다. VP의 변화는 Biopac Windows 데이터 수집 인터페이스(interface)에 기록되었다. 기준선 값은 5분 이상 동안 수집되었고, 그 시간 이후에 기관지수축제(메타콜린 또는 히스타민) 2배 증분된 투여량을 기니아 피그에 IV로 비-누적적으로 투여하였다. 메타콜린이 기관지 수축제로 사용되었을 때, 테스트 화합물의 항무스카린 효능을 없애기 위해 동물들을 프로프라놀롤(5 mg/kg, IV)로 미리 처리하였다. 프로프라놀롤은 메타콜린 또는 히스타민에 대해 투여량-반응 곡선을 만들기 30분 전에 투여되었다. VP의 변화는 Acknowledge Data Collection Software (Santa Barbara, CA)를 사용하여 기록되었다. 연구가 완료된 후에, 동물들을 안락사시켰다.

<327> VP의 변화는 물의 cm로 측정되었다. VP의 변화(cm H<sub>2</sub>O) = 최고 압력(peak pressure)(기관지 수축제 투여 이후)-최고 기준 압력(peak baseline pressure). 메타콜린 또는 히스타민에 대해 투여량-반응 곡선은 Windows를 위해 GraphPad Prism, version 3.00을 사용하는 4개 파라미터 로그 방정식(logistic equation)에 맞추었다. 하기의 식이 사용되었다:

$$Y = \text{Min} + (\text{Max}-\text{Min}) / (1 + 10^{((\log \text{ID}_{50}-X) * \text{Hill slope})})$$

<329> 상기에서 X는 투여량의 로그이고, Y는 반응이다. Y는 Min에서 시작하고 S 자 형태로 Max에 점근선으로 접근한다.

<330> 메타콜린 또는 히스타민의 최대하 투여량(submaximal dose)에 대한 기관지 수축제 반응의 억제의 백분율은 하기의 식을 사용하여 테스트-화합물의 각각의 투여량에서 계산되었다:

<331> % 반응의 억제 = 100-((최고 압력 (기관지 수축제 처리 후, 처리 군) - 최고 기준 압력 (처리군) \*100% / (최고 압력 (기관지 수축제 처리 후, 물) - 최고 기준 압력 (물) x 100).

<332> 억제 곡선은 GraphPad software로부터의 4개 파라미터 로그 식을 사용하여 맞추었다. 또한, 적절한 곳에서는 ID<sub>50</sub>(기관지 수축제 반응의 50% 억제를 생성하는데 요구되는 투여량)과 Emax(최고 억제)를 평가하였다. 테스트 화합물의 흡입 이후에 서로 다른 시간 지점에서 기관지 보호의 크고 작음은 약력학적 반감기(PD T<sub>1/2</sub>)를 평가하는데 사용되었다. PD T<sub>1/2</sub>는 일-위상 지수 분해 식(one-phase exponential decay equation)(GraphPad Prism, Version 4.00)을 사용하고 비-선형 회귀 맞춤을 사용하여 결정되었다: Y=Span\*exp(-K\*X) + Plateau;

Span+Plateau에서 시작하여 비례 상수 K로 Plateau로 분해된다.  $PD\ T_{1/2} = 0.69/K$ . Plateau는 0으로 수렴하였다.

<333> 투여하고 1.5시간 후에, 비페닐-2-일카르바산 1-[2- $\mu$ g(4-{[(R)-2-(3-포르밀아미노-4-히드록시페닐)-2-히드록시 에틸아미노]메틸}-2,5-디메틸페닐카르바모일)에틸]피페리딘-4-일 에스테르(IIa)는 메타콜린-유도된 기관지 수축 및 히스타민-유도된 기관지 수축 모두에 대해 약 50  $\mu$ g/ml보다 낮은  $ID_{50}$ 을 갖는 것으로 밝혀졌다.

<334> 추가적으로, 이 화합물은 일 회 최대 투여량(100  $\mu$ g/mL)으로 투여되었을 때 약 72시간동안 유의성 있는 기관지 보호를 생성하였다. 이 분석법에서는, 살메테롤(3  $\mu$ g/mL)( $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트)은 6시간 내지 14시간 동안 유의성 있는 기관지 보호를 나타내었고; 티오토로피움(10  $\mu$ g/mL)(무스카린 수용체 안타고니스트)은 72시간보다 더 오랫동안 유의성 있는 기관지 보호를 나타내었다.

