

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7333336号

(P7333336)

(45)発行日 令和5年8月24日(2023.8.24)

(24)登録日 令和5年8月16日(2023.8.16)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 471/04 (2006.01)

C 0 7 D 471/04

1 0 6 A

A 6 1 K 31/444 (2006.01)

C 0 7 D 471/04

C S P

A 6 1 P 7/02 (2006.01)

A 6 1 K 31/444

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 7/02

A 6 1 P 43/00

1 1 1

請求項の数 9 (全32頁)

(21)出願番号 特願2020-555192(P2020-555192)

(86)(22)出願日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(65)公表番号 特表2021-521132(P2021-521132
A)

(43)公表日 令和3年8月26日(2021.8.26)

(86)国際出願番号 PCT/EP2019/058398

(87)国際公開番号 WO2019/197244

(87)国際公開日 令和1年10月17日(2019.10.17)

審査請求日 令和4年3月1日(2022.3.1)

(31)優先権主張番号 18166490.5

(32)優先日 平成30年4月10日(2018.4.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 300049958

バイエル ファーマ アクチエンゲゼルシ
ャフトドイツ連邦共和国 デー - 1 3 3 5 3 ベ
ルリン ミューラーシュトラッセ 1 7 8

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

最終頁に続く

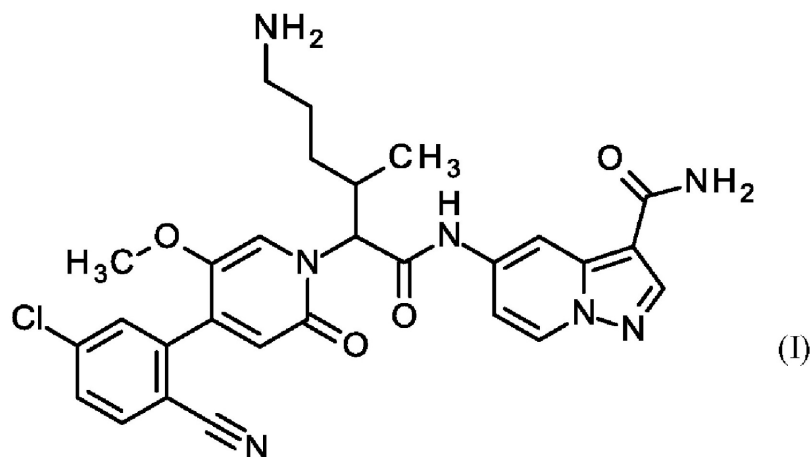
(54)【発明の名称】 置換オキソピリジン誘導体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)

【化1】



10

の化合物5 - ({ 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メ

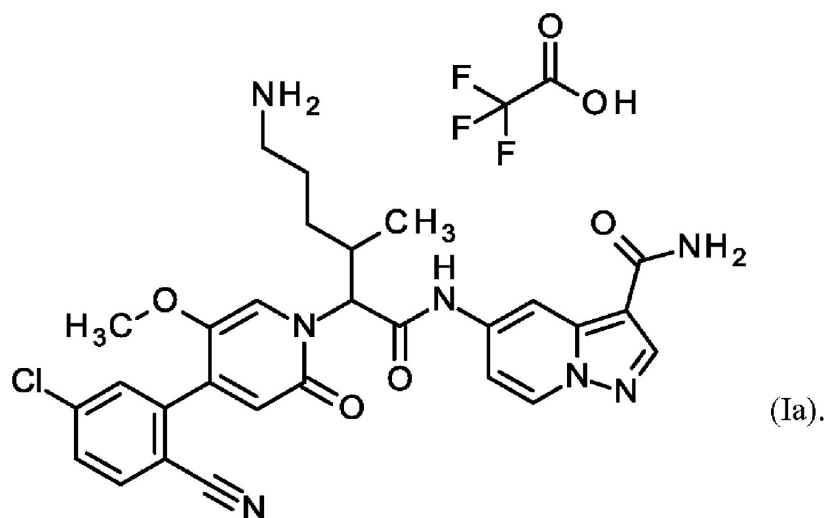
20

トキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミド又はその塩、その溶媒和物もしくはその塩の溶媒和物の一つ。

【請求項 2】

式 (I a)

【化 2】

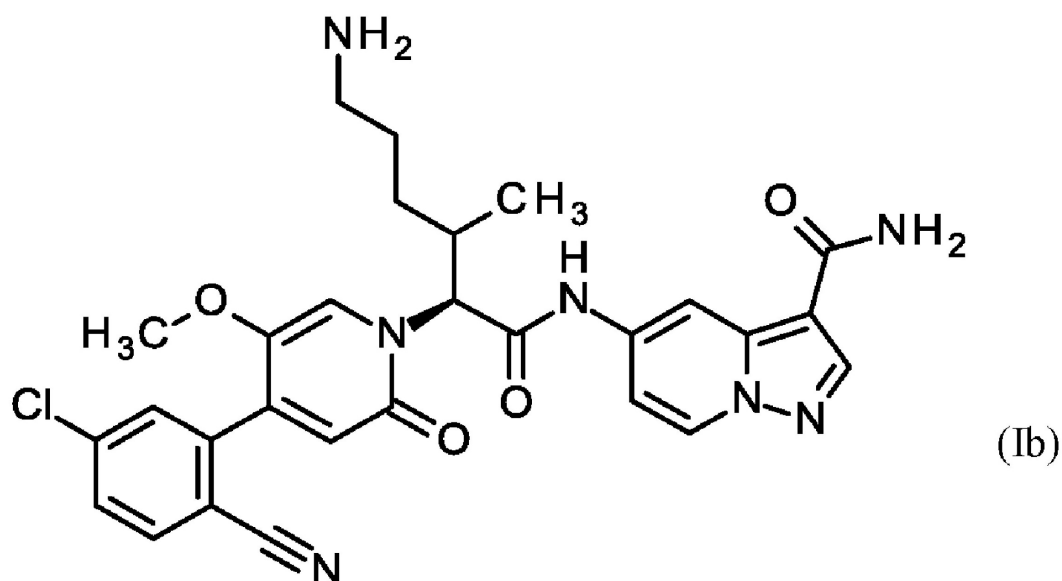


の 5 - ({ 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミドトリフルオロ酢酸塩である請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

式 (I b)

【化 3】



の 5 - ({ (2 S) - 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミド又はその塩、その溶媒和物もしくはその塩の溶媒和物の一つである請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

10

20

30

40

50

疾患の治療および／または予防のための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 5】

疾患の治療および／または予防のための医薬を製造するための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項 6】

血栓性または血栓塞栓性障害の治療および／または予防のための医薬を製造するための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の化合物の使用。

【請求項 7】

血栓性または血栓塞栓性障害の治療および／または予防のための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の化合物を含む医薬。

10

【請求項 8】

治療有効量の本発明の化合物を使用する血栓性障害または血栓塞栓性障害の治療および／または予防のための方法における使用のための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の化合物。

【請求項 9】

血漿カリクレイン（PK）による生理学および人工的基質の代謝回転によって引き起こされる妨害効果を防止するために、血漿プレカリクレイン（PPK）または血漿カリクレイン（PK）を含有する生物学的試料において使用するための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の化合物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、5 - ({ 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミド、その製造方法、その疾患の治療および／または予防のための使用、ならびに疾患、特に心血管障害、好ましくは血栓性または血栓塞栓性障害、および浮腫、ならびに眼科障害の治療および／または予防のための医薬の調製のためのその使用、ならびに体外処置および分析アッセイの実施のための妨害血漿カリクレイン活性を阻害するためのその使用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

血液凝固は生体の防御機構であり、血管壁の欠損を迅速かつ確実に「密封」するのに役立つ。したがって、血液の喪失は避けることができ、または最小限に保つことができる。血管損傷後の止血は、主に血漿蛋白質の複雑な反応の酵素的カスケードが引き起こされる凝固系によって行われる。この過程には多数の血液凝固因子が関与し、それぞれの因子は活性化すると次の不活性な前駆体をそれぞれその活性型に変換する。カスケードの最後に、可溶性フィブリノーゲンが不溶性フィブリンに変換され、血液凝塊が形成される。

【0003】

凝固系は、外来細胞（例えば、細菌）の表面構造だけでなく、血管プロテアーゼ、ステントおよび共腎外循環などの人工表面も含む、特に負に帯電した表面上で活性化することができることが焦点となる。表面上では、最初に第 XI 因子（FXI）が第 XIa 因子に活性化され、これが、続いて第 XI 因子を第 XIa 因子に活性化する。加えて、第 XIa 因子は血漿プレカリクレイン（PPK）を血漿カリクレイン（PK）に活性化し、これは増強ループにおいて、第一にさらなる第 XI 因子活性化につながり、全体的に凝固カスケードの開始の増幅をもたらす。さらに、PK は重要なブラジキニン放出プロテアーゼであり、したがって、これはとりわけ内皮透過性の増加をもたらす。さらなる基質はプロレニンおよびプロウロキナーゼであり、その活性化はレニン - アンジオテンシン系および線維素溶解の調節過程に影響を及ぼす可能性がある。したがって、PK の活性化は凝固過程と炎症過程の重要な関連である。

40

【0004】

50

凝固系の制御不能な活性化または活性化過程の阻害不良は、血管（動脈、静脈、リンパ管）または心腔における局所的な血栓症または塞栓症の形成につながる可能性がある。さらに、全身性の凝固能亢進は、血栓の系全体の形成につながり、最終的には播種性血管内凝固症候群との関連での消費性凝固障害につながる可能性がある。血栓塞栓性合併症は、血液透析中などの体外循環系においても、また人工血管や人工心臓弁やステントにおいても起こりうる。

【 0 0 0 5 】

血漿カリクレイン（PK）は、糖尿病性網膜症、黄斑浮腫および遺伝性血管浮腫または慢性炎症性腸疾患における場合のような血管透過性の増加または慢性炎症性疾患と関連する他の疾患と関連する。糖尿病性網膜症は、主に微小血管の欠損によって引き起こされる。微小血管の欠損は、血管の基底膜の肥厚と血管化した周皮細胞の消失に続いて血管閉塞と網膜虚血を引き起こし、このようにして引き起こされた網膜低酸素のため、血管透過性の亢進に続いて黄斑浮腫が形成され、全ての過程のために、患者が盲目になることがある。遺伝性血管性浮腫（HAE）では、生理学的カリクレイン阻害物質、C1-エステラーゼインヒビターの形成の低下は、劇症浮腫形成および強い痛みを伴う炎症を引き起こすコントロールされていない血漿カリクレイン活性化を引き起こす。実験動物モデルから、血漿カリクレインの阻害は、血管透過性の増加を阻害し、従って、黄斑浮腫および/または糖尿病性網膜症の形成を防止するか、またはHAEの急性症状を改善するかもしれないという指摘がある。経口血漿カリクレイン阻害剤はまた、HAEの予防のために使用され得る。

【 0 0 0 6 】

血漿カリクレインによって生成されるキニンは、慢性炎症性腸疾患（CID）の進行において特に原因的役割を有する。ブラジキニン受容体の活性化を介したそれらの炎症誘発作用は、疾患進行を誘導し、増強する。クローン病患者に関する研究では、腸管上皮におけるカリクレイン濃度と腸管炎症の程度との間に相関が示されている。カリクレイン - キニン系の活性化は、実験動物試験でも同様に観察された。従って、カリクレイン阻害剤によるブラジキニン合成の阻害は、慢性炎症性腸疾患の予防および/または治療にも使用することができる。

【 0 0 0 7 】

多くの疾患について、抗血栓性および抗炎症性の原理の組み合わせは、凝固および炎症の相互の増強を防止するために特に魅力的である。

【 0 0 0 8 】

WO 2006/030032は、とりわけ、mGluR2レセプターのアロステリックモジュレーターとしての置換ピリジンを記載し、WO 2008/079787は、置換ピリジン - 2 - オンおよびグルコキナーゼアクチベーターとしてのそれらの使用を記載する。WO2005/123680、WO 2014/154794、WO 2014/160592、WO 2014/011087、WO 2014/160592、WO 2015/063093、WO 2015/120777、WO 2015/120777、WO 2016/046156、WO 2016/046157、WO 2016/046157、WO 2016/046156、WO 2017/037051およびWO 2018/041122は、置換ピリジン - 2 - オン、ならびにXIa因子阻害剤および/またはカリクレイン阻害剤としてのそれらの使用を記載する。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 文献 】 WO 2006/030032

