

ÖZET

N-[(R)-1-[(S)-1-(4-AMİNOMETİL-BENZİLKARBAMOİL)-2-FENİL-ETİLKARBAMOİL]-2-(4-ETOKSİ-FENİL)-ETİL]-BENZAMİT HİDROKLORÜRÜN POLİMORFLARI

Mevcut buluş, N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürün yeni polimorflarını, bunları içeren farmasötik bileşimleri ve bunların terapide kullanımını sunmaktadır.

İSTEMLER

1. N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait katı bir form **olup, özelliği**; en azından $5,1 \pm 0,2$, $10,3 \pm 0,2$, $10,7 \pm 0,2$, $18,1 \pm 0,2$ ve $18,6 \pm 0,2$ değerlerinde aşağıdaki belirgin X ışını toz kırınım piklerini (2 θ derece cinsinden ifade edilen Cu K α ışınımı) sergilemesidir.
2. İstem 1'e göre katı bir form **olup, özelliği**; Şekil 1'de gösterilen ile büyük ölçüde aynı bir X ışını toz kırınım desenine sahip olmasıdır.
3. İstem 1 veya 2'ye göre katı form **olup, özelliği**; 3274 ± 1 , 3027 ± 1 , 2976 ± 1 , 2928 ± 1 , 1651 ± 1 , 1636 ± 1 , 1536 ± 1 , 1512 ± 1 , 1243 ± 1 ve 703 ± 1 değerlerinde cm⁻¹ cinsinden ifade edilen piklere sahip bir IR spektrumu ile karakterize edilmesidir.
4. İstem 1 ila 3 arasındaki istemlerden herhangi birine göre katı form **olup, özelliği**; Şekil 2'de gösterilen ile büyük ölçüde aynı bir IR spektrumuna sahip olmasıdır.
5. İstem 1 veya istem 2'ye göre katı form **olup, özelliği**; bir hidrat olmasıdır.
6. İstem 5'e göre katı form **olup, özelliği**; söz konusu hidratın bir monohidrat olmasıdır.
7. İstem 1 ila 6 arasındaki istemlerden herhangi birinde talep edilen farmasötik olarak kabul edilebilir bir adjuvan, seyreltici veya taşıyıcı ile ilişkili şekilde katı bir form içeren farmasötik bir bileşim **olup, özelliği**; söz konusu farmasötik bileşimin, bir süspansiyon, tablet, kapsül, toz, granül veya fitil formunda olmasıdır.

8. İstem 1 ila 6 arasındaki istemlerden herhangi birinde talep edilen bir katı form **olup, özelliği**; terapide kullanılmasıdır.

9. İstem 1 ila 6 arasındaki istemlerden herhangi birinde talep edilen, plazma kallikreinin aracılık ettiği bir hastalık veya rahatsızlığının tedavisinde kullanılmaya yönelik bir katı form **olup, özelliği**; plazma kallikreinin aracılık ettiği söz konusu hastalığın veya rahatsızlığın bozulmuş görme keskinliği, diyabetik retinopati, diyabetik makula ödemi, kalıtsal anjioödem, diyabet, pankreas, serebral hemoraji, nefropati, kardiyomiyopati, nöropati, inflamatuvar bağırsak hastalığı, artrit, iltihaplanma, septik şok, hipotansiyon, kanser, yetişkin respiratuvar distres sendromu, yaygın damariçi pıhtılaşması ve postoperatif cerrahi kanaması arasından seçilmesidir.

10. İstem 9'a göre katı form **olup, özelliği**; plazma kallikreinin aracılık ettiği hastalık veya rahatsızlığın diyabetik retinopati veya diyabetik makula ödemi olmasıdır.

11. İstem 1 ila 6 arasındaki istemlerden herhangi birine uygun, plazma kallikrein tarafından aracılık edilen bir hastalık veya rahatsızlığında tedavisinde kullanılan bir katı form **olup, özelliği**; plazma kallikreinin aracılık ettiği hastalık veya rahatsızlığın, diyabetik retinopati ve diyabetik makula ödemi ile ilişkili retinal vasküler geçirgenlik olması ve bahsi geçen katı formun, bir hastanın oküler bölgesine enjeksiyon yapmaya uygun bir formda, özellikle intra-vitreal enjeksiyon yapmaya uygun bir formda uygulanmasıdır.

12. İstem 1 ila 4 arasındaki istemlerden herhangi birinde talep edilen bir katı formun hazırlanmasına yönelik N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür ve bir çözücü ve bir çözücü karışımından oluşturulan söz konusu katı formun

kristalleştirilmesini içeren bir proses **olup, özelliği**; çözücü karışımının asetonitril ve su veya asetonitril ve dimetilsülfoksit olması ve söz konusu karışımın, oda sıcaklığına soğumaya bırakılmadan önce yaklaşık 75-80°C'lik bir sıcaklığa ısıtılmasıdır.

TARİFNAME

N-[(R)-1-[(S)-1-(4-AMİNOMETİL-BENZİLKARBAMOİL)-2-FENİL-ETİLKARBAMOİL]-2-(4-ETOKSİ-FENİL)-ETİL]-BENZAMİT HİDROKLORÜRÜN POLİMORFLARI

Mevcut buluş, bir plazma kallikrein inhibitörünün yeni polimorfları, bunları içeren bir farmasötik bileşim ve bunların tedavide kullanımı ile ilgilidir.

10 BULUŞUN GEÇMİŞİ

Plazma kallikreinin inhibitörleri, özellikle diyabetik retinopati ve diyabetik maküla ödemi ile ilişkili retinal vasküler geçirgenliğin tedavisinde bir dizi terapötik uygulamaya sahiptir. Serebral hemoraji, nefropati, kardiyomiyopati ve nöropati gibi diyabetin diğer komplikasyonlarının tümü plazma kallikrein ile birliktelik gösteren bir plazma kallikrein inhibitörü için hedef olarak düşünülebilir.

Plazma kallikrein, kininleri kininogenlerden serbest bırakabilen tripsin benzeri bir serin proteazdır (bkz. K. D. Bhoola v.d. "Kallikrein-Kinin Cascade", *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, s.483-493; J. W. Bryant v.d. "Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters" *Cardiovascular and haematological agents in medicinal chemistry*, 7, s. 234-250, 2009; K. D. Bhoola v.d. *Pharmacological Rev.*, 1992, **44**, 1 ve D. J. Campbell, "Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from the measurement of kinin peptides", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000, **33**, 665-677). Bu kaskaddaki rolü, bradikinin veya enzimatik bölünmenin serbest kalmasını içermemesine rağmen, intrinsik kan pıhtılaşma kaskadının zorunlu bir üyesidir. Plazma prekallikrein tek bir gen tarafından kodlanır ve karaciğerde sentezlenir. Aktif plazma kallikreini vermek üzere aktive edilen

yüksek moleköl ağırlıklı kininojene bağılı bir heterodimer kompleksi olarak plazma içinde dolaşan inaktif bir plazma, prekallikrein olarak hepatositler tarafından salgılanır. Kininler, **G** protein-bağılı reseptörler ve kininlerin (örneğin
5 bradikinin antagonistleri gibi) antagonistleri aracılığıyla etkili olan enflamasyonun kuvvetli aracılarıdır ve daha önce bir takım bozuklukların tedavisi için potansiyel terapötik maddeler olarak araştırılmıştır (F. Marceau ve D. Regoli, *Nature Rev., Drug Discovery*, 2004, **3**, 845-852).

10 Kininler, pankreatitin patogeneğinde önemli bir rol oynar ve ayrıca, oedematousun hastalığının nekrotizan formlarına ilerlemesinde de önemli olabilir. Pankreatitin hayvan modellerinde bradikinin antagonistleri ile yapılan ön tedavinin, pankreatik dokuda ödem oluşumunu ve hipotansiyon, hipovalemi,
15 hemoglobinasyon ve aktive edilmiş sindirim enzimlerinin birikmesi gibi sekel oluşumunu engellediğı gösterilmiştir (T. Griesbacher ve F. Lembeck *F. Br. J. Pharmacol.*, 1992 **107**, 356-360; T. Griesbacher v.d. *Br. J. Pharmacol.*, 1993, **108**, 405-411). Ancak, bradikinin antagonistlerinin daha fazla geliştirilmesi,
20 özgüllük ve etkililik eksikliği ile sınırlıdır. Ayrıca, bradikinin antagonistlerinin pankreasta hK1 seviyelerini arttırdığı ve böylece hK1 inhibitörleri ile gerçekleştirilen tedavinin bradikinin antagonistlerinden önemli ölçüde daha etkili olduğu gösterilmiştir (T. Griesbacher v.d. *Br. J. Pharmacol.*, 2003,
25 **139**, 299-308). Kinin oluşumunun hK1 inhibisyonu yoluyla önlenmesi, söz konusu bozuklukların tedavisi için kinin antagonistlerine uygun bir alternatif teşkil eder.

Plazma kallikreinin bir dizi inflamatuvar bozuklukta rol oynadığı düşünülmektedir. Plazma kallikreinin başlıca inhibitörü, serpin
30 C1 esteraz inhibitörüdür. C1 esteraz inhibitöründe genetik eksiklik gösteren hastalar, yüz, el, boğaz, gastrointestinal kanal ve genital bölgelerin şişmesi ile sonuçlanan kalıtsal anjiyoödemden (HAE) muzdariptir. Akut ataklar sırasında oluşan

kabarcıklar, yüksek moleküler ağırlığa sahip kininojen serbestleştirici bradikininin vasküler geçirgenliğinin artmasına yol açan yüksek plazma kallikrein seviyelerini içerir. Büyük bir protein plazma kallikrein inhibitörü ile yapılan tedavinin, kalıtsal anjioödem tedavisi için bir plazma kallikrein inhibitörü olan vasküler geçirgenliğe neden olan bradikinin salınmasını önleyerek HAE'yi etkili bir şekilde tedavi ettiği gösterilmiştir (A. Lehmann "Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery" *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, s. 1187-99).

İleri derecede diyabetik maküla ödemi olan hastalarda plazma kallikrein-kinin sistemi anormal derecede fazladır. Yakın zamanda, plazma kallikreinin, diyabetik sıçanlarda retinal vasküler disfonksiyonlara katkıda bulunduğu bildirilmiştir (A. Clermont v.d. "Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats" *Diabetes*, 2011, 60, s. 1590-98). Ayrıca, plazma kallikrein inhibitörü ASP-440 uygulanması, diyabetik sıçanlarda hem retinal vasküler geçirgenliği hem de retinal kan akımı anormalliklerini iyileştirmiştir. Bu nedenle bir plazma kallikrein inhibitörü, diyabetik retinopati ve diyabetik maküla ödemi ile ilişkili retinal vasküler geçirgenliği azaltmak için bir tedavi olarak kullanılmalıdır.

