

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290488 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.11(51) Int. Cl. C07D 231/14 (2006.01)
C07C 237/40 (2006.01)
C07C 231/02 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.08.05

(54) СИНТЕЗ ИНГИБИТОРА ПЛАЗМЕННОГО КАЛЛИКРЕИНА В ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ОБЪЕМЕ

(31) 62/883,396

(32) 2019.08.06

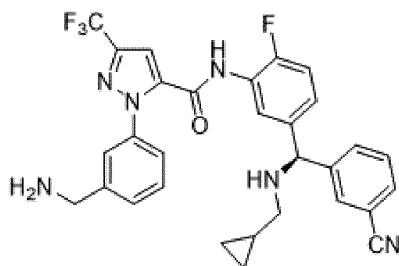
(33) US

(86) PCT/US2020/044921

(87) WO 2021/026182 2021.02.11

(71) Заявитель:
БАЙОКРИСТ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)(72) Изобретатель:
Эль-Каттан Яхия, Бабу Ярлагадда С.
(US)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты способы получения соединения I и его солей. Способы получения соединения I подходят для использования в технологическом объеме.



202290488

A1

A1

202290488

**СИНТЕЗ ИНГИБИТОРА ПЛАЗМЕННОГО КАЛЛИКРЕИНА В
ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ОБЪЕМЕ**

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/883396, поданной 6 августа 2019 г.

Уровень техники

Сериновые протеазы составляют самую большую и наиболее изученную группу протеолитических ферментов. Их важные роли в физиологических процессах распространяются на такие разнообразные области, как свертывание крови, фибринолиз, активация комплемента, восстановление, расщепление и высвобождение физиологически активных пептидов. Многие из этих жизненно важных процессов начинаются с расщепления одинарной пептидной связи или нескольких пептидных связей в белке-предшественнике или пептидах. Последовательные ограниченные протеолитические реакции или каскады участвуют в свертывании крови, фибринолизе и активации комплемента. Биологические сигналы для запуска этих каскадов также можно контролировать и усиливать. Аналогично контролируемый протеолиз может отключить или инактивировать белки или пептиды за счет расщепления одинарной связи.

Калликреины представляют собой подгруппу сериновых протеаз. У человека плазменный калликреин (KLKB1) не имеет известного гомолога, в то время как тканевые калликреин-родственные пептидазы (KLK) кодируют семейство из пятнадцати близкородственных сериновых протеаз. Плазменный калликреин участвует в ряде путей, относящихся к внутреннему пути коагуляции, воспаления и системы комплемента.

Коагуляция представляет собой процесс, при котором кровь образует сгустки, например, для остановки кровотечения. Физиология коагуляции несколько сложна, поскольку включает два отдельных начальных пути, которые сливаются в конечный общий путь, ведущий к образованию сгустка. В конечном общем пути протромбин превращается в тромбин, который, в свою очередь, превращает фибриноген в фибрин, последний является основным строительным блоком сшитых полимеров фибрина, образующих гемостатическую пробку. Из двух начальных путей, расположенных выше конечного общего пути, один известен как контактная активация или внутренний путь, а другой известен как тканевой фактор или внешний путь.

Внутренний путь начинается с образования на коллагене первичного комплекса с помощью высокомолекулярного кининогена (HMWK), прокалликреина и FXII (фактор XII; фактор Хагемана). Прокалликреин превращается в калликреин, а FXII активируется, превращаясь в FXIIa. Затем FXIIa преобразует фактор XI (FXI) в FXIa, а FXIa, в свою очередь, активирует фактор IX (FIX), который вместе со своим кофактором FVIIIa образует «теназный» комплекс, который активирует фактор X (FX) в FXa. Именно FXa отвечает за превращение протромбина в тромбин в конечном общем пути.

Прокалликреин, неактивный предшественник плазменного калликреина, синтезируется в печени и циркулирует в плазме крови связанным с НМWK или в виде свободного зимогена. Прокалликреин расщепляется активированным фактором XII (FXIIa) с высвобождением активированного плазменного калликреина (РК). Активированный плазменный калликреин проявляет эндопептидазную активность в отношении пептидных связей после аргинина (предпочтительно) и лизина. Затем РК генерирует дополнительный FXIIa в цикле обратной связи, который, в свою очередь, активирует фактор XI (FXI) в FXIa для соединения с общим путем. Хотя первоначальная активация внутреннего пути происходит за счет небольшого количества FXIIa, активирующего небольшое количество РК, именно последующая активация обратной связи FXII с помощью РК контролирует степень активации внутреннего пути и, следовательно, коагуляцию ниже. Hathaway, W. E., et al. (1965) *Blood* 26:521-32.

Активированный плазменный калликреин также расщепляет НМWK с высвобождением мощного сосудорасширяющего пептида брадикинина. Он также способен расщеплять ряд неактивных белков-предшественников с образованием активных продуктов, таких как плазмин (из пламиногена) и урокиназа (из проурокиназы). Плазмин, регулятор коагуляции, протеолитически расщепляет фибрин на продукты распада фибрина, которые ингибируют чрезмерное образование фибрина.

У пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда (МИ), наблюдаются клинические признаки гиперкоагуляции (образования тромбов). Эта гиперкоагуляция парадоксальным образом дополнительно усугубляется у людей, получающих фибринолитическую терапию. Повышенное образование тромбина, измеряемое уровнями тромбина-антитромбина III (ТАТ), наблюдается у пациентов, получающих такое лечение, по сравнению с уже высокими уровнями, наблюдаемыми у пациентов, получающих только гепарин. Hoffmeister, H. M. et al. (1998) *Circulation* 98:2527-33. Было высказано предположение, что увеличение тромбина является результатом опосредованной плазмином активации внутреннего пути посредством прямой активации FXII плазмином.

Индукцированная фибринолизом гиперкоагуляция не только приводит к увеличению частоты повторной окклюзии, но и, вероятно, является причиной по меньшей мере частичной неспособности достичь полного фибринолиза сгустка крови (тромба), что является основным недостатком фибринолитической терапии (Keeley, E. C. et al. (2003) *Lancet* 361: 13-20). Другой проблемой фибринолитической терапии является сопутствующий ей повышенный риск внутримозгового кровоизлияния. Menon, V. et al. (2004) *Chest* 126:549S-575S; Fibrinolytic Therapy Trialists' Collaborative Group (1994) *Lancet* 343:311-22. Следовательно, дополнительная антикоагулянтная терапия, которая не увеличивает риск кровотечения, но ингибирует образование нового тромбина, была бы очень полезной.

Ингибиторы плазменного калликреина также обладают терапевтическим потенциалом для лечения наследственного ангионевротического отека (НАЕ). НАЕ представляет собой серьезное и потенциально опасное для жизни редкое генетическое

заболевание, вызванное мутациями в гене ингибитора C1-эстеразы (C1INH), расположенном на хромосоме 11q. НАЕ наследуется как аутосомно-доминантное заболевание, хотя четверть диагностированных случаев возникает в результате новой мутации. НАЕ классифицируется как орфанное заболевание в Европе с предполагаемой распространенностью 1 на 50 000. Субъекты с НАЕ испытывают повторяющиеся острые приступы болезненного подкожного или подслизистого отека лица, гортани, желудочно-кишечного тракта, конечностей или гениталий, которые при отсутствии лечения могут длиться до 5 дней. Приступы различаются по частоте, тяжести и локализации и могут быть опасными для жизни. Наибольший риск представляют ларингеальные приступы с возможностью удушья. Абдоминальные приступы особенно болезненны и часто приводят к диагностическим процедурам или ненужному хирургическому вмешательству. Лицевые и периферические приступы обезображивают и истощают.

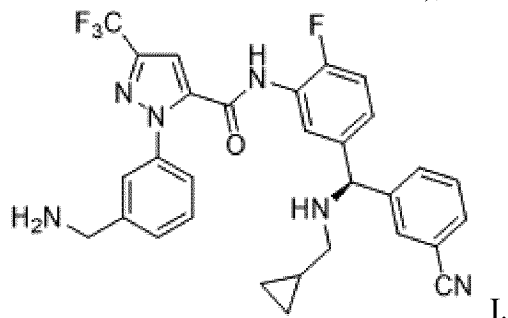
НАЕ имеет несколько подтипов. НАЕ типа I определяется мутациями гена C1INH, которые приводят к низким уровням ингибитора C1, тогда как НАЕ типа II определяется мутациями, которые приводят к нормальным уровням неэффективного белка C1. НАЕ типа III имеет отдельный патогенез, вызванный мутациями в гене F12, который кодирует сериновую протеазу, известную как фактор XII. Диагностические критерии для различения подтипов НАЕ и отличия НАЕ от других ангионевротических отеков можно найти в работе Ann Allergy Asthma Immunol 2008; 100(Suppl2): S30-S40 and J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 629-37, включенной в настоящий документ в качестве ссылки.

Современные методы лечения НАЕ делятся на два основных типа. Старые неспецифические методы лечения, включая андрогены и антифибринолитики, связаны со значительными побочными эффектами, особенно у женщин. Новые методы лечения основаны на понимании молекулярной патологии заболевания, а именно на том, что C1INH является наиболее важным ингибитором калликреина в плазме крови человека, и что дефицит C1INH приводит к беспрепятственной активации калликреин-брадикининового каскада, при этом брадикинин является наиболее важным посредником местного повышения проницаемости сосудов, что является признаком приступа. Все доступные в настоящее время целенаправленные виды терапии проводятся внутривенно или подкожно. В настоящее время не существует специальной целенаправленной пероральной продолжительной терапии НАЕ.

Таким образом, существует потребность в разработке ингибиторов РК, которые могут склонить баланс фибринолиза/тромбоза в окклюзирующей тромбе в сторону растворения, тем самым способствуя реперфузии, а также ослабляя состояние гиперкоагуляции, тем самым предотвращая повторное образование тромба и повторную окклюзию сосуда. В частности, создание специфичных ингибиторов плазменного калликреина, которые могут быть составлены для применения *in vivo*, может привести к созданию нового класса терапевтических средств. Таким образом, необходимы усовершенствованные способы получения и составления ингибиторов плазменного калликреина, особенно в технологическом объеме.

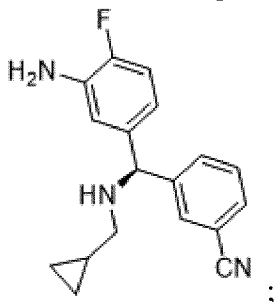
Сущность изобретения

Один аспект изобретения относится к синтезу соединения **I** или его соли, который можно проводить в технологическом объеме (например, для получения около 100 килограмм соединения **I** или его соли);

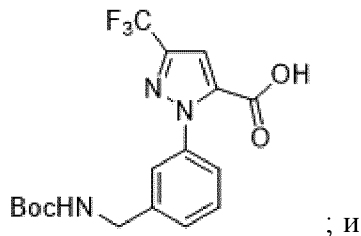


В определенных аспектах изобретение предусматривает способ, включающий стадию объединения соединения **C** или его соли и соединения **F** или его соли в условиях, достаточных для получения соединения **D** или его соли, где:

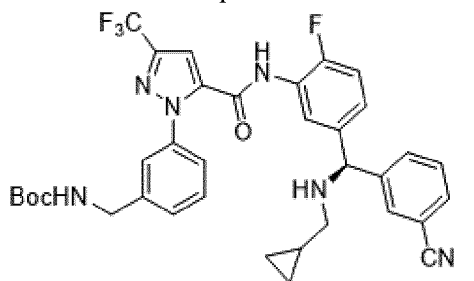
соединение **C** представлено с помощью:



соединение **F** представлено с помощью:

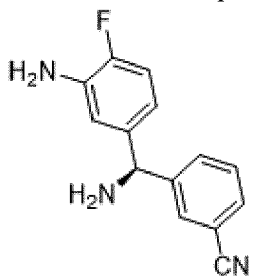


соединение **D** представлено с помощью:



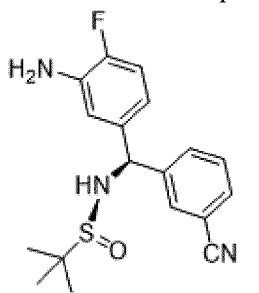
В определенных аспектах способ дополнительно включает (a) объединение соединения **B** или его соли и $\triangle\text{-CHO}$ с образованием первой реакционной смеси, затем (b) объединение первой реакционной смеси с восстанавливающим средством в условиях, достаточных для образования соединения **C** или его соли; при этом:

соединение **В** представлено с помощью:



В определенных аспектах способ дополнительно включает (а) объединение соединения **А** и второй кислоты в условиях, достаточных для образования соединения **В** или его соли; при этом:

соединение **А** представлено с помощью:



В определенных аспектах способ дополнительно включает (с) объединение соединения **Д** и реагента для удаления защиты с образованием второй реакционной смеси, затем (d) подвергание второй реакционной смеси воздействию условий, достаточным для образования соединения **І** в качестве свободного основания.

В определенных аспектах способ дополнительно включает е) обеспечение первой смеси свободного основания соединения **І** в качестве свободного основания в четвертом органическом растворителе; f) объединение смеси свободного основания с первым раствором реагента, содержащим четвертую кислоту и пятый органический растворитель, в условиях, достаточных для образования третьей реакционной смеси, содержащей соль соединения **І**; и g) кристаллизацию соли соединения **І** из смеси, содержащей соль соединения **І**.

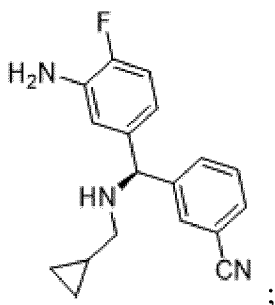
Подробное описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к синтезу соединения **І**, который можно осуществить в технологическом объеме (например, для получения около 100 кг соединения **І**).