WO 2008/079787

WO2005/123680

WO 2014/154794

WO 2014/160592

10

20

30

40

50

WO 2014/011087
 WO 2014/160592
 WO 2015/063093
 WO 2015/120777
 WO 2016/046156
 WO 2016/046157
 WO 2016/046157
 WO 2016/046156
 WO 2017/037051
 WO 2018/041122

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、本発明の目的は、ヒトおよび動物における心血管障害、特に血栓性障害または血栓塞栓性障害の治療のための、ならびにPKによる生理学のおよび人工基質の代謝回転によって引き起こされる妨害効果を防止するための、血漿プレカリクレイン（PPK）または血漿カリクレイン（PK）を含有する生物学的試料における使用のための、新規な化合物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

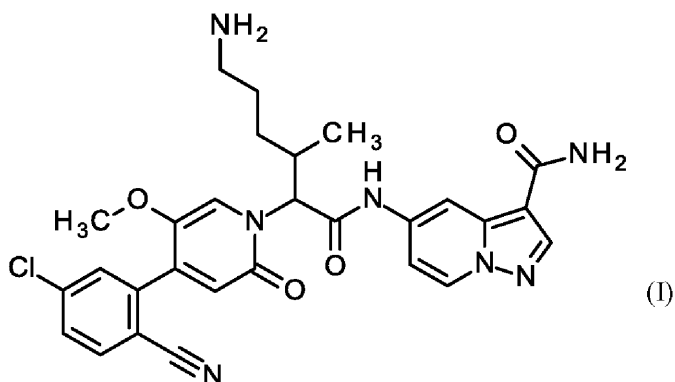
驚くべきことに、特定の置換オキソピリジン誘導体は、非常に強力で選択的な血漿カリクレイン阻害剤を表すことが現在見出されている。

20

【0012】

本発明は、式（I）の化合物に対応する化合物5 - （ { 6 - アミノ - 2 - [4 - （ 5 - クロロ - 2 - シアノフェニル） - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1（2H） - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ ）ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミド及びその塩、その溶媒和物及びその塩の溶媒和物を提供する。

【化1】



30

【0013】

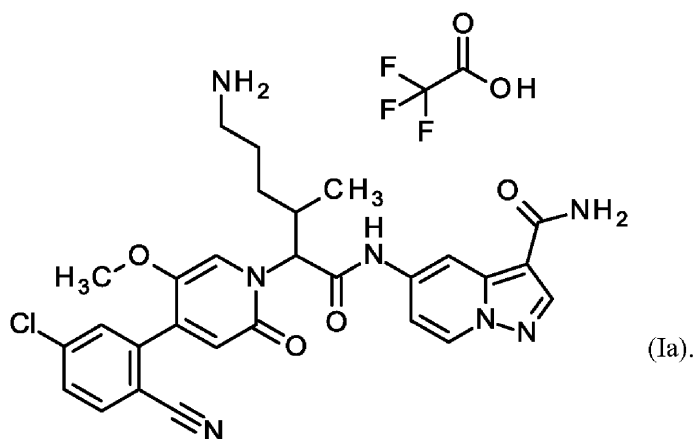
さらに、本発明は、式（Ia）の化合物に対応する化合物5 - （ { 6 - アミノ - 2 - [4 - （ 5 - クロロ - 2 - シアノフェニル） - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1（2H） - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ ）ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミドトリフルオロアセテートを提供する。

40

【0014】

50

【化 2】



10

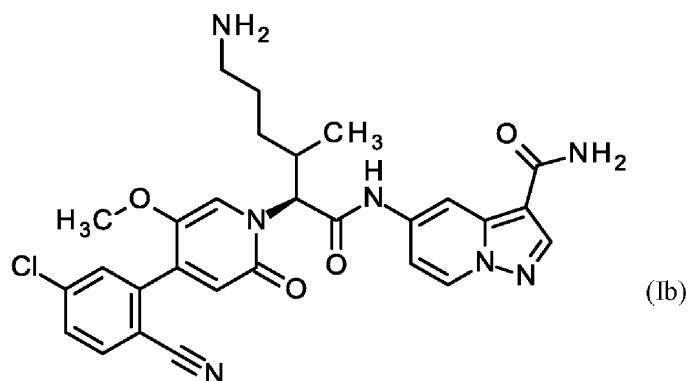
【 0 0 1 5 】

好ましくは、式 (I b) の化合物に対応する化合物 5 - ({ (2 S) - 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミド及びその塩、その溶媒和物及びその塩の溶媒和物が挙げられる。

【 0 0 1 6 】

20

【化 3】



30

【 0 0 1 7 】

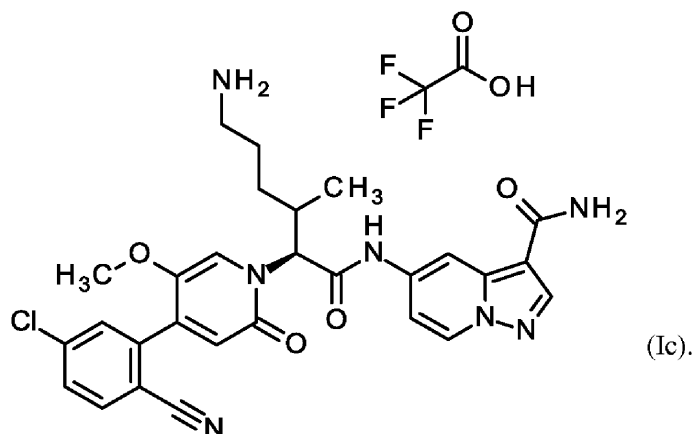
さらに、好ましくは、式 (I c) の化合物に対応する化合物 5 - ({ (2 S) - 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミドトリフルオロアセテートが挙げられる。

【 0 0 1 8 】

40

50

【化 4】



10

【 0 0 1 9 】

本発明の化合物は、それらの構造に応じて、異なる立体異性体形態で、すなわち立体配置異性体の形態で、または、適切であれば、立体配座異性体（エナンチオマーおよび／またはジアステレオマー、アトロプ異性体の場合を含む）として存在し得る。したがって、本発明は、エナンチオマーおよびジアステレオマー、ならびにそれらのそれぞれの混合物を包含する。立体異性的に均一な成分は、公知の様式で、エナンチオマーおよび／または

20

【 0 0 2 0 】

本発明による化合物が互変異性形態で生じ得る場合、本発明は、すべての互変異性形態を包含する。

【 0 0 2 1 】

本発明の文脈において、用語「エナンチオマー的に純粋な」は、キラル中心の絶対配置に関して問題となる化合物が 95 % 超、好ましくは 97 % 超のエナンチオマー過剰で存在することを意味すると理解されるべきである。エナンチオマー過剰率 e_e は、ここでは、

30

$$e_e = \left[E^A \text{ (面積\%)} - E^B \text{ (面積\%)} \right] \times 100\% / \left[E^A \text{ (面積\%)} + E^B \text{ (面積\%)} \right]$$

(E^A : メジャーエナンチオマー、 E^B : マイナーエナンチオマー)

【 0 0 2 2 】

本発明はまた、本発明の化合物のすべての適切な同位体変異体を包含する。本発明の化合物の同位体変異体は、ここでは、本発明の化合物内の少なくとも 1 つの原子が、同じ原子番号の別の原子と交換されているが、通常または主に天然に存在する原子質量とは異なる原子質量を有する化合物を意味すると理解される。本発明の化合物に組み込むことができる同位体の例は、水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素（例えば、 ^2H （重水素）、 ^3H （トリチウム）、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O および ^{36}Cl ）のものである。本発明の化合物の特定の同位体変異体、特に、1 つ以上の放射性同位体が組み込まれたものは、例えば、作用機序または体内における活性成分分布の試験に有益であり得る；比較的容易な調製性および検出性、とりわけ、 ^3H または ^{14}C 同位体で標識された化合物は、この目的に適している。さらに、同位体、例えば重水素の取り込みは、化合物のより大きな代謝安定性、例えば、体内半減期の延長または必要とされる活性用量の減少の結果として、特定の治療利益をもたらし得る；したがって、本発明の化合物のこのような修飾は、場合によっては、本発明の好ましい実施形態も構成し得る。本発明の化合物の同位体変異体は、それぞれの試薬お

40

50

よび／または出発化合物の対応する同位体修飾を使用することによって、例えば、さらに下に記載された方法および実施例に記載された手順によって、当業者に公知のプロセスによって調製することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明の文脈における好ましい塩は、本発明による化合物の生理学的に許容される塩である。しかしながら、本発明はまた、それ自体は医薬用途には不適當であるが、例えば、本発明による化合物の単離または精製に使用することができる塩を包含する。

【 0 0 2 4 】

本発明による化合物の生理学的に許容される塩は、鉱酸、カルボン酸およびスルホン酸の酸付加塩、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、フマル酸、マレイン酸および安息香酸の塩を含む。

10

【 0 0 2 5 】

本発明の文脈において溶媒和物として指定されるのは、溶媒分子との配位によって固体または液体状態で複合体を形成する本発明による化合物の形態である。水和物は、配位が水である溶媒和物の特定の形態である。

【 0 0 2 6 】

本発明はさらに、本発明の化合物のプロドラッグも包含する。用語「プロドラッグ」は、それらの部分が生物学的に活性または不活性であり得るが、体内でのそれらの滞留時間中に本発明による化合物に変換される（例えば、代謝または加水分解によって）化合物を包含する。

20

【 0 0 2 7 】

本発明の文脈において、用語「治療」または「治療すること」は、疾患、状態、障害、傷害または健康問題の阻害、遅延、チェック、緩和、減弱、制限、低減、抑制、忌避または治癒、またはそのような状態および／またはそのような状態の症状の進行または進行を含む。用語「治療」は、ここでは、用語「治療」と同義で使用される。

【 0 0 2 8 】

用語「防止」、「予防」および「排除」は、本発明の文脈において同義的に使用され、病気、状態、無秩序、傷害または健康問題、またはそのような状態の発達または前進および／またはそのような状態の症状を収縮、経験、被害、または有するリスクの回避または低減を指す。

30

【 0 0 2 9 】

疾病、状態、障害、外傷または健康上の問題の治療または予防は、部分的なものであっても完全なものであってもよい。

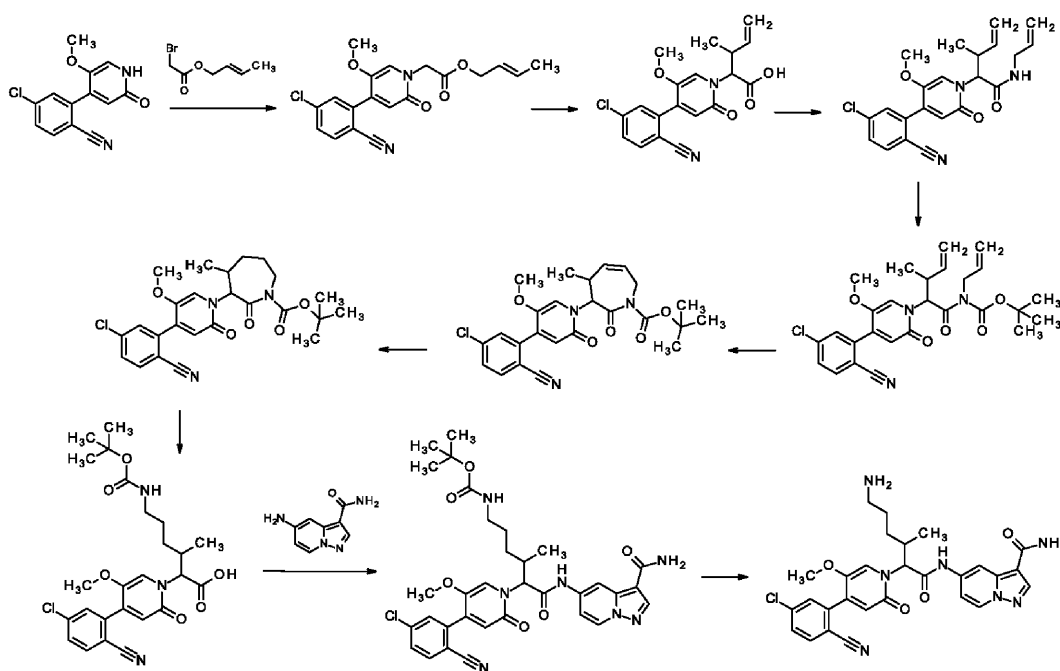
【 0 0 3 0 】

本発明はさらに、式 (I)、(I a)、(I b) および (I c) の化合物、またはその塩、その溶媒和物またはその塩の溶媒和物を調製するための方法を提供する。化合物は、合成スキーム 1 に例示されるように合成することができる：