Sentetik ve küçük moleküllü plazma kallikrein inhibitörleri, örneğin, Garrett v.d. ("Peptide aldehyde...." *J. Peptide Res.* 52, p62- 71 (1998)), T. Griesbacher v.d. ("Involvement of tissue kallikrein but not plasma kallikrein in the development of symptoms mediated by endogenous kinins in acute pancreatitis in rats" *British Journal of Pharmacology* 137, p692-700 (2002)), Evans ("Selective dipeptide inhibitors of kallikrein" WO03/076458), Szelke v.d. ("Kininogenase inhibitors" WO92/04371), D. M. Evans v.d. (*Immunopharmacology*, 32, s. 115-

116 (1996)), Szelke v.d. ("Kininogen inhibitors" WO95/07921),
Antonsson v.d. ("New peptides derivatives" WO94/29335), J.
Stürzbecher v.d. (*Brazilian J. Med. Biol. Res* 27, s. 1929-34
(1994)), Kettner v.d. (US 5,187,157), N. Teno v.d. (*Chem. Pharm.*
5 *Bull.* 41, s. 1079-1090 (1993)), W. B. Young v.d. ("Small molecule
inhibitors of plasma kallikrein" *Bioorg. Med. Chem. Letts.* 16,
s.2034-2036 (2006)), Okada v.d. ("Development of potent and
selective plasmin and plasma kallikrein inhibitors and studies
on the structure-activity relationship" *Chem. Pharm. Bull.* 48,
10 s. 1964-72 (2000)), Steinmetzer v.d. ("Trypsin-like serine
protease inhibitors and their preparation and use" WO08/049595),
Zhang v.d. ("Discovery of highly potent small molecule
kallikrein inhibitors" *Medicinal Chemistry* 2, p545-553 (2006)),
Sinha v.d. ("Inhibitors of plasma kallikrein" WO08/016883),
15 Brandl v.d. ("N-((6-amino-pyridin-3-yl)methyl)-heteroaryl-
carboxamides as inhibitors of plasma kallikrein" WO2012/017020)
ve Okada v.d. ("Development of plasmin and plasma kallikrein
selective inhibitors and their effect on M1 (melanoma) and ht29
cell lines" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, s. 2217-2221 (2000))
20 referanslı yayınlarda daha önce tarif edilmiştir.

Bugüne kadar, küçük molekülü sentetik plazma kallikrein
inhibitörünün tıbbi amaçlarla kullanılması onaylanmamıştır.
Bilinen teknikte açıklanan moleküller, KLK1, trombin ve diğer
serin proteazlar gibi ilgili enzimler üzerinde zayıf seçicilik
25 ve kötü oral kullanılabilirlik gibi kısıtlamalardan muzdariptir.
Büyük protein plazma kallikrein inhibitörleri, Ecallantide için
rapor edildiği gibi, anafilaktik reaksiyon riskleri sunmaktadır.
Dolayısıyla, plazma kallikreini seçimli olarak inhibe eden,
anafilaksi oluşturmayan ve oral olarak mevcut olan bileşiklere
30 ihtiyaç duyulmaktadır. Dahası, bilinen teknikteki moleküllerin
büyük çoğunluğu, oldukça polar ve iyonize edilebilir bir
guanidin veya amidin işlevselliğine sahiptir. Bu
işlevselliklerin bağırsak geçirgenliğine ve dolayısıyla oral
kullanılabilirliğe sınırlanabileceği iyi bilinmektedir.

Farmasötik formülasyonların üretiminde, etken bileşiğin, ticari olarak uygulanabilir bir üretim prosesi elde etmek için uygun şekilde işlenebildiği ve işlenebileceği bir formda olması önemlidir. Dolayısıyla etken bileşiğin kimyasal dayanıklılığı ve fiziksel dayanıklılığı önemli faktörlerdir. Etken bileşik ve etken bileşiği içeren formülasyonlar, etken bileşiğin fizikokimyasal özelliklerinde (örneğin kimyasal bileşimi, yoğunluğu, higroskopisi ve çözünürlüğü) önemli bir değişiklik göstermeksizin, kayda değer süreler boyunca etkili bir şekilde depolanabilmelidir.

Farmasötik bir terkip maddesinin belirli bir katı haldeki formunun üretilmesinin, katı hal özelliklerinin birçok yönünü etkileyebileceği ve çözünürlük, çözünme oranı, kimyasal kararlılık, mekanik özellikler, teknik fizibilite, işlenebilirlik, farmakokinetik ve biyoyararlanım açısından avantajlar sağladığı bilinmektedir. Bunlardan bazıları "Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection and Use", P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.) (Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich) referanslı yayında tarif edilmektedir. Katı haldaki formların üretilmesine yönelik yöntemler, "Practical Process Research and Development", Neal G. Anderson (Academic Press, San Diego) ve "Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry", Rolf Hilfiker (Ed) (Wiley VCH). referanslı yayınlarda da tarif edilmektedir. Farmasötik kristallerde polimorfizm, Byrn (Byrn, S.R., Pfeiffer, R.R., Stowell, J.G., "Solid-State Chemistry of Drugs", SSCI Inc., West Lafayette, Indiana, 1999), Brittain, H.G., "Polymorphism in Pharmaceutical Solids", Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 1999) veya Bernstein (Bernstein, J., "Polymorphism in Molecular Crystals", Oxford University Press, 2002) referanslı yayınlarda tarif edilmektedir.

Patent başvurusu sahibi, W02013/005045 (PCT/GB2012/051588) sayılı yayında açıklanan plazma kallikrein inhibitörleri olan

5 yeni bir benzilamin türevleri serisi geliştirmiştir. Bu bileşikler plazma kallikrein için iyi bir seçicilik gösterir ve bozulmuş görme keskinliği, diyabetik retinopati, maküla ödemi, kalıtsal anjioödem, diyabet, pankreatit, serebral hemoraji, nefropati, kardiyomiyopati, nöropati, inflamatuvar bağırsak hastalığı, artrit, inflamasyon, septik şok, hipotansiyon, kanser, yetişkin respiratuvar distres sendromu, yaygın damar içi pıhtılaşma, kardiyopulmoner baypas cerrahisi ve postoperatif cerrahi kaynaklı kanama tedavisinde potansiyel olarak yararlıdır. Söz konusu gibi bir benzilamin türevi, N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamittir. N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hazırlamaya yönelik ilk denemeler sonucunda biçimsiz bir katı elde edilmiştir. Ancak başvurusu sahibi, bu bileşiğin hidroklorik asit tuzuna ait bundan böyle "Form 1" ve "Form 2" olarak adlandırılacak yeni, kararlı kristal formlarını geliştirmiştir. Söz konusu yeni katı formlar, bunları geliştirmeye uygun hale getiren avantajlı fizikokimyasal özelliklere sahiptir.

Örneğin, Şekil 4'e yer alan N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait "Form 1" in Gravimetrik Buhar Sorpsiyon (GVS) verileri, hidrasyonun tersinir (anlamli histerezis yok) olduğunu gösterir. Bu veriler ayrıca, normal koşullar altında (%20 ila %80 bağıl nem) sadece su içeriğinde nispeten kademeli bir artış göstermektedir. Bunun nedeni örneğin ıslatılması olabilir ve anlamlı higroskopisitenin bulunmamasıyla tutarlıdır.

30 Kristal formların farmasötik gelişme için uygunluğuna dair daha fazla kanıt, aşağıda yer alan kararlılık verileri ile sunulmuştur. N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid

- XRPD diffraktogramında bir değişiklik görülmemiştir.

- Anlamlı bir kimyasal bozulma görülmemiştir. Saflık (HPLC), %99,8'lik alanda kalmıştır.

2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid
hidroklorürün kristal formunun hidratlarını kapsar.

5 N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-
etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre
ait burada "Form 1" ve "Form 2" olarak anılan iki kristal
polimorf izole edilmiştir ve bugüne kadar karakterize
edilmiştir.

10 Mevcut buluşa ait kristal form, Form 1'dir. Buluşun bir yönünde
N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-
etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre
ait kristal form, bir hidrat, özellikle bir monohidrat veya
hemihidrattır.

Mevcut tarifnamede, (2 θ derece şeklinde ifade edilen) X ışını
toz kırınım pikleri, Cu K α ışınması kullanılarak ölçülmektedir.

15 Mevcut buluş, N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-
2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid
hidroklorüre ait bir kristal form (Form 1) sunar ve bu form,
yaklaşık olarak aşağıdaki değerlerde olan en azından aşağıdaki
belirgin X ışını toz kırınım piklerini (2 θ derece cinsinde ifade
20 edilen Cu K α ışınımı) sergiler:

- (1) 5,1, 10,3, 10,7, 18,1 ve 18,6 veya
- (2) 5,1, 10,3, 10,7, 14,9, 17,9, 18,1 ve 18,6 veya
- (3) 5,1, 7,8, 10,3, 10,7, 14,9, 16,6, 17,9, 18,1 ve 18,6.

25 "Yaklaşık" terimi bu bağlamda, 2 θ derecesinin ölçümlerinde (2 θ
derece cinsinden ifade edilen) $\pm 0,2^\circ$ 'lik bir belirsizlik olduğu
anlamına gelir.

Mevcut buluş ayrıca, yaklaşık 5,1, 7,8, 10,3, 10,7, 13,0, 14,9,
16,6, 17,9, 18,1 ve 18,6 değerlerinde (2 θ derece cinsinden ifade

edilen) belirgin pikleri içeren bir X ışını toz kırınım desenine sahip N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait kristal bir form (Form 1) sunar.

5 Mevcut buluş ayrıca, en az yaklaşık olarak aşağıdaki belirgin d uzaklığı değerlerini (Å) sergileyen X ışını toz kırınım desenine sahip N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait kristal bir form (Form 1) sunar:

- 10 (1) 17,32, 8,61, 8,23, 4,89 ve 4,76 veya
(2) 17,32, 8,61, 8,23, 5,96, 4,97, 4,89 ve 4,76 veya
(3) 17,32, 11,28, 8,61, 8,23, 5,96, 5,34, 4,97, 4,89 ve 4,76.

"Yaklaşık" terimi bu bağlamda, d uzaklığı değerlerinin (A) ölçümlerinde (A cinsinden ifade edilen) $\pm 0,2'$ lik bir belirsizlik
15 olduğu anlamına gelir.

Şekil 1'te N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl) -2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait Form 1'nin X ışını toz kırınım deseni gösterilir. Mevcut buluş ayrıca, Şekil 1'de gösterilen ile büyük
20 ölçüde aynı olan bir X ışını toz kırınım desenine sahip N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait bir kristal form (Form 1) sağlar.

Şekil 2'de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl) -2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid
25 hidroklorüre ait Form 1'in IR spektrumu gösterilir. Mevcut buluş ayrıca, yaklaşık 3274, 3027, 2976, 2928, 1651, 1636, 1536, 1512, 1243 ve 703 değerlerinde cm^{-1} cinsinden ifade edilen belirgin piklere sahip bir IR spektrumu ile karakterize edilen N-[(R)-1-
30 [(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-

2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait kristal bir form (Form 1) sunar.

“Yaklaşık” terimi bu bağlamda, cm^{-1} değerlerinin örneğin $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ ’e kadar değişebileceği anlamı gelir. Mevcut buluş ayrıca, Şekil 2’de gösterilen ile büyük ölçüde aynı olan bir IR spektrumuna sahip N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait bir kristal form (Form 1) sağlar.

Şekil 5’te N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait Form 2’nin X ışını toz kırınım deseni gösterilir.

Mevcut buluşun kristal formları hem solvatlı hem de solvatsız formlarda mevcuttur. Burada kullanılan ‘solvat’ terimi buluşun bileşiğini ve bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir moleküllerden, örneğin etanolden bir miktar içeren moleküler bir kompleksi açıklamak için kullanılır. Çözücü su olduğunda, ‘hidrat’ terimi kullanılır.