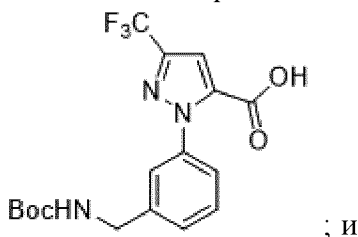
Способы получения соединения І

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способу, включающему стадию объединения соединения **С** или его соли и соединения **F** или его соли в условиях, достаточных для получения соединения **Д** или его соли, где:

соединение **С** представлено с помощью:

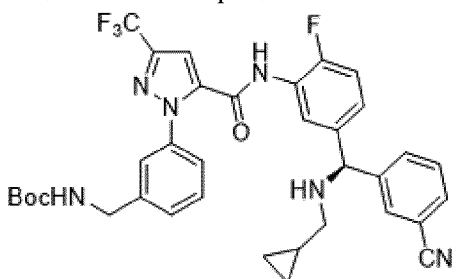


соединение **F** представлено с помощью:



; и

соединение **D** представлено с помощью:



В определенных вариантах осуществления условия, достаточные для получения соединения **D**, включают реагент, связывающий амид, и первое основание.

В определенных вариантах осуществления реагент, связывающий амид, представляет собой ангидрид пропилфосфоновой кислоты (ТЗР), N, N'-ди(изопропил)карбодиимид, N, N'-ди(циклогексил)карбодиимид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид или этил-2-циано-2-(гидроксиимино)ацетат; предпочтительно реагент, связывающий амид, представляет собой ангидрид пропилфосфоновой кислоты (ТЗР).

В определенных вариантах осуществления первое основание представляет собой первое органическое основание. Иллюстративные органические основания включают основания на основе амина и основания на основе алкоксида. В определенных вариантах осуществления первое основание представляет собой триэтиламин, пиридин, диизопропилэтиламин, диизопропилметиламин, имидазол, пиримидин, N-метилморфолин, хинуклидин или 1,4-диазабицикло[2.2.2]октан (DABCO). В предпочтительных вариантах осуществления первое основание представляет собой пиридин.

В определенных вариантах осуществления условия, достаточные для получения соединения **D**, дополнительно включают первый растворитель. Первый растворитель может представлять собой полярный апротонный растворитель, такой как дихлорметан,

тетрагидрофуран, ацетон, ацетонитрил или этилацетат. В предпочтительных вариантах осуществления первый растворитель представляет собой этилацетат.

В определенных вариантах осуществления соединение **C** присутствует в виде кислой соли; и способ дополнительно включает стадию объединения кислой соли соединения **C** со вторым водным основанием, образуя тем самым свободное основание соединения **C**; при этом стадию объединения кислой соли соединения **C** со вторым водным основанием выполняют до объединения соединения **C** и соединения **F**.

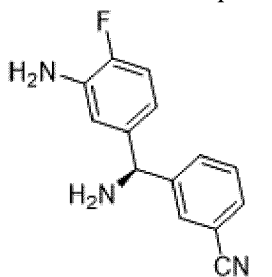
В определенных вариантах осуществления «кислая соль» означает соль, которая образуется в присутствии кислоты Брэнстеда. Например, такой амин, как $R-NH_2$, легко протонируется кислотой Брэнстеда $H-X$ с образованием $R-NH_3^+ X^-$. Таким образом, $R-NH_3^+ X^-$ является кислой солью $R-NH_2$. Общие кислоты Брэнстеда, которые могут вызывать образование кислой соли, включают хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, йодистоводородную кислоту и щавелевую кислоту. При контакте с амином такие кислоты Брэнстеда могут вызывать образование хлористоводородных солей, бромистоводородных солей, йодистоводородных солей или солей щавелевой кислоты соответственно.

В определенных вариантах осуществления кислая соль соединения **C** представляет собой хлористоводородную соль, бромистоводородную соль, йодистоводородную соль или щавелевую кислотную соль. Предпочтительно кислая соль соединения **C** представляет собой щавелевую кислотную соль.

В определенных вариантах осуществления второе водное основание включает гидроксид калия, гидроксид натрия, гидроксид аммония, бикарбонат калия, бикарбонат натрия, карбонат калия или карбонат натрия. В предпочтительных вариантах осуществления второе водное основание включает гидроксид калия.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает (a) объединение соединения **B** или его соли и  с образованием первой реакционной смеси, затем (b) объединение первой реакционной смеси с восстанавливающим средством в условиях, достаточных для образования соединения **C** или его соли; при этом:

соединение **B** представлено с помощью:



В определенных вариантах осуществления восстанавливающее средство представляет собой $LiAlH_4$ или $NaBH_4$, предпочтительно $NaBH_4$.

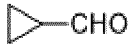
В определенных вариантах осуществления условия, достаточные для получения соединения **C**, дополнительно включают второй растворитель.

В определенных вариантах осуществления второй растворитель представляет собой второй полярный протонный растворитель. Иллюстративные полярные протонные растворители включают метанол, этанол и изопропанол. В определенных вариантах осуществления второй растворитель представляет собой метанол.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение в контакт соединения **C** с первой кислотой с образованием кислой соли соединения **C**.

В определенных таких вариантах осуществления первая кислота представляет собой хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, йодистоводородную кислоту или щавелевую кислоту; а кислая соль соединения **C** представляет собой хлористоводородную соль, бромистоводородную соль, йодистоводородную соль или щавелевую кислую соль. В предпочтительных вариантах осуществления первая кислота представляет собой щавелевую кислоту и кислая соль соединения **C** представляет собой щавелевую кислую соль.

В определенных вариантах осуществления соединение **B** присутствует в виде кислой соли; и способ дополнительно включает стадию объединения соли соединения **B** с третьим органическим основанием, образуя тем самым свободное основание соединения **B**;

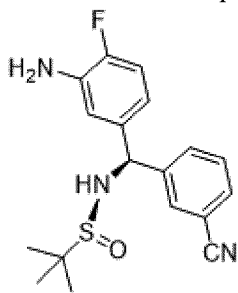
при этом стадию объединения соли соединения **B** с третьим органическим основанием выполняют до объединения соединения **B** и .

В определенных таких вариантах осуществления кислая соль соединения **B** представляет собой хлористоводородную соль, бромистоводородную соль или йодистоводородную соль. Предпочтительно кислая соль соединения **B** представляет собой хлористоводородную соль.

В определенных вариантах осуществления третье органическое основание включает метоксид натрия.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает (а) объединение соединения **A** и второй кислоты в условиях, достаточных для образования соединения **B** или его соли; при этом:

соединение **A** представлено с помощью:



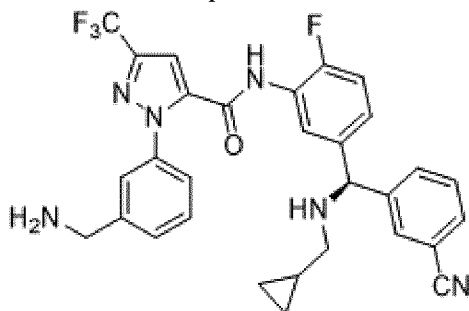
В определенных вариантах осуществления вторая кислота представляет собой хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту или йодистоводородную кислоту, предпочтительно хлористоводородную кислоту.

В определенных вариантах осуществления условия, достаточные для получения соединения **В**, включают третий полярный протонный растворитель. Иллюстративные полярные протонные растворители включают метанол, этанол и изопропанол. В предпочтительных вариантах осуществления третий полярный протонный растворитель представляет собой изопропанол.

В определенных вариантах осуществления соединение **В** образовано в виде кислой соли, такой как хлористоводородная соль, бромистоводородная соль или йодистоводородная соль. В предпочтительных вариантах осуществления кислая соль соединения **В** представляет собой хлористоводородную соль.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает (с) объединение соединения **Д** и реагента для удаления защиты с образованием второй реакционной смеси, затем (d) подвергание второй реакционной смеси воздействию условий, достаточных для образования соединения **І** в качестве свободного основания; при этом:

соединение **І** представлено с помощью:



В определенных вариантах осуществления реагент для удаления защиты представляет собой третью кислоту. Иллюстративные кислоты включают хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту и йодистоводородную кислоту. В предпочтительных вариантах осуществления третья кислота представляет собой хлористоводородную кислоту.

В определенных вариантах осуществления условия, достаточные для получения соединения **І** в качестве свободного основания, включают четвертое основание. В определенных вариантах осуществления четвертое основание представляет собой водный раствор аммиака.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает:

е) обеспечение первой смеси свободного основания соединения **І** в качестве свободного основания в четвертом органическом растворителе;

ф) объединение смеси свободного основания с первым раствором реагента, содержащим четвертую кислоту и пятый органический растворитель, в условиях, достаточных для образования третьей реакционной смеси, содержащей соль соединения **І**;

и

g) кристаллизацию соединения **І** из смеси, содержащей соль соединения **І**.

В определенных вариантах осуществления кристаллическая соль представляет

собой хлористоводородную соль, например, соль бис(гидрохлорида).

В определенных вариантах осуществления четвертый органический растворитель включает четвертый полярный апротонный растворитель. Примеры полярных апротонных растворителей включают ацетонитрил, N, N-диметилацетамид (ДМА), диметилформамид (ДМФ), диметилсульфоксид (ДМСО), диэтиловый эфир, этилацетат, изопропилацетат, метилэтилкетон, метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ), N-метил-2-пирролидон (НМП), тетрагидрофуран, дихлорметан и ацетон. В определенных вариантах осуществления четвертый полярный апротонный растворитель представляет собой метил-трет-бутиловый эфир.

В определенных вариантах осуществления четвертый органический растворитель дополнительно включает четвертый неполярный растворитель. Неполярные растворители включают, например, бензол, гептан, гексаны и толуол. В определенных вариантах осуществления неполярный растворитель представляет собой толуол.

В определенных вариантах осуществления четвертая кислота представляет собой хлористоводородную кислоту.

В определенных вариантах осуществления пятый органический растворитель представляет собой пятый полярный протонный растворитель, такой этанол, метанол, 2-пропанол, 1-бутанол, вода или любая их комбинация. Предпочтительно пятый полярный протонный растворитель представляет собой метанол.

В определенных вариантах осуществления соединение С применяется в количестве по меньшей мере 1 кг, по меньшей мере 5 кг, по меньшей мере 10 кг, по меньшей мере 15 кг, по меньшей мере 20 кг, по меньшей мере 25 кг, по меньшей мере 30 кг, по меньшей мере 35 кг, по меньшей мере 40 кг, по меньшей мере 45 кг, по меньшей мере 50 кг, по меньшей мере 55 кг или по меньшей мере 60 кг. В дополнительных вариантах осуществления соединение С применяют в количестве по меньшей мере 50 кг.

В определенных вариантах осуществления способ по изобретению обеспечивает соединение I или его соль в объеме по меньшей мере 1 кг, по меньшей мере 5 кг, по меньшей мере 10 кг, по меньшей мере 15 кг, по меньшей мере 20 кг, по меньшей мере 25 кг, по меньшей мере 30 кг, по меньшей мере 35 кг, по меньшей мере 40 кг, по меньшей мере 45 кг, по меньшей мере 50 кг, по меньшей мере 55 кг, по меньшей мере 60 кг, по меньшей мере 65 кг, по меньшей мере 70 кг, по меньшей мере 75 кг, по меньшей мере 80 кг, по меньшей мере 85 кг, по меньшей мере 90 кг, по меньшей мере 95 кг или по меньшей мере 100 кг.

Фармацевтические композиции

Соединение I, синтезированное в соответствии с описанными в настоящем документе способами, может быть составлено в фармацевтическую композицию. Такие фармацевтические композиции содержат соединение I и фармацевтически приемлемый носитель.

Термины «носитель» и «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего документа относятся к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу

или среде-носителю, с которым соединение вводят или составляют для введения. Неограничивающие примеры таких фармацевтически приемлемых носителей включают жидкости, такие как вода, физиологический раствор и масла; и твердые вещества, такие как аравийская камедь, желатин, крахмальная паста, тальк, кератин, коллоидный кремнезем, мочевины и т. п. Кроме того, могут применяться вспомогательные, стабилизирующие, загущающие, смазывающие, ароматизирующие и красящие вещества. Другие примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в работе *Remington's Pharmaceutical Sciences* by E.W. Martin, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительное фармацевтически активное средство, отличное от соединения I. По меньшей мере один дополнительное фармацевтически активное средство может представлять собой средство, пригодное для лечения заболевания или состояния, характеризующегося ненормальной активностью плазменного калликреина. Например, по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство может представлять собой антикоагулянт, антитромбоцитарное средство или тромболитическое средство.

Антикоагулянты предотвращают коагуляцию компонентов крови и тем самым предотвращают образование тромбов, например, при мерцательной аритмии. Антикоагулянты включают, помимо прочего, гепарин, варфарин, кумадин, дикумарол, фенпрокумон, аценокумарол, этилбискумацетат, гирудин, биваларутин, прямые ингибиторы тромбина и производные индандиола.

Антитромбоцитарные средства ингибируют агрегацию тромбоцитов и часто применяются для предотвращения тромбоэмболического инсульта у пациентов, перенесших транзиторную ишемическую атаку, инсульт или мерцательную аритмию. Антитромбоцитарные средства включают, помимо прочего, аспирин, производные тиенопиридина, такие как тиклопидин и клопидогрель, дипиридамола и сульфинпиразона, а также миметики RGD.

Тромболитические средства лизируют сгустки, которые вызывают тромбоэмболические явления, такие как инсульт, инфаркт миокарда и легочная тромбоэмболия. Тромболитические средства включают, помимо прочего, плазминоген, а2-антиплазмин, стрептокиназу, антистрептолазу, TNK, тканевый активатор плазминогена (tPA) и урокиназу. Активатор тканевого плазминогена включает нативный tPA и рекомбинантный tPA, а также модифицированные формы tPA, сохраняющие ферментативную или фибринолитическую активность нативного tPA.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть получены путем объединения соединения I с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно одним или несколькими дополнительными фармацевтически активными средствами.

