



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **326496**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

*C07D 205/04 (2006.01)*

*C07C 59/56 (2006.01)*

*C07C 45/29 (2006.01)*

*C07C 59/64 (2006.01)*

*C07C 45/51 (2006.01)*

*C07C 69/732 (2006.01)*

*C07C 45/67 (2006.01)*

*C07C 69/734 (2006.01)*

*C07C 45/71 (2006.01)*

*C07C 69/738 (2006.01)*

*C07C 47/575 (2006.01)*

Flere klasser finnes

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20040813	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.08.30 PCT/SE02/01557
(22)	Inng.dag	2004.02.24	(85)	Videreføringsdag	2004.02.24
(24)	Løpedag	2002.08.30	(30)	Prioritet	2001.08.30, SE, 0102921 2001.11.30, WO, PCT/SE01/02
(41)	Alm.tilgj	2004.02.24			
(45)	Meddelt	2008.12.15			
(73)	Innehaver	AstraZeneca AB, 15185 SÖDERTÄLJE, SE			
(72)	Oppfinner	Tord Inghardt, c/o AstraZeneca R&D Mölndal, 43183 MÖLNDAL, SE Arne Svensson, c/o AstraZeneca R&D, 43183 MÖLNDAL, SE Anders Johansson, c/o AstraZeneca R&D, 43183 MÖLNDAL, SE			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Nye mandelsyre-derivater, farmasøytiske formuleringer inneholdende slike samt anvendelse derav for fremstilling av medikament for behandling av sykdom</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 00 42059 A			
(57)	Sammendrag				

Det tilveiebringes en forbindelse med formel (1) og farmasøytisk akseptable derivater (omfattende prodrug) derav, hvilken forbindelse og derivater er anvendelige som eller er anvendelige som prodrug for, kompetitive inhibitorer av trypsin-lignende proteaser, så som trombin og således spesielt for behandling av lidelser hvor hemning av trombin er nødvendig (f.eks. trombose) eller som antikoaguleringsmidler.

## Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse angår nye farmasøytisk anvendelige forbindelser, spesielt forbindelser som er kompetitive inhibitorer av trypsin-lignende serinproteaser, spesielt trombin, anvendelse derav for fremstilling  
5 av medikament, anvendelse av dem som medikamenter og farmasøytiske preparater inneholdende slike.

## Bakgrunn

Blodkoagulering er nøkkelprosessen involvert i både hemostase  
10 (dvs. forhindring av blodtap fra et skadet kar) og trombose (dvs. dannelse av en blodklump i et blodkar, hvilket noen ganger fører til kar-obstruksjon).

Koagulering er resultatet av en kompleks serie av enzymatiske reaksjoner. Ett av de siste trinn i denne serien av reaksjoner er omdannelsen av proenzymet protrombin til det aktive enzym trombin.

15 Trombin er kjent å spille en sentral rolle i koagulering. Det aktiverer blodplater, hvilket fører til blodplateaggregering, omdanner fibrinogen til fibrin-monomerer, som polymeriserer spontant til fibrin-polymerer og aktiverer faktor XIII, som så kryssbinder polymerene for å danne uopløselig fibrin. Videre aktiverer trombin faktor V og faktor VIII, hvilket  
20 fører til en "positiv feedback" dannelse av trombin fra protrombin.

Ved å hemme aggregering av blodplater og dannelse og kryssbinding av fibrin, ville effektive inhibitorer av trombin forventes å vise antitrombotisk aktivitet. I tillegg ville antitrombotisk aktivitet forventes å bli forbedret ved effektiv hemning av den positive feedback-mekanisme.  
25

## Kjent teknikk

Den tidlige utvikling av lavmolekylære inhibitorer av trombin er beskrevet av Claesson i *Blood Coagul. Fibrinol.* (1994) **5**, 411.