Mevcut buluş ayrıca, mevcut buluşa ait Form 1’in hazırlanmasına yönelik bir prosesi kapsar ve söz konusu proses, bir çözücü veya çözücü karışımı içindeki N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür çözeltisinden elde edilen bahsi geçen kristal formun kristalleştirilmesini içerir. Buluşun bir yönünde çözücü karışım, asetonitril ve sudur. Buluşun bir başka yönünde çözücü karışım, asetonitril ve dimetilsülfoksittir. Başka bir yönde, N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür, bir çözücüye veya bir çözücü karışımına (örneğin asetonitril ve su veya asetonitril ve dimetilsülfoksit) ilave edilir ve birleştirilen karışım (bileşik artı çözücü(ler)) oda sıcaklığına

5 getirilmeden önce yaklaşık 70-85°C'lik bir sıcaklığa ısıtılır. Alternatif olarak bu yönde, birleştirilen karışım, oda sıcaklığına getirilmeden önce yaklaşık 75-80°C'lik bir sıcaklığa ısıtılır. Alternatif olarak bu yönde, birleştirilen karışım, oda sıcaklığına getirilmeden önce yaklaşık 75, 76, 77, 78, 79 veya 80°C'lik bir sıcaklığa ısıtılır. Alternatif olarak bu yönde, birleştirilen karışım, oda sıcaklığına getirilmeden önce yaklaşık 77°C'lik bir sıcaklığa ısıtılır.

10 Alternatif olarak, bahsi geçen kristal form, katı amorf olmayan form üzerinde termal döngü gerçekleştirilmesiyle (örn. diferansiyel tarama kalorimetresi ile örnek üzerinde gerçekleştirilen 245°'ye kadar ısıtma/soğutma döngüsü) elde edilir.

15 Mevcut buluşa ait prosesler, aynı zamanda buluşun kristal formunun kristal tohumlarının ilave edilmesini içerebilir.

Bir yönde mevcut buluş, buluşa göre bir proses ile üretildiğinde buluşun kristal formunu sağlar.

20 Daha önce de bahsedildiği gibi mevcut buluşun kristal formu, özellikle plazma kallikreinin aracılık ettiği hastalıkların ve rahatsızlıkların tedavisinde bir dizi terapötik uygulamaya sahiptir.

Dolayısıyla, daha önce tanımlandığı gibi tedavide kullanılmaya yönelik N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid

25 hidroklorüre ait Form 1'i sunar.

Ayrıca, daha önce burada tanımlandığı gibi N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait bir kristal formun plazma kallikreinin aracılık ettiği bir hastalık veya 30 rahatsızlığın tedavisine yönelik bir ilacın üretilmesine

kullanılması açıklanmaktadır. Mevcut tarifnamenin tercih edilen bir yönünde söz konusu kristal form, Form 1'dir.

Mevcut buluş, plazma kallikreinin aracılık ettiği bir hastalık veya rahatsızlığın bir tedavi yönteminde kullanılmaya yönelik daha önce burada tanımlandığı gibi N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil) -2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait Form 1'i sunar.

Ayrıca, plazma kallikreinin aracılık ettiği bir hastalık veya rahatsızlığın tedavisine yönelik bir yöntem açıklanmaktadır ve söz konusu yöntem, daha önce burada tanımlandığı gibi N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil) -2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait kristal bir formun terapötik olarak etkili bir miktarının söz konusu tedaviye ihtiyaç duyan bir memeliye verilmesini içerir. Mevcut tarifnamenin tercih edilen bir yönünde söz konusu kristal form, Form 1'dir.

Bir yönüyle, plazma kallikreinin aracılık ettiği hastalık veya durumlar, bozuk görme keskinliği, diyabetik retinopati, maküla ödemi, kalıtsal anjiyoödem, diyabet, pankreatit, serebral hemoraji, nefropati, kardiyomiyopati, nöropati, inflamatuvar bağırsak hastalığı, artrit, inflamasyon, septik şok, hipotansiyon, kanser, yetişkin respiratuvar distres sendromu, yaygın damar içi pıhtılaşma, kardiyopulmoner baypas cerrahisi ve postoperatif cerrahi kaynaklı kanama arasından seçilmektedir.

Başka bir yönüyle, plazma kallikreinin aracılık ettiği hastalık veya durum, diyabetik retinopati veya diyabetik maküla ödemi ile ilişkili retinal vasküler geçirgenliktir.

Mevcut buluş bağlamında, burada "tedavi" ye yapılan atıflar, aksi belirtilmedikçe iyileştirici, palyatif ve profilaktik tedaviye yönelik atıfları kapsamaktadır. "Terapi", "terapötik" ve "terapötik olarak" terimleri aynı şekilde yorumlanmalıdır.

Mevcut buluşun kristal formu, tek başına veya bir veya daha fazla başka ilaç ile kombinasyon halinde uygulanabilir. Genellikle, bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir ekşiپیان ile birlikte bir formülasyon olarak uygulanacaktır. "Ekşiپیان" terimi burada, buluşun hem fonksiyonel (örn. ilaç salım hızını kontrol eden) hem de fonksiyonel olmayan (örn. yardımcı veya seyreltici) formülasyonlara karakteristik kazandırabilen bileşiklerin dışında herhangi bir içeriği açıklamak için kullanılır. Ekşiپیان seçimi, belirli uygulama tarzı, ekşiپیanın çözünürlük ve stabilite üzerindeki etkisi ve dozaj formunun doğası gibi faktörlere büyük ölçüde bağlı olacaktır.

Başka bir yönüyle, bu buluşun bileşikleri retinanın lazer tedavisi ile kombinasyon halinde uygulanabilir. Diyabetik maküla ödemi tedavisinde intravitreal bir VEGF inhibitörü ile lazer tedavisinin kombinasyonu bilinmektedir (Elman M, Aiello L, Beck R v.d. "Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema" .Ophthalmology. 27 Nisan 2010).

Mevcut buluşa ait kristal formların verilmesi için uygun farmasötik bileşimleri ve bunların hazırlanması için yöntemler, teknikte uzman kişilerce kolayca anlaşılabilecektir. Bu tür bileşimler ve bunların hazırlanması için yöntemler, örneğin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 19. Baskı (Mack Publishing Company, 1995) referanslı yayında bulunabilir.

İnsan hastalara uygulama için, buluşun kristal formlarının toplam günlük dozu uygulama moduna göre değişmekle birlikte, tipik olarak, 0,01 mg ve 1000 mg aralığında veya 0,1 mg ila 250 mg arasında veya 1 mg ila 50 mg arasındadır. İntravitreal enjeksiyon yoluyla uygulanması halinde, her göze 0,0001 mg (0,1 µg) ve 0,2 mg (200 µg) arasında veya 0,0005 mg (0,5 µg) ve 0,05 mg (50 µg) arasında daha düşük bir doz öngörülmektedir.

Toplam günlük doz, tek veya bölünmüş dozlarda uygulanabilir ve doktorun takdirine bağlı olarak, burada verilen tipik aralığın dışında kalabilir. Bu dozajlarda yaklaşık 60 kg ila 70 kg arasında bir ağırlığa sahip bir ortalama bir insan deneği baz alınmaktadır. Hekim, bebekler ve yaşlılar gibi ağırlığı bu aralığın dışında kalan denekler için dozları kolayca belirleyebilir.

Dolayısıyla mevcut buluş, daha önce burada tanımlandığı gibi N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-

etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait Form 1'i içeren farmasötik bir bileşik veya farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı, seyreltici veya ekşiyan sağlar. Farmasötik bileşimler, örneğin krem, süspansiyon, heptafloroalkan (HFA) aerosol ve kuru toz formülasyonlar gibi formlar halinde (örn. göze, deriye veya akciğere ve/veya hava yollarına) topikal olarak veya tablet, kapsül, toz veya granül formunda oral yolla veya süspansiyon formunda parenteral yolla veya subkütanöz yolla veya fitil formunda rektal yolla sistematik olarak veya transdermal olarak uygulanabilir.

Mevcut buluşun bir uygulamasında etken madde oral olarak uygulanır. Oral yolla uygulama, bileşiğin gastrointestinal kanala girdiği yutmayı ve/veya bileşiğin kan dolaşımına doğrudan ağızdan girdiği bukkal, lingual veya sublingual yolla uygulamayı içerebilir.

Oral yolla uygulama için uygun olan farmasötik formülasyonlar arasında, tabletler gibi katı buşonlar, katı mikropartiküller, (çoklu fazlar veya dağılmış sistemler dahil olmak üzere) yarı katı ve sıvı tabletler; çoklu veya nano partikülleri, sıvıları (örneğin sulu çözelti), emülsiyonları veya tozları içeren yumuşak veya sert kapsüller; (sıvı dolgulular dahil olmak üzere) pastiller; çiğneme tabletleri; jeller; hızlı dağılan dozaj formları; filmler; ovüller; spreyler; ve bukkal/muko yapışkan

bantlar bulunmaktadır.

Oral uygulama için uygun olan formülasyonlar ayrıca, kristal formun çabuk salım şeklinde veya hızla sürdürülebilir bir şekilde verilmek üzere tasarlanabilir ve burada salım profili, 5 bahsi geçen kristal formun terapötik etkinliğini optimize edecek şekilde geciktirilebilir, kesikli halde olabilir, kontrol edilebilir, sürdürülebilir veya geciktirilebilir veya modifiye edilebilir. Hızla sürdürülen bir tarzda bileşiklerin iletilmesi için araçlar, teknikte uzman kişilerce bilinmekte ve 10 salınımlarını kontrol etmek için bahsedilen bileşikler ile formüle edilebilen yavaş salınan polimerleri kapsamaktadır.

Hızla sürdürülen polimerlerin örnekleri arasında, adı geçen bileşimlerin difüzyon veya difüzyon ve polimer erozyonunun bir kombinasyonu ile serbest bırakılmasında kullanılabilen, 15 parçalanabilir ve bozunur olmayan polimerler bulunur. Hızla sürdürülen polimerlerin örnekleri kapsamında hidroksipropil metilselüloz, hidroksipropil selüloz, metil selüloz, etil selüloz, sodyum karboksimetil selüloz, polivinil alkol, polivinil pirolidon, ksantan sakızı, polimetakrilatlar, 20 polietilen oksit ve polietilen glikol yer almaktadır.

Sıvı (çoklu fazlar ve dağıtılmış sistemler dahil) formülasyonlar arasında süspansiyonlar yer almaktadır. Bu gibi formülasyonlar yumuşak veya sert kapsüllerde (örneğin jelatin veya hidroksipropilmetilselülozdan yapılmış) dolgu maddeleri olarak 25 sunulabilir ve tipik olarak bir taşıyıcı, örneğin su, etanol, polietilen glikol, propilen glikol, metilselüloz veya uygun bir yağ ve bir veya daha fazla emülgatör ve/veya süspanse edici ajan içerebilir. Sıvı formülasyonlar ayrıca bir katı maddenin, örneğin bir saşetten yeniden oluşturulmasıyla da hazırlanabilir.

30 Buluşa ait kristal form ayrıca Liang ve Chen, Expert Opinion in Therapeutic Patents, 2001, **11 (6)**, 981-986 referanslı yayında

tarif edilenler gibi hızlı çözülen, hızlı parçalanan dozaj formlarında kullanılabilir.

Tabletlerin formülasyonu, Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, 1. cilt, H. Lieberman ve L. Lachman (Marcel Dekker, New York, 5 1980) referanslı yayında açıklanmaktadır.