В определенных вариантах осуществления изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, которая составлена для профилактического или терапевтического лечения заболевания или состояния, характеризующегося ненормальной активностью плазменного калликреина.

Терапевтические способы

В настоящем изобретении предусмотрены способы получения соединений, которые подавляют образование тромбина внутренним путем и, таким образом, снижают риск образования новых патогенных тромбов (окклюзии или повторной окклюзии сосудов), а также улучшают реперфузию, вызванную фибринолитическими средствами, при применении в качестве дополнительной терапии к схеме приема фибринолитических средств. Заболевания и состояния, которые можно лечить с помощью соединений по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, инсульт, воспаление, реперфузионное повреждение, острый инфаркт миокарда, тромбоз глубоких вен, состояние после фибринолитического лечения, стенокардию, отек, ангионевротический отек, наследственный ангионевротический отек, сепсис, артрит, кровоизлияние, кровопотерю при искусственном кровообращении, воспалительные заболевания кишечника, сахарный диабет, ретинопатию, диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, диабетическую макулярную дегенерацию, возрастной макулярный отек, возрастную макулярную дегенерацию, пролиферативную ретинопатию, невропатию, артериальную гипертензию, отек головного мозга, повышенную экскрецию альбумина, макроальбуминурию и нефропатию.

Например, у пациентов с ангионевротическим отеком небольшой полипептидный ингибитор РК DX-88 (экаллантин) уменьшает отек у пациентов с наследственным ангионевротическим отеком (HAE). Williams, A. et al. (2003) *Transfus. Apher. Sci.* 29:255-8; Schneider, L. et al. (2007) *J Allergy Clin Immunol.* 120:416-22; and Levy, J. H. et al. (2006) *Expert Opin. Invest. Drugs* 15:1077-90. Антагонист рецептора брадикинина B2, икатибант, также эффективен при лечении HAE. Bork, K. et al. (2007) *J. Allergy Clin. Immunol.* 119:1497-1503. Поскольку плазменный калликреин образует брадикинин, ожидается, что ингибирование плазменного калликреина будет подавлять выработку брадикинина.

Например, при коагуляции в результате фибринолитического лечения (например, лечения тканевым активатором плазминогена или стрептокиназой) у пациентов, подвергающихся фибринолизу, обнаруживаются более высокие уровни плазменного калликреина. Hoffmeister, H. M. et al. (1998) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31:764-72. Было показано, что опосредованная плазмином активация внутреннего пути происходит в плазме крови и крови и заметно ослабляется в плазме крови у лиц с дефицитом любого из компонентов внутреннего пути. Ewald, G. A. et al. (1995) *Circulation* 91:28-36.

У субъектов, перенесших острый МИ, было обнаружено повышенное содержание активированного плазменного калликреина и тромбина. Hoffmeister, H. M., et al. (1998) *Circulation* 98:2527-33.

DX-88 уменьшал отек мозга, объем инфаркта и неврологический дефицит в модели

ишемического инсульта на животных. Storini, C. et al. (2006) *J. Pharm. Exp. Ther.* 318:849-854. C1-ингибитор уменьшал объем инфаркта в мышинной модели окклюзии средней мозговой артерии (МКАО). De Simoni, M. G. et al. (2004) *Am. J. Pathol.* 164:1857-1863; and Akita, N. et al. (2003) *Neurosurgery* 52:395-400). Было обнаружено, что антагонисты рецептора B2 уменьшают объем инфаркта, отек головного мозга и накопление нейтрофилов и оказывают нейропротекторное действие на модели животных МКАО. Zausinger, S. et al. (2003) *Acta Neurochir. Suppl.* 86:205-7; Lumenta, D. B. et al. (2006) *Brain Res.* 1069:227-34; Ding-Zhou, L. et al. (2003) *Br. J Pharmacol.* 139:1539-47.

Что касается кровопотери при искусственном кровообращении (СРВ), то установлено, что при САВГ активируется калликреин-кининовая (т. е. контактная) система. Wachtfogel, Y. T. (1989) *Blood* 73:468. Активация контактной системы во время искусственного кровообращения приводит к 20-кратному повышению уровня брадикинина в плазме крови. Cugno, M. et al. (2006) *Chest* 120:1776-82; and Campbell, D. J. et al. (2001) *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 281:1059-70.

Также было обнаружено, что ингибиторы плазменного калликреина P8720 и PKSI-527 уменьшают отек суставов в крысиных моделях артрита. De La Cadena, R. A. et al. (1995) *FASEB J.* 9:446-52; Fujimori, Y. (1993) *Agents Action* 39:42-8. Также было обнаружено, что воспаление на животных моделях артрита сопровождалось активацией контактной системы. Blais, C. Jr. et al. (1997) *Arthritis Rheum.* 40:1327-33.

Кроме того, было обнаружено, что ингибитор плазменного калликреина P8720 уменьшает воспаление в модели острого и хронического воспалительного заболевания кишечника (IBD) у крыс. Stadnicki, A. et al. (1998) *FASEB J.* 12:325-33; Stadnicki, A. et al. (1996) *Dig. Dis. Sci.* 41:912-20; and De La Cadena, R. A., et al. (1995) *FASEB J.* 9:446-52. Контактная система активируется при остром и хроническом воспалении кишечника. Sartor, R. B. et al. (1996) *Gastroenterology* 110:1467-81. Было обнаружено, что антагонист B2-рецептора, антитело к высокомолекулярному кининогену или снижение уровня кининогена снижают клиничко-патологические процессы в животных моделях IBD. Ibid.; Arai, Y. et al. (1999) *Dig. Dis. Sci.* 44:845-51; and Keith, J. C. et al. (2005) *Arthritis Res. Therapy* 7:R769-76.

Было обнаружено, что Н-D-Pro-Phe-Arg-хлорметилкетон (СМК), ингибитор РК и FXII и физиологический ингибитор (C1-ингибитор), снижает проницаемость сосудов во многих органах и уменьшает повреждения при вызванном липополисахаридами (LPS) или бактериями сепсисе у животных. Liu, D. et al. (2005) *Blood* 105:2350-5; Persson, K. et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192:1415-24. Клиническое улучшение наблюдалось у пациентов с сепсисом, получавших C1-ингибитор. Zeerleder, S. et al. (2003) *Clin. Diagnost. Lab. Immunol.* 10:529-35; Caliezi, C., et al. (2002) *Crit. Care Med.* 30:1722-8; and Marx, G. et al. (1999) *Intensive Care Med.* 25:1017-20. Установлено, что летальные случаи септицемии имеют более высокую степень контактной активации. Martinez-Brotons, F. et al. (1987) *Thromb. Haemost.* 58:709-713; and Kalter, E. S. et al. (1985) *J. Infect. Dis.* 151:1019-27.

Также было обнаружено, что уровни prePK выше у диабетиков, особенно с

пролиферативной ретинопатией, и коррелируют с уровнями фруктозамина. Gao, B.-B., et al. (2007) *Nature Med.* 13:181-8; and Kedzierska, K. et al. (2005) *Archives Med. Res.* 36:539-43. Также обнаружено, что уровень PrePK наиболее высок у субъектов с сенсорно-двигательной невропатией. Christie, M. et al. (1984) *Thromb. Haemostas. (Stuttgart)* 52:221-3. Уровни PrePK повышены у диабетиков и связаны с повышенным кровяным давлением. Уровни PrePK независимо коррелируют со скоростью экскреции альбумина и повышены у диабетиков с макроальбуминурией, что позволяет предположить, что prePK может быть маркером прогрессирующей нефропатии. Jaffa, A. A. et al. (2003) *Diabetes* 52:1215-21. Было обнаружено, что антагонисты рецептора B1 уменьшают утечку плазмы крови у крыс, получавших стрептозотоцин. Lawson, S. R. et al. (2005) *Eur. J. Pharmacol.* 514:69-78. Антагонисты рецептора B1 также могут предотвратить развитие гипергликемии и почечной дисфункции у мышей, получавших стрептозотоцин. Zuccollo, A. et al. (1996) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74:586-9.

Соединение I может быть применено в качестве лекарственного средства.

Например, соединение I может быть применено в способах лечения или предотвращения заболевания или состояния, характеризующегося неправильной активностью плазменного калликреина. Способ включает стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения I, тем самым осуществляя лечение или предотвращение заболевания или состояния, характеризующегося неправильной активностью плазменного калликреина. Путем снижения активности плазменного калликреина у субъекта лечат заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина.

Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» в контексте настоящего документа означают предотвращение, остановку или замедление прогрессирования или устранение заболевания или состояния у субъекта. В некоторых вариантах осуществления термин «лечить», «лечащий» и «лечение» означает остановку или замедление прогрессирования или устранение заболевания или состояния у субъекта. В некоторых вариантах осуществления «лечить», «лечащий» и «лечение» означают уменьшение по меньшей мере одного объективного проявления заболевания или состояния у субъекта.

Термин «эффективное количество» в контексте настоящего документа относится к количеству, достаточному для достижения необходимого биологического эффекта.

Термин «терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего документа относится к количеству, достаточному для достижения желаемого терапевтического эффекта.

В контексте настоящего документа термин «ингибировать» означает уменьшение на объективно измеримую величину или степень. В различных вариантах осуществления «ингибировать» означает снижение по меньшей мере на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95 процентов по сравнению с соответствующим контролем. В одном варианте осуществления «ингибировать» означает снижение на 100 процентов, т. е. остановку или устранение.

В контексте настоящего документа термин «субъект» относится к млекопитающему. В различных вариантах осуществления субъект представляет собой мышь, крысу, кролика, кошку, собаку, свинью, овцу, лошадь, корову или примата, отличного от человека. В одном варианте осуществления субъектом является человек.

Альтернативно в некоторых аспектах соединение I можно применять для лечения заболевания или состояния, характеризующегося неправильной активностью плазменного калликреина.

Альтернативно в некоторых аспектах соединение I может быть применено для изготовления лекарственного средства для применения при лечении заболевания или состояния, характеризующегося неправильной активностью плазменного калликреина.

В контексте настоящего документа термин «заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина» относится к любому заболеванию или состоянию, при котором желательно снизить активность плазменного калликреина. Например, может быть желательно снизить активность плазменного калликреина в условиях ненадлежащей активации или гиперактивации калликреина. В качестве другого примера может быть желательно снизить активность плазменного калликреина в условиях гиперкоагуляции. В качестве другого примера может быть желательно снизить активность плазменного калликреина в условиях ишемии ткани, связанной с наличием или образованием тромба.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина, выбрано из группы, состоящей из инсульта, воспаления, реперфузионного повреждения, острого инфаркта миокарда, тромбоза глубоких вен, состояния после фибринолитического лечения, стенокардии, отека, ангионевротического отека, наследственного ангионевротического отека, сепсиса, артрита, кровоизлияния, кровопотери при искусственном кровообращении, воспалительных заболеваний кишечника, сахарного диабета, ретинопатии, диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, диабетической макулярной дегенерации, возрастного макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации, пролиферативной ретинопатии, невропатии, артериальной гипертензии, отека головного мозга, повышенной экскреции альбумина, макроальбуминурии и нефропатии.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина, представляет собой ангионевротический отек.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина, представляет собой приобретенный ангионевротический отек или наследственный ангионевротический отек (HAE).

Приобретенный ангионевротический отек (AAE) (Caldwell JR, et al. Clin Immunol Immunopathol. 1972; 1:39-52) характеризуется несколькими признаками, в том числе

приобретенным дефицитом ингибитора C1 (C1-INH), гиперактивацией классического пути комплемента человека и симптомов ангионевротического отека, опосредованных брадикинином, высвобождаемым при ненадлежащей активации контактно-кининовой системы. ААЕ может присутствовать в двух формах: ААЕ типа I (который обычно связан с другим заболеванием) и ААЕ типа II, который обычно связан с аутоиммунным заболеванием. ААЕ может быть вызван рядом факторов, включая, помимо прочего, аутоиммунные заболевания (например, выработку антител против C1INH) или приобретенную мутацию C1 INH. Кроме того, соединение I можно применять для лечения побочных эффектов лечения ингибитором ангиотензинпревращающего фермента (АПФ). Ингибиторы АПФ блокируют основной путь распада брадикинина. Подавление образования калликреина за счет использования соединения I уменьшает образование брадикинина.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина, представляет собой наследственный ангионевротический отек (НАЕ). В определенных вариантах осуществления наследственный ангионевротический отек представляет собой наследственный ангионевротический отек I типа. Альтернативно наследственный ангионевротический отек может представлять собой наследственный ангионевротический отек II типа. Альтернативно наследственный ангионевротический отек может представлять собой наследственный ангионевротический отек III типа.

В определенных вариантах осуществления соединение I применяют для профилактического лечения НАЕ. В других вариантах осуществления соединение I применяют для длительного лечения НАЕ.

В определенных вариантах осуществления соединение I применяют для предотвращения или лечения приступов ангионевротического отека у субъекта с НАЕ. В определенных вариантах осуществления соединение I применяют в качестве профилактического лечения для снижения частоты приступов ангионевротического отека у субъекта с НАЕ. В других вариантах осуществления соединение I применяют для лечения приступа острого ангионевротического отека у субъекта с НАЕ.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина представляет собой инсульт.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина, представляет собой реперфузионное повреждение.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина, представляет собой острый инфаркт миокарда.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина представляет

собой кровоизлияние.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина, представляет собой кровопотерю во время искусственного кровообращения.

В определенных вариантах осуществления заболевание или состояние, характеризующееся неправильной активностью плазменного калликреина, выбрано из группы, состоящей из ретинопатии, диабетической ретинопатии, диабетического макулярного отека, диабетической макулярной дегенерации, возрастного макулярного отека, возрастной макулярной дегенерации и пролиферативной ретинопатии.