【 0 0 3 1 】

40

スキーム 1 :



本発明による化合物は、予期せぬ有用な薬理学的活性スペクトルを有する。それらは、セリンプロテアーゼ血漿カリクレイン（PK）のタンパク質分解活性に影響を及ぼす化合物である。本発明の化合物は、血液凝固の活性化、血小板の凝集、および炎症プロセス（特に血管透過性の増加を含む）において必須の役割を有する、PKによって触媒される基質の酵素的切断を阻害する。

したがって、それらは、ヒトおよび動物における疾患の治療および／または予防のための医薬としての使用に適している。

本発明はさらに、障害、特に心血管障害、好ましくは血栓性または血栓塞栓性障害および／または血栓塞栓性合併症、および／または眼障害、特に糖尿病性網膜症または黄斑浮腫、および／または炎症性障害、特に遺伝性血管浮腫（HAE）または慢性炎症性障害、特にクローン病などの腸の過剰な血漿カリクレイン活性に関連するものの治療および／または予防のための本発明の化合物の使用を提供する。

第XIIa因子は、特に増強ループにおいて、さらなる第XII因子活性化を導き、全体的に、表面での凝固カスケードの開始の増幅をもたらす内因性活性化との関連において、血漿プレカリクレイン（PPK）を血漿カリクレイン（PK）に活性化する。したがって、本発明に従う化合物のPK阻害活性は、表面活性化を介する凝固を減少させ、したがって抗凝固効果を有する。

従って、本発明の化合物は、凝塊の形成から生じ得る障害または合併症の治療および／または予防に適している。

本発明の目的において、「血栓性または血栓塞栓性障害」は、動脈および静脈血管系の両方で発生し、特に本発明による化合物で治療できる障害、例えば、急性冠動脈症候群（ＡＣＳ）、ＳＴセグメント上昇を伴う心筋梗塞（ＳＴＥＭＩ）およびＳＴセグメント上昇を伴わない心筋梗塞（非ＳＴＥＭＩ）、安定狭心症、不安定狭心症、血管形成術、ステント移植または大動脈冠動脈バイパス術などの冠動脈介入後の再閉塞および再狭窄、ならび

に末梢動脈閉塞性障害、肺塞栓症、静脈血栓塞栓症、静脈血栓症、特に下肢深部静脈および腎静脈における血栓性または血栓塞栓性障害および一過性脳虚血発作および血栓塞栓性脳卒中を含む。

【0037】

凝固系の刺激は、様々な原因または関連する障害によって起こりうる。外科的介入、不動状態、ベッドへの閉じ込め、感染症、炎症または癌または癌治療との関連において、特に凝固系は高度に活性化され得、そして血栓性合併症、特に静脈血栓症があり得る。したがって、本発明による化合物は、癌に罹患している患者における外科的介入との関連において、血栓症の予防に適している。したがって、本発明による化合物は、例えば、記載された刺激状況において、活性化凝固システムを有する患者における血栓症の予防にも適している。

10

【0038】

したがって、本発明の化合物は、心原性血栓塞栓症、例えば、脳虚血、脳卒中および全身性血栓塞栓症および虚血の予防および治療、急性、間欠性または持続性の心臓不整脈、例えば、心房細動の患者、および電氣的除細動を受ける患者、ならびに心臓弁障害または人工心臓弁を有する患者の予防および治療にも適している。

【0039】

さらに、本発明の化合物は、特に敗血症に関連して起こり得る広範な血管内凝固(DIC)の治療および予防に適しているが、外科的介入、新生物性障害、火傷または他の損傷のためでもあり、微小血栓症を介して重度の臓器損傷をもたらし得る。

20

【0040】

さらに、血栓血麻酔複雑症は、血栓溶血性貧血および血液が体外循環の関連で、例えば、血液透析、ECMO(「体外膜酸素付加」)、LVAD(「左室補助装置」)および同様の方法、AVフィッシュラス、血管および心臓弁補綴物などの体外循環の関連で、異種表面に接触することによって発生する。

【0041】

さらに、本発明の化合物は、血管性認知症またはアルツハイマー病などの認知症障害をもたらし得る脳血管におけるマイクロロット形成またはフィブリン沈着を含む障害の治療および/または予防に適している。ここで、凝血塊は、閉塞を介して、およびさらなる疾患関連因子を結合することによって、疾患に寄与する可能性がある。

30

【0042】

さらに、本発明による化合物は、特に、プロ凝固剤成分に加えて、プロ炎症成分も必須の役割を果たす障害の治療および/または予防に適している。凝固および炎症の相互増強は、特に、本発明による化合物によって防止することができ、したがって、血栓性合併症の確率を決定的に低下させる。この場合、(トロンビン産生の障害を介して)第XIa因子阻害成分とPK阻害成分の両方が、(例えばブラジキニンを介して)抗凝固作用と抗炎症作用に寄与しうる。したがって、アテローム硬化性血管障害、運動系のリウマチ性疾患との関連における炎症、肺線維症などの肺の炎症性障害、糸球体腎炎などの腎臓の炎症性障害、クローン病または潰瘍性大腸炎などの腸の炎症性障害、または糖尿病性網膜症または腎症などの糖尿病性基礎疾患との関連において存在しうる障害との関連における治療および/または予防は、とりわけ考慮されうる。

40

【0043】

血漿カリクレインによって生成されるキニンは、とりわけ、慢性炎症性腸疾患(CID)の進行における原因的役割を有する。ブラジキニン受容体の活性化を介したそれらの炎症誘発作用は、疾患進行を誘導し、増強する。クローン病患者に関する研究では、腸管上皮におけるカリクレイン濃度と腸管炎症の程度との間に相関が示されている。カリクレイン-キニン系の活性化は、実験動物試験でも同様に観察された。従って、カリクレイン阻害剤によるブラジキニン合成の障害は、慢性炎症性腸疾患の予防および/または治療にも使用することができる。

【0044】

50

さらに、本発明の化合物は、腫瘍の成長および転移の形成を阻害するために、また、例えば、静脈血栓塞栓症などの血栓塞栓性合併症の予防および/または治療のために、腫瘍患者、特に、主要な外科的介入または化学療法または放射線療法を受ける患者に使用することができる。

【0045】

さらに、本発明による化合物は、感染症、および/または全身性炎症症候群（SIRS）、敗血症性臓器機能不全、敗血症性臓器不全および多臓器不全、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、急性肺損傷（ALI）、敗血症性ショックおよび/または敗血症性臓器不全の状況における播種性血管内凝固の治療および/または予防にも適している。

【0046】

感染の経過中に、様々な臓器における微小血栓症および二次的な出血性合併症を伴う凝固系の全般的な活性化（播種性血管内凝固症候群または消費性凝固障害、以下「DIC」と呼ぶ）がみられることがある。さらに、血管の透過性の増加、および血管外腔への流体およびタンパク質の拡散を伴う内皮損傷が存在し得る。感染症が進行すると、臓器不全（腎不全、肝不全、呼吸不全、中枢神経障害、心血管不全など）や多臓器不全が起こる。

【0047】

DICの場合、損傷した内皮細胞、異物の表面または架橋した血管外組織の表面で凝固系の大量の活性化が存在する。その結果、低酸素症とそれに続く臓器機能不全を伴う様々な臓器の小血管に凝固がみられる。二次的な効果は、凝固因子（例えば、第X因子、プロトロンビンおよびフィブリノーゲン）および血小板の消費であり、これは、血液の凝固性を低下させ、重度の出血をもたらす得る。

【0048】

抗凝固活性に加えて、血漿カリクレインは重要なブラジキニン放出プロテアーゼであり、したがって、これはとりわけ内皮透過性の増加をもたらす。したがって、本化合物は、眼障害、特に糖尿病性網膜症または黄斑浮腫または遺伝性血管浮腫などの浮腫形成を含む障害の治療および/または予防に使用することができる。

【0049】

本発明の文脈における「眼障害」は、糖尿病性網膜症、糖尿病性黄斑浮腫（DME）、黄斑浮腫、網膜静脈閉塞症に伴う黄斑浮腫、加齢黄斑変性症（AMD）、脈絡膜血管新生（CNV）、脈絡膜新生血管膜（CNVM）、嚢胞様黄斑浮腫（CME）、網膜上膜（ERM）および黄斑穿孔、近視関連脈絡膜新生血管条、色素線条、血管条、網膜剥離、網膜色素上皮の萎縮性変化、網膜色素上皮の肥大性変化、網膜静脈閉塞症、網膜色素変性症、スターガルト病、未熟児網膜症、緑内障、ぶどう膜炎、強膜炎または眼内炎などの炎症性眼障害、白内障、近視、遠視または乱視および円錐角膜などの屈折異常、例えば角膜炎の後遺症としての角膜血管新生、角膜移植または角膜移植、低酸素症の後遺症としての角膜血管新生（例えばコンタクトレンズの過剰使用による）、翼状結膜、角膜下浮腫 および角膜内浮腫を含む。

【0050】

本発明の化合物はまた、遺伝子突然変異が酵素の活動の増強をもたらす、または酵素原のレベルの増加をもたらす、これらが酵素活動または酵素原濃度の関連する試験/測定によって確立される患者において、血栓性または血栓塞栓性障害および/または炎症性障害および/または血管透過性の増加を伴う障害の一次予防に適している。

【0051】

本発明はさらに、障害、特に上記の障害の処置および/または予防のための本発明による化合物の使用を提供する。

【0052】

本発明はさらに、障害、特に上記障害の治療および/または予防のための医薬の製造のための本発明による化合物の使用を提供する。

【0053】

本発明はさらに、治療有効量の本発明による化合物を使用する、障害、特に上記障害の

10

20

30

40

50

処置および／または予防のための方法を提供する。

【 0 0 5 4 】

本発明はさらに、治療有効量の本発明による化合物を使用して、障害、特に上記障害の治療および／または予防のための方法において使用するための本発明による化合物を提供する。

【 0 0 5 5 】

特に、本発明は、治療有効量の本発明による化合物を使用して、血栓性障害または血栓塞栓性障害の治療および／または予防のための方法において使用するための、本発明による化合物を提供する。

【 0 0 5 6 】

本発明はさらに、本発明による化合物および1つ以上のさらなる活性化合物を含む医薬を提供する。

【 0 0 5 7 】

さらに、本発明の化合物は、生体外での凝固の防止、例えば、凝血塊の形成によって引き起こされる臓器損傷に対する移植される臓器の保護、および移植された臓器からの血栓塞栓から臓器レシピエントを保護するために、血液および血漿製品を保存するために、カテーテルおよび他の医療助剤および器具を洗浄／前処理するために、生体内または生体外で使用される医療助剤および器具の合成表面をコーティングするために、使用することもできる。

【 0 0 5 8 】

本発明による化合物はまた、PKによる生理学的および人工的基質の代謝回転によって引き起こされる妨害効果を防止するために、血漿プレカリクレイン（PPK）または血漿カリクレイン（PK）を含有する生物学的試料において使用され得る。

【 0 0 5 9 】

さらに、本発明は、インビトロでの血液の凝固を防止するための方法、特に血漿カリクレインを含み得るバンクド血液または生物学的サンプルを提供し、この方法は、本発明による化合物の抗凝固有効量が添加されることを特徴とする。