Mevcut buluş buradan itibaren, sınırlayıcı olmayan aşağıdaki örnekler ile açıklanacaktır. Ekteki istemlerin kapsamı dışında kalan herhangi bir örnek, sadece referans amaçlı verilmiştir. Örneklerde aşağıdaki şekiller sunulmaktadır:

- 10 Şekil 1: N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil) -2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait Form 1'nin X ışını toz kırınım deseni.
- Şekil 2: N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil) -2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid
- 15 hidroklorüre ait Form 1'in IR spektrumu.
- Şekil 3: N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil) -2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait Form 1'in DSC termografı.
- Şekil 4: N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil) -2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid
- 20 hidroklorüre ait Form 1'in gravimetrik buhar sorpsiyon izotermeleri (sorpsiyon, desorpsiyon ve sorpsiyon).
- Şekil 5: N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil) -2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid
- 25 hidroklorüre ait Form 2'nin X ışını toz kırınım deseni.
- Şekil 6: N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil) -2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre ait Form 2'nin DSC termografı.
- Şekil 7: Sprague Dawley sıçanlarında CA-I ile uyarılmış RVP'nin
- 30 ardından N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür ("Test Bileşiği" olarak etiketlenmiştir) ve CH-

3457'nin (pozitif kontrol; plazma kallikrein inhibitörü) inhibe edici etkisi gösterilmektedir.

Şekil 8: 4,2 µg/mL'lik (210 ng/göz) IVT uygulamasının ardından N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-feniletilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürün ("Test Bileşiği" olarak etiketlenmiştir) inhibe edici etkisi gösterilmektedir.

Genel Deney Detayları

¹H NMR spektrumları, oda sıcaklığında döteryum çözücüyeye referansla bir Bruker Avance III (400 MHz) spektrometresi üzerinde kaydedilmiştir.

Moleküler iyonlar, 1,5 mL/dk akış hızında 11 dakika boyunca %0,1 HCO₂H/H₂O içine %10 ila %90 %0,1 HCO₂H/MeCN lineer gradyanlı bir Chromolith Speedrod RP-18e kolonu, 50 x 4,6 mm kullanılarak gerçekleştirilen LMCS kullanılarak elde edilmiştir. Veriler, Thermofinnigan Surveyor LC sistemi ile birlikte elektrospay iyonizasyonu ile Thermofinnigan Surveyor MSQ kütle spektrometresi kullanılarak toplanmıştır.

Kimyasal isimler, MDL Bilgi Sistemleri'nden ISIS çekme paketinin bir parçası olarak sağlanan Otonomi yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur.

Tüm çözücüler ve ticari reaktifler alındığı gibi kullanılmıştır.

Kızıl ötesi spektrumlar, standart absorbanz konfigürasyonuna ayarlanmış bir sistem kullanılarak, potasyum bromür ile hazırlanmış ve 4000 cm⁻¹ ila 400 cm⁻¹ arasında taranmış örneklerle ölçülmüştür.

X Işını Toz Kırınım desenleri, Cu Kα ışınım (45kV, 40mA), θ - θ ganyometre, odaklama aynası, diverjan split (1/2"), hem gelen

ışıkta hem de saçılan ışıktaki soler slitler (4mm) ve bir PIXcel dedektörü kullanılarak bir PANalytical diffraktometre üzerinde toplanmıştır. Veri toplamada kullanılan yazılım X'Pert Data Collector, versiyon 2.2f'dir ve veriler, X'Pert Data Viewer, versiyon 1.2d kullanılarak sunulmuştur.

XRPD desenleri, bir PANalytical X'Pert PRO kullanılarak ortam koşullarında bir transmisyon folyosu örnek tablası (poliimid-Kapton, 12,7 µm kalınlıkta film) ile ortam koşullarında elde edilmiştir. Veri toplama aralığı, 0,202004°s⁻¹'lık sürekli tarama hızı ile 2,994 - 35°2θ şeklindedir.

DSC verileri, bir 45 pozisyonlu örnek tutucusuna sahip bir PerkinElmer Pyris 4000 DSC üzerinde toplanmıştır. Cihaz, sertifikalı indiyum kullanarak enerji ve sıcaklık kalibrasyonu açısından doğrulanmıştır. Önceden belirlenmiş 0,5-3,0 arasında bir miktarda örnek, iğne delikli bir alüminyum tavaya yerleştirilmiş ve 30 ila 350°C arasında 20°C.min⁻¹'de ısıtılmıştır ve bunlar dikte edilen deneye göre değişebilmektedir. Örnek üzerinde, 60 ml.min⁻¹'de kuru nitrojen ile süpürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Cihaz kontrolü, veri toplama ve analiz, Pyris Software v9.0.1.0203 ile gerçekleştirilmiştir.

N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür (Form 1)

Yöntem

A. {(S)-1-[4-(tert-butoksikarbonilamino-metil)-benzilkarbamoyl]-2-fenil-etil}-karbamik asit benzil ester

(S)-2-benziloksikarbonilamino-3-fenil-propiyonik asit 2,5-diokso-pirrolidin-1-il ester (4,25 g, 10,72 mmol), CH₂Cl₂ (100 mL) içinde çözülmüştür. Bu çözelti 0°C'ye soğutulmuştur. 1-(N-Boc-Aminometil)-4-(aminometil)benzen (2,79 g, 11,79 mmol) ve

ardından trietilamin (3,25 g, 32,16 mmol) ilave edilmiştir. 0°C
ila oda sıcaklığında 18 saatin ardından tepkime karışımı,
kloroform (100 mL) ile seyreltilmiş ve NaHCO₃ (1x30 mL), su (1x30
mL), tuzlu su (1x30 mL) ile yıkanmış, kurutulmuş (Na₂SO₄), vakum
5 ortamında sarı bir yağ elde etmek üzere buharlaştırılmıştır.
Kalıntı, { (S)-1-[4-(tert-butoksikarbonilamino-metil)-
benzilkarbamoil]-2-fenil-etil}-karbamik asit benzil ester (3,88
g, 7,49 mmol, %70) olarak tanımlanan beyaz bir katı elde etmek
üzere Pet. Eter (60-80°C) ve EtOAc ile toz haline getirilmiştir.
10 [M+H]⁺ = 518,28; 540,32 (M+Na).

**B. {4-[(S)-2-Amino-3-fenil-propionilamino]-metil}-benzil}-
karbamik asit tert-butil ester**

{ (S)-1-[4-(tert-butoksikarbonilamino-metil)-benzilkarbamoil]-
2-fenil-etil}-karbamik asit benzil ester (3,66 g, 7,08 mmol),
15 metanol (200 mL) içinde çözülmüştür. Bu çözelti, atmosfer
basıncında ve oda sıcaklığında bir saat boyunca % 10 Pd/C (500
mg) üzerinde hidrojenlenmiş; daha sonra katalizör, selit ile
filtre edilmiş ve kalıntı, metanol (30 mL) ile yıkanmış;
birleştirilen filtratlar, {4-[(S)-2-amino-3-fenil-
20 propionilamino)-metil]-benzil}-karbamik asit tert-butil ester
(2,627 g, 6,85 mmol, %97) olarak tanımlanan beyaz bir katı elde
edecek şekilde vakumla buharlaştırılmıştır. [M+H]⁺ = 384.37

C. (R)-2-Amino-3-(4-etoksi-fenil)-propionik asit

(R)-2-butoksikarbonilamino-3-(4-etoksi-fenil)-propionik asit
25 (4,0 g, 12,93 mmol), dioksan içinde (150 mL) 4M HCl içerisinde
çözülmüştür. Oda sıcaklığında bir saat sonra çözücü, (R)-2-
amino-3-(4-etoksi-fenil)-propionik asit hidroklorür (3,18 g,
12,9 mmol, %100) olarak tanımlanan beyaz bir katı elde etmek
üzere vakumla çıkarılmıştır.

30 [M+H]⁺ = 210,18

**D. (R)-2-benziloksikarbonilamino-3-(4-etoksi-fenil)-
propionik asit**

(R)-2-Amino-3-(4-etoksi-fenil)-propionik asit hidroklorür

(3,17 g, 12,9 mmol), su (100 mL) içindeki birsodyum hidroksit (1,14 g, 28,38 mmol) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Dioksan (100 mL) içinde benzil kloroformat (2.64 g, 15.48 mmol) ilave edilmiştir. Tepkime karışımı, 18 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır ve daha sonra dioksan, vakum ortamında çıkarılmıştır. Sulu kalıntı, dietil eter (1x100 mL) ile yıkanmış, 1M HCl ile pH 2'ye asitlendirilmiş ve kloroform ile (2x200 mL) ile özütlenmiştir. Birleştirilen ekstraktlar, su (1x50 mL), tuzlu su (1x50 mL) ile yıkanmış, kurutulmuş (Na₂SO₄) ve (R)-2- benziloksikarbonilamino-3-(4-etoksi-fenil)-propiyonik asit (4,0 g, 11,65 mmol, %90) olarak tanımlanan beyaz bir katı elde etmek üzere vakum ortamında buharlaştırılmıştır. [M+H]⁺ = 344,20.

E. [(R)-1-{(S)-1-[4-(tert-butoksikarbonilamino-metil)-benzilkarbamoil]-2-fenil-etilkarbamoil}-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-karbamik asit benzil ester

{4-[(S)-2-Amino-3-fenil-propiyonilamino)-metil]-benzil}-karbamik asit tert-butyl ester (2,63 g, 6,86 mmol), CH₂Cl₂ (100 mL) ve DMF (5 mL) içinde çözülmüştür. Bu çözelti 0°C'ye soğutulmuştur. (R)-2-benziloksikarbonilamino-3-(4-etoksi-fenil)-propiyonik asit (2,59 g, 7,54 mmol) ve ardından HOBt (1,11 g, 8,23 mmol) ve trietilamin (2,08 g, 20,57 mmol) ilave edilmiştir. Daha sonra suda çözünür karbodiimit (1,45 g, 7,54 mmol) sonra ilave edilmiştir. 0°C ila oda sıcaklığında 18 saatin ardından tepkime karışımı, kloroform (200 mL) ile seyreltilmiş ve NaHCO₃ (1x50 mL), su (1x50 mL), tuzlu su (1x50 mL) ile yıkanmış, kurutulmuş (Na₂SO₄) ve vakum ortamında sarı bir yağ elde etmek üzere buharlaştırılmıştır. Kalıntı, [(R)-1-{(S)-1-[4-(tert-butoksikarbonilamino-metil)-benzilkarbamoil]-2-fenil-etilkarbamoil}-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-karbamik asit benzil ester (3,55 g, 5,01 mmol, %73) olarak tanımlanan beyaz bir katı elde etmek üzere Pet. Eter (60-80°C) ile toz haline getirilmiştir. [M+H]⁺ = 709,34.

**F. [4-({(S)-2-[(R)-2-Amino-3-(4-etoksi-fenil)-
propiyonilamino]-3-fenil- propiyonilamino}-metil)-benzil]-
karbamik asit tert-butil ester**

[(R)-1-({(S)-1-[4-(tert-butoksikarbonilamino-metil)-

5 benzilkarbamoyl]-2-fenil- etilkarbamoyl}-2-(4-etoksi-fenil)-
etil]-karbamik asit benzil ester (3,55 g, 5,00 mmol), metanol
(200 mL) içinde çözülmüştür. Bu çözelti, atmosfer basıncında ve
oda sıcaklığında bir saat boyunca % 10 Pd/C (500 mg) üzerinde
hidrojenlenmiş; daha sonra katalizör, selit ile filtre edilmiş
10 ve kalıntı, metanol (30 mL) ile yıkanmış; birleştirilen
filtratlar, [4-({(S)-2-[(R)-2-amino-3-(4-etoksi-fenil)-
propiyonilamino]-3-fenil- propiyonilamino}-metil)-benzil]-
karbamik asit tert-butil ester (2,8 g, 4,87 mmol, %97) olarak
tanımlanan beyaz bir katı elde edecek şekilde vakumla
15 buharlaştırılmıştır. [M+H]⁺ = 575,37.