Составы, пути введения и дозирование

Соединение I, синтезированное, как описано в настоящем документе, может быть получено в виде фармацевтических композиций и введено млекопитающему-хозяину, такому как пациент-человек, в различных формах, адаптированных к выбранному пути введения, например, перорально или парентерально, внутривенно, внутривенно, внутривенно, внутримышечно, местно или подкожно. Дополнительные способы введения также предусмотрены настоящим изобретением.

Таким образом, соединение I (также называемое в настоящем документе «активным соединением») можно вводить системно, например, перорально, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как инертный разбавитель или усваиваемый пищевой носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы с твердой или мягкой оболочкой, могут быть спрессованы в таблетки или могут быть включены непосредственно в пищевой рацион пациента. Для перорального терапевтического введения активное соединение можно комбинировать с одним или несколькими вспомогательными веществами и применять в форме таблеток для приема внутрь, защечных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и т. п. Такие композиции и препараты должны содержать по меньшей мере 0,1% активного соединения. Процентное содержание композиций и препаратов может, конечно, варьироваться и обычно может составлять от около 2% до около 60% от массы данной стандартной лекарственной формы. Количество активного соединения в таких терапевтически полезных композициях таково, что будет получен эффективный уровень дозировки.

Таблетки, пастилки, пилули, капсулы и т. п. могут также содержать следующие разбавители и носители: связующие, такие как трагакантовая камедь, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин; вспомогательные вещества, такие как дикальцийфосфат; вещество для улучшения распадаемости, такое как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и т. п.; смазывающее вещество, такое как стеарат магния; и можно добавить подсластитель, такой как сахароза, фруктоза, лактоза или аспартам, или ароматизатор, такой как перечная мята, масло грушанки или вишневый ароматизатор. Когда стандартной лекарственной формой является капсула, она может содержать, помимо веществ вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как

растительное масло или полиэтиленгликоль. Различные другие вещества могут присутствовать в качестве покрытий или иным образом модифицировать физическую форму твердой стандартной лекарственной формы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты желатином, воском, шеллаком или сахаром и т. п. Сироп или эликсир могут содержать активное соединение, сахарозу или фруктозу в качестве подсластителя, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Конечно, любое вещество, применяемое при приготовлении любой стандартной лекарственной формы, должно быть фармацевтически приемлемым и по существу нетоксичным в применяемых количествах. Кроме того, активное соединение может быть включено в препараты и устройства с замедленным высвобождением.

Активное соединение можно также вводить внутривенно или внутривнутрибрюшинно путем инфузии или инъекции. Растворы активного соединения могут быть получены в воде или в физиологически приемлемом водном растворе, необязательно смешанном с нетоксичным поверхностно-активным веществом. Дисперсии также можно приготовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, триацетине и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Фармацевтические лекарственные формы, подходящие для инъекций или инфузий, могут включать стерильные водные растворы или дисперсии или стерильные порошки, содержащие активное соединение, которые адаптированы для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций или инфузий, необязательно инкапсулированных в липосомы. Во всех случаях конечная лекарственная форма должна быть стерильной, жидкой и стабильной в условиях производства и хранения. Жидкий носитель или среда-носитель может представлять собой растворитель или жидкую дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкие полиэтиленгликоли и т. п.), растительные масла, нетоксичные сложные эфиры глицерина и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет образования липосом, поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий или за счет применения поверхностно-активных веществ. Предупредить действие микроорганизмов можно с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические средства, например сахара, буферы или хлорид натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено за счет использования в композициях средств, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций получают путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В случае стерильных порошков для получения стерильных

растворов для инъекций способы получения могут включать вакуумную сушку и методы лиофильной сушки, которые обеспечивают порошок активного соединения вместе с любым дополнительным желаемым ингредиентом, присутствующим в предварительно стерильно отфильтрованных растворах.

Для местного применения соединение I можно применять в чистом виде, т. е. когда их готовят в жидкостях. Однако обычно желательно наносить их на кожу в виде композиций или составов в комбинации с дерматологически приемлемым носителем, который может быть твердым или жидким.

Полезные твердые носители включают мелкодисперсные твердые вещества, такие как тальк, глина, микрокристаллическая целлюлоза, диоксид кремния, оксид алюминия и т. п. Полезные жидкие носители включают воду, спирты или гликоли или смеси вода-спирт/гликоль, в которых соединение I может быть растворено или диспергировано в эффективных количествах, необязательно с помощью нетоксичных поверхностно-активных веществ. Адъюванты, такие как отдушки и дополнительные антимикробные агенты, могут быть добавлены для оптимизации свойств для данного применения. Полученные жидкие композиции можно наносить с впитывающих прокладок, применять для пропитки бинтов и других повязок или распылять на пораженный участок с помощью насосных или аэрозольных распылителей.

Загустители, такие как синтетические полимеры, жирные кислоты, соли и сложные эфиры жирных кислот, жирные спирты, модифицированные целлюлозы или модифицированные минеральные материалы, также можно применять с жидкими носителями для образования пастообразных паст, гелей, мазей, мыла и т. п. для нанесения непосредственно на кожу пользователя.

Примеры пригодных дерматологических композиций, которые можно применять для доставки соединения I в кожу, известны в данной области техники; например, см. Jacquet et al. (патент США № 4608392; включен в настоящий документ в качестве ссылки), Geria (патент США № 4992478; включен в настоящий документ в качестве ссылки), Smith et al. (патент США № 4559157; включен в настоящий документ в качестве ссылки) и Wortzman (патент США № 4820508; включен в настоящий документ в качестве ссылки).

Пригодные дозы соединения I можно определить, по меньшей мере первоначально, путем сравнения их активности *in vitro* и активности *in vivo* на животных моделях. Способы экстраполяции эффективных доз мышей и других животных на человека известны в данной области техники; например, см. патент США № 4938949 (включен в настоящий документ в качестве ссылки).

Количество соединения I, необходимое для применения при лечении, будет варьироваться в зависимости от способа введения, природы состояния, подлежащего лечению, а также возраста и состояния пациента, и в конечном счете остается на усмотрение лечащего врача.

В целом, однако, подходящая доза будет находиться в диапазоне от около 0,5 до около 100 мг/кг массы тела реципиента в сутки, например, от около 3 до около 90 мг/кг

массы тела в сутки, от около 6 до около 75 мг на килограмм массы тела в сутки, от около 10 до около 60 мг/кг массы тела в сутки или от около 15 до около 50 мг/кг массы тела в сутки.

Соединение I может быть удобно составлено в виде стандартной лекарственной формы; например, содержащей от 5 до 1000 мг, от 10 до 750 мг, от 50 до 500 мг, от 75 мг до 350 мг, от 75 мг до 300 мг, от 75 мг до 250 мг, от 75 мг до 200 мг, от 75 мг до 175 мг, от 75 мг до 150 мг, от 75 мг до 125 мг, от 100 мг до 750 мг, от 100 мг до 500 мг, от 100 мг до 350 мг, от 100 мг до 300 мг, от 100 мг до 250 мг, от 100 мг до 200 мг, от 100 мг до 175 мг, от 100 мг до 150 мг, от 100 мг до 125 мг, от 125 мг до 350 мг, от 125 мг до 300 мг, от 125 мг до 250 мг, от 125 мг до 200 мг, от 125 мг до 175 мг, от 125 мг до 150 мг, включая, например, 5 мг, 10 мг, 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, и других таких стандартных доз, попадающих в вышеуказанные диапазоны стандартных доз активного соединения на стандартную лекарственную форму. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает композицию, содержащую соединение I, составленную в виде такой стандартной лекарственной формы. Желаемая доза может быть удобно представлена в виде разовой дозы или в виде разделенных доз для введения через соответствующие интервалы, например, в виде двух, трех, четырех или более дополнительных доз в день. Сама дополнительная доза может быть дополнительно разделена, например на несколько отдельных введений с небольшим интервалом.

Соединение I можно также вводить в комбинации с другими терапевтическими средствами, например, другими средствами, применимыми для лечения или профилактики ишемии, кровопотери или реперфузионного повреждения.

Другие системы доставки могут включать системы доставки с пролонгированным высвобождением, отсроченным высвобождением или отложенным высвобождением, такие как хорошо известные в данной области техники. Такие системы позволяют избежать повторных введений активного соединения, повышая удобство для субъекта и врача. Многие типы систем доставки высвобождения доступны и известны специалистам в данной области техники. Может быть желательным использование имплантата отложенного действия с замедленным высвобождением. Долгосрочное высвобождение в контексте настоящего документа означает, что система доставки или имплантат сконструированы и приспособлены для доставки терапевтических уровней активного соединения в течение по меньшей мере 30 дней и предпочтительно 60 дней.

В определенных вариантах осуществления соединение I составляют для внутриглазного введения, например, для прямой инъекции или введения внутри внутриглазного медицинского устройства или в комбинации с ним.

Соединение I может быть составлено для введения в медицинское устройство, которое может включать любые из множества обычных трансплантатов, стентов, включая стент-графты, катетеры, баллоны, корзины или другие устройства, которые можно

размещать или постоянно имплантировать в полость тела. В качестве конкретного примера было бы желательно иметь устройства и способы, которые могут доставлять соединение I в область тела, подлежащую лечению с помощью интервенционной техники.

В иллюстративных вариантах осуществления соединение I может быть помещено в медицинское устройство, такое как стент, и доставлено в место лечения для лечения части тела.

Стенты применялись в качестве средств доставки терапевтических средств (например, лекарственных средств). Внутрисосудистые стенты обычно постоянно имплантируют в коронарные или периферические сосуды. Конструкции стентов включают конструкции из патента США № 4733655 (Palmaz), патента США № 4800882 (Gianturco) или патента США № 4886062 (Wiktor). К таким конструкциям относятся как металлические, так и полимерные стенты, а также саморасширяющиеся и баллонно-расширяемые стенты. Стенты также можно применять для доставки лекарственного средства в место контакта с сосудистой сетью, как описано в патенте США № 5102417 (Palmaz), патенте США № 5419760 (Narciso, Jr.), патенте США № 5429634 (Narciso, Jr.) и, например, в международных патентных заявках № WO 91/12779 (Medtronic, Inc.) и WO 90/13332 (Cedars-Sinai Medical Center).

Термин «осажденный» означает, что активное соединение покрыто, адсорбировано, помещено или иным образом включено в устройство способами, известными в данной области техники. Например, соединение может быть внедрено и может высвобождаться изнутри («матричный тип») или окружено полимерными материалами («резервуарный тип») и высвобождаться через них, которые покрывают или охватывают медицинское устройство. В последнем примере соединение может быть захвачено полимерными материалами или связано с полимерными материалами с помощью одного или более способов получения таких материалов, известных в данной области техники. В других составах соединение может быть связано с поверхностью медицинского устройства без необходимости нанесения покрытия, например, с помощью разъемных соединений и высвобождаться со временем или может быть удалено активными механическими или химическими процессами. В других составах соединение может быть в постоянно иммобилизованной форме, которая представляет соединение в месте имплантации.

В определенных вариантах осуществления активное соединение может быть включено в полимерные композиции во время формирования биосовместимых покрытий для медицинских устройств, таких как стенты. Покрытия, полученные из этих компонентов, обычно однородны и могут быть применены для покрытия ряда устройств, предназначенных для имплантации.

Полимер может быть либо биостабильным, либо биорассасываемым полимером в зависимости от желаемой скорости высвобождения или желаемой степени стабильности полимера, но часто биорассасываемый полимер является предпочтительным для этого варианта осуществления, поскольку, в отличие от биостабильного полимера, он не будет

присутствовать долгое время после имплантации, чтобы вызвать любой неблагоприятный, хронический местный ответ. Биоабсорбируемые полимеры, которые можно применять, включают, помимо прочего, поли(L-молочную кислоту), поликапролактон, полигликолид (PGA), сополимер лактида и гликолида (PLLA/PGA), поли(гидроксibuтират), сополимер гидроксibuтирата и валерата, полидиоксанон, полиортоэфир, полиангидрид, поли(гликолевую кислоту), поли(D-молочную кислоту), поли(L-молочную кислоту), поли(D, L-молочную кислоту), поли(D, L-лактид) (PLA), поли(L-лактид) (PLLA), сополимер гликолевой кислоты и триметиленкарбоната (PGA/PTMC), полиэтиленоксид (PEO), полидиоксанон (PDS), полифосфозфир, полифосфозфинуретан, поли(аминокислоты), цианоакрилаты, поли(триметиленкарбонат), поли(иминокарбонат), сополимеры простых эфиров и сложных эфиров (например, PEO/PLA), полиалкиленоксалаты, полифосфазены и биомолекулы, такие как фибрин, фибриноген, целлюлоза, крахмал, коллаген и гиалуроновая кислота, полиэпсилон капролактон, полиоксимасляную кислоту, полиортоэфиры, полиацетали, полидигидропираны, полицианоакрилаты, сшитые или амфипатические блок-сополимеры гидрогелей и другие подходящие биорассасывающиеся полимеры, известные в данной области техники. Кроме того, можно применять биостабильные полимеры с относительно низкой длительным тканевым ответом, такие как полиуретаны, силиконы и полиэферы, а также другие полимеры, если их можно растворять и отверждать или полимеризовать на медицинском устройстве, такие как полиолефины, полиизобутилен и сополимеры этилена и альфаолефина; акриловые полимеры и сополимеры, винилгалогенидные полимеры и сополимеры, такие как поливинилхлорид; поливинилпирролидон; поливиниловые эфиры, такие как поливинилметилэфир; поливинилиденгалогениды, такие как поливинилиденфторид и поливинилиденхлорид; полиакрилонитрил, поливинилкетоны; поливинилароматические соединения, такие как полистирол, сложные поливиниловые эфиры, такие как поливинилацетат; сополимеры виниловых мономеров друг с другом и олефинами, такие как сополимеры этилена и метилметакрилата, сополимеры акрилонитрила и стирола, смолы ABS и сополимеры этилена и винилацетата; сополимер пирана; полигидроксипропилметакриламидфенол; полигидроксиэтилспартамидфенол; полиэтиленоксид-полилизин, замещенный пальмитоильными остатками; полиамиды, такие как нейлон 66 и поликапролактан; алкидные смолы, поликарбонаты; полиоксиметилены; полиимиды; простые полиэферы; эпоксидные смолы, полиуретаны; вискоза; целлюлоза-триацетат; целлюлоза, ацетат целлюлозы, бутират целлюлозы; бутират ацетата целлюлозы; целлофан; нитрат целлюлозы; пропионат целлюлозы; эфиры целлюлозы; и карбоксиметилцеллюлозу.