Blombäck *et al* (i *J. Clin. Lab. Invest.* **24**, suppl. 107, 59, (1969))  
30 rapporterte trombin-inhibitorer basert på aminosyresekvensen plassert rundt spaltningssetet for fibrinogen A $\alpha$ -kjeden. Av aminosyresekvensene beskrevet, foreslo disse forfattere at tripeptidsekvensen Phe-Val-Arg

(P9-P2-P1, nedenfor referert til som P3-P2-P1-sekvensen) ville være den mest effektive inhibitor.

Trombin-inhibitorer basert på dipeptidyl-derivater med et  $\alpha,\omega$ -aminoalkyl-guanidin i P1-stilling er kjent fra US-patent nr 4,346,078 og  
5 internasjonalt patentsøknad WO 93/11152. Lignende, strukturelt beslektede, dipeptidyl-derivater har også vært rapportert. For eksempel beskriver internasjonalt patentsøknad WO 94/29336 forbindelser med for eksempel aminometyl-benzamidiner, cycliske aminoalkyl-amidiner og cycliske aminoalkyl-guanidiner i P1-stilling (internasjonalt patentsøknad  
10 WO 97/23499 beskriver prodrug av visse av disse forbindelser); europeisk patentsøknad 0 648 780 beskriver forbindelser med for eksempel cycliske aminoalkyl-guanidiner i P1-stilling.

Trombin-inhibitorer basert på peptidyl-derivater som også har cycliske aminoalkyl-guanidiner (f.eks. enten 3- eller 4-aminometyl-1-  
15 amidino-piperidin) i P1-stillingen er kjent fra europeiske patentsøknader 0 468 231, 0 559 046 og 0 641 779.

Trombin-inhibitorer basert på tripeptidyl-derivater med arginin-aldehyd i P1-stillingen ble først beskrevet i europeisk patentsøknad  
0 185 390.

Senere er argininaldehyd-baserte peptidyl-derivater, modifisert i P3-  
20 stillingen, rapportert. For eksempel beskriver internasjonalt patentsøknad WO 93/18060 hydroksysyrer, europeisk patentsøknad 0 526 877 desaminosyrer og europeisk patentsøknad 0 542 525 O-metyl-mandelsyrer i P3-stillingen.

Inhibitorer av serinproteaser (f.eks. trombin) basert på elektrofile  
25 ketoner i P1-stillingen er også kjent. For eksempel beskriver europeisk patentsøknad 0 195 212 peptidyl- $\alpha$ -ketoestere og -amider, europeisk patentsøknad 0 362 002 fluoralkylamid-ketoner, europeisk patentsøknad 0 364 344  $\alpha,\beta,\delta$ -triketoforbindelser og europeisk patentsøknad 0 530 167  
30  $\alpha$ -alkoksy-ke-ton-derivater av arginin i P1-stillingen.

Andre, strukturelt forskjellige, inhibitorer av trypsin-lignende serinproteaser basert på C-terminal boronsyrederivater av arginin og

isotiuronium-analoger derav er kjent fra europeisk patentsøknad 0 293 881.

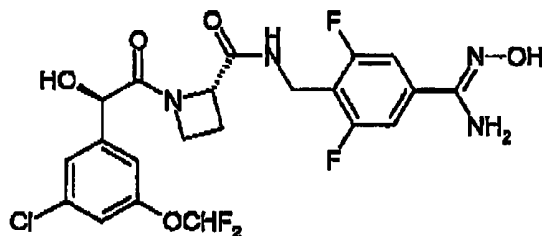
Mer nylig er trombin-inhibitorer basert på peptidyl-derivater beskrevet i europeisk patentsøknad 0 669 317 og internasjonale patentsøknader WO 95/35309, WO 95/23609, WO 96/25426, WO 97/02284, WO 97/46577, WO 96/32110, WO 96/31504, WO 96/03374, WO 98/06740, WO 97/49404, WO 98/57932, WO 99/29664, WO 00/35869 og WO 00/42059.

Spesielt beskriver WO 97/02284 og WO 00/42059 trombin-inhibitorer med substituerte mandelsyrer i P3-stillingen.