**G. [4-({(S)-2-[(R)-2-Benzoilamino-3-(4-etoksi-fenil)-
propiyonilamino]-3- fenil-propiyonilamino}-metil)-benzil]-
karbamik asit tert-butil ester**

[4-({(S)-2-[(R)-2-Amino-3-(4-etoksi-fenil)-propiyonilamino]-3-
20 fenil-propiyonilamino}-metil)-benzil]-karbamik asit tert-butil
ester (3,45 g, 5,99 mmol), diklorometan (150 mL) içinde
çözülmüştür. Benzoil klorür (1,01 g, 7,19 mmol), ardından
trietilamin (1,82 g, 17,98 mmol) ilave edilmiştir. Tepkime
karışımı, oda sıcaklığında 5 saat boyunca karıştırılmış ve CHCl₃
25 (150 mL) ile seyreltilmiştir ve söz konusu çözelti, 0,3M KHSO₄
(1x50 mL), doymuş NaHCO₃ (1x50 mL), su (1x50 mL), tuzlu su (1x50
mL) ile yıkanmış, kurutulmuş (Na₂SO₄) ve vakum ortamında
buharlaştırılmıştır. Kalıntı, [4-({(S)-2-[(R)-2-benzoilamino-3-
(4-etoksi-fenil)-propiyonilamino]-3-fenil-propiyonilamino}-
30 metil)-benzil]- karbamik asit tert-butil ester (3,06 g, 4,51
mmol, %75) olarak tanımlanan beyaz bir katı elde etmek üzere Pet
Eter (60-80°C) ve EtOAc ile toz haline getirilmiştir. [M+H]⁺ =
679,34.

H. N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür (Form 1)

[4-((S)-2-[(R)-2-Benzoilamino-3-(4-etoksi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil)-benzil]-karbamik asit tert-butyl ester (10,0 g, 14,7 mmol), hidrojen klorür/etil asetat (3,7M, 250 mL) içinde oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Karışım 2 saat sonra filtre edilmiş, etil asetat (2 x 50 mL) ile yıkanmıştır ve bir katı (7,9 g) elde etmek üzere kurutulmuştur. Söz konusu katının bir kısmı (0,106 g), bir asetonitril (2,1 mL) ve su (0,32 mL) karışımında süspansiyon edilmiş, karıştırılmış ve 77°C'ye ısıtılmıştır. İlave su alikotları (0,05 mL), çözünme gözlemlenene kadar karışıma art arda ilave edilmiştir. Karıştırılan karışım, daha sonra oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen katı, filtrasyon yoluyla izole edilmiştir ve N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür (form 1) (0,067 g, 3,41 mmol, %81) elde etmek üzere 40°C'de vakum ortamında kurutulmuştur. $[M+H]^+ = 579,34$

¹H NMR: (CD₃OD), 1,40 (3H, t, J= 6,9 Hz), 2,91-2,99 (3H, m), 3,14-3,19 (1H, m), 4,02 (2H, q, J= 6,9 Hz), 4,08 (2H, s), 4,41 (1H, d, J= 15,5 Hz), 4,51 (1H, d, J= 15,5 Hz), 4,66- 4,69 (2H, m), 6,82 (2H, d, J= 8,4 Hz), 7,10 (2H, d, J= 8,2 Hz), 7,18-7,20 (2H, m), 7,25- 7,38 (7H, m), 7,44-7,59 (3H, m), 7,72 (2H, d, J= 7,8 Hz).

N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre (Form 1) ait bir XRPD diffraktogramı, Şekil 1'de gösterilmiştir.

Pik pozisyonu tablosu:

Pos. [°2Th.]	Yükseklik [cts]	FWHM [°2Th.]	d uzaklığı [Å]	Rel. Int. [%]
5,1017	1329,67	0,1023	17,32212	100,00

5,9073	268,87	0,1023	14,96140	20,22
7,8360	212,97	0,1279	11,28276	16,02
10,2760	325,77	0,1279	8,60856	24,50
10,6870	227,90	0,1023	8,27835	17,14
11,8572	67,00	0,1535	7,46389	5,04
12,9566	230,78	0,1535	6,83291	17,36
14,8739	293,35	0,1279	5,95615	22,06
15,4578	148,51	0,1023	5,73245	11,17
15,7597	243,28	0,1535	5,62332	18,30
16,5908	488,41	0,1535	5,34347	36,73
17,8537	439,46	0,1279	4,96822	33,05
18,1443	1305,68	0,1535	4,88931	98,20
18,6294	1316,97	0,1535	4,76308	99,05
19,5704	643,93	0,1279	4,53612	48,43
20,0346	491,15	0,1791	4,43206	36,94
20,6761	789,56	0,1535	4,29598	59,38
20,9345	644,58	0,1279	4,24353	48,48
21,5959	208,07	0,2047	4,11503	15,65
22,1545	308,04	0,1791	4,01253	23,17
22,5745	392,23	0,1791	3,93883	29,50
23,3449	238,25	0,1279	3,81055	17,92
23,7157	786,12	0,1791	3,75181	59,12
23,9647	892,17	0,1535	3,71338	67,10
24,5150	156,93	0,2047	3,63125	11,80
25,5989	359,73	0,1791	3,47991	27,05
26,6668	341,96	0,2303	3,34294	25,72
27,6988	394,43	0,2047	3,22068	29,66
28,1867	71,81	0,1535	3,16604	5,40
28,9888	296,12	0,1279	3,08023	22,27
29,5799	56,04	0,2047	3,02001	4,21
30,5389	38,86	0,1535	2,92733	2,92
31,4200	71,21	0,1535	2,84722	5,36

31,8195	63,64	0,1535	2,81237	4,79
33,0388	37,25	0,1535	2,71132	2,80
34,1843	48,19	0,3070	2,62305	3,62
34,8271	94,43	0,2047	2,57609	7,10

Kızıl ötesi spektroskopisi

Form 1'e ait IR spektrumu, yaklaşık 3274, 3027, 2976, 2928, 1651, 1636, 1536, 1512, 1243 ve 703 cm^{-1} değerlerinde dalgalıboylarında 5 pikler içerir. Spektrum, Şekil 2'de gösterilmektedir.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Form 1 için DSC verileri, Şekil 3'te gösterilmiştir.

Gravimetrik Buhar Sorpsiyonu

Sorpsiyon izotermi, Hiden Isochema moisture sorption analyser (model IGAsorp) kullanılarak elde edilmiştir ve IGAsorp Systems Software V6.50.48 ile kontrol edilmiştir. Örnek, cihaz kontrolleri ile sabit bir sıcaklıkta (25°C) tutulmuştur. Nem, 250 ml.min-1'lik bir toplam akışla kuru ve ıslak nitrojen akımlarının karıştırılmasıyla kontrol edilmiştir. Cihaz, kalibre edilmiş üç Rotronic tuzu çözeltisinin (%10 - 50 - 88) ölçülmesiyle bağıl nem içeriği açısından doğrulanmıştır. Örneğin ağırlığındaki değişim, bir nem fonksiyonu olarak mikro terazi (+/- 0,005 mg doğruluk) ile izlenmiştir. Belirlenen miktarda örnek, ortam koşullarında paslanmaz çelikten oluşan tel sepet içine yerleştirilmiştir. Tam bir deney döngüsü, sabit bir sıcaklıkta (25°C) ve %0 - 90 aralığında %10 RH intervallerde (her bir nemlilik düzeyi için 60 dakika) üç taramadan (sorpsiyon, desorpsiyon ve sorpsiyon) oluşmaktadır.

Form 1 için GVS verileri, Şekil 4'te gösterilmiştir.

N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür
(Form 2)

5 Yöntem

[4-((S)-2-[(R)-2-Benzoylamino-3-(4-etoksi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil]-benzil-karbamik asit tert-butyl ester (5,0 g), bir nitrojen atmosferi altında etil asetat (15 mL) içerisinde süspansiyon edilmiştir. Etil asetat içindeki bir kuru hidrojen klorür çözeltisi (3,7 M, 60 mL), süspansiyona doldurulmuştur ve karışım, oda sıcaklığında çalkalanmıştır. 2 saatlik bir karıştırmanın ardından elde edilen süspansiyon filtre edilmiştir ve etil asetat (2 x 25 mL) ile yıkanmıştır. Katı, kırık beyaz bir katı olarak N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür (4,14 g, %91 verim) elde etmek üzere 40°C'de 60 saat boyunca vakum ortamında kurutulmuştur. Bir alikot (6 mg), iğne delikli bir alüminyum tavaya kapatılmıştır. Tava, 30 °C'den 256 °C'ye kadar her dakika 20 °C artan termal bir döngü kullanılarak ısıtılmış ve daha sonra (her dakika 50 °C azalarak) 30 °C'ye geri soğutulmuştur. Döngü sırasında örnek üzerinde 60 mL/dk'lık nitrojen akış hızı muhafaza edilmiştir. Beyaz katının (6 mg) DSC tavadan izole edilmesi sonucunda N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür (Form 2) elde edilmiştir.

N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorüre (Form 2) ait bir XRPD diffraktogramı, Şekil 5'te gösterilmiştir.

30 Pik pozisyonu tablosu:

Pos. [°2Th.]	Yükseklik [cts]	FWHM [°2Th.]	d uzaklığı [Å]	Rel. Int. [%]
3,3070	1075,86	0,0768	26,71753	39,80
4,6799	950,11	0,1023	18,88250	35,15
5,6951	1856,24	0,0768	15,51845	68,67
5,9805	1039,95	0,1023	14,77853	38,47
6,6686	1014,97	0,0768	13,25511	37,55
7,3582	369,02	0,1279	12,01428	13,65
7,8208	487,46	0,1023	11,30472	18,03
8,2936	899,00	0,1791	10,66123	33,26
8,4475	806,49	0,0768	10,46733	29,83
8,9889	330,16	0,1023	9,83805	12,21
9,4038	486,45	0,1023	9,40489	18,00
10,0299	729,01	0,1023	8,81923	26,97
10,4931	624,51	0,1791	8,43091	23,10
10,9988	975,24	0,1023	8,04442	36,08
11,7536	245,09	0,1023	7,52941	9,07
13,1421	877,95	0,1279	6,73688	32,48
14,1298	189,58	0,2047	6,26812	7,01
15,3505	210,21	0,1535	5,77229	7,78
15,7802	310,59	0,2047	5,61607	11,49
16,7562	812,56	0,1023	5,29108	30,06
16,9866	1130,90	0,1279	5,21984	41,83
17,3077	810,26	0,1279	5,12370	29,97
18,0388	1199,00	0,3070	4,91767	44,35
18,3860	1333,07	0,0768	4,82559	49,31
18,5848	1711,69	0,1279	4,77440	63,32
18,9114	1053,68	0,1023	4,69267	38,98
19,7135	945,69	0,1791	4,50353	34,98
20,2996	767,87	0,2558	4,37480	28,41
21,1161	602,32	0,1535	4,20744	22,28
21,4678	764,85	0,1279	4,13931	28,29

22,1871	1028,96	0,1279	4,00671	38,06
22,7211	815,23	0,2558	3,91373	30,16
23,4683	678,22	0,2047	3,79080	25,09
24,3820	1401,49	0,1279	3,65077	51,84
25,5221	2703,25	0,2047	3,49021	100,00
26,4725	476,72	0,2047	3,36702	17,63
27,4387	294,02	0,4093	3,25062	10,88
28,1127	1047,80	0,1791	3,17420	38,76
28,9034	464,66	0,1279	3,08914	17,19
29,3333	255,04	0,1535	3,04484	9,43
30,4339	165,30	0,1535	2,93719	6,12
31,0871	342,59	0,1248	2,87456	12,67
31,8915	61,28	0,4992	2,81084	2,27

Form 2 için DSC verileri, Şekil 6'da gösterilmiştir.