【 0 0 6 0 】

本発明は、さらに、本発明による化合物と、1つ以上のさらなる活性化合物とを含む医薬、特に、上記の障害の治療および／または予防を提供する。

【 0 0 6 1 】

本発明の目的のための「組み合わせ」とは、全ての成分（いわゆる固定された組み合わせ）を含有する剤形および互いに分離した成分を含有する組み合わせパックだけでなく、それらが同じ疾患の予防および／または治療のために使用されることを条件として、同時にまたは連続して投与される成分も意味する。同様に、2つ以上の活性成分を互いに組み合わせることが可能であり、したがって、それらは、それぞれが2成分または多成分の組み合わせであることを意味する。

【 0 0 6 2 】

本発明の化合物は、全身のおよび／または局所的に作用することができる。この目的のために、それらは、適切な様式で、例えば、経口、非経口、肺、鼻、舌下、舌、頬側、直腸、皮膚、経皮、結膜または耳経路によって、またはインプラントまたはステントとして投与され得る。

【 0 0 6 3 】

本発明の化合物は、これらの投与経路に適した投与形態で投与することができる。

【 0 0 6 4 】

経口投与に適した投与形態は、従来技術に従って機能し、本発明化合物を迅速かつ／または改変様式で送達するものであり、本発明化合物を結晶および／または非晶質および／または溶解形態で含有するもの、例えば錠剤（例えば、腸溶コーティングまたはコーティングを有し、遅延で溶解または溶解し、本発明化合物の放出を制御する）、口中で急速に崩壊する錠剤、またはフィルム／ウェーハ、フィルム／凍結乾燥物、カプセル（例えば、

10

20

30

40

50

硬質または軟質ゼラチンカプセル)、糖被覆錠剤、顆粒、ペレット、粉末、エマルジョン、懸濁液、エアロゾルまたは溶液である。

【0065】

非経口投与は、吸収段階の回避(例えば、静脈内、動脈内、心臓内、脊髄内または腰部内経路による)または吸収の封入(例えば、筋肉内、皮下、皮内、経皮または腹腔内経路による)を伴って達成することができる。非経口投与に適した投与形態としては、溶液、懸濁液、エマルジョン、凍結乾燥物または滅菌粉末の形態の注射および注入のための調製物が挙げられる。

【0066】

眼外(局所)投与に適しているのは、従来技術に従って作動する投与形態であり、この投与形態は、活性化化合物を迅速におよび/または修飾または制御された様式で放出し、活性化化合物を結晶性および/または非晶質および/または溶解形態で含有する、例えば、点眼剤、スプレーおよびローション(例えば、溶液、懸濁液、小胞/コロイド系、乳濁液、エアロゾル)、点眼剤、スプレーおよびローションのための粉末(例えば、粉碎活性化化合物、混合物、凍結乾燥物、沈降活性化化合物)、半固体眼製剤(例えば、ヒドロゲル、インサイチュヒドロゲル、クリームおよび軟膏)、眼挿入物(固体および半固体製剤、例えば、バイオ接着剤、フィルム/ウエハ、コンタクトレンズ)である。

【0067】

眼内投与には、例えば、硝子体内、網膜下、強膜下、脈絡膜内、結膜下、球後およびエノン下投与が含まれる。眼内投与に適しているのは、従来技術に従って作動する投与形態であり、この投与形態は、活性化化合物を迅速におよび/または修飾もしくは制御された様式で放出し、活性化化合物を結晶性および/または非晶質および/または溶解形態で含有し、注射用調製物(例えば、溶液、懸濁液、小胞/コロイド系、エマルジョン)、注射用調製物の粉末(例えば、粉碎活性化化合物、混合物、凍結乾燥物、沈降活性化化合物)、注射用調製物のゲル(半固体調製物、例えば、ヒドロゲル、in-situヒドロゲル)および移植植物(固体調製物、例えば、生分解性および非生分解性移植植物、移植可能ポンプ)などの注射用調製物および濃縮物を含む。

【0068】

経口投与、または眼科的疾患の場合は、外眼部および内眼部投与を優先する。

【0069】

他の投与経路に適した投与形態は、例えば、吸入のための医薬形態(粉末吸入器、ネブライザーを含む)、点鼻剤、溶液またはスプレー;舌下、舌下または口腔内投与のための錠剤、フィルム/ウエハまたはカプセル、座薬、耳または眼のための調製物、腔カプセル、水性懸濁液(ローション、振盪混合物)、親油性懸濁液、軟膏、クリーム、経皮治療システム(例えばパッチ)、ミルク、ペースト、泡、粉塵粉末、インプラントまたはステントである。

【0070】

本発明の化合物は、言及される投与形態に変換することができる。これは、それ自体公知の方法で、不活性で、無毒性で、薬学的に適当な賦形剤と混合することによって達成することができる。これらの賦形剤には、担体(例えば、微結晶セルロース、ラクトース、マンニトール)、溶媒(例えば、液体ポリエチレングリコール)、乳化剤および分散剤または湿潤剤(例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、ポリオキシソルビタンオレエート)、結合剤(例えば、ポリビニルピロリドン)、合成および天然ポリマー(例えば、アルブミン)、安定剤(例えば、アスコルビン酸などの酸化防止剤)、着色剤(例えば、無機顔料、例えば、酸化鉄)ならびに香味剤および/または臭気矯正剤が含まれる。

【0071】

本発明はさらに、少なくとも1つの本発明化合物を、好ましくは1つ以上の不活性な無毒性の薬学的に適切な賦形剤と一緒に含む医薬、および上記の目的のためのその使用を提供する。

【0072】

10

20

30

40

50

非経口投与の場合、有効な結果を達成するために、24時間毎に約5～250mgの量を投与することが一般に有利であることが見出されている。経口投与の場合、その量は24時間毎に約5～500mgである。

【0073】

これにもかかわらず、適切であれば、特に体重、投与経路、活性成分に対する個々の挙動、製剤のタイプ、および投与の時間または間隔に応じて、指定された量から逸脱することが必要であり得る。

【0074】

特に明記しない限り、以下に続く試験および実施例におけるパーセンテージは重量パーセントであり；部は重量部である。液体／液体溶液の溶媒比、希釈比および濃度データは、それぞれの場合において体積に基づいている。「w/v」は「重量／体積」を意味し、例えば、「10% w/v」は、100mlの溶液または懸濁液が10gの物質を含むことを意味する。

【0075】

10

20

30

40

50

【表 1】

A) 例

略号:

水性。	水	
Boc	tert-ブチルオキシカルボニル	
br	ブロード(NMR)	
brsm	回収出発物質ベース	
d	day(s), doublet (in NMR)	10
dd	二重線の二重線(NMR)	
ddd	二重線の二重線(NMRの場合)	
DMF	N, N-ジメチルホルムアミド	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
ESI	エレクトロスプレーイオン化(MS)	
h	時間	
HATU	O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラ メチルウロニウム	20
	ヘキサフルオロリン酸	
HPLC	高圧高速液体クロマトグラフィー	
HV	高真空	
LC-MS	液体クロマトグラフィー結合質量分析法	
m	多重線(NMR)	
min	minute(s)	
MS	質量分析	30
NMR	核磁気共鳴スペクトル測定法	
R _t	保持時間(HPLC)	
s	一重項(NMR)	
t	三重項(NMR)	
THF	テトラヒドロフラン	
TFA	トリフルオロ酢酸	
T3P	2, 4, 6-トリプロピル-1, 3, 5, 2, 4, 6-トリオキサトリホスフィナン 2, 4, 6-トリオキシド	40

【0076】

LC-MS法:

第1法: 器具MS: サーモサイエンティフィックFT-MS; HPLC器具: サーモサイエンティフィックUltimate 3000; カラム: ウォーターズ・アキティ・UPLC HSS T3、100 μm、1.8 μm、2.1 mm x 75 mm; 溶離剤A: 1 l 水 + 0.01%ギ酸; 溶離剤B: 1 l アセトニトリル + 0.01%ギ酸; 勾配: 0.0分10% B → 2.5分95% B → 3.5分95% B; Oven: 50; 流量: 0.90 ml / 分; UV検出: 210 nm / 最適積分経路210 ~ 300 nm。

方法2：器具：水取得S Q D U P L Cシステム；カラム：水取得U P L C H S S T 3、100、1.8 μm；1mm x 50mm；溶離液A：1 l水 + 0.25 ml 99%ギ酸、溶離液B：1 lアセトニトリル + 0.25 ml 99%ギ酸；勾配：0.0 min 90% A → 1.2 min 5% A → 2.0 min 5% A；オープン：50；流量：0.40 ml/min；UV-検出：210 nm。

【0077】

溶離剤が添加剤、例えば、トリフルオロ酢酸、ギ酸またはアンモニアを含有するクロマトグラフィーによって本発明による化合物を精製する場合、本発明による化合物が十分に塩基性または酸性の官能性を含有するならば、本発明による化合物は、塩の形態、例えば、トリフルオロ酢酸塩、ギ酸塩またはアンモニウム塩として得られ得る。このような塩は、当業者に公知の種々の方法によって、対応する遊離塩基または酸に変換することができる。

10

【0078】

以下に記載される本発明の合成中間体および実施例の場合、対応する塩基または酸の塩の形態で特定される任意の化合物は、それぞれの調製および/または精製プロセスによって得られるように、一般に、未知の正確な化学量論組成の塩である。より詳しく明記しない限り、「塩酸塩」、「トリフルオロ酢酸塩」、「ナトリウム塩」または「x HCl」、「x CF₃COOH」、「x Na⁺」のような名称および構造式への付加は、したがって、そのような塩のケースにおいて化学量論的な意味で理解されるべきではなく、その中に存在する塩形成成分に関して単なる記述的特徴を有する。

20

【0079】

これは、記載された調製及び/又は精製プロセスによって、化学量論組成が未知の溶媒和物、例えば水和物の形態で合成中間体又は実施例又はその塩が得られた場合にも（それらが規定されたタイプのものである場合には）、相応に適用される。

【0080】

出発化合物

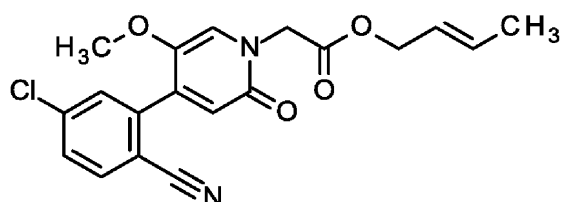
【0081】

実施例1A

(2E) - ブタ - 2 - エン - 1 - イル [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] アセテート

30

【化6】



【0082】

DMF (90 ml) 中の 4 - クロロ - 2 - (5 - メトキシ - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロピリジン - 4 - イル) ベンゾニトリル [CAS - RN 1630193 - 83 - 7 ; WO2015/063093 , p . 73 f . , exp l . 2 . 1 C] (11 . 3 g , 43 . 2 mmol) 、 (2 E) - ブタ - 2 - エン - 1 - イルプロモアセテート [CAS - RN 93455 - 19 - 7 ; S . M . Weinrebら、J . Org . Chem . 1984 , 49 , 5058 - 5064] (10 . 0 g , 51 . 8 mmol) および炭酸カリウム (8 . 95 g , 64 . 8 mmol) の混合物を 100 に 45 分間加熱した。続いて、溶媒を真空中で除去した。水を加え、混合物を酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を蒸発させ、残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル ; 溶離剤 : シクロヘキサン - 酢酸エチル勾配) によって精製して、10.8 g (純度 92 % 、収率 62 %) の表題化合物を得た。

40

50

【0083】

LC-MS (方法2): $R_t = 0.92$ 分; MS (ESIpos): $m/z = 373 [M+H]^+$

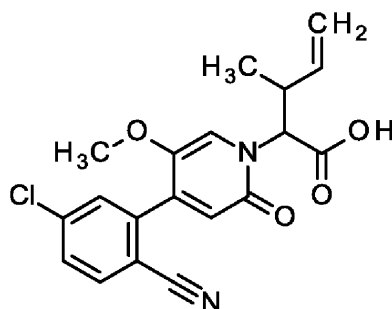
1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8.01 - 7.97 (m, 1H), 7.75 - 7.71 (m, 2H), 7.58 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.88 - 5.78 (m, 1H), 5.65 - 5.55 (m, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.59 (d, 2H), 3.62 (s, 3H), 1.70 (dd, 3H).