Полимеры и полупроницаемые полимерные матрицы могут быть сформованы в изделия определенной формы, такие как клапаны, стенты, трубки, протезы и т. п.

В определенных вариантах осуществления изобретения соединение I связывают с полимерной или полупроницаемой полимерной матрицей, которая формируется в виде стента или стент-графта.

Обычно полимеры наносят на поверхность имплантируемого устройства путем центрифугирования, погружения или распыления. Для этой цели также могут быть применены дополнительные способы, известные в данной области техники. Методы распыления включают традиционные методы, а также методы микроосаждения с помощью дозатора струйного типа. Кроме того, полимер можно наносить на имплантируемое устройство с помощью фотошаблона, чтобы разместить полимер только на определенных участках устройства. Это покрытие устройства обеспечивает равномерный слой вокруг устройства, что позволяет улучшить диффузию различных аналитов через покрытие устройства.

В определенных вариантах осуществления изобретения активное соединение составлено для высвобождения из полимерного покрытия в окружающую среду, в которой находится медицинское устройство. Предпочтительно соединение высвобождается контролируемым образом в течение длительного периода времени (например, месяцев) с помощью по меньшей мере одного из нескольких хорошо известных методов, включающих полимерные носители или слои для контроля элюирования. Некоторые из этих методов описаны в заявке на патент США 2004/0243225A1, полное раскрытие которой включено в настоящий документ во всей полноте.

Кроме того, как описано, например, в патенте США № 6770729, который полностью включен в настоящий документ, реагентами и условиями реакции полимерных композиций можно управлять так, чтобы можно было контролировать высвобождение активного соединения из полимерного покрытия. Например, коэффициент диффузии одного или более полимерных покрытий можно регулировать, чтобы контролировать высвобождение соединения из полимерного покрытия. В вариации на эту тему можно контролировать коэффициент диффузии одного или более полимерных покрытий, чтобы модулировать способность аналита, присутствующего в среде, в которой находится медицинское устройство (например, аналита, который способствует разрушению или гидролизу некоторой части полимера), иметь доступ к одному или нескольким компонентам полимерной композиции (и, например, модулируя тем самым высвобождение соединения из полимерного покрытия). Еще один вариант осуществления изобретения включает устройство, имеющее множество полимерных покрытий, каждое из которых имеет множество коэффициентов диффузии. В таких вариантах осуществления изобретения высвобождение активного соединения из полимерного покрытия можно регулировать с помощью множества полимерных покрытий.

В еще одном варианте осуществления изобретения высвобождение активного соединения из полимерного покрытия регулируется путем модулирования одного или более свойств полимерной композиции, таких как присутствие одного или более эндогенных или экзогенных соединений, или, альтернативно, pH полимерной композиции. Например, некоторые полимерные композиции могут быть разработаны для высвобождения соединения в ответ на снижение pH полимерной композиции.

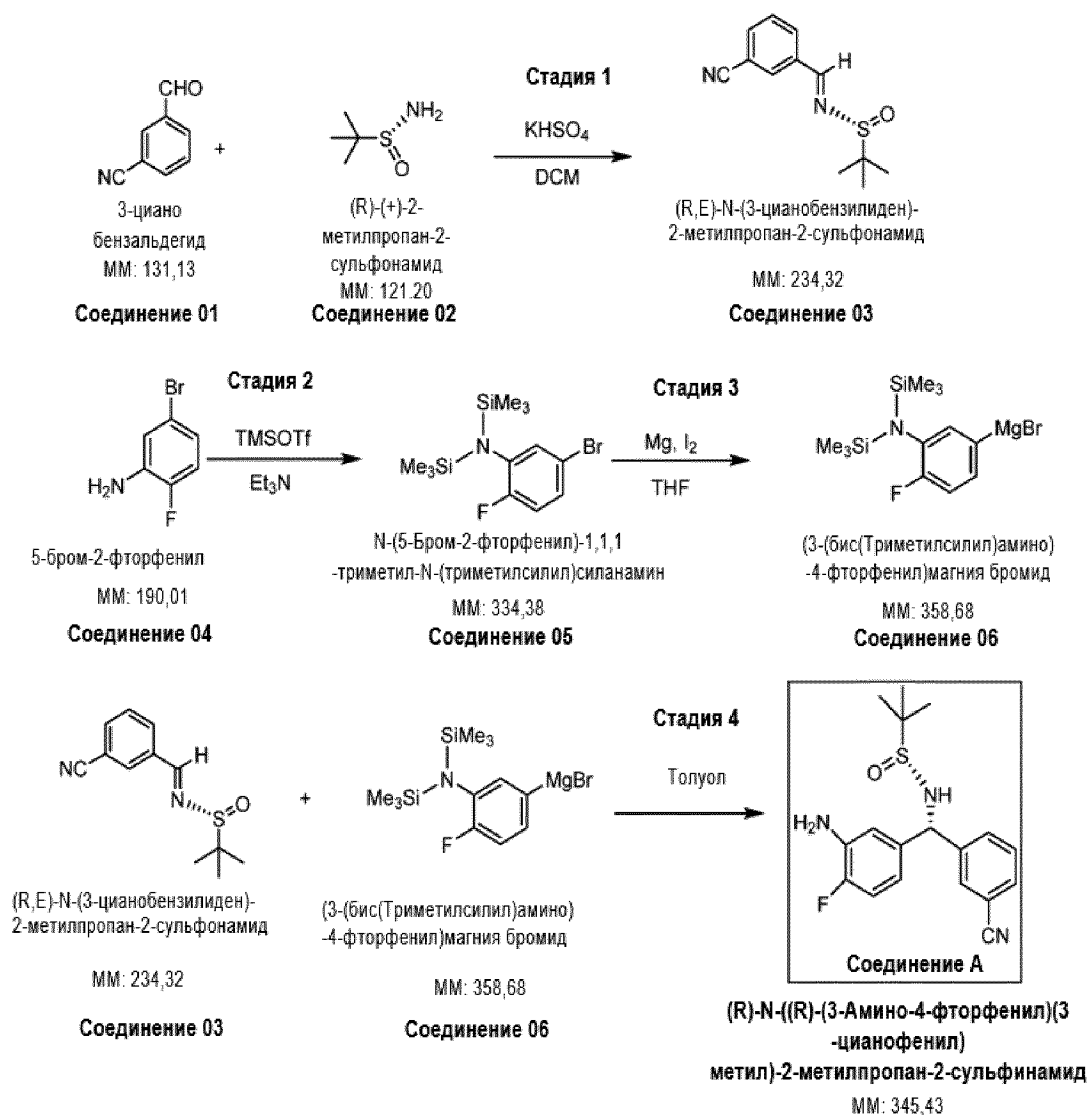
Наборы

Изобретение также относится к набору, содержащему соединение I, по меньшей мере одно другое терапевтическое средство, упаковочный материал и инструкции по введению соединения I и другого терапевтического средства или средств млекопитающему для лечения или предотвращения заболевания или состояния, характеризующегося неправильной активностью калликреина у млекопитающего. В одном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека.

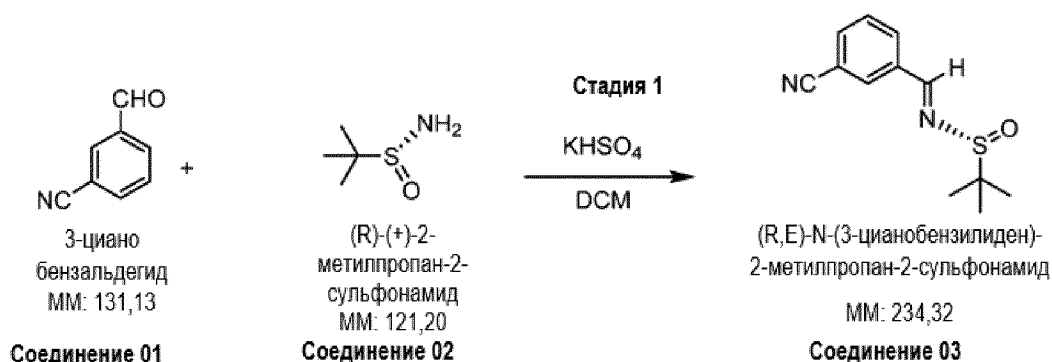
Примеры

Пример 1. Процедура синтеза соединения A

Следующая схема и сопутствующие стадии излагают процедуру синтеза соединения A.

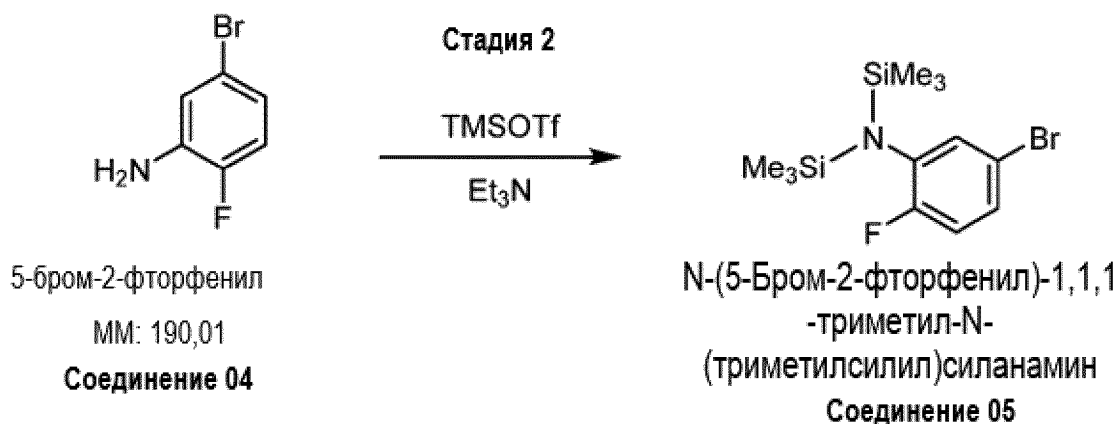


Стадия 1. (R, E)-N-(3-Цианобензилиден)-2-метилпропан-2-сульфинамид (соединение 03)



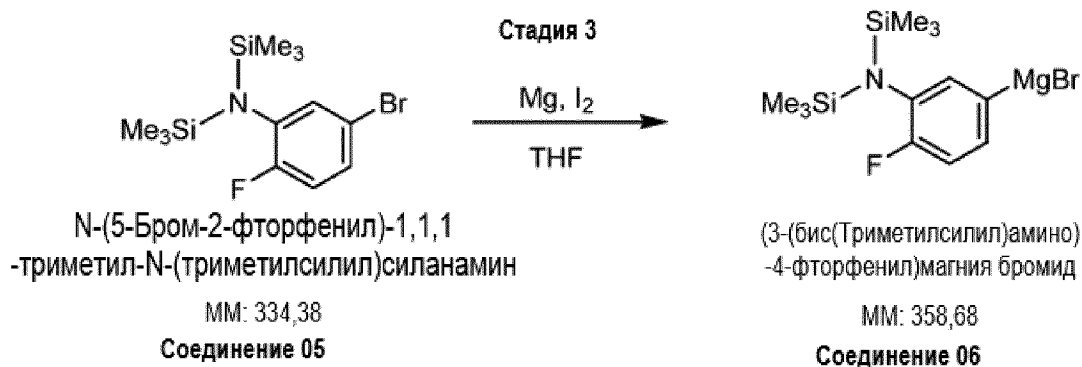
3-Цианобензальдегид (соединение 01; 53,57 кг, 408,42 моль, 0,9 экв.) добавляли в перемешиваемый раствор (R)-(+)-2-метилпропан-2-сульфинамида (соединение 02; 55,0 кг, 453,8 моль, 1,0 экв.) в дихлорметане (DCM) (550,0 л, 10,0 об.) при комнатной температуре. Добавляли KHSO₄ (46,2 кг, 340,35 моль, 0,75 экв.) при комнатной температуре и реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при этой температуре. Ход реакции отслеживали с помощью анализа ВЭЖХ. Реакционную смесь гасили водой (220,0 л) и перемешивали в течение 30 мин. Слой DCM отделяли и водный слой снова экстрагировали с помощью DCM (110,0 л). Объединенный органический экстракт промывали метабисульфитом натрия (17,24 кг в DMW (165,0 л)) в течение 2 ч. Водный слой экстрагировали с помощью DCM (55,0 л). Объединенный органический раствор сушили над Na₂SO₄ (13,75 кг) и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении при 40°C. Добавляли н-гептан 110,0 л для кристаллизации, перемешивали в течение 2 ч при 10 °С, фильтровали и промывали н-гептаном 27,5 л. Твердое вещество сушили в вакуумной центробежной сушилке при 35°C с получением (**R, E**)-N-(3-цианобензилиден)-2-метилпропан-2-сульфинамида (соединение 03; 86,23 кг, 81,1%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,63 (s, 1H), 8,42 (d, J=1,7 Гц, 1H), 8,28 (dt, J=7,9, 1,4 Гц, 1H), 8,07 (dt, J=7,8, 1,4 Гц, 1H), 7,76 (t, J=7,8 Гц, 1H), 1,21 (s, 9H); МС (ЭР+) 235,2 (M+1), 257,2 (M+Na).