Imidlertid er det fortsatt et behov for effektive inhibitorer av trypsin-lignende serinproteaser, så som trombin. Det er også et behov for forbindelser som har en fordelaktig farmakokinetisk profil og er selektive ved å hemme trombin fremfor andre serinproteaser, spesielt de involvert i hemostase. Forbindelser som viser kompetitiv hemmende aktivitet mot trombin ville være forventet å være spesielt anvendelige som antikoaguleringsmidler og derfor for terapeutisk behandling av trombose og beslektede lidelser.

## 20 **Beskrivelse av foreliggende oppfinnelse**

Ifølge oppfinnelsen tilveiebringes en forbindelse med formelen under



25

(dvs. Ph(3-Cl)(5-OCHF<sub>2</sub>)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH)), eller et farmasøytisk akseptabelt derivat derav.

Betegnelsen "farmasøytisk akseptabelt derivat" omfatter farmasøytisk akseptable salter (f.eks. syreaddisjonssalter).

Forkortelser er listet opp ved slutten av denne beskrivelsen.

5 Oppfinnelsen omfatter farmasøytisk formulering kjennetegnet ved at den utviser aktiviteten av trombininhibisjon inkludert forbindelsen som definert definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, dannet sammen med en farmasøytisk akseptabel adjuvant, fortynningsmiddel eller bærer.

10 Videre omfatter oppfinnelsen forbindelse som definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse som et farmasøytisk middel som har trombininhibisjonsaktivitet.

Oppfinnelsen omfatter også forbindelsen som definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse ved behandling av en tilstand hvor inhibisjon av trombin er nødvendig.

15 Oppfinnelsen omfatter også forbindelse som definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse ved behandling av en tilstand hvor antikoagulerende terapi er indikert.

Oppfinnelsen omfatter også forbindelse som definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse ved behandling av trombose.

Oppfinnelsen omfatter også forbindelse som definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse som et antikoaguleringsmiddel.

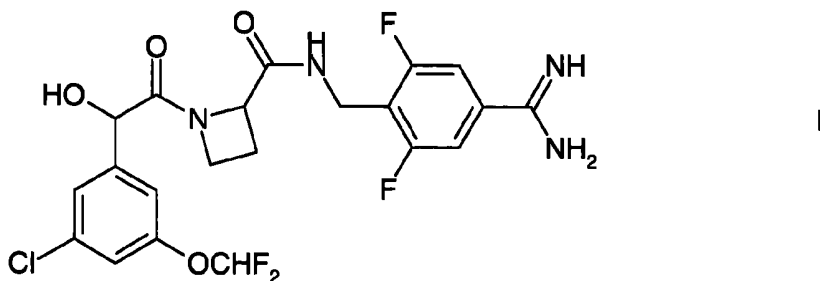
25 Oppfinnelsen omfatter videre anvendelse av forbindelsen som definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, som en aktiv ingrediens for fremstilling av et medikament for behandling av en tilstand hvor inhibisjon av trombin er nødvendig.

30 Oppfinnelsen omfatter også anvendelse av forbindelsen som definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, som en aktiv ingrediens for fremstilling av et medikament for behandling av en tilstand hvor antikoagulerende terapi er indikert.

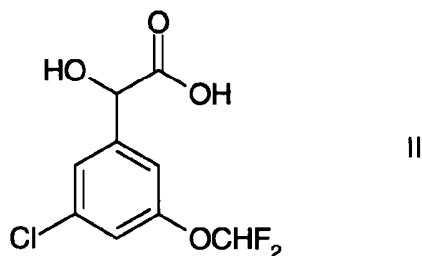
Oppfinnelsen omfatter også anvendelsene ifølge som nevnt over, hvor tilstanden er trombose eller hyperkoagulabilitet i blod og/eller vev.

Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse av forbindelsen som definert over, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, som et aktivt ingrediens for fremstilling av et antikoaguleringsmiddel.

Forbindelsen med formel I kan fremstilles i henhold til teknikker velkjent for fagfolk på området, for eksempel som beskrevet nedenfor.