【0084】

実施例2A

2-[4-(5-クロロ-2-シアノフェニル)-5-メトキシ-2-オキソピリジン-1(2H)-イル]-3-メチルペンタ-4-エン酸(ジアステレオマーのラセミ混合物)

【化7】



(2E)-ブタ-2-エン-1-イル[4-(5-クロロ-2-シアノフェニル)-5-メトキシ-2-オキソピリジン-1(2H)-イル]アセテート(10.8g、純度92%、26.7mmol)をTHF(150ml)に溶解し、-78℃に冷却した。リチウムビス(トリメチルシリル)アミド(58ml、THF中1.0M、58mmol)を添加した。反応物を-78℃で30分間攪拌した。続いて、クロロ(トリメチル)シラン(7.4ml、58mmol)を添加した。60℃に加温し、1時間攪拌した。反応混合物に水を加え、1N水性塩酸で酸性化した。それをジクロロメタンで3回抽出した。合わせた有機層を1N水酸化ナトリウム溶液で3回抽出した。合わせた塩基層を4N水性塩酸で酸性化し、ジクロロメタンで5回抽出した。合わせた有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を蒸発して、標記化合物6.95g(収率70%)をジアステレオマーのラセミ混合物(比38:62)で得た。

【0085】

LC-MS (方法1): $R_t = 1.59$ 分(副異性体)、1.62分(主異性体); MS (ESIpos): $m/z = 373 [M+H]^+$

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 13.16 (br s, 1H)、7.99 (d, 1H主異性体)および7.98 (d, 1H副異性体)、7.76 - 7.69 (m, 2H)、7.44 (s, 1H主)および7.38 (s, 1H副)、6.52 (s, 1H主)および6.46 (s, 1H副)、5.95 (dd, 1H主)および5.59 (dd, 1H副)、5.20 (d, 1H主)および5.02 (d, 1H副)、5.18 - 5.15 (m, 1H)、5.11 (dd, 1H主)および4.92 (dd, 1H副)、3.65 (s, 3H主) 3.11 (m, 1H), 1.18 (d, 3H副)および0.87 (d, 3H主)。

【0086】

実施例3A

2-[4-(5-クロロ-2-シアノフェニル)-5-メトキシ-2-オキソピリジン-1(2H)-イル]-3-メチル-N-(プロピ-2-エン-1-イル)-ペンタ-4-エナミド(ジアステレオマーのラセミ混合物)

10

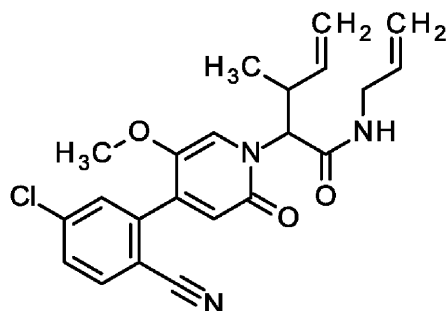
20

30

40

50

【化 8】



10

2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキシピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルペンタ - 4 - エン酸 (ジアステレオマーのラセミ混合物) (4 . 0 0 g 、 1 0 . 7 m m o l) およびプロパ - 2 - エン - 1 - アミン (1 2 m l 、 1 6 0 m m o l) をピリジン (4 0 m l) に溶解し、60 に加熱した。酢酸エチル (1 9 m l 、 純度 5 0 % 、 3 2 m m o l) 中の T 3 P の溶液を滴下し、混合物を 6 0 で 1 時間さらに撹拌した。水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を真空下で除去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル ; 溶離剤 : シクロヘキサン - 酢酸エチル勾配) により精製して、標記化合物 2 . 5 6 g (収率 5 8 %) をジアステレオマーのラセミ混合物として得た。

20

【 0 0 8 7 】

L C - M S (方法 1) : $R_t = 1.81$ 分 ; M S (E S I p o s) : $m/z = 412$ [$M+H$] $^{+}$

1 H - N M R (4 0 0 M H z 、 D M S O - d_6) : δ [p p m] = 8 . 8 4 (t 、 1 H 副異性体) および 8 . 6 9 (t 、 1 H 主異性体) 、 7 . 9 9 (d 、 1 H 主) および 7 . 9 7 (d 、 1 H 副) 、 7 . 7 6 ~ 7 . 6 8 (m 、 2 H) 、 7 . 6 4 (s 、 1 H 副) および 7 . 6 2 (s 、 1 H 副) 、 6 . 5 2 (s 、 1 H 副 , 3 H 主) 。

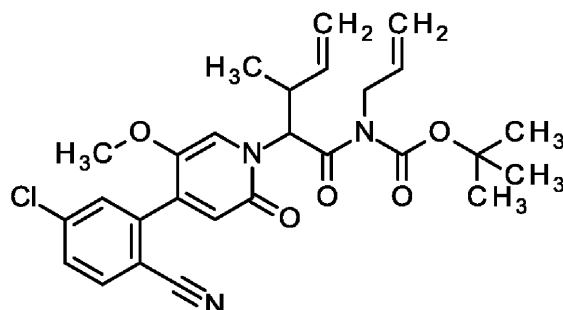
【 0 0 8 8 】

実施例 4 A

t e r t - ブチルアリル { 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキシピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルペンタ - 4 - エノイル } カルバメート (ジアステレオマーのラセミ混合物)

30

【化 9】



40

2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキシピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチル - N - (プロピ - 2 - エン - 1 - イル) ペンタ - 4 - エナミド (ジアステレオマーのラセミ混合物) (2 . 5 0 g 、 6 . 0 7 m m o l) をアセトニトリル (1 2 0 m l) に溶解した。ジ - t e r t - ブチルジカーボネート (2 . 8 m l 、 1 2 m m o l) および 4 - ジメチルアミノピリジン (2 9 7 m g 、 2 . 4 3 m m o l) を添加し、混合物を 6 0 に 1 時間加熱した。次いで、混合物を真空中で濃縮し、残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル ; 溶離剤 : シクロヘキサン - 酢酸エチル勾配) に

50

よって直接精製して、3.07 g (収率99%)の標記化合物をジアステレオマーのラセミ混合物として得た。

【0089】

LC-MS (方法1): $R_t = 2.41$ 分; MS (ESI pos): $m/z = 512$ [M+H]⁺

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7.99 (d, 1H主異性体)および7.97 (d, 1H副異性体)、7.75-7.63 (m, 2H)、7.42 (s, 1H主)および7.39 (s, 1H副)、6.51 (s, 1H主)および6.46 (s, 1H副)、6.45 (br. d, 1H主)および6.36 (br. d, 1H副)、5.96-5.58 (m, 2H)、5.22-4.92 (m, 4H)、4.24-4.07 (m, 2H)、3.66 (s, 3H主)および3.62 (s, 3H副)、3.35-3.478 (s, 9H主)、1.16 (d, 3H副)、および0.89 (d, 3H主)。

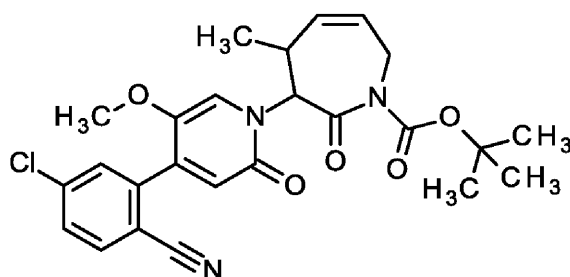
10

【0090】

実施例5A

tert-ブチル3-[4-(5-クロロ-2-シアノフェニル)-5-メトキシ-2-オキソピリジン-1(2H)-イル]-4-メチル-2-オキソ-2,3,4,7-テトラヒドロ-1H-アゼピン-1-カルボキシレート(ジアステレオマーのラセミ混合物)
【化10】

20



tert-ブチルアリル{2-[4-(5-クロロ-2-シアノフェニル)-5-メトキシ-2-オキソピリジン-1(2H)-イル]-3-メチルペント-4-エノイル}カルバメート(ジアステレオマーのラセミ混合物)(3.00 g、5.86 mmol)をジクロロメタン(1.0 l)に溶解し、溶液を脱気した。ベンジリデン[1,3-ビス(2,4,6-トリメチルフェニル)イミダゾリジン-2-イリデン]ジクロロテニウム-トリシクロヘキシルホスファン(1/1) [CAS-RN 246047-72-3] (249 mg、293 μ mol)を添加し、反応物を45℃で1.5時間撹拌した。続いて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加した。有機層を分離し、水層をジクロロメタンで2回抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を蒸発させ、残渣をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル; 溶離剤: シクロヘキサン-酢酸エチル勾配)によって精製して、2.75 g (収率97%)の標記化合物をジアステレオマーのラセミ混合物として得た。

30

【0091】

LC-MS (方法1): $R_t = 2.04$ (主異性体)および2.06分(副異性体); MS (ESI neg): $m/z = 482$ [M-H]⁻

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 8.01 (m, 1H副異性体)および8.00 (d, 1H主異性体)、7.78~7.71 (m, 2H)、7.47 (s, 1H主)および7.31 (s, 1H副)、6.60 (s, 1H副)および6.56 (s, 1H主)、6.34 (d, 1H主)および6.18 (d, 1H副)、6.03~5.94 (m, 1H)、5.90~5.83 (m, 1H副)および5.83~5.77 (m, 1H主)、4.57 (dd, 1H副)および4.47 (676 (s, 3H主)、3.48-3.38 (m, 1H副)、3.07-2.97 (m, 1H副)

50

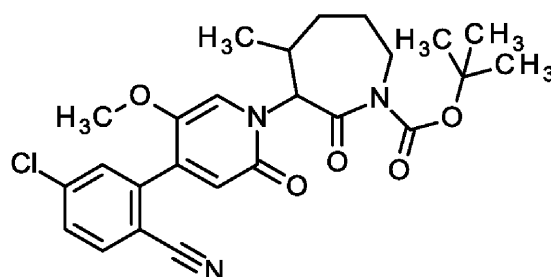
、1.46 (s, 9H 主)および1.45 (s, 9H 副)、1.18 (d, 3H 副)および0.91 (d, 3H 主)

【0092】

実施例 6 A

tert - ブチル 3 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 4 - メチル - 2 - オキソアゼパン - 1 - カルボキシレート (ジアステレオマーのラセミ混合物)

【化 1 1】



10

tert - ブチル 3 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 4 - メチル - 2 - オキソ - 2 , 3 , 4 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - アゼピン - 1 - カルボキシレート (ジアステレオマーのラセミ混合物) (2.70 g, 5.58 mmol) を酢酸エチル (250 ml) に溶解し、パラジウム (木炭上 10 % , 594 mg) を加えた。反応物を水素下 (大気圧) で 4 時間撹拌した。混合物を珪藻土を通して濾過し、溶媒を真空中で除去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル ; 溶離剤 : シクロヘキサン - 酢酸エチル勾配) により精製して、0.54 g の出発物質の主異性体および 1.78 g (66 % 収率、82 % 収率 brsm) の標記化合物をジアステレオマーのラセミ混合物として得た。

20

【0093】

LC - MS (方法 1) : $R_t = 2.05$ 分 ; MS (ESI neg) : $m/z = 484$ [M - H]⁻

¹ H - NMR (400 MHz, DMSO - d₆) : δ [ppm] = 8.00 (d, 1 H) および 7.99 (d, 1 H)、7.77 ~ 7.71 (m, 2 H)、7.42 (s, 1 H 副異性体) および 7.16 (s, 1 H 主異性体)、6.56 (s, 1 H 主) および 6.52 (s, 1 H 副)、5.89 (s, 1 H 主) および 5.86 ~ 5.66 (m, 1 H 副)、4.23 ~ 4.13 (m, 1 H)、3.68 (s, 3 H 主) および 3.66 (s, 3 H 副)、3.65 ~ 3.55 (m, 1 H)、2.64 ~ 2.56 (m, , 1.46 (s, 9 H) , 1.14 (d, 3 H 主) および 0.86 (d, 3 H 副)。