Biyolojik Aktivite

Buluşun kristal formlarının plazma kallikreini inhibe etme kabiliyeti, aşağıdaki biyolojik tahlil kullanılarak belirlenebilir:

Plazma kallikrein için Ki değeri Tayini

In vitro plazma kallikrein inhibitör aktivitesi standart yayınlanmış yöntemler kullanılarak belirlenmiştir (bkz örn. Johansen v.d. Int. J. Tiss. Reac. 1986, **8**, 185; Shori v.d. Biochem. Pharmacol., 1992, **43**, 1209; Stürzebecher v.d. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1992, **373**, 1025). İnsan plazma kallikreini (Protogen), 37°C'de florojenik substrat H-DPro-Phe-Arg-AFC ve test bileşiğinin çeşitli konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. Artık enzim aktivitesi (başlangıçtaki reaksiyon

hızı), 410 nm'de optik absorbanstaki değişimin ölçülmesiyle belirlenmiştir ve test bileşiği için Ki değeri belirlenmiştir. Bu tahlilde test edildiğinde Form 1, 0,010 µM'Lik bir Ki (insan Pkal) değeri göstermiştir.

- 5 Kristal formlar ayrıca, aşağıdaki biyolojik tahlil kullanılarak ilgili enzim KLK1'e karşı inhibe edici aktivite açısından taranabilir:

KLK1 için IC50 Değerinin Tayini

- 10 In vitro KLK1 inhibitör aktivitesi standart yayınlanmış yöntemler kullanılarak belirlenmiştir (bkz örn. Johansen v.d. Int. J. Tiss. Reac. 1986, **8**, 185; Shori v.d. Biochem. Pharmacol., 1992, **43**, 1209; Stürzebecher v.d. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1992, **373**, 1025). İnsan KLK1'i (Callbiochem), 37°C'de florojenik substrat H-DVal-Leu-Arg-AFC ve test bileşiğinin çeşitli
- 15 konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. Artık enzim aktivitesi (başlangıçtaki reaksiyon hızı), 410 nm'de optik absorbanstaki değişimin ölçülmesiyle belirlenmiştir ve test bileşiği için IC50 değeri belirlenmiştir.

- 20 Bu tahlilde test edildiğinde Form 1, 10 µM'den az bir IC50 (insan KLK1) değeri göstermiştir.

Kristal formlar ayrıca, aşağıdaki biyolojik tahliller kullanılarak ilgili enzimler plazmin, trombin, tripsin, Faktör Xa ve Faktör XIIa'ya karşı inhibe edici aktivite açısından taranabilir:

- 25 **Enzim seçiciliğinin tayini**

İnsan serin proteaz enzimleri plazmin, trombin, tripsin, Faktör Xa ve Faktör XIIa, uygun bir florojenik substrat kullanılarak enzimatik aktivite açısından analiz edilmiştir. Proteaz

aktivitesi, substrattan serbest kalan floresan birikiminin 5 dakika boyunca izlenmesiyle ölçülmüştür. Dakika başına doğrusal flüoresan artışı hızı, aktivite yüzdesi (%) olarak ifade edilmiştir. Her bir substratın yarılması için Km, Michaelis-Menten denkleminin standart dönüşümü ile belirlenmiştir. Bileşik inhibitör tahlilleri, substrat Km konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir ve aktiviteler, inhibe edilmeyen enzim aktivitesinin (%100) %50 inhibisyonunu (IC50) veren inhibitör konsantrasyonu olarak hesaplanmıştır.

- 10 N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür bu tahlillerde test edildiğinde aşağıdaki veriler elde edilmiştir:

IC ₅₀ (nM)				
Trombin	Tripsin	Plazmin	Faktör Xa	Faktör XIIa
>40000	10800	3500	>10000	>10000

15 Karbonik anhidraz I ile indüklenen Retinal Vasküler Geçirgenlik Modeli

N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürün etkinliği, bu in vivo sıçan modeli kullanılarak oluşturulmuştur.

- 20 Sıçanlara, zaman 0'da intravitreal enjeksiyon (5µL) şeklinde fosfat tamponlu salin (PBS), CH-3457 (bir plazma kallikrein inhibitör pozitif kontrol) (10µM) veya N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür ("Test Bileşiği") (1
- 25 µM) verilmiştir. 30 dakika sonra ikinci bir intravitreal

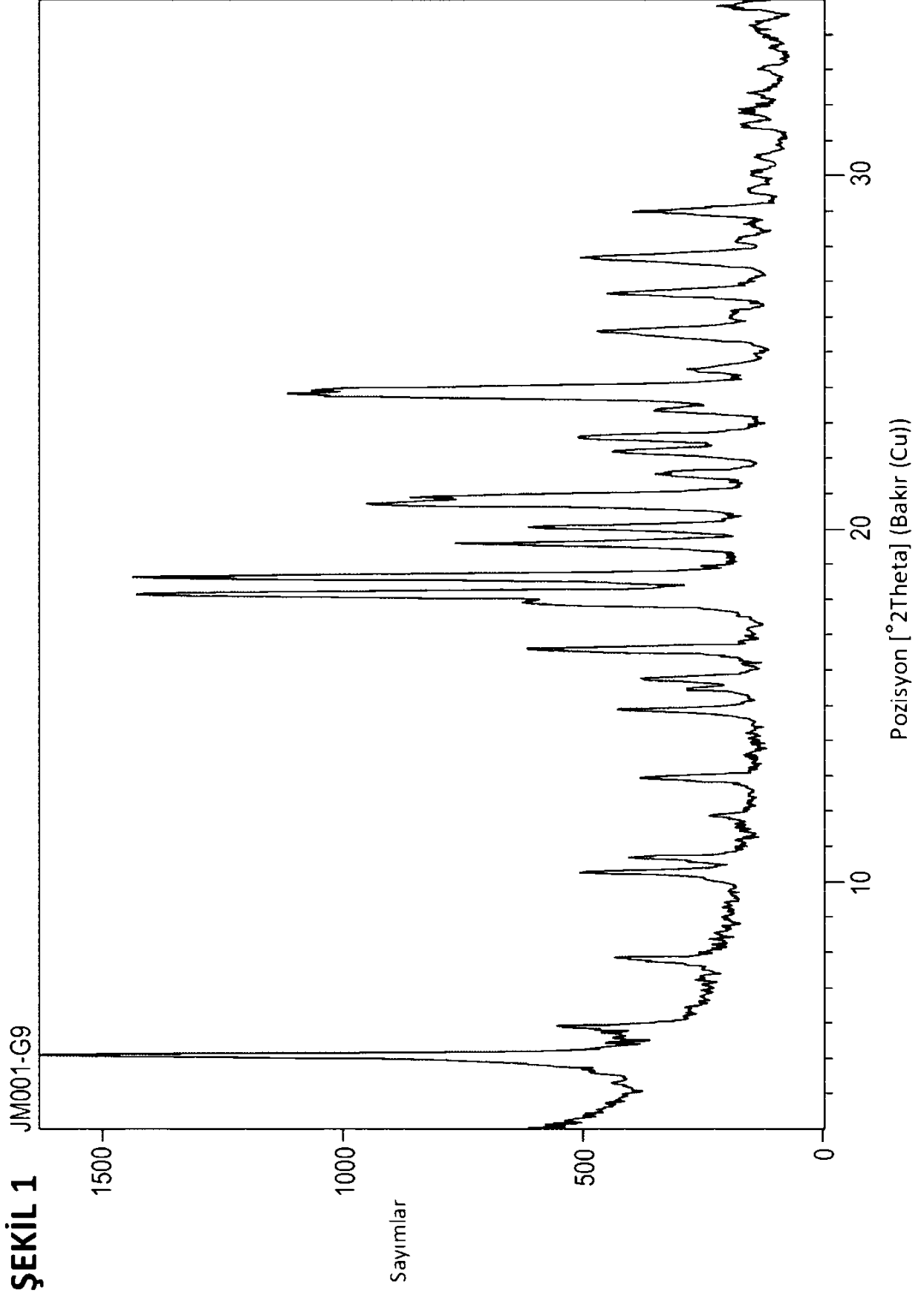
enjeksiyon (5µL) şeklinde PBS veya CA-I (200 ng/göz) verilmiştir. 15 dakika sonra %10 sodyum floresein infüze edilmiştir ve retinal vasküler geçirgenlik (RVP), başlangıçta yapılan IVT enjeksiyonlarından 75 dakika sonra vitröz flüorofotometri ile ölçülmüştür. N-[(R)-1- [(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür ("Test Bileşiği") için elde edilen veriler Şekil 7'de sunulmakta olup, aşağıdaki kesikli çizgi PBS/PBS'nin ardından bazal RVP'yi ve yukarıdaki kesikli çizgi ise maksimum uyarılmayı göstermektedir. 1 µM'lik bir N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürün tek başına intravitreal enjeksiyonu, tek başına PBS'ye kıyasla bazal RVP üzerinde etkisi olmamıştır (3,29±0,21 vs. 3,64±0,48). N-[(R)-1- [(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürün intravitreal enjeksiyonu, (CA-I enjeksiyonu ile uyarılan) RVP'yi %53±21 oranında düşürmüştür.