Стадия 2. N-(5-Бром-2-фторфенил)-1,1,1-триметил-N-(триметилсилил)силанамин



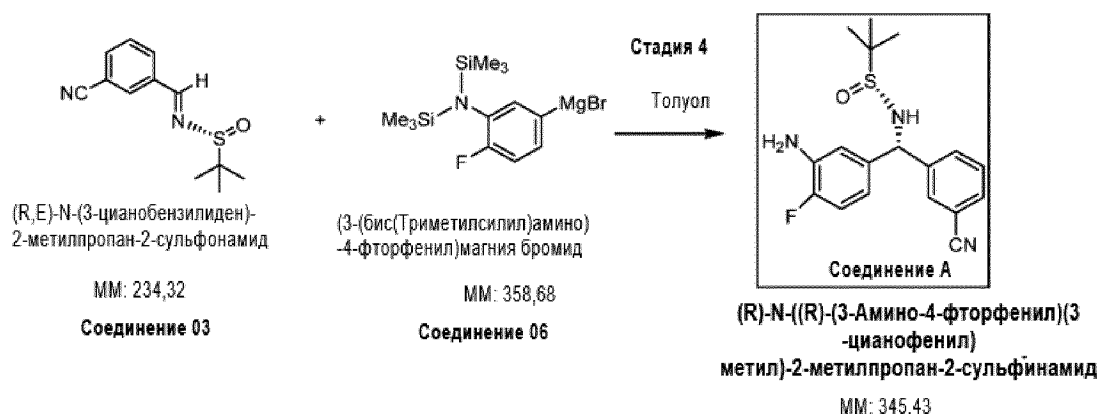
Триметилсилилтрифторметансульфонат (55,1 кг, 249,98 моль) добавляли в перемешиваемый раствор 5-бром-2-фторанилина (соединение 04; 19,0 кг, 99,99 моль) в триэтиламине (95,0 л) при комнатной температуре в атмосфере азота. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в атмосфере азота и перемешивали в течение 8-14 часов. Ход реакции отслеживали с помощью ^1H ЯМР. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры в атмосфере азота и позволяли отстаивание для разделения слоев. Нижний слой собирали в отдельный барабан из ПЭВП в атмосфере азота. Верхний слой концентрировали при температуре от 70 °С до 80 °С при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью HVD с получением продукта **N-(5-бром-2-фторфенил)-1,1,1-триметил-N-(триметилсилил)силанамина (соединение 05)** в виде светло-желтоватого масла (29,09 кг, 86,99%).

Стадия 3. (3-(бис(Триметилсилил)амино)-4-фторфенил)магния бромид



Суспензию высушенной в печи магниевой стружки (4,5 кг, 185,15 моль) в ТГФ (15 л) и йоде (50,50 г, 0,0013 экв.) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут в атмосфере азота. N-(5-Бром-2-фторфенил)-1,1,1-триметил-N-(триметилсилил)силанамин (соединение 05) (1,5 кг, 4,49 моль) медленно добавляли к вышеуказанной суспензии при комнатной температуре в атмосфере азота. В начале инициации реакции наблюдали экзотермическую реакцию. ТГФ (100,0 L) добавляли в реакционную смесь в атмосфере азота. Оставшееся соединение 05 (48,5 кг, 145,04 моль) добавляли к реакционной смеси с такой скоростью, чтобы поддерживать температуру реакции ниже 45 °С в течение периода от 5 до 7 ч. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. Реакционную смесь использовали на следующей стадии как таковую. Кол-во: 150,0 л

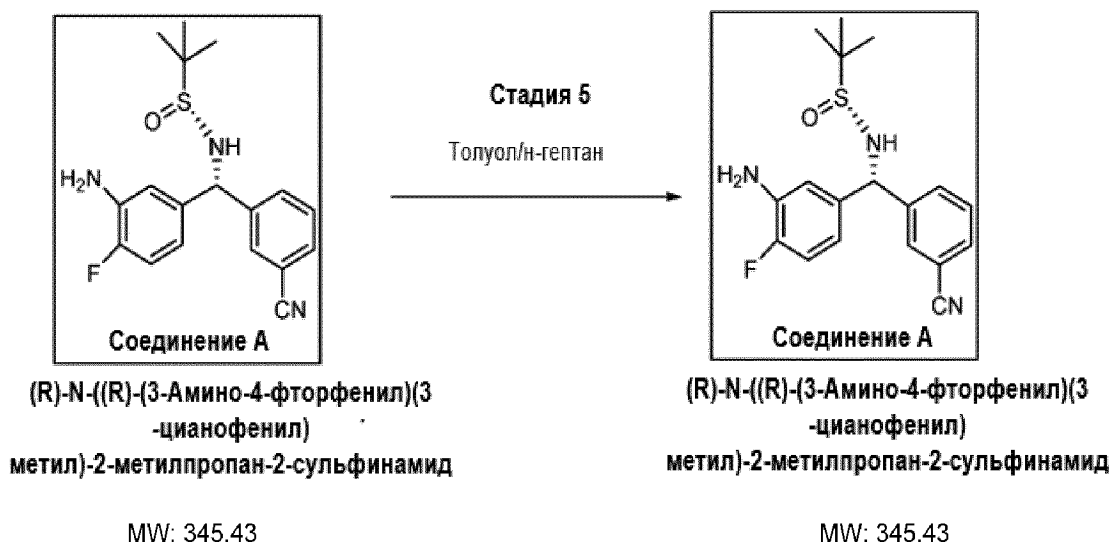
Стадия 4. (R)-N-((R)-(3-Амино-4-фторфенил)(3-цианопенил)метил)-2-метилпропан-2-сульфинамид (соединение А)



Перемешиваемый раствор (R, E)-N-(3-цианобензилиден)-2-метилпропан-2-сульфинамида (соединение 03) (62,0 кг, 264,6 моль) в толуоле (1240,0 л) охлаждали до от -60 до -50°C. Раствор реагента Гриньяра (3-(бис(триметилсилил)амино)-4-фторфенил)магния бромида (соединение 06) (450,0 л) добавляли в течение периода 2 ч в атмосфере азота с поддержанием температуры реакции от -60 до -35°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при от -60 до -35°C в атмосфере азота и затем гасили водным раствором KHSO₄ (99,2 кг KHSO₄ в DM W 744 л) при от -60 до 15°C, смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем обеспечивали отстаивание для разделения слоев. Нижний водный слой удаляли и повторно экстрагировали толуолом (341,0 л). Объединенные органические слои промывали солевым раствором (105,4 кг NaCl в DM W 527,0 л). Органический слой сушили над Na₂SO₄ (43,4 кг) и фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении при 65°C с получением неочищенного соединения A (99,0 кг) в виде липкого красноватого неочищенного вещества.

Липкое красноватое неочищенное соединение A (99,1 кг) растворяли в толуоле (893,0 л) при 40-45 °C. Раствор медленно охлаждали до комнатной температуры. Раствор энергично перемешивали и добавляли н-гептан (347,2 л) при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение 5 ч при 15-20°C, выпавшее в осадок твердое вещество собирали фильтрованием, промывали смесью 20 частей толуола и 80 частей н-гептана (97,0 л) и сушили при комнатной температуре в течение 24 ч с получением продукта в виде светло-коричневого твердого вещества (40,36 кг, 44,16%), точка плавления 100,6 °C.

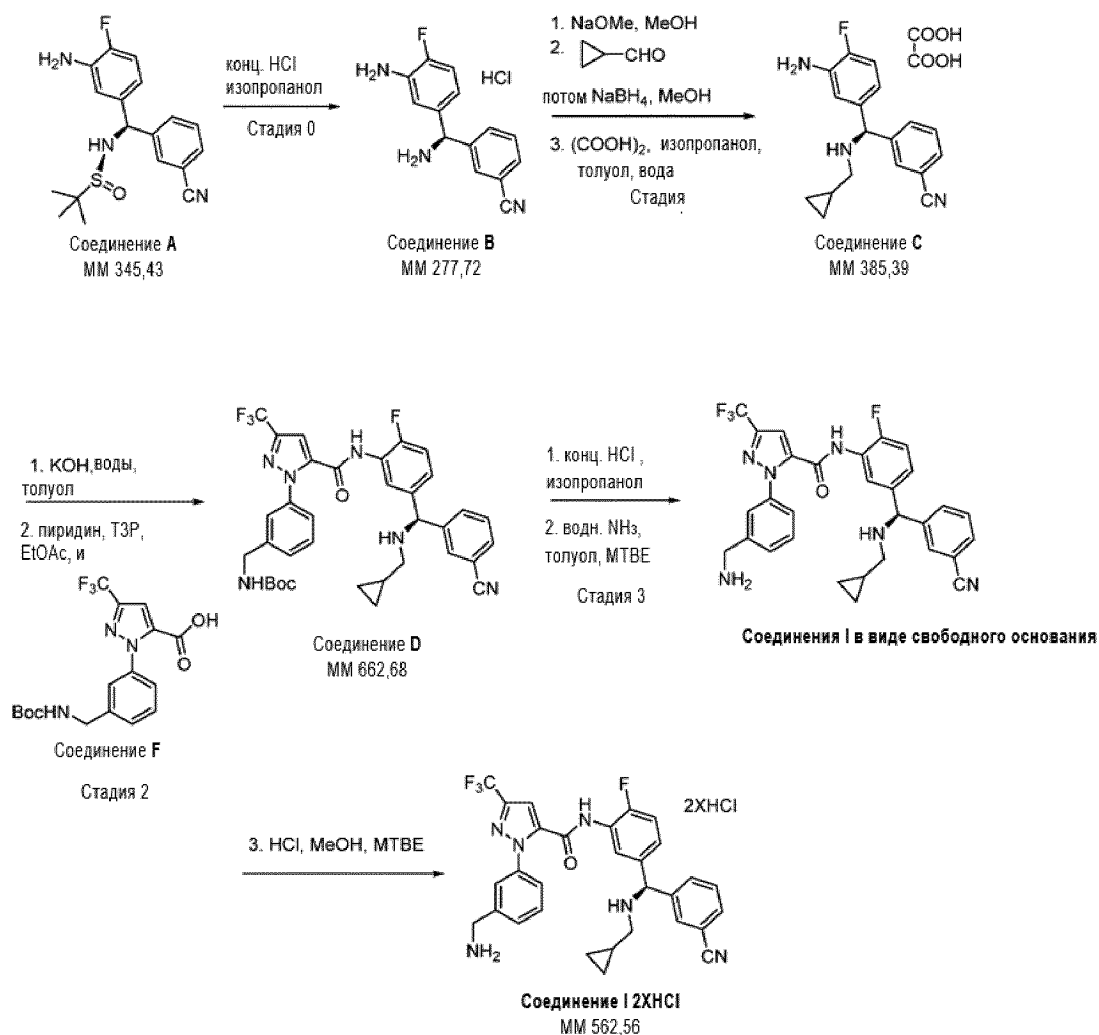
Стадия 5. Перекристаллизация (R)-N-((R)-(3-амино-4-фторфенил)(3-цианофенил)метил)-2-метилпропан-2-сульфинамида (соединение A)



(R)-N-((R)-(3-Амино-4-фторфенил)(3-цианофенил)метил)-2-метилпропан-2-сульфинамид (соединение А) (81,0 кг) растворяли в толуоле (567,0 л) при 40-50 °С. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и затем фильтровали через слой Нуфло, промывая толуолом (162,0 л). Раствор загружали в реактор. Раствор энергично перемешивали и добавляли н-гептан (324,0 л) при комнатной температуре. Смесь перемешивали в течение 5 ч при 15-20 °С, выпавшее в осадок твердое вещество собирали фильтрованием, промывали смесью 10 частей толуола с 90 частями н-гептана (81,0 л) и сушили при комнатной температуре в течение 24 ч с получением продукта **(R)-N-((R)-(3-амино-4-фторфенил)(3-цианофенил)метил)-2-метилпропан-2-сульфинамида (соединение А)** в виде грязно-белого твердого вещества (67,96 кг, 83,9%). ¹Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,82 (d, J=1,7 Гц, 1H), 7,70 (ddt, J=8,1, 5,2, 1,4 Гц, 2H), 7,54 (t, J=7,7 Гц, 1H), 6,93 (dd, J=11,4, 8,3 Гц, 1H), 6,73 (dd, J=8,8, 2,3 Гц, 1H), 6,57 (ddd, J=8,4, 4,4, 2,2 Гц, 1H), 5,99 (d, J=6,0 Гц, 1H), 5,48 (d, J=6,0 Гц, 1H), 5,14 (s, 2H), 1,13 (s, 9H); МС (ЭР+) 346,3 (M+1).

Пример 2. Процедура синтеза соединения I•2HCl

Следующая схема и сопутствующие стадии представляют собой процедуру синтеза кристаллической бис(хлористоводородной) соли соединения I.



Стадия 0. Получение соединения B в виде HCl (объем 100 кг)

Соединение А (151 кг) и 2-пропанол (501 л) загружали в реактор и перемешивали при 35 ± 5 °С до получения прозрачного раствора. После доведения температуры до 30-35 °С в реактор переносили концентрированную хлористоводородную кислоту (37% водн., 64 кг, 1,5 экв.) в течение по меньшей мере 10 минут, поддерживая температуру реактора ≤ 35 °С. Температуру содержимого реактора доводили до 25 ± 5 °С, и после перемешивания в течение 6 ± 1 часа содержимое охлаждали до 10 ± 5 °С и отбирали образец ИРС для анализа превращения с помощью ИРС ВЭЖХ. Если превращение в продукт реакции, соединение В HCl, составляло $<99,5\%$, реакционную смесь повторно нагревали до 25 ± 5 °С и перемешивали еще в течение 3 ± 1 час, а затем снова охлаждали до 10 ± 5 °С и собирали новый образец ИРС для анализа.