30

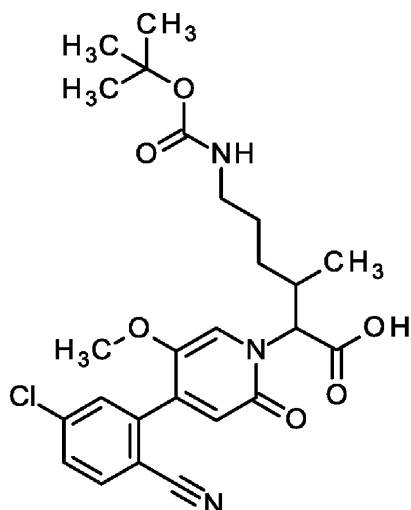
【0094】

実施例 7 A

6 - [(tert - ブトキシカルボニル) アミノ] - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘキサン酸 (ジアステレオマーのラセミ混合物)

40

【化 1 2】



10

tert - ブチル 3 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 4 - メチル - 2 - オキソアゼパン - 1 - カルボキシレート (ジアステレオマーのラセミ混合物) (1 . 7 7 g , 3 . 6 4 m m o l) を T H F (2 5 m l) に溶解し、水酸化リチウムの水溶液 (3 . 6 m l 、 2 . 0 M 、 7 . 2 m m o l) を加えた。混合物を 3 0 で 1 時間攪拌し、次いで真空中で濃縮し、残渣を水に溶解した。酢酸エチルで洗浄した。水相を 1 N a q . 塩酸で酸性化し、酢酸エチルで 2 回抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥して、標記化合物 1 . 7 8 g (収率 9 7 %) をジアステレオマーのラセミ混合物として得た。

20

【 0 0 9 5 】

LC - MS (方法 1) : $R_t = 1 . 8 0$ 分 (副異性体) および $1 . 8 4$ 分 (主異性体) ; MS (ESIpos) : $m/z = 504 [M+H]^+$
 1H - NMR (400 MHz , DMSO - d_6) : δ [ppm] = 13 . 13 (br . s , 1 H) , 8 . 01 - 7 . 97 (m , 1 H) , 7 . 76 - 7 . 71 (m , 2 H) , 7 . 38 (s , 1 H) , 6 . 80 (br . t , 1 H 主異性体) and 6 . 70 (br . t , 1 H 副異性体) , 6 . 51 (s , 1 H) , 5 . 10 (d , 1 H 副) and 5 . 05 (d , 1 H 主 , 3 . 64 (s , 3 H 副) and 3 . 63 (s , 3 H 主) , 3 . 01 - 2 . 71 and 2 . 49 - 2 . 37 (m , 共通 3 H) , 1 . 64 - 1 . 40 および 1 . 31 - 1 . 13 および 1 . 02 - 0 . 93 (m , 共通 4 H) , 1 . 38 (s , 9 H 主) 1 . 34 (s , 9 H 副) , 1 . 05 (d , 3 H 副) , 0 . 72 (d , 3 H 主)

30

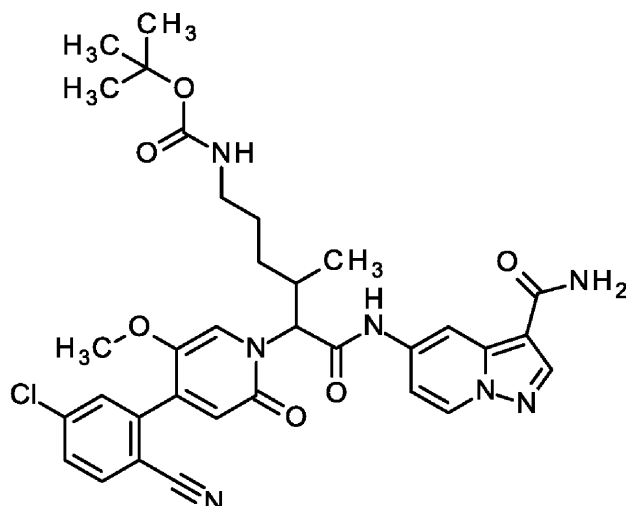
【 0 0 9 6 】

実施例 8 A

tert - ブチル { 6 - [(3 - カルバモイルピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 5 - イル) アミノ] - 5 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 4 - メチル - 6 - オキソヘキシル } カルバメート (ジアステレオマーのラセミ混合物)

40

【化 13】



10

6 - [(tert - ブトキシカルボニル) アミノ] - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シア
ノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘ
キサン酸 (ジアステレオマーのラセミ混合物) (1 . 0 8 g 、 2 . 1 4 m m o l) および
5 - アミノピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミドトリフルオロ酢酸 [C
AS - RN 1 8 9 1 0 7 1 - 1 1 - 6 ; WO 2 0 1 6 / 0 4 6 1 5 8 , p . 5 3 、 e x
p l . 1 . 1 C] (7 4 6 m g 、 2 . 5 7 m m o l) を DMF (4 . 0 m l) に溶解し
た。DMF (2 . 0 m l) 中の溶液としての H A T U (1 . 2 2 g 、 3 . 2 1 m m o l)
)、続いて N , N - ジイソプロピルエチルアミン (3 7 0 μ l 、 2 . 1 m m o l) を滴下
して添加した。反応物を室温で 1 . 5 時間攪拌した。さらに 5 - アミノピラゾロ [1 , 5
- a] ピリジン - 3 - カルボキサミドトリフルオロアセテート (1 8 7 m g 、 6 4 3 μ m
o l) および N , N - ジイソプロピルエチルアミン (3 7 0 μ l 、 2 . 1 m m o l) を添
加した。一晩攪拌した後、さらに H A T U (4 0 7 m g 、 1 . 0 7 m m o l) および N
, N - ジイソプロピルエチルアミン (3 7 0 μ l 、 2 . 1 m m o l) を添加し、1 時間後
、反応物を真空中で濃縮した。残渣を水で結晶化し、吸引濾過によって収集し、水で洗浄
し、真空中で乾燥した。化合物をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル ; 溶離剤 : ジク
ロロメタン / メタノール勾配) により精製して、標記化合物 1 . 2 0 g (収率 8 4 %) を
ジアステレオマーのラセミ混合物として得た。

20

30

【 0 0 9 7 】

LC - MS (方法 1) : R_t = 1 . 7 5 分 ; MS (ESI pos) : m/z = 6 6 2 [M + H] ⁺
1 H - NMR (4 0 0 MHz 、 DMSO - d₆) : δ [ppm] = 1 1 . 1 4 (b r . s 、 1 H 主異性体) および 1 1 . 1 2 (b r . s 、 1 H 副異性体) 、 8 . 7 3 ~ 8 . 6 6 (m 、 2 H) 、 8 . 4 7 (s 、 1 H 主) および 8 . 4 6 (s 、 1 H 副) 、 8 . 0 0 (d 、 1 H 主) および 7 . 9 9 (d 、 1 H 副) 、 7 . 7 7 ~ 7 . 7 1 (m 、 2 H) 、 7 . 6 3 (s 、 1 H) 、 7 . 6 0 (b r . s 、 1 H) 、 7 . 2 6 (d d 、 1 H) 、 6 . 9 8 (b r . s 、 1 H) 、 6 . 7 6 ~ 6 . 7 0 (m 、 1 H) 、 6 . 5 6 (s 、 1 H 副) および 6 . 5 5 (s 、 1 H 主) 、 3 . 7 2 (s 、 3 H 主) および 3 . 7 1 (s 、 3 H 副) 、 2 . 9 6 - 2 . 7 6 (m 、 2 H) 、 1 . 6 4 - 0 . 9 6 (m 、 5 H) 、 1 . 3 4 (s 、 9 H 主) および 1 . 2 8 (s 、 9 H 副) 、 1 . 0 5 (d 、 3 H 主) および 0 . 7 8 (d 、 3 H 副)

40

【 0 0 9 8 】

4 つの立体異性体の分離は、キラルクロマトグラフィーによって達成することができる
: カラムおよび固相 : 2 5 0 m m $\times$ 2 0 m m 、キラルパック IE 、 5 μ m ; 溶離剤 : エ
タノール ; 流速 1 5 . 0 m l / 分。3 つのピーク (7 . 0 ~ 8 . 5 分、1 1 . 1 分、1 3

50

． 9 分）を生じる。第 1 のピークは、分離のためにさらにクロマトグラフィーを必要とする：カラムおよび固相： 250 mm × 20 mm、Chiralpak IC、5 μm；溶離液：エタノール；流速 15.0 ml / 分。2 つのピーク（6.29 分、7.33 分）を生じる。

【0099】

分析 HPLC：カラム 250 mm × 4.6 mm、キラルセル OX - H、5 μm；溶離液：イソヘキサン / エタノール 1：1；流量 1.0 ml / 分；温度： 40 。

立体異性体 1： $R_t = 10.90$ 分。

立体異性体 2： $R_t = 7.50$ 分。

立体異性体 3： $R_t = 8.85$ 分。

立体異性体 4： $R_t = 9.19$ 分。

立体異性体 1 および 4 ならびに立体異性体 2 および 3 は、互いにエナンチオマーである。

立体異性体 1 および 4：

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 11.14 (br. s, 1H), 8.70 - 8.67 (m, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.75 - 7.71 (m, 2H), 7.60 (br. s, 1H), 7.62 (br. s, 1H), 7.25 (dd, 1H), 6.98 (br. s, 1H), 6.76 - 7.70 (m, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.57 (d, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.93 - 2.74 (m, 2H), 1.52 - 1.29 (m, 3H), 1.34 (s, 9H), 1.26 - 0.96 (m, 2H), 1.05 (d, 3H)。

立体異性体 2 および 3：

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 11.12 (br. s, 1H), 8.71 (d, 1H), 8.68 (d, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.99 (d, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.73 (dd, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.59 (br. s, 1H), 7.25 (dd, 1H), 6.99 (br. s, 1H), 6.75 (br. t, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.56 (d, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.95 - 2.83 (m, 2H), 2.48 - 2.39 (m, 1H), 1.66 - 1.53 (m, 1H), 1.51 - 1.29 (m, 3H), 1.28 (s, 9H), 0.77 (d, 3H)。

【0100】

実施例

実施例 1

5 - ({ 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチル - ヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミドトリフルオロアセテート (ジアステレオマーのラセミ混合物)

10

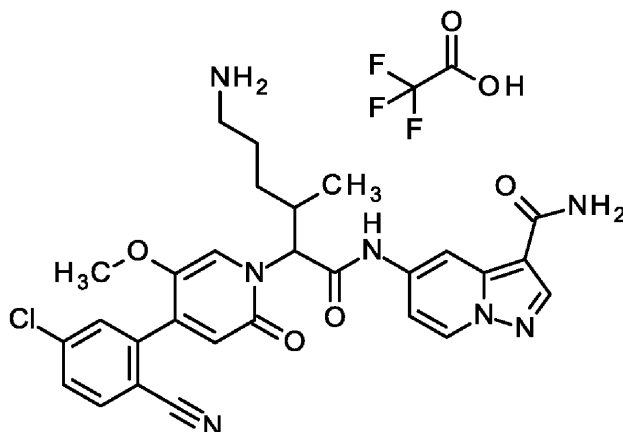
20

30

40

50

【化 1 4】



10

tert - ブチル { 6 - [(3 - カルバモイルピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 5 - イル) アミノ] - 5 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 4 - メチル - 6 - オキソヘキシル } カルバメート (ジアステレオマーのラセミ混合物) (1 . 2 0 g , 1 . 8 1 m m o l) をジクロロメタンに溶解し、氷水で冷却した。トリフルオロ酢酸 (2 . 8 m l , 3 6 m m o l) を添加した。混合物を室温に温め、そして 1 時間攪拌した。次いで、混合物を蒸発させた。ジクロロメタンを加え、減圧下で除去した。この手順を 1 回繰り返した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカゲル ; 溶離剤 : ジクロロメタン / メタノール勾配) により精製して、7 8 5 m g (収率 6 4 %) の標記化合物をジアステレオマーのラセミ混合物として得た。