Farmakokinetik

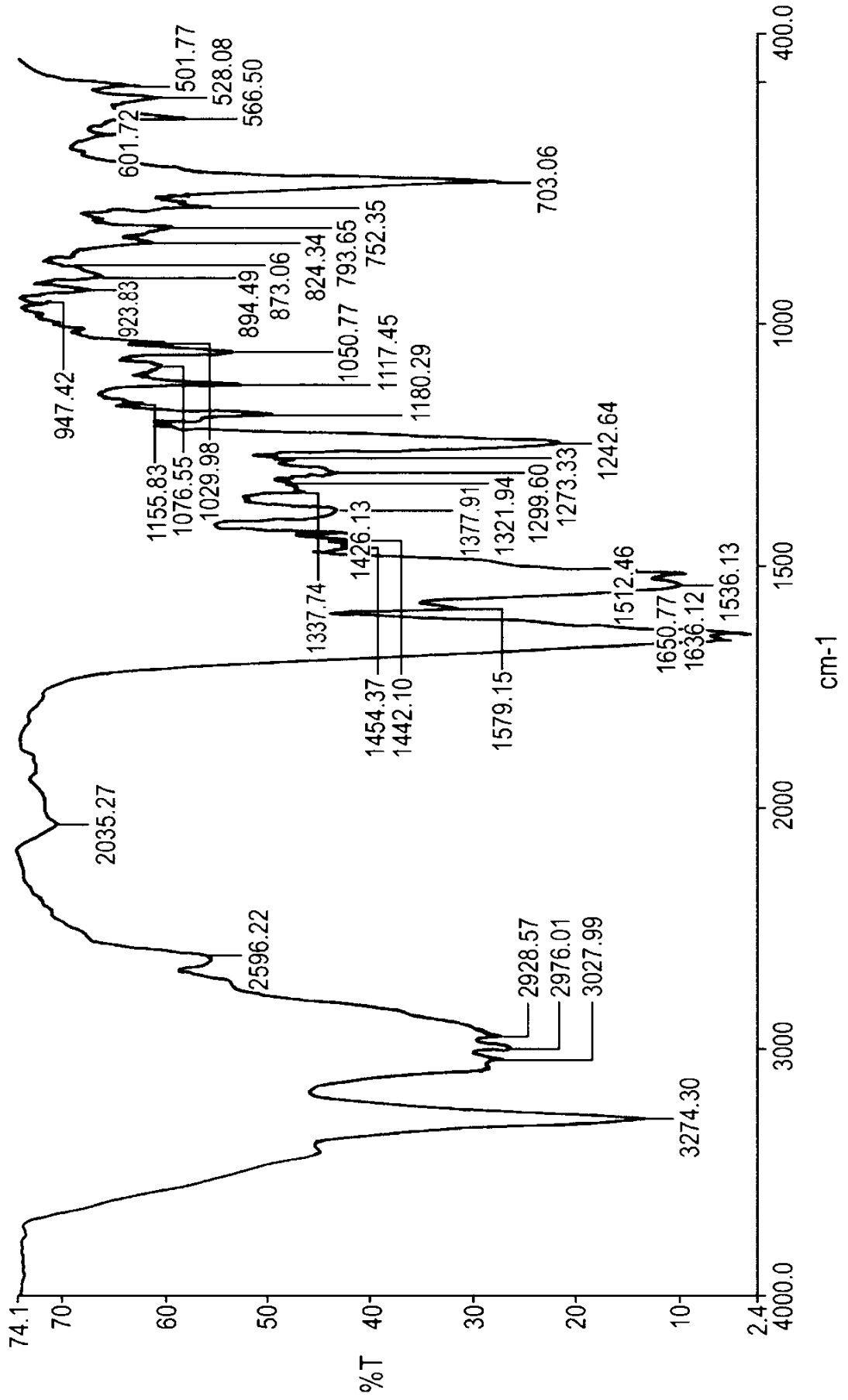
Pigmentli (Dutch-belted) tavşanlarda tek bir IVT dozunu takiben oküler ve sistemik farmakokinetiklerin değerlendirilmesi için N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorür üzerinde farmakokinetik bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Her doz için altı tavşana, fosfat tamponlu salin içinde formüle edilmiş 4,2 µg/mL'lik (her göze 210 ng) N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürden 50 µL'lik tek, iki taraflı, IVT enjeksiyonu verilmiştir. Her bir zaman noktasında (IVT uygulamasından 4, 8, 24, 48, 96 ve 168 saat sonra) bir tavşana ötanazi uygulanmıştır ve vitröz, retina/koroid ve kamara sıvısında N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-benzilkarbamoil)-2-fenil-etilkarbamoil]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürün oküler doku konsantrasyonları ölçülmüştür. Hayatta

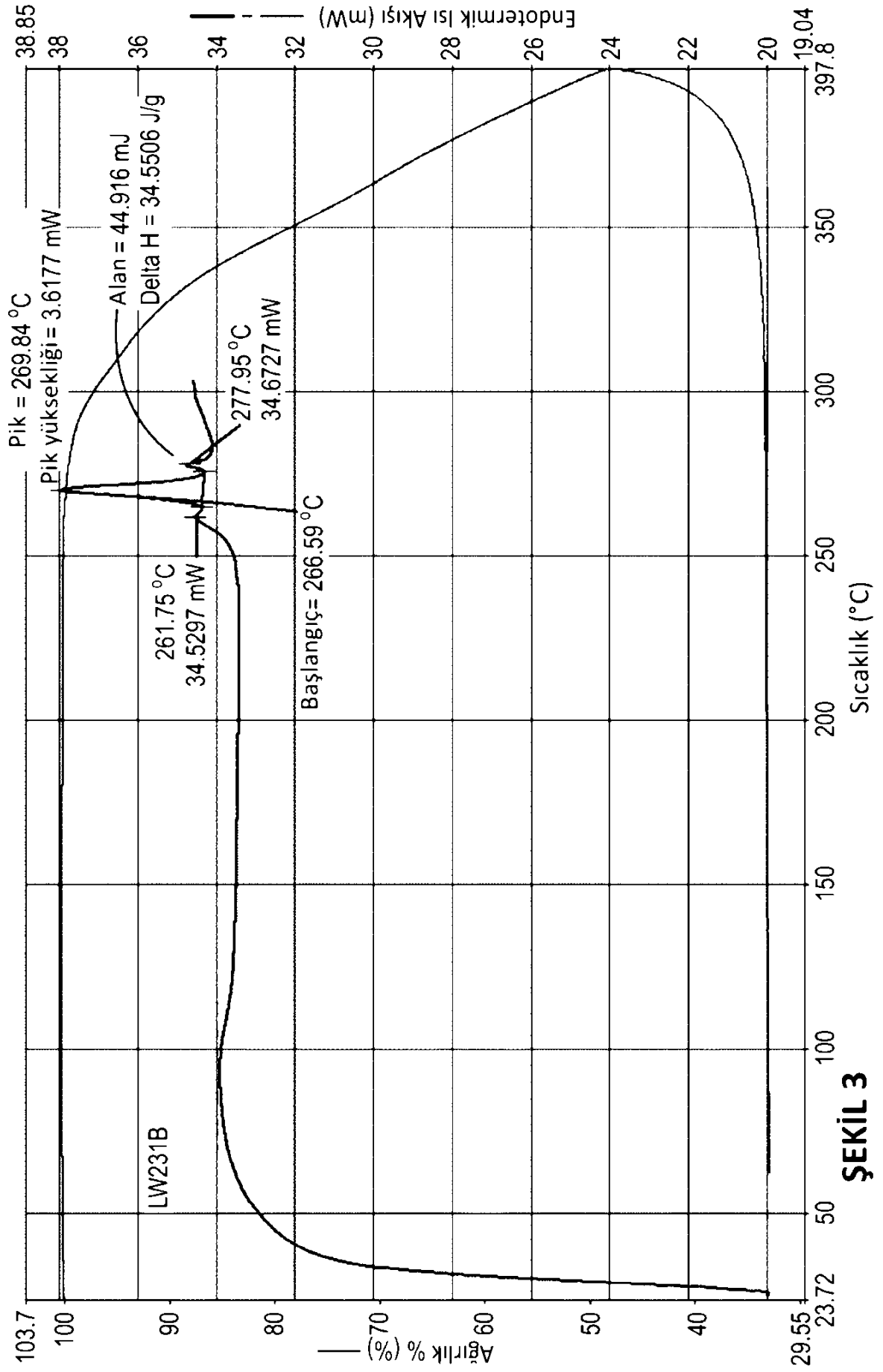
kalan tavşanlardan seri kan örnekleri toplanmıştır.

Oküler doku konsantrasyonu verileri, Şekil 8'de sunulmaktadır ve söz konusu şekilde, her bir oküler doku konsantrasyonu için düz çizgi, her bir tavşanın sol ve sağ gözünün ortalamasıdır. N-
5 [(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil- benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürün ("Test Bileşiği") oküler doku konsantrasyonlarındaki düşüş, 7 gün boyunca minimaldir. IVT uygulamasından sonra N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil benzilkarbamoyl)-2-fenil-etilkarbamoyl]-2-(4-
10 etoksi-fenil)-etil]-benzamid hidroklorürün plazma konsantrasyonları, tüm zaman noktalarında 1 ng/mL'nin altındaydı.