<335> 실시예 18

<336> 기관지 보호 효능 및 지속 시간을 결정하기 위한 체적 변동 기록계(Plethysmograph) 기니아 피그 분석

<337> 이 분석법에서는, 기니아 피그 분석을 사용하여 테스트 화합물의 기관지 보호 효능 및 지속 시간을 결정하였다.

<338> 250 내지 350 g의 체중이 나가는 수컷 6 마리의 기니아 피그(Duncan-Hartley (HsdPocDH) Harlan, Madison, WI)의 그룹을 각각 케이지 카드(cage card)로 구별하였다. 연구 전체에 걸쳐, 동물들이 자유롭게 음식과 물에 접근가능하도록 하였다. 신체 전체 투여 챔버(R&S Molds, San Carlos, CA)에서 테스트 화합물을 10분 동안 흡입에 의해 투여하였다. 에어로졸이 중앙에 있는 다기관으로부터 6개의 개별적인 챔버로 자발적으로 전달될 수 있도록 투여 챔버를 배치시켰다. 기니아 피그를 테스트 화합물 또는 비히클(WFI)의 에어로졸에 노출시켰다. 에어로졸은 22 psi의 압력 하에서 기체 혼합물( $CO_2 = 5\%$ ,  $O_2 = 21\%$  및  $N_2 = 74\%$ )에 의해 추진되는 LC Star Nebulizer Set (Model 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA)를 사용하여 수용액으로부터 발생되었다. 이러한 작동 압력에서 네블라이저를 통한 기체의 흐름은 대략 1분 당 3 L가 되었다. 생성된 에어로졸은 양의 압력에 의해 챔버 안으로 이동되었다. 에어로졸화되는 용액의 전달 동안에는 희석 공기는 사용되지 않았다. 10분 동안 분무하는 동안에, 대략 1.8 mL의 용액이 분무되었다. 이 값은 충전된 네블라이저의 분무-전 및 분무-후 중량을 비교함으로써 중량 측정법으로 측정되었다.

<339> 흡입에 의해 투여된 테스트 화합물의 기관지 보호 효능은 투여-후 1.5, 24, 48, 72시간에 신체 전체에 대해 체적 변동 기록계를 사용하여 평가되었다. 폐에 대해 평가를 시작하기 45분 전에, 각각의 기니아 피그를 케타민(43.75 mg/kg), 크실라진(3.50 mg/kg) 및 아세프로마진(1.05 mg/kg)의 근육내 주사로 마취시켰다. 수술할 부위의 털을 제거하고 70% 알코올로 세정하였고, 목의 복부 형태의 2 내지 3 cm의 중앙 절개를 하였다. 경정맥을 분리하였고, 식염수로-채운 폴리에틸렌 카테터로 캐놀라하여 식염수 중 아세틸콜린 또는 히스타민의 근육내 주입이 가능하도록 하였다. 그런 다음, 기관을 절개하였고 14G 테플론 튜브(#NE-014, Small Parts, Miami Lakes, FL)로 캐놀라하였다. 필요하다면, 마취제용 혼합물의 추가적인 근육내 주입에 의해 마취 상태를 유지하였다. 마취가 깊은 정도를 모니터링하였고, 동물이 발의 찢림에 반응하거나 또는 호흡 속도가 1분 당 100 호흡수보다 더 커졌다면 조절하였다.

<340> 일단 캐놀레이션이 완료되면, 동물들을 체적 변동 기록계(#PLY3114, Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT)에 두었고, 식도 압력 캐놀라(esophageal pressure cannula)(PE-160, Becton Dickinson, Sparks, MD)를 삽입하여 폐 운동 압력(pulmonary driving pressure)을 측정하였다. 테플론 기관 튜브를 체적 변동 기록계의 튜브에 부착시켜, 기니아 피그가 챔버 외부로부터의 실내 공기를 호흡할 수 있도록 하였다. 그런 다음, 챔버를 밀봉하였다. 체온을 유지하기 위해 가열 램프를 사용하였고, 기니아 피그의 폐를 10 mL의 눈금 시린지(#5520 Series, Hans Rudolph, Kansas City, MO)를 사용하여 공기 4 mL로 3회 팽창시켜, 하루 기도가 허탈하지 않고 동물이 과호흡 증후군으로 고통스럽지 않도록 하였다.