Содержимое реактора выдерживали при 10 ± 5 °С в течение 20-35 часов. Взвесь продукта переносили в центрифугу, продукт выделяли центрифугированием и промывали 2-пропанолом. После сухого формования продукт в виде соединения В HCl во влажном состоянии выгружали из центрифуги. Продукт сушили в вакууме при ≤ 30 °С в течение ≥ 3 часов и при ≤ 40 °С в течение ≥ 2 часов. Выход ($\sim 80\%$). ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,28 (s, 3H), 8,04 (s, 1H), 7,88-7,79 (m, 2H), 7,63 (t, J=7,8 Гц, 1H), 7,10-6,98 (m, 1H), 6,76 (d,

J=10,3 Гц, 2H), 5,58 (s, 1H), 5,32 (s, 2H).

Стадия 1. Получение соединения С в виде оксалата (объем 100 кг)

Соединение В в виде HCl (94 кг) и метанол (412 л) загружали в реактор и температуру содержимого доводили до -10 ± 5 °С. Загружали 30% метоксид натрия в метаноле (46 кг, 0,76 экв.), поддерживая внутреннюю температуру реактора на уровне -10 ± 5 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение ≥ 60 мин., проверяли pH и при необходимости дополнительно регулировали pH до 7-8 с применением необязательной порции 30% метоксида натрия в метаноле (2,6 кг, 0,04 экв.). Реакционную смесь охлаждали до -22 ± 4 °С и загружали предварительно взвешенный циклопропанкарбоксальдегид (23,4 кг, 0,99 экв.) пятью порциями, поддерживая внутреннюю температуру реактора ≤ -10 °С. Затем содержимое реактора перемешивали в течение $\geq 1,5$ часа при температуре -20 ± 5 °С.

Боргидрид натрия (4,5 кг, 0,35 экв.) загружали по одной порции за раз, поддерживая температуру реактора -20 ± 5 °С. Затем содержимое реактора перемешивали в течение ≥ 30 минут при температуре -20 ± 5 °С и анализировали ИРС на превращение в соединение С. При необходимости загружали необязательное количество боргидрида натрия (0,32 кг, 0,025 экв.), а затем перемешивали содержимое реактора в течение 30 мин при -20 ± 5 °С. Когда реакция была завершена (превращение в соединение С $\geq 95,0\%$), проводили вакуумную перегонку метанола при температуре рубашки ≤ 50 °С до тех пор, пока не были достигнуты объемные критерии (примерно 213 л). Экстракцию толуолом (339 л) и технической водой (121 л) проводили при внутренней температуре 30 ± 5 °С с последующим разделением в течение ≥ 15 мин. Нижнюю водную фазу отбрасывали. 10% хлорид натрия (99 кг) и технологическую воду (121 л) предварительно смешивали, а затем загружали в реактор при 30 ± 5 °С с последующим разделением в течение ≥ 15 мин. Нижнюю водную фазу отбрасывали. Процесс продолжали вакуумной перегонкой толуола при температуре рубашки ≤ 50 °С до заданных объемных критериев (около 221 л).

В реактор загружали дигидрат щавелевой кислоты (42 кг, 1 экв.) и 2-пропанол (254 л) и доводили температуру содержимого до 30 ± 5 °С. Затем содержимое перемешивали в течение ≥ 30 мин до получения прозрачного раствора. Затем переносили концентрированную толуольную фазу с описанной выше стадии, температуру в реакторе регулировали до 30 ± 5 °С, перемешивали в течение ≥ 30 мин и проверяли кристаллизацию. Содержимое реактора охлаждали до 20 ± 5 °С и перемешивали в течение ≥ 6 часов. Продукт в виде осадка переносили в центрифугу и промывали предварительно смешанным толуолом (59 л) и 2-пропанолом (62 л). После сухого формования продукт в виде соединения С в виде оксалата во влажном состоянии выгружали из центрифуги. Перекристаллизацию выполняли, загружая всю выгруженную партию соединения С в виде оксалата во влажном виде в реактор с последующей загрузкой предварительно нагретого ($80-83$ °С) 2-пропанола (516 л) и толуола (348 л). Содержимое реактора быстро нагревали до 79 ± 3 °С и перемешивали до получения прозрачного раствора. К содержимому реактора загружали технологическую воду (6,1 л, 1 экв.), содержимое

охлаждали до 20 ± 3 °С и перемешивали в течение по меньшей мере 12 часов, пока не произошла кристаллизация. Продукт выделяли центрифугированием и промывали предварительно смешанным изопропанолом (62 л) и толуолом (59 л). Продукт выгружали и отбирали образцы ИРС, а вторую перекристаллизацию проводили по той же процедуре, что описана ранее, и отбирали образцы ИРС (соединение В $\leq 0,05\%$, RRT $1,39 \leq 1,04\%$). Продукт сушили сначала при ≤ 30 °С в течение ≥ 3 часов, а затем при ≤ 40 °С в течение ≥ 3 часов в конусной сушилке. Высушенный материал выгружали, получая оксалат в виде соединения С (выход $\sim 77\%$). ^1H ЯМР (300 МГц, оксид дейтерия) δ 7,77 (d, J=3,3 Гц, 2H), 7,73 (s, 1H), 7,58 (t, J=7,8 Гц, 1H), 7,11 (dd, J=10,9, 8,4 Гц, 1H), 6,98 (dd, J=8,2, 2,3 Гц, 1H), 6,86 (dt, J=7,0, 3,2 Гц, 1H), 5,51 (s, 1H), 2,88 (d, J=7,4 Гц, 2H), 1,03 (tq, J=7,9, 3,9, 3,0 Гц, 1H), 0,63 (d, J=7,7 Гц, 2H), 0,24 (p, J=5,5, 5,1 Гц, 2H).

Стадия 2. Получение соединения D (объем 100 кг; раствор толуола 500 кг, 20 вес./вес.% соединения D)

Получали предварительную смесь раствора КОН путем загрузки воды (141 л) и гидроксида калия (24 кг, 85%, 2,1 экв.). Смесь перемешивали при 20 ± 5 °С до получения прозрачного раствора. Оксалат в виде соединения С (67 кг), 2-пропанол (10 л) и толуол (292 л) загружали в реактор и содержимое реактора перемешивали при 20 ± 5 °С в течение ≥ 15 мин. Полученный раствор гидроксида калия переносили в другой реактор при температуре ≤ 50 °С. Затем реакционную смесь нагревали до 50 ± 5 °С и перемешивали до получения прозрачного раствора. Проверяли pH (≥ 13) нижней водной фазы, затем содержимое реактора оставляли для разделения на ≥ 10 мин., а нижнюю водную фазу отбрасывали.

Оставшуюся толуольную фазу промывали технической водой (156 л) при 50 ± 5 °С и отделяли в течение ≥ 15 мин с последующим удалением нижней водной фазы. Процедуру повторяли и отбирали образец ИРС для органической фазы (RRT 0,85, NMT 0,10%). Толуольную фазу перегоняли в вакууме при температуре рубашки ≤ 70 °С до заданного объема (173 л). Загружали толуол (192 л) и повторяли перегонку по той же процедуре.

В другой реактор через люк загружали соединение F (73,5 кг в виде 100%, 1,1 экв.) и реактор перемешивали при 20 ± 5 °С в течение ≥ 15 мин и загружали первую порцию пиридина (13,7 кг, 1,0 экв.). Затем содержимое перемешивали до получения прозрачного раствора.

ТЗР, 50% в EtOAc (148,7 кг, 50%, 1,35 экв.) загружали в указанный выше раствор при температуре ≤ 3 °С. Содержимое реактора нагревали до 20 ± 5 °С и смесь перемешивали в течение 1,5-2,5 часов, а затем загружали вторую порцию пиридина (6,9 кг, 0,5 экв.). После перемешивания содержимого в течение 2-4 часов при 20 ± 5 °С из реакционной смеси (содержащей как воду, так и органическую фазу) отбирали образцы ИРС для анализа превращения (соединение D $\geq 99,6\%$). В реактор загружали технологическую воду (265 л) и третью порцию пиридина (20,6 кг). Реакционную смесь перемешивали при 35-40 °С в течение 15 мин., затем разделяли в течение ≥ 20 мин и

отбрасывали нижнюю водную фазу. Органическую фазу промывали технологической водой (265 л) и перемешивали при 35-40 °С в течение ≥ 15 мин., а затем оставляли для отделения в течение ≥ 20 мин с последующим удалением нижней водной фазы. Процедуру повторяли по мере необходимости. Затем переносили предварительно смешанный раствор водного раствора бикарбоната натрия (5%), воды (487 л) и NaHCO_3 (24,8 кг, 1,7 экв.), содержащее перемешивали при 38 ± 3 °С в течение ≥ 20 мин и разделяли в течение ≥ 20 мин и нижнюю водную фазу отбрасывали. Процесс продолжили промывкой технической водой (266 л) содержащего при температуре 35-40 °С в реакторе с последующим отделением и удалением нижней водной фазы.

Перегонку содержащего реактора под вакуумом проводили при Т.пл. < 70 °С до объема в реакторе ≤ 284 л. Толуол (примерно 280 л) загружали для достижения указанного целевого объема (примерно 563 л). Раствор продукта (соединение D) охлаждали до 4 ± 5 °С, отбирали образцы и выгружали в цилиндр, продуваемый азотом, а затем хранили в охлаждающем контейнере при 4 ± 5 °С. ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 10,56 (s, 1H), 7,89 (t, $J=1,6$ Гц, 1H), 7,74 (d, $J=7,7$ Гц, 1H), 7,69-7,61 (m, 2H), 7,58 (s, 1H), 7,54-7,31 (m, 7H), 7,22 (dd, $J=10,3, 8,5$ Гц, 1H), 4,93 (s, 1H), 4,19 (d, $J=6,2$ Гц, 2H), 2,25 (s, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,26 (s, 1H), 1,00-0,80 (m, 1H), 0,48-0,30 (m, 2H), 0,10 - -0,03 (m, 2H); ^{19}F ЯМР (282 МГц, DMSO) δ -60,62, -123,00; МС (ЭР+) 663,5 (M+1).

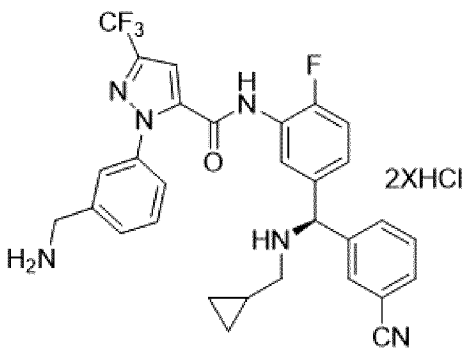
Стадия 3. Получение соединения I в виде 2XHCl (объем 100 кг)

В реактор загружали соединение D (119,9 кг, в виде 614,7 кг, 19,5% раствора в толуоле) и раствор подвергали вакуумной перегонке при температуре рубашки ≤ 70 °С для удаления толуола до тех пор, пока не было достигнуто объемное содержание 283 л. Замену растворителя проводили путем загрузки в реактор 2-пропанола (807 л) с последующей вакуумной перегонкой при Т.пл. < 70 °С до достижения объемного содержания 283 л. Процедуру повторяли один раз, затем дистиллированный раствор разбавляли 2-пропанолом (306 л) и водой (542 л) и доводили температуру до 20 ± 5 °С. В реактор загружали 37% хлористоводородную кислоту (115,2 кг; 6,46 экв.), поддерживая внутреннюю температуру реактора ≤ 45 °С. Реакционную смесь затем перемешивали при 40-47 °С в течение 5-12 часов, а затем отбирали образцы ИРС для контроля превращения (соединение I $\geq 98\%$). Содержимое реактора промывали толуолом (420 л) и перемешивали в течение по меньшей мере 15 мин при 35-40 °С с последующим отделением фазы продукта (нижняя водная фаза) в течение ≥ 15 мин при 35-40 °С. Фазу органических отходов (верхнюю фазу) отбрасывали. Эту процедуру повторяли два раза (сначала с 540 л толуола, затем с 633 л толуола). Толуол (662 л) загружали в водную фазу продукта и 25% водный аммиак (137 кг, 11,2 экв.) загружали в реактор через стеклянный сосуд при температуре ≤ 40 °С, и основную смесь перемешивали в течение по меньшей мере 30 мин при 35-40 °С и проверяли pH ($\text{pH} \geq 10$) с последующим прекращением перемешивания для разделения нижней водной фазы и верхней органической фазы, содержащей продукт соединения I в виде свободного основания. Нижнюю водную фазу отбрасывали. Органическую фазу продукта промывали технологической водой (614 л) при температуре

35-40 °С и водную фазу отбрасывали. Эту процедуру повторяли один раз. Тoluольную фазу перегоняли в вакууме при температуре рубашки ≤ 70 °С до заданного объема (314 л) в реакторе. Замену растворителя на МТВЕ (627 л) проводили в условиях вакуумной перегонки при Т.пл. <70 °С. Процедуру повторяли один раз и доводили оставшееся содержимое в реакторе дополнительным добавлением МТВЕ или дальнейшей перегонкой до получения заданного объема (максимум 1372 л, минимум 1262 л) при температуре 20 ± 5 °С. Затем содержимое охлаждали до -7 ± 3 °С.