20

【 0 1 0 1 】

LC - MS (方法 2) : $R_t = 0.64 \text{ min}$ (メジャーアイソマー) 0 . 6 8 (マイナーアイソマー) ; MS (ESIpos) : $m/z = 562 [M+H]^+$
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz , DMSO - d_6) : δ [ppm] = 11 . 17 (s , 1 H 主異性体) および 11 . 14 (s , 1 H 副異性体) , 8 . 73 - 8 . 67 (m , 2 H) , 8 . 48 (s , 1 H) , 8 . 00 (d , 1 H 主) および 7 . 99 (d , 1 H 副) , 7 . 76 - 7 . 72 (m , 2 H) , 7 . 69 (br . s , 4 H) , 7 . 65 (s , 1 H 主) および 7 . 61 (s , 1 H 副) , 7 . 28 - 7 . 25 (m , 1 H) , 6 . 98 (br . s , 1 H) , 6 . 58 (s , 1 H 副) および 6 . 57 (s , 1 H 主) , 5 . 61 - 5 . 55 (m , 副) , 2 . 87 ~ 2 . 51 (m , 3 H) , 1 . 80 ~ 1 . 09 (m , 4 H) , 1 . 08 (d , 3 H 主) , および 0 . 79 (d , 3 H 副) 。

30

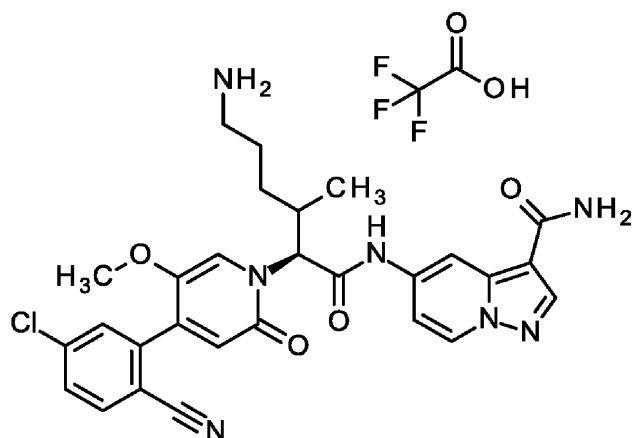
【 0 1 0 2 】

実施例 2

5 - ({ (2 S) - 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2 H) - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミドトリフルオロ酢酸塩 (立体異性体 3)

40

【化 1 5】



10

実施例 1 に記載した手順に従って、実施例 8 A 立体異性体 3 の分離したカルバメートを個々に脱保護した。

【 0 1 0 3】

立体異性体 3 :

LC - MS (方法 1) : $R_t = 1.05$ 分 ; MS (ESI pos) : $m/z = 562$ [M + H]⁺

20

¹H - NMR (400 MHz, DMSO - d₆) : δ [ppm] = 11.15 (s, 1H), 8.72 (d, 1H), 8.69 (d, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.76 - 7.72 (m, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.63 (br s, 4H), 7.27 (dd, 1H), 6.98 (br s, 1H), 6.58 (s, 1H), 5.56 (d, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.88 - 2.72 (m, 2H), (1H under DMSO), 1.81 - 1.67 (m, 1H), 1.63 - 1.44 (m, 2H), 1.39 - 1.28 (m, 1H), 0.79 (d, 3H)。

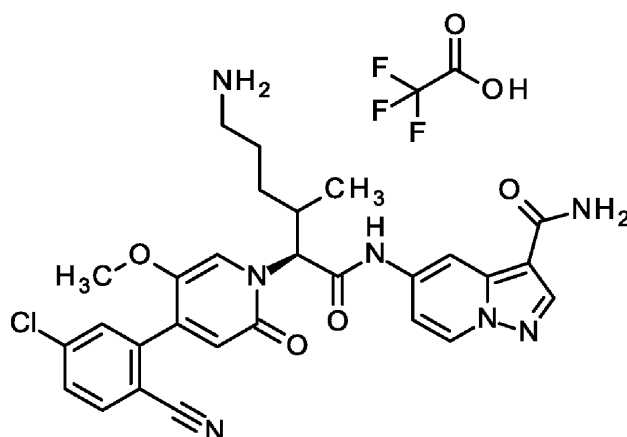
【 0 1 0 4】

実施例 3

30

5 - ({ (2S) - 6 - アミノ - 2 - [4 - (5 - クロロ - 2 - シアノフェニル) - 5 - メトキシ - 2 - オキソピリジン - 1 (2H) - イル] - 3 - メチルヘキサノイル } アミノ) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリジン - 3 - カルボキサミドトリフルオロ酢酸塩 (立体異性体 4)

【化 1 6】



40

実施例 1 に記載した手順に従って、実施例 8 A 立体異性体 4 の分離したカルバメートを個々に脱保護した。

50

【 0 1 0 5 】

立体異性体 4 :

LC - MS (方法 1) : $R_t = 0.99$ 分 ; MS (ESI pos) : $m/z = 562$ [M+H]⁺

¹H - NMR (400 MHz, DMSO - d₆) : δ [ppm] = 11.17 (s, 1H), 8.72 - 8.67 (m, 2H), 8.48 (s, 1H), 8.03 - 7.98 (m, 1H), 7.77 - 7.72 (m, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.62 (br s, 4H), 7.26 (dd, 1H), 6.98 (br s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.59 (d, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.83 - 2.62 (m, 2H), 2.58 - 2.51 (m, 1H), 1.70 - 1.44 (m, 2H), 1.08 (d, 3H), 1.26 - 1.06 (m, 2H) .

10

【 0 1 0 6 】

B) 生理学的有効性の評価

血栓塞栓性障害を処置するための本発明による化合物の適切性は、以下のアッセイ系において実証され得る :

【 0 1 0 7 】

a) 試験内容 (in vitro)

a. 1) 血漿カリクレイン活性の測定

本発明による物質の血漿カリクレイン阻害を測定するために、ペプチド性血漿カリクレイン基質の反応を利用してヒト血漿カリクレインの酵素活性を測定する生化学的試験系が使用される。ここで、血漿カリクレインは、ペプチックプラズマカリクレイン基質から C 末端アミノメチルクマリン (AMC) を切断し、その蛍光を測定する。測定はマイクロタイタープレートで行う。

20

【 0 1 0 8 】

被験物質をジメチルスルホキシドに溶解し、ジメチルスルホキシド (3000 μ M ~ 0.0078 μ M ; 試験における最終濃度 : 50 μ M ~ 0.00013 μ M) で連続希釈する。それぞれの場合において、1 μ l の希釈物質溶液を、Greiner からの白色マイクロタイタープレートのウェル (384 ウェル) に入れる。次いで、20 μ l のアッセイ緩衝液 (50 mM トリス / HCl pH 7.4 ; 100 mM 塩化ナトリウム溶液 ; 5 mM の塩化カルシウム溶液 ; 0.1 % のウシ血清アルブミン) および Kordia からの 20 μ l の血漿カリクレイン (アッセイ緩衝液中 0.6 nM) を連続的に添加する。15 分間のインキュベーションの後、Bachem からのアッセイ緩衝液に溶解した 20 μ l の基質 H - Pro - Phe - Arg - AMC (アッセイ緩衝液中 10 μ M) の添加によって酵素反応を開始し、混合物を室温 (22) で 30 分間インキュベートし、次いで蛍光を測定する (励起 : 360 nm、発光 : 460 nm)。被験物質を用いた試験バッチの測定された排出量を、被験物質を含まない対照バッチ (ジメチルスルホキシド中の被験物質の代わりにジメチルスルホキシドのみ) の排出量と比較し、濃度 / 活性相関から IC₅₀ を計算する。この試験からの活性データを以下の表 A に列挙する (いくつかは、複数の独立した個々の決定からの平均値として) :

30

40

【表 2】

表 A

実施例 No.	IC ₅₀ [nM]
1	5.6
2	1.8
3	2.1

【 0 1 0 9 】

50

a. 2) F X I a 阻害の測定

本発明に係る物質の第 X I a 因子阻害は、ペプチド性第 X I a 因子基質の反応を利用してヒト第 X I a 因子の酵素活性を決定する生化学的試験系を用いて決定される。ここで、第 X I a 因子は、C 末端アミノメチルクマリン (A M C) をペプチド性第 X I a 因子基質から切断し、その蛍光が測定される。測定はマイクロタイタープレートで行う。

【 0 1 1 0 】

被験物質をジメチルスルホキシドに溶解し、ジメチルスルホキシド ($3000\mu\text{M} \sim 0.0078\mu\text{M}$; 試験における最終濃度 : $50\mu\text{M} \sim 0.00013\mu\text{M}$) で連続希釈する。それぞれの場合において、 $1\mu\text{l}$ の希釈物質溶液を、Greiner からの白色マイクロタイタープレートのウェル (384 ウェル) に入れる。次いで、 $20\mu\text{l}$ のアッセイ緩衝液 (50mM のトリス / H C l pH 7.4 ; 100mM の塩化ナトリウム ; 5mM の塩化カルシウム ; 0.1% のウシ血清アルブミン) および $20\mu\text{l}$ の K o r d i a からの第 X I a 因子 (アッセイ緩衝液中 0.45nM) を連続的に添加する。15 分間のインキュベーションの後、B a c h e m からのアッセイ緩衝液に溶解した $20\mu\text{l}$ の第 X I a 因子基質 B o c - G l u (O B z l) - A l a - A r g - A M C (アッセイ緩衝液中 $10\mu\text{M}$) の添加によって酵素反応を開始し、混合物を室温 (22) で 30 分間インキュベートし、次いで蛍光を測定する (励起 : 360nm 、発光 : 460nm) 。被験物質を用いた試験バッチの測定された排出量を、被験物質を含まない対照バッチ (ジメチルスルホキシド中の被験物質の代わりにジメチルスルホキシドのみ) の排出量と比較し、濃度 / 活性相関から IC_{50} を計算する。この試験からの活性データを以下の表 B に列挙する (いくつかは、複数の独立した個々の決定からの平均値として) :

【 表 3 】**表 B**

実施例 No.	IC_{50} [nM]
1	> 10000
2	> 2000
3	> 2000

【 0 1 1 1 】a. 3) 選択性の決定

F X I a 阻害に関する物質の選択性を実証するために、第 X a 因子、トリプシンおよびプラスミンなどの他のヒトセリンプロテアーゼの阻害について試験物質を試験する。第 X a 因子 (K o r d i a から 1.3nM / 1) 、トリプシン (S i g m a から 83mU / ml) およびプラスミン (K o r d i a から $0.1\mu\text{g}$ / ml) の酵素活性を測定するために、これらの酵素を溶解し (50mmol / 1 のトリス緩衝液 [C , C , C - トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン] 、 100mmol / 1 の N a C l 、 0.1% B S A [ウシ血清アルブミン] 、 5mmol / 1 の塩化カルシウム、pH 7.4) 、ジメチルスルホキシド中の種々の濃度の試験物質および試験物質なしのジメチルスルホキシドと共に 15 分間インキュベートする。次いで、酵素反応を、適切な基質 (X a 因子およびトリプシンについては B a c h e m からの B o c - I l e - G l u - G l y - A r g - A M C の $5\mu\text{mol}$ / 1 、プラスミンについては B a c h e m からの M e O S u c - A l a - P h e - L y s - A M C の $50\mu\text{mol}$ / 1) の添加によって開始する。22 で 30 分間インキュベートした後、蛍光を測定する (励起 : 360nm 、発光 : 460nm) 。被験物質を含む試験混合物の測定された排出量を、被験物質を含まない対照混合物 (ジメチルスルホキシド中の被験物質の代わりにジメチルスルホキシドのみ) と比較し、濃度 / 活性相関から IC_{50} を計算する。

【 0 1 1 2 】a. 4) 抗凝固活性の測定

10

20

30

40

50

被験物質の抗凝固活性は、ヒト血漿およびラット血漿中の *in vitro* で測定される。この目的のために、レシーバーとして 0.11 M のクエン酸ナトリウム溶液を使用して、1:9 のクエン酸ナトリウム / 血液の混合比中に採血する。採血後直ちに十分に混合し、約 4000 g で 15 分間遠心分離する。上清をピペットで除去する。