<341> 기준값이 순응하는 동안 cm H<sub>2</sub>O 당 0.3 내지 0.9 mL 범위에 있고 저항하는 동안 1초당 1 mL당 0.1 내지 0.199 cm H<sub>2</sub>O 범위에 있음을 결정한 후에, 폐에 대한 평가를 시작하였다. 폐에 대한 수치의 수집 및 도출을 위해서, Buxco 폐 측정 컴퓨터 프로그램을 사용하였다. 프로그램의 시작은 실험 프로토콜 및 데이터 수집을 개시하였다. 매번의 호흡으로 체적 변동 기록계에서 일어나는 시간에 대한 체적의 변화를 Buxco 압력 전환기를 통해 측정하였다. 시간에 대해 이 신호값을 적분함으로써, 매번의 호흡 동안 유출량(flow)의 측정값이 계산되었다. Sensym 압력 전환기(TRD4100)를 사용하여 수집된, 이러한 신호 및 폐 운동 압력은 Buxco (MAX 2270) 전치 증폭기를 통

해 데이터 수집 인터페이스(SFT3400 및 SFT3813)에 연결되었다. 그 밖의 다른 폐에 대한 파라미터는 이러한 두 개의 입력값으로부터 도출되었다.

<342> 기준값은 5분 동안 수집되었고, 그 시간 이후에 기니아 피그에 아세틸콜린 또는 히스타민을 시도하였다. 테스트 화합물의 무스카린 안타고니스트 효능을 평가할 때에는 프로파놀올(5 mg/Kg, iv) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 아세틸콜린 시도하기 15분 전에 투여하였다. 아세틸콜린(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (0.1 mg/mL)은 시린지 펌프(sp210iw, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL)로부터 1분 동안 정맥내로 하기의 투여량 및 실험 개시로부터 지정된 시간에 투여되었다: 5분에는 1.9  $\mu$ g/분, 10분에는 3.8  $\mu$ g/분, 15분에는 7.5  $\mu$ g/분, 20분에는 15.0  $\mu$ g/분, 25분에는 30  $\mu$ g/분 및 30분에는 60  $\mu$ g/분. 택일적으로는, 테스트 화합물의 기관지 보호 효능은 프로파놀올의 사전 처리 없이 아세틸콜린 시도 모델에서 평가되었다.

<343> 테스트 화합물의  $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트 효능을 평가할 때에는, 히스타민(25  $\mu$ g/mL)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 시린지 펌프로부터 1분 동안 정맥내로 하기의 투여량 및 실험 개시로부터 지정된 시간에 투여하였다: 5분에 0.5  $\mu$ g/분, 10분에 0.9  $\mu$ g/분, 15분에 1.9  $\mu$ g/분, 20분에 3.8  $\mu$ g/분, 25분에 7.5  $\mu$ g/분 및 30분에 15  $\mu$ g/분. 각각의 아세틸콜린 또는 히스타민 투여한 다음 3분에 저항 또는 순응이 기준값으로 되 돌아오지 않는다면, 기니아 피그의 폐를 10 mL 눈금 시린지로부터 4 mL의 공기로 3회 팽창시켰다. 기록된 폐에 대한 파라미터는 호흡 빈도수(1분 당 호흡수), 순응값(cm H<sub>2</sub>O당 mL), 및 폐 저항값(1 초당 1 mL 당 cm H<sub>2</sub>O)을 포함하였다. 일단 폐에 대한 기능 측정이 이 프로토콜 35분에 완료되면, 기니아 피그를 체적 변동 기록계로부터 빼내고 이산화탄소 질식으로 안락사시켰다.

<344> 데이터를 두 가지 방법 중 하나로 평가하였다:

<345> (a) 폐 저항값(Pulmonary resistance,  $R_L$ )(1 초당 1 mL 당 cm H<sub>2</sub>O)은 압력의 변화에 대한 흐름의 변화의 비율로부터 계산되었다. 아세틸콜린에 대한  $R_L$  반응은 비히클 및 테스트 화합물에 대해 계산되었다. 각각의 사전-처리 시간에서 비히클-처리된 동물에서의 평균 아세틸콜린 반응이 계산되었고, 각각의 테스트 화합물 투여시 상응하는 사전-처리 시간에서 아세틸콜린 반응의 억제 퍼센트를 계산하는데 사용되었다. ' $R_L$ '을 위한 억제 투여량-반응 곡선은 기관지 보호 ID<sub>50</sub>(아세틸콜린(60  $\mu$ g/분) 기관지 수축 반응을 50% 억제시키기 위해 필요한 투여량)를 평가 하기 위해 Windows에 대해 GraphPad Prism, version 3.00(GraphPad Software, San Diego, California)을 사용하는 4개의 파라미터 로그 식을 사용하여 맞추었다. 하기의 식을 사용하였다:

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

<346>

<347> 상기에서 X는 투여량의 로그이고, Y는 반응( $R_L$ 에서 아세틸콜린-유도된 증가의 억제 백분율)이다. Y는 Min에서 시작하고 S 자 형태로 Max에 점근선으로 접근한다.