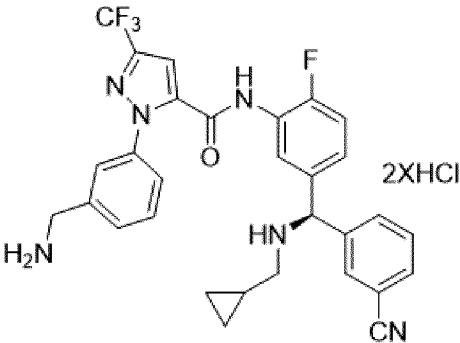
37% водный раствор хлористоводородной кислоты (38,1 кг, 32,3 л, 2,14 экв.) загружали в чистый и пустой сосуд для кристаллизации, добавляли метанол (228,9 кг, 39,5 экв.) для промывки и содержимое охлаждали до -7 ± 3 °С. Фазу МТВЕ с предыдущей стадии фильтровали через фильтр доочистки в сосуд для кристаллизации при температуре -5 ± 5 °С. После промывки с помощью МТВЕ через люк загружали предварительно взвешенные затравки соединения I 2ХНСI (1,39 кг, 0,012 экв.). Содержимое сосуда нагревали до 30-33 °С и скорость перемешивания устанавливали на 25-50 об/мин. После подтвержденной кристаллизации взвесь перемешивали еще в течение трех-четырех часов. Взвесь продукта переносили в центрифугу и выделяли центрифугированием, а продукт промывали с помощью МТВЕ (585 л). После сухого формования продукт соединение I 2ХНСI во влажном состоянии выгружали из центрифуги и продукт сушили при ≤ 40 °С под вакуумом в конусной сушилке. Типичный выход=74-86%.

Данные ^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) показаны в следующей таблице.

Структура	Химический сдвиг (ч/млн)	Класс	Количество атомов водорода
	0,02-0,10	m	2
	0,33-0,42	m	2
	0,80-0,97	m	1
	2,21-2,31	m	2
	3,77	s	2
	4,93	s	1
	7,22	dd	1
	7,34	ddt	2
	7,38-7,47	m	2
	7,47-7,54	m	2
	7,56	s	1
	7,63	dd	1
	7,67	dt	1
	7,71-7,77	m	1
	7,88	t	1

	10,53	s	1
--	-------	---	---

Данные ^{19}F ЯМР (282 МГц, ДМСО- d_6) показаны в следующей таблице.

Структура	Химические сдвиги фтора (ч/млн)
	-60,81, -119,99

Соединение I имеет два основных сайта. Было рассчитано, что сопряженная кислота первичного амина имеет значение pK_a 8,89, а рассчитанная сопряженная кислота вторичного амина имеет значение pK_a 7,86.

Пример 3. Анализы соединения

Соединение I исследовали в биохимическом анализе *in vitro*, измеряя подавление активности плазменного калликреина человека. Экспериментальные протоколы и результаты анализов можно найти в WO 2015/134998 и публикации заявки на патент США № 2017/0073314 A1 (оба включены в качестве ссылки). Результаты этого биохимического анализа демонстрируют, что соединение I является мощным ингибитором активности плазменного калликреина человека.

Включение посредством ссылки

Все патенты США и опубликованные заявки на патенты США и РСТ, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте, как если бы каждый отдельный патент или опубликованная заявка были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая любые приведенные в настоящем документе определения, будет иметь преимущественную силу.

Эквиваленты

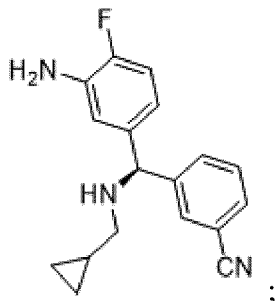
Хотя обсуждались конкретные варианты осуществления объекта изобретения, приведенное выше описание является иллюстративным, а не ограничительным. Многие варианты настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники после ознакомления с этим описанием и приведенной ниже формулой изобретения. Полный объем настоящего изобретения должен определяться ссылками на пункты формулы изобретения вместе с их полным объемом эквивалентов и описанием вместе с такими вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

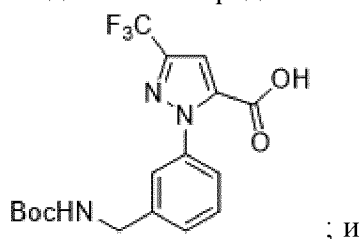
1. Способ, включающий стадию:

объединения соединения **C** или его соли и соединения **F** или его соли в условиях, достаточных для получения соединения **D** или его соли, при этом:

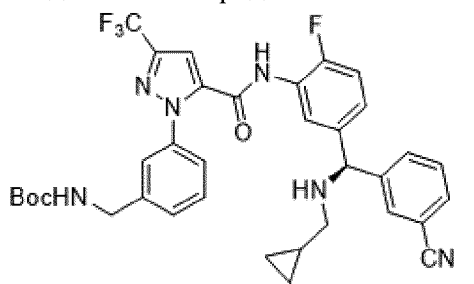
соединение **C** представлено с помощью:



соединение **F** представлено с помощью:



соединение **D** представлено с помощью:



2. Способ по п. 1, в котором условия, достаточные для получения соединения **D** включают реагент, связывающий амид, и первое основание.

3. Способ по п. 2, в котором реагент, связывающий амид, представляет собой ангидрид пропилфосфоновой кислоты (ТЗР), N, N'-ди(изопропил)карбодиимид, N, N'-ди(циклогексил)карбодиимид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид или этил-2-циано-2-(гидроксиимино)ацетат.

4. Способ по п. 3, в котором реагент, связывающий амид, представляет собой ангидрид пропилфосфоновой кислоты (ТЗР).

5. Способ по любому из пп. 2-4, в котором первое основание представляет собой первое органическое основание.

6. Способ по любому из пп. 2-5, в котором первое основание представляет собой триэтиламин, пиридин, диизопропилэтиламин, диизопропилметиламин, имидазол, пиримидин, N-метилморфолин, хинуклидин или 1,4-диазобисцикло[2.2.2]октан (DABCO).

7. Способ по любому из пп. 2-6, в котором первое основание представляет собой

пиридин.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором условия, достаточные для получения соединения **D**, дополнительно включают первый растворитель.

9. Способ по п. 8, в котором первый растворитель представляет собой полярный апротонный растворитель.

10. Способ по п. 9, в котором первый растворитель представляет собой дихлорметан, тетрагидрофуран, ацетон, ацетонитрил или этилацетат.

11. Способ по п. 9 или п. 10, в котором первый растворитель представляет собой этилацетат.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором соединение **C** представлено в виде кислой соли; и

способ дополнительно включает стадию объединения кислой соли соединения **C** со вторым водным основанием, образуя тем самым свободное основание соединения **C**;

при этом стадию объединения кислой соли соединения **C** со вторым водным основанием выполняют до объединения соединения **C** и соединения **F**.

13. Способ по п. 12, в котором кислая соль соединения **C** представляет собой хлористоводородную соль, бромистоводородную соль, йодистоводородную соль или щавелевую кислотную соль.

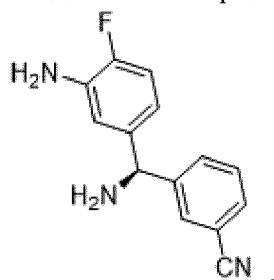
14. Способ по п. 13, в котором кислая соль соединения **C** представляет собой щавелевую кислотную соль.

15. Способ по любому из пп. 12-14, в котором второе водное основание включает гидроксид калия, гидроксид натрия, гидроксид аммония, бикарбонат калия, бикарбонат натрия, карбонат калия или карбонат натрия.

16. Способ по любому из пп. 12-15, в котором второе водное основание включает гидроксид калия.

17. Способ по любому из пп. 1-16, дополнительно включающий (а) объединение соединения **B** или его соли и  с образованием первой реакционной смеси, затем (b) объединение первой реакционной смеси с восстанавливающим средством в условиях, достаточных для образования соединения **C** или его соли; при этом:

соединение **B** представлено с помощью:



18. Способ по п. 17, в котором восстанавливающее средство представляет собой LiAlH_4 или NaBH_4 .

19. Способ по п. 17 или п. 18, в котором восстанавливающее средство представляет

собой NaBH_4 .

20. Способ по любому из пп. 17-19, в котором условия, достаточные для получения соединения **C**, дополнительно включают второй растворитель.

21. Способ по п. 20, в котором второй растворитель представляет собой второй полярный протонный растворитель.

22. Способ по п. 20 или п. 21, в котором второй растворитель представляет собой метанол, этанол или изопропанол.

23. Способ по любому из пп. 20-22, в котором второй растворитель представляет собой метанол.

24. Способ по любому из пп. 17-23, дополнительно включающий введение в контакт соединения **C** с первой кислотой с образованием кислой соли соединения **C**.

25. Способ по п. 24, в котором первая кислота представляет собой хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, йодистоводородную кислоту или щавелевую кислоту; а кислая соль соединения **C** представляет собой хлористоводородную соль, бромистоводородную соль, йодистоводородную соль или щавелевую кислую соль.

26. Способ по п. 25, в котором первая кислота представляет собой щавелевую кислоту; а кислая соль соединения **C** представляет собой щавелевую кислую соль.

27. Способ по любому из пп. 17-26, в котором соединение **B** представлено в виде кислой соли; и

способ дополнительно включает стадию объединения соли соединения **B** с третьим органическим основанием, образуя тем самым свободное основание соединения **B**;

при этом стадию объединения соли соединения **B** с третьим органическим основанием выполняют до объединения соединения **B** и .

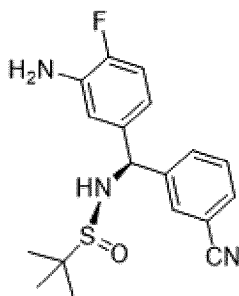
28. Способ по п. 27, в котором кислая соль соединения **B** представляет собой хлористоводородную соль, бромистоводородную соль или йодистоводородную соль.

29. Способ по п. 28, в котором кислая соль соединения **B** представляет собой хлористоводородную соль.

30. Способ по любому из пп. 27-29, в котором третье органическое основание включает метоксид натрия.

31. Способ по любому из пп. 17-30, дополнительно включает (а) объединение соединения **A** и второй кислоты в условиях, достаточных для образования соединения **B** или его соли; при этом:

соединение **A** представлено с помощью:



32. Способ по п. 31, в котором вторая кислота представляет собой хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту или йодистоводородную кислоту.

33. Способ по п. 32, в котором вторая кислота представляет собой хлористоводородную кислоту.

34. Способ по любому из пп. 31-33, в котором условия, достаточные для получения соединения **В**, включают третий полярный протонный растворитель.

35. Способ по п. 34, в котором третий полярный протонный растворитель представляет собой метанол, этанол или изопропанол.

36. Способ по п. 34 или п. 35, в котором третий полярный протонный растворитель представляет собой изопропанол.

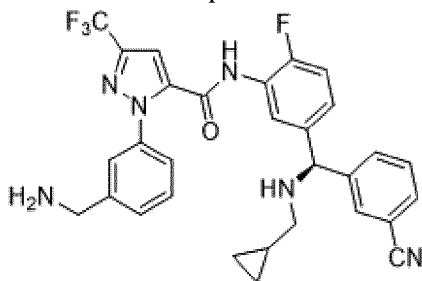
37. Способ по любому из пп. 31-36, в котором соединение **В** образовано в виде кислой соли.

38. Способ по п. 37, в котором кислая соль соединения **В** представляет собой хлористоводородную соль, бромистоводородную соль или йодистоводородную соль.

39. Способ по п. 38, в котором кислая соль соединения **В** представляет собой хлористоводородную соль.

40. Способ по любому из пп. 1-39, дополнительно включающий (с) объединение соединения **Д** и реагента для удаления защиты с образованием второй реакционной смеси, затем (d) подвергание второй реакционной смеси воздействию условий, достаточных для образования соединения **И** в качестве свободного основания; при этом:

соединение **И** представлено с помощью:



41. Способ по п. 40, в котором реагент для удаления защиты представляет собой третью кислоту.

42. Способ по п. 41, в котором третья кислота представляет собой хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту или йодистоводородную кислоту.

43. Способ по п. 42, в котором третья кислота представляет собой хлористоводородную кислоту.

44. Способ по любому из пп. 40-43, в котором условия, достаточные для получения соединения I в качестве свободного основания, включают четвертое основание.

45. Способ по п. 44, в котором четвертое основание представляет собой водный раствор аммиака.

46. Способ по любому из пп. 40-45, дополнительно включающий:

е) обеспечение первой смеси свободного основания соединения I в качестве свободного основания в четвертом органическом растворителе;

ф) объединение смеси свободного основания с первым раствором реагента, содержащим четвертую кислоту и пятый органический растворитель, в условиях, достаточных для образования третьей реакционной смеси, содержащей соль соединения I; и

г) кристаллизацию соединения I из смеси, содержащей соль соединения I.

47. Способ по п. 46, в котором кристаллическая соль представляет собой хлористоводородную соль.

48. Способ по п. 46, в котором кристаллическая соль представляет собой соль бис(гидрохлорида).

49. Способ по любому из пп. 46-48, в котором четвертый органический растворитель включает четвертый полярный апротонный растворитель.

50. Способ по п. 49, в котором четвертый полярный апротонный растворитель представляет собой метил-трет-бутиловый эфир.

51. Способ по п. 49 или п. 50, в котором четвертый органический растворитель дополнительно включает четвертый неполярный растворитель.

52. Способ по п. 51, в котором четвертый неполярный растворитель представляет собой толуол.

53. Способ по любому из пп. 46-52, в котором четвертая кислота представляет собой хлористоводородную кислоту.

54. Способ по любому из пп. 41-48, в котором пятый органический растворитель представляет собой пятый полярный протонный растворитель.

55. Способ по п. 54, в котором пятый полярный протонный растворитель представляет собой метанол.

56. Способ по любому из пп. 1-55, в котором соединение C применяется в количестве по меньшей мере 1 кг, по меньшей мере 5 кг, по меньшей мере 10 кг, по меньшей мере 15 кг, по меньшей мере 20 кг, по меньшей мере 25 кг, по меньшей мере 30 кг, по меньшей мере 35 кг, по меньшей мере 40 кг, по меньшей мере 45 кг, по меньшей мере 50 кг, по меньшей мере 55 кг или по меньшей мере 60 кг.

57. Способ по любому из пп. 1-56, в котором соединение C применяется в количестве по меньшей мере 50 кг.

По доверенности