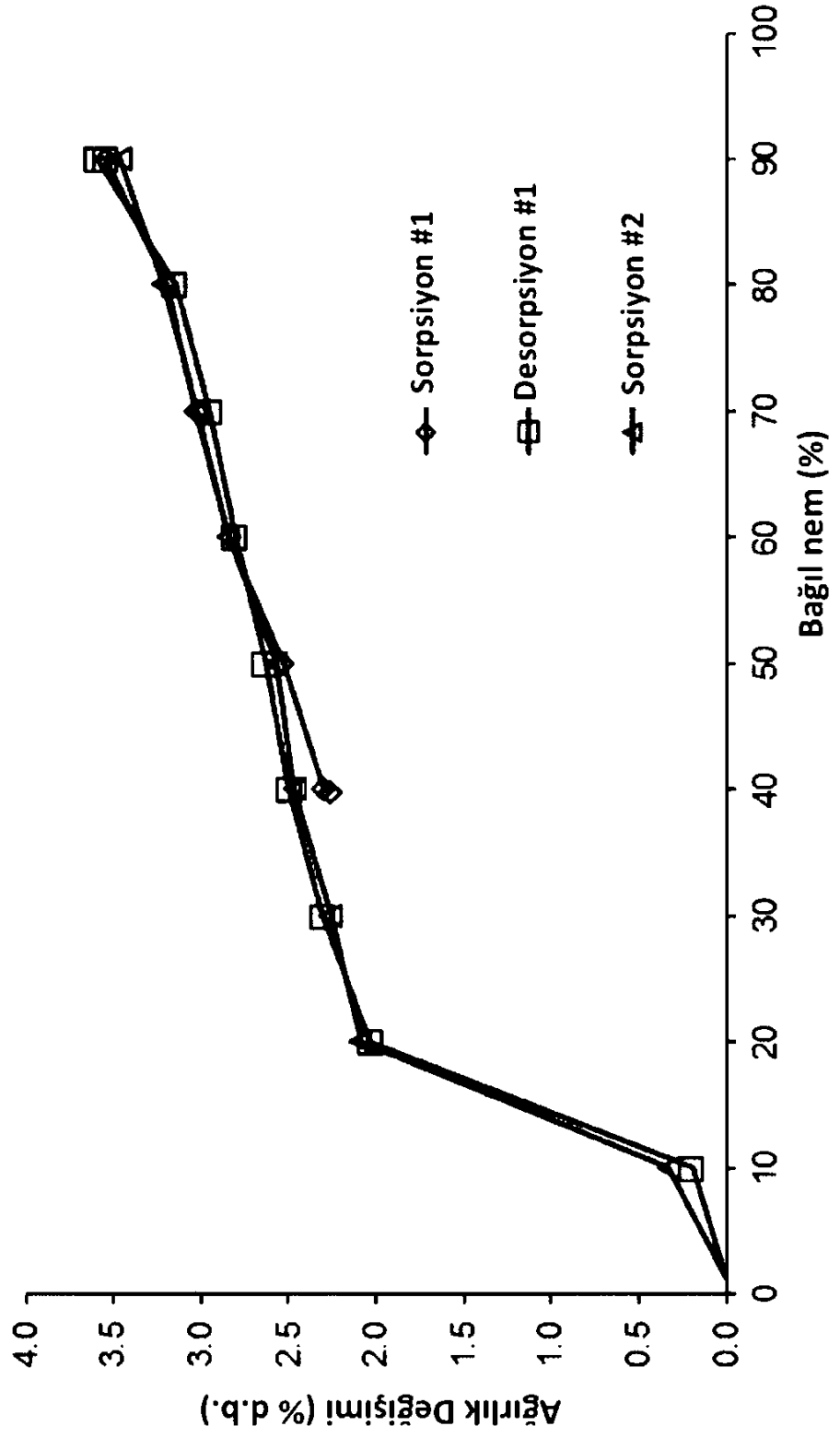


ŞEKİL 2

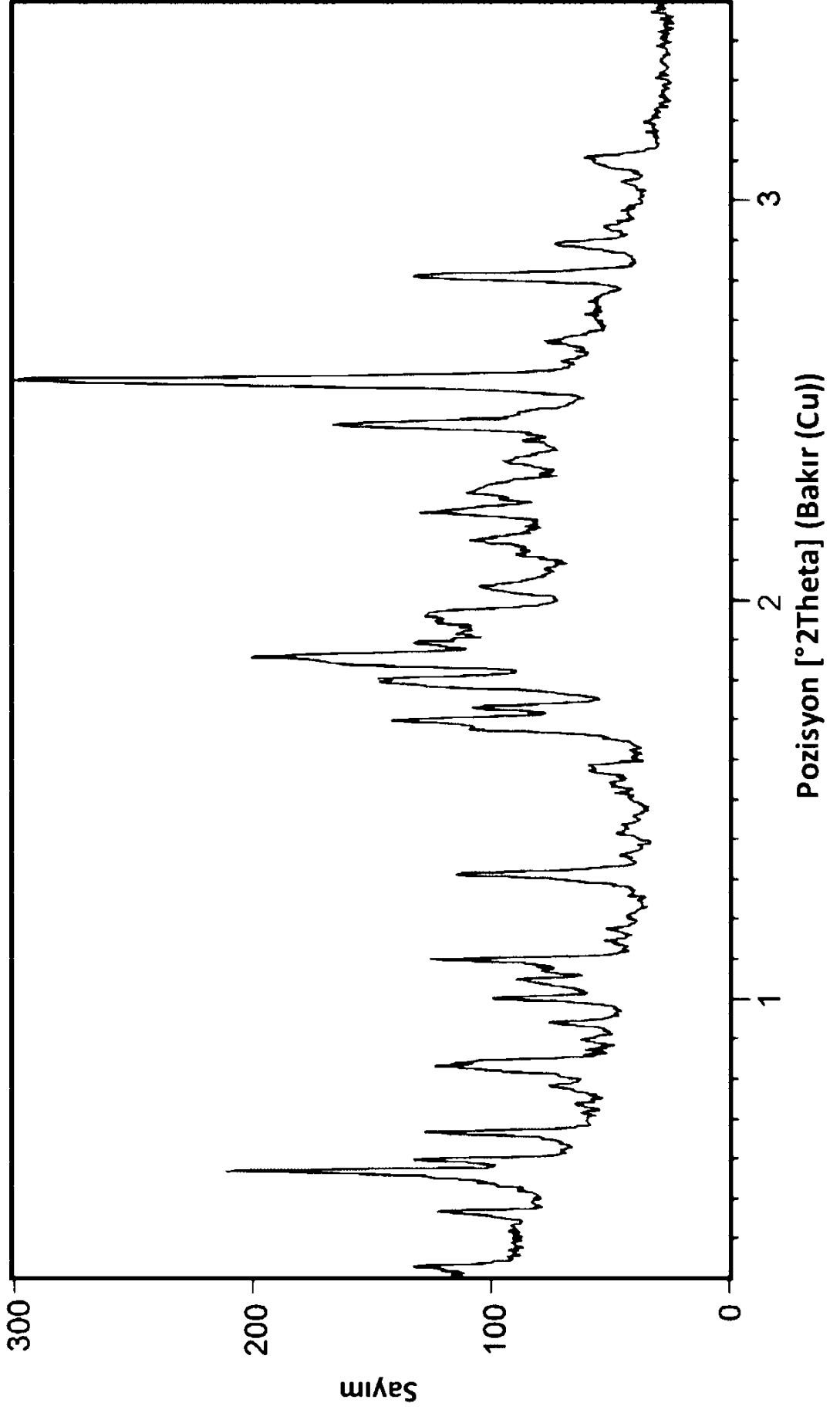


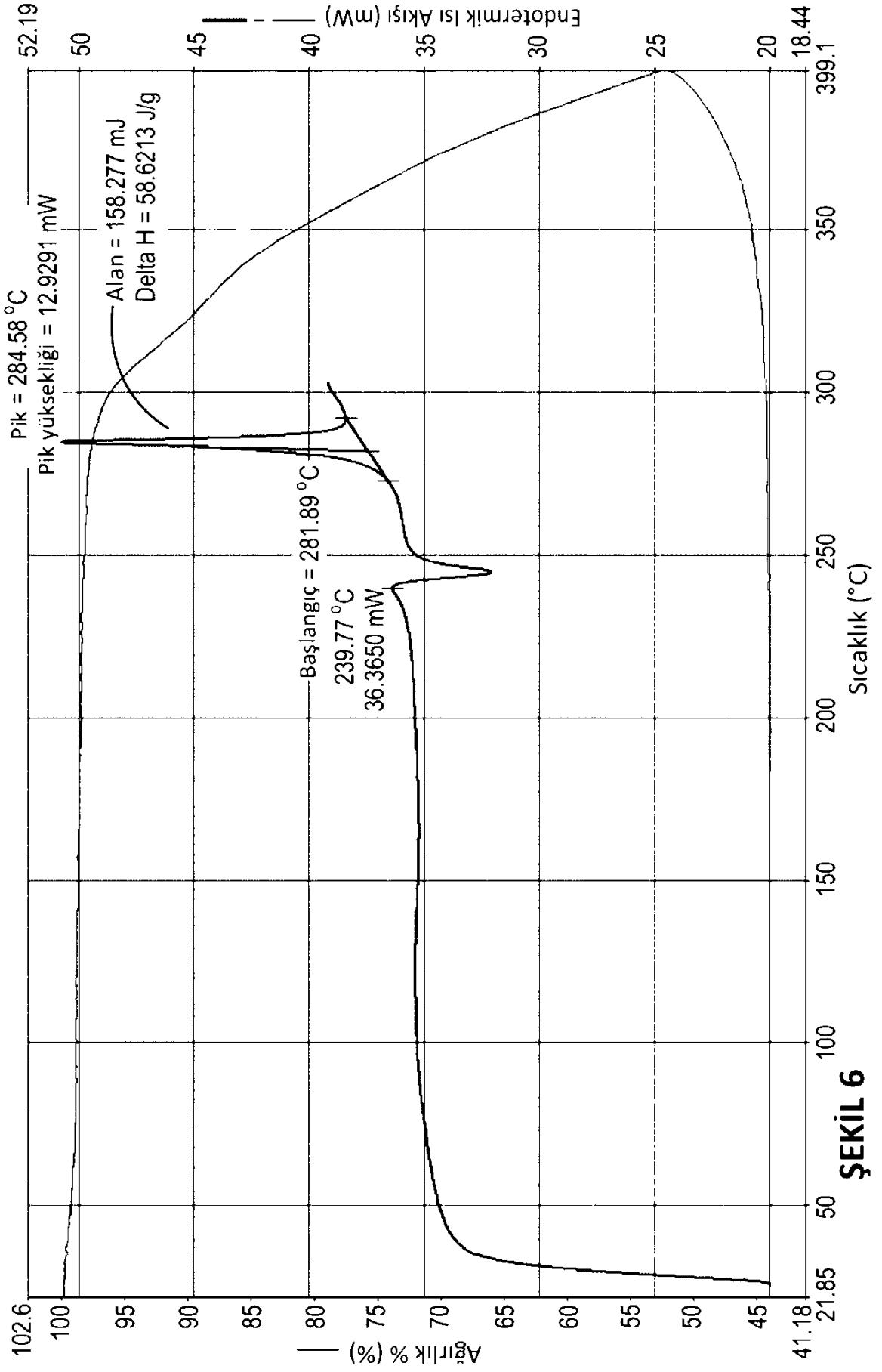
**ŞEKİL 3**

ŞEKİL 4

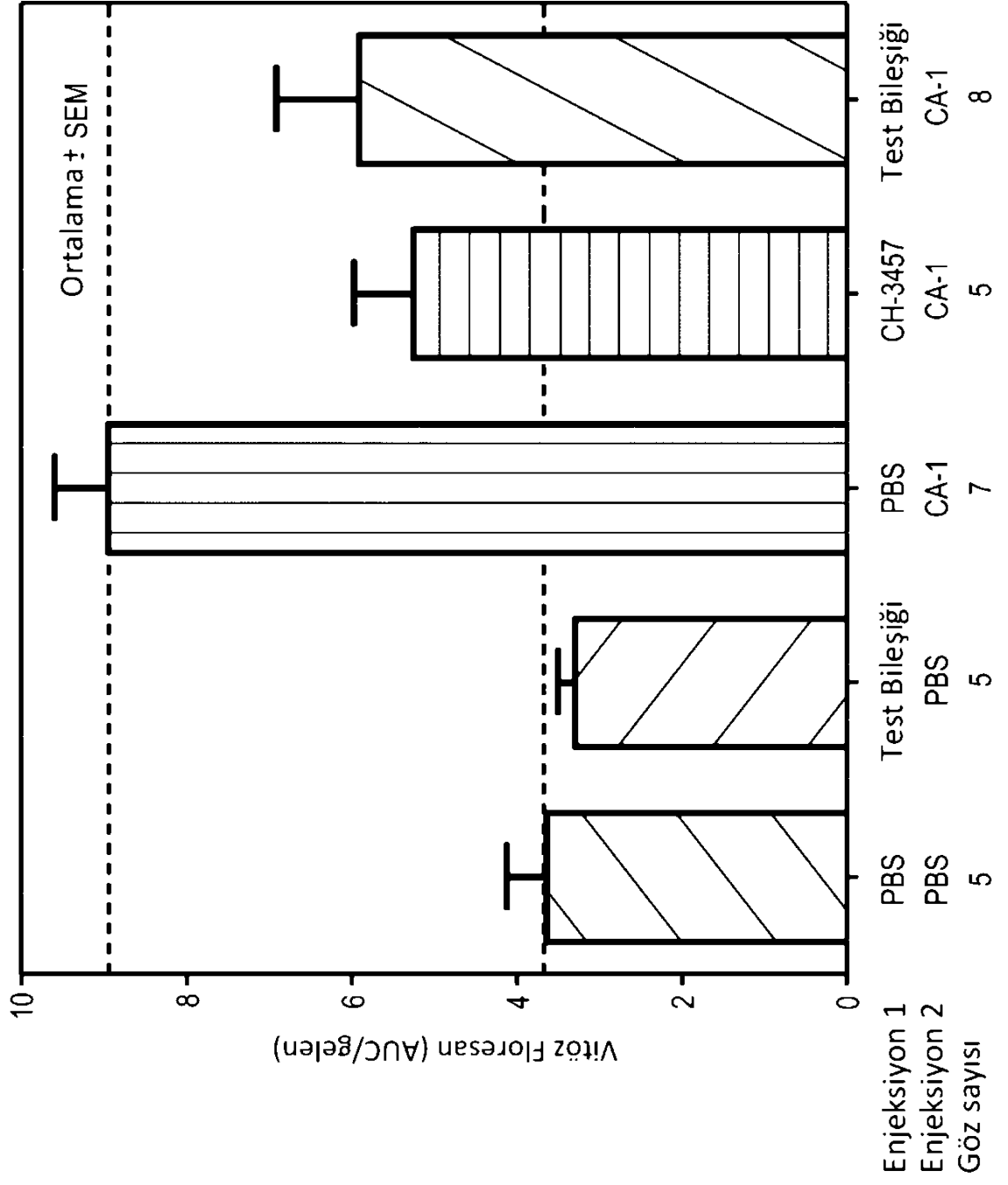


ŞEKİL 5





ŞEKİL 7



ŞEKİL 8