<348> (b) 기준값 폐 저항값의 두 배를 유발하기 위해 필요한 아세틸콜린 또는 히스타민의 함량으로 정의되는 함량 PD<sub>2</sub>는 하기 식(American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing - 1999. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161: 309-329에서 기술된 PC<sub>20</sub> 값을 계산하기 위해 사용된 식으로부터 도출됨)을 사용하여 아세틸콜린 또는 히스타민 시도 범위에 걸쳐 흐름 및 압력으로부터 유도된 폐 저항값을 사용하여 계산되었다.

$$\text{PD}_2 = \text{antilog} \left[ \log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1)(2R_0 - R_1)}{R_2 - R_1} \right]$$

<349>

<350> 상기에서:

<351>  $C_1$  =  $C_2$  전의 아세틸콜린 또는 히스타민의 농도

<352>  $C_2$  = 폐 저항값( $R_L$ )에서 2배 이상의 증가를 만드는 아세틸콜린 또는 히스타민의 농도

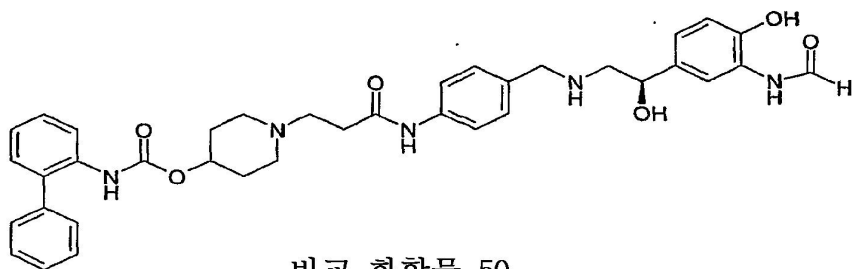
<353>  $R_0$  = 기준  $R_L$  값

<354>  $R_1 = C_1$  이후의  $R_L$  값

<355>  $R_2 = C_2$  이후의  $R_L$  값

<356> 데이타의 통계학적 분석은 two tailed Students t-test를 사용하여 수행되었다. P 값  $<0.05$ 은 유의성이 있다고 간주되었다.

<357> 2004년 8월 24일에 공개된 미국특허출원 No. US 2004/0167167A1에서 기술된 화합물 50이 이 분석법에서 테스트 되었다. 화합물 50의 화학 구조는 다음과 같다:



비교 화합물 50

<358>

<359> 이 화합물은 본 발명의 화합물의 페닐 고리에 존재하는 알킬 기가 결여되어 있다. 이 분석법에서, 화합물 50은  $3 \mu\text{g/mL}$  내지  $300 \mu\text{g/mL}$  범위의 투여 동안 투여-후 24시간 동안 유의성 있는 기관지 보호를 보여주지 않았다. 24시간에 화합물 50의 PD<sub>2x</sub> 값은 비히클(물) 군과 유사하였다.

<360> 이 분석법에서, 살메테롤( $100 \mu\text{g/mL}$ )( $\beta_2$  아드레날린성 수용체 아고니스트)은 24시간 이상 동안 유의성 있는 기관지 보호를 나타내었고; 티오토로피움( $10 \mu\text{g/mL}$ )(무스카린 수용체 안타고니스트)은 24시간 이상 동안 유의성 있는 기관지 보호를 나타내었다.

<361> 본 발명이 특정 실시 형태 또는 그의 구체예를 참조로 하여 기술되었지만, 본 발명의 진정한 정신 및 범위를 벗어나지 않는다면 다양한 변화가 있을 수 있거나 또는 등가물이 치환될 수 있음을 당해 분야의 당업자들에게 이해될 것이다. 추가적으로, 적용가능한 특허 상태 및 규제에 의해 허용되는 정도까지는, 본 명세서에서 인용된 모든 공개 문헌, 특허 및 특허 출원은 각각의 문서가 개별적으로 본 명세서에서 참조로 통합된 바와 같이 동일한 정도로 전문으로 참조로 통합되어 있다.

<362>

<363>

<364>

<365>

<366>

<367>

<368>