【0113】

活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は、様々な濃度の被験物質または対応する溶媒の存在下で、市販の試験キット (Siemens 社の aPTT 試薬) を使用して決定される。試験化合物を血漿および aPTT 試薬と共に 37 °C で 3 分間インキュベートする。次いで、25 mM 塩化カルシウムの添加によって凝固を開始し、凝固が起こる時間を決定する。APTT の 50 % 延長または倍加をもたらす被験物質の濃度を測定する。

10

【0114】

a. 5) 内皮の完全性の決定

本発明による化合物の活性は、「ヒト臍静脈細胞」(HUV EC) に対するインビトロ透過性アッセイによって特徴付けられる。EOS 装置 (ECIS: Electric Cell-substrate Impedance Sensing; Applied Biophysics Inc; Troy, NY) を使用して、金電極上にプレーティングされた内皮細胞単層を横切る経内皮電気抵抗 (TEER) の連続的変動を測定することが可能である。HUV EC を 96 ウェルセンサー電極プレート (96W1 E, Ibidi GmbH, Martinsried, Germany) に播種する。形成されたコンフルエントな細胞単層の高透過性は、キニノーゲン、プレカリクレインおよび第 XI 因子 (それぞれ 100 nM) による刺激によって誘導される。本発明による化合物は、上記の物質の添加の前に添加される。通常、 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ M が使用される。

20

【0115】

a. 6) 内皮細胞のインビトロ透過性の決定

さらなる高透過性モデルにおいて、高分子透過性の調節に対する物質の活性が決定される。HUV EC をフィブロネクチンでコーティングしたトランスウェルフィルター膜 (24 ウェルプレート、0.4 μ のポリカーボネート膜を有する 6.5 mm インサート; Costar #3413) 上に播種する。フィルター膜は、上部を下部細胞培養空間から分離し、融合内皮細胞層は、上部細胞培養空間の床にある。250 g/ml の 40 kDa FITC デキストラン (Invitrogen, D1844) を上部チャンバーの培地に添加する。単層の高透過性は、キニノーゲン、プレカリクレインおよび第 XI 因子 (それぞれ 100 nM) による刺激によって誘導される。30 分ごとに、培地サンプルを下部チャンバーから取り出し、時間の関数としての高分子透過性の変化のためのパラメータとしての相対蛍光を蛍光光度計を使用して決定する。本発明による化合物は、上記の物質の添加の前に添加される。通常、 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ M が使用される。

30

【0116】

b) 抗血栓活性の測定 (in vivo)

b. 1) ウサギの耳出血時間と併用した動脈血栓症モデル (塩化鉄 (II) 誘発血栓症)

FXIa 阻害薬の抗血栓活性は、動脈血栓症モデルにおいて試験される。血栓形成は、ウサギにおいて頸動脈の領域に化学的損傷を引き起こすことによってここで引き起こされる。同時に耳出血時間を測定する。

40

【0117】

正常な食餌を与え、体重が 2.2 ~ 2.5 kg の雄ウサギ (Crl: KBL (NZW) BR、チャールス川) にキシラジンおよびケタミン (Rompun, Bayer, 5 mg/kg および Ketavet, Pharmacia & Upjohn GmbH, 40 mg/kg 体重) を筋肉内投与することによって麻酔する。さらに、右耳介静脈から同一製剤 (ボラス: 持続注入) を静脈内投与することにより麻酔を維持する。

右頸動脈を露出させ、血管損傷を、次いで、血液流を妨害することなく、頸動脈の周りに Parafilm (登録商標) ストリップ (25 mm $\times$ 12 mm) 上に濾紙片 (10 mm

50

× 10 mm) を巻くことによって引き起こす。濾紙は、水中の塩化鉄 (II) (Sigma) の 13% 強度溶液 100 μL を含有する。5 分後、濾紙を除去し、容器を 0.9% 塩化ナトリウム水溶液で 2 回すすぐ。損傷 30 分後、頸動脈の損傷領域を外科的に抽出し、任意の血栓性物質を除去し、秤量する。

【0118】

被験物質は、麻酔動物に大腿静脈を介して静脈内投与するか、覚醒動物に強制経口投与するかのいずれかで、それぞれ損傷の 5 分前および 2 時間前に投与する。

【0119】

耳出血時間は、頸動脈の損傷から 2 分後に決定される。この目的のために、左耳を剃毛し、規定された長さ 3 mm の切開 (ブレードアート番号 10 - 150 - 10、Martín, Tuttlingen、ドイツ) を耳の縦軸に平行に作製する。ここでは、目に見える血管を損傷しないように注意する。漏出した血液は、創傷に直接接触することなく、正確に秤量した濾紙片を用いて 15 秒間隔で採取する。出血時間は、切開創を作製してから、濾紙上でこれ以上血液を検出することができない時点までの時間として計算される。漏出血液の体積は、濾紙片の重量を測定した後に計算される。

【0120】

c) 眼における血管外漏出 / 浮腫形成及び / 又は血管新生に対する影響の測定 (in vivo)

c. 1) レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルにおける物質の有効性の試験

本試験は、レーザー誘発脈絡膜新生血管のラットモデルにおいて、血管外漏出 / 浮腫形成および / または脈絡膜新生血管の減少に対する被験物質の有効性を検討するために役立つ。

【0121】

この目的のために、眼疾患の徴候を全く示さない Brown - Norway 系統の有色ラットを選択し、治療群に無作為に割り付ける。0 日目に、動物を腹腔内注射 (15 mg / kg のキシラジンおよび 80 mg / kg のケタミン) によって麻酔する。瞳孔を拡張させるために 0.5% 強度のトロピカミド溶液を滴下した後、532 nm アルゴンレーザー光凝固器 (直径 50 ~ 75 μm、強度 150 mW、持続時間 100 ms) を用いて、脈絡膜血管新生を光神経周囲の 6 つの規定された位置でトリガーする。被験物質および適切な媒体 (例えば、PBS、等張生理食塩水) は、経口または腹腔内経路によって全身的に、または点眼剤または硝子体内注射としての反復投与によって眼に局所的に投与される。すべての動物の体重は試験開始前に測定し、その後試験中は毎日測定する。

【0122】

21 日目に、蛍光眼底カメラ (例えば、Kowa、HRA) を使用して血管造影を実施する。麻酔下およびその後の瞳孔散大の後、10% 強度のフルオレセインナトリウム色素を皮下注射 (s.c.) し、2 ~ 10 分後、眼のバックグラウンドの写真を撮影する。血管外漏出 / 浮腫の程度は、フルオレセインの漏出で表され、2 ~ 3 人の盲検化された観察者によって評価され、0 (血管外漏出なし) から 3 (実際の病変を超える強い色調) までの重症度に分類される。

【0123】

動物を 23 日目に 殺し、その後、眼を取り出し、4% 強度パラホルムアルデヒド溶液中で室温で 1 時間固定する。1 回の洗浄後、網膜を注意深く剥離し、FITC イソレクチン B4 抗体を用いて強膜 - 脈絡膜複合体を染色し、次いで顕微鏡スライドに平らに適用する。このようにして得られた調製物を、励起波長 488 nm の蛍光顕微鏡 (Aptom, Zeiss) を用いて評価する。脈絡膜血管新生の面積または体積 (それぞれ μm² および μm³) は、Axiovision 4.6 ソフトウェアを使用する形態計測分析によって計算される。

【0124】

c. 2) 酸素誘発網膜症モデルにおける物質の有効性の試験

酸素誘発網膜症は病理学的網膜血管新生の研究に有用な動物モデルであることが示されている。このモデルは、網膜における出生後早期の発達中の高酸素症が、正常な網膜血管の

成長の停止または遅延を引き起こすという観察に基づいている。7日間の高酸素相の後、動物を正常酸素室の空気に戻すと、これは相対的低酸素と同等である。なぜなら、正常酸素条件下で神経組織の十分な供給を確保するために必要とされる正常血管が網膜に欠けているからである。このようにして引き起こされた虚血状態は、ウェットAMDのような眼疾患における病態生理学的新生血管といくらかの類似性を有する異常な新生血管を生じる。さらに、引き起こされる新生血管は、再現性が高く、定量可能であり、様々な形態の網膜障害に対する疾患機序および可能な治療を検討するための重要なパラメータである。

【0125】

本研究の目的は、酸素誘発網膜症モデルにおける網膜血管の成長に対する被験化合物の連日全身投与用量の有効性を検討することである。C57BL/6マウスの新生児とその母親は、生後7日目(PD7)に高酸素(70%酸素)に5日間曝露される。PD12から、マウスをPD17まで正常酸素条件下(室内空気、21%酸素)に保つ。12日目から17日目まで、マウスに被験物質または対応する溶媒を毎日投与する。17日目に、すべてのマウスをイソフルランで麻酔した後、頸部骨折により殺す。眼を摘出し、4%ホルマリンで固定する。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、網膜を切除し、その平坦な調製物を作製し、これをイソレクチンB4抗体で染色する。新生血管形成の定量は、Zeiss ApoTomeを用いて行われる。

【0126】

C) 医薬組成物の実施例

本発明による物質は、以下のように医薬調製物に変換することができる：

【0127】

錠剤：

組成物：

実施例1の化合物100mg、ラクトース(一水和物)50mg、トウモロコシデンプン50mg、ポリビニルピロリドン(PVP 25)(ドイツBASF社製)10mgおよびステアリン酸マグネシウム2mg。

錠剤重量212mg。直径8mm、曲率半径12mm。

製造：

実施例1の化合物、ラクトースおよびデンプンの混合物を、水中のPVPの5%強度溶液(m/m)で顆粒化する。乾燥後、顆粒をステアリン酸マグネシウムと5分間混合する。この混合物を通常の打錠プレスで圧縮する(錠剤のフォーマットについては上記を参照のこと)。

【0128】

経口懸濁液：

組成物：

1000mgの実施例1の化合物、1000mgのエタノール(96%)、400mgのRhodigel(キサンタンガム)(米国FMCから)、および99gの水。

10mlの経口懸濁液は、100mgの本発明の化合物の単回用量に相当する。

製造：

Rhodigelをエタノールに懸濁し、実施例1の化合物を懸濁液に添加する。攪拌しながら水を加える。混合物を、Rhodigelの膨潤が完了するまで、約6時間攪拌する。

【0129】

眼に局所投与するための溶液または懸濁液(点眼剤)：

眼への局所投与のための無菌医薬調製物は、本発明化合物の凍結乾燥物を無菌生理食塩水中に再構成することによって調製することができる。このような溶液または懸濁液に好適な防腐剤は、例えば、0.001~1重量%の濃度範囲の塩化ベンザルコニウム、チオマーサルまたは硝酸フェニル水銀である。

【0130】

眼に局所投与するための溶液または懸濁液(点眼剤)：

10

20

30

40

50

眼への局所投与のための無菌医薬調製物は、本発明化合物の凍結乾燥物を無菌生理食塩水中に再構成することによって調製することができる。このような溶液または懸濁液に好適な防腐剤は、例えば、0.001～1重量%の濃度範囲の塩化ベンザルコニウム、チオマーサルまたは硝酸フェニル水銀である。

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也
- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩
- (74)代理人 100182132
弁理士 河野 隆
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 ロベル, マリオ
ドイツ国、4 2 1 1 3・ヴッパータール、アム・アイゲンバッハ・1 6
- (72)発明者 シロック, ハルトムート
ドイツ国、4 0 7 6 4・ランゲンフェルト、ペスタロッツィシュトラッセ・3 9 アー
- (72)発明者 テルシュテーゲン, エイドリアン
ドイツ国、4 2 1 1 1・ヴッパータール、リューベツァールヴェーク・8
- 審査官 神谷 昌克
- (56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 3 5 0 3 1 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 2 8 3 4 1 2 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 1 8 / 0 4 1 1 2 2 (W O , A 1)
特表 2 0 0 8 - 5 0 2 7 0 0 (J P , A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
C 0 7 D
A 6 1 K
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)