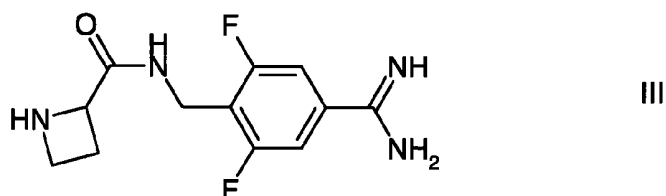


(i) kobling av en forbindelse med formel II,



med en forbindelse med formel III,

15

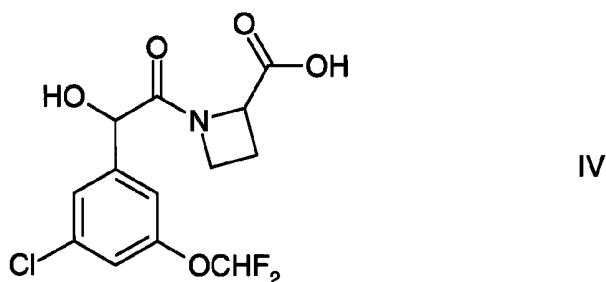


for eksempel i nærvær av et koblingsmiddel (f.eks. oksalyklorid i DMF, EDC, DCC, HBTU, HATU, PyBOP eller TBTU), en passende base (f.eks.

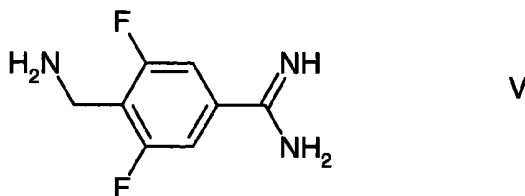
pyridin, DMAP, TEA, 2,4,6-kollidin eller DIPEA) og et egnet organisk løsningsmiddel (f.eks. diklormetan, acetonitril, EtOAc eller DMF);

(ii) kobling av en forbindelse med formel IV,

5



med forbindelsen med formel V,



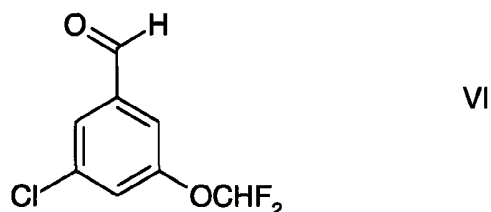
10

for eksempel under betingelser som beskrevet i prosess (i) ovenfor; eller

(iii) omsetning av en tilsvarende forbindelse med formel XVI, som definert  
 15 nedenfor, med en egnet kilde for ammoniakk (f.eks. ammoniumacetat eller  
 ammoniakk-gass) under betingelser kjent for fagfolk på området, så som ved  
 omsetning av et etylimidoat-mellomprodukt (dannet ved reaksjon av en  
 forbindelse med formel XVI med HCl(g) i etanol) med ammoniakk-gass i  
 etanol eller under de betingelser som er beskrevet i *Tetrahedron Lett.* 40,  
 20 7067 (1999), idet beskrivelsene i dette dokument herved inntas ved  
 referanse.

Forbindelser med formel II er tilgjengelige ved anvendelse av kjente og/eller standard teknikker.

For eksempel kan forbindelser med formel II fremstilles ved omsetning av aldehydet med formel VI,



5

med:

(a) en forbindelse med formel VII,

10

$R''CN$

VII

hvor  $R''$  representerer H eller  $(CH_3)_3Si$ , for eksempel ved romtemperatur eller forhøyet temperatur (f.eks. under  $100^\circ C$ ) i nærvær av et egnet organisk løsningsmiddel (f.eks. kloroform eller metylenklorid) og, hvis

15 nødvendig, i nærvær av en egnet base (f.eks. TEA) og/eller et egnet katalysator-system (f.eks. benzylammoniumklorid eller sinkjodid eller ved anvendelse av en chiral katalysator, for eksempel som beskrevet i *Chem. Rev.*, (1999) **99**, 3649), fulgt av hydrolyse under betingelser som er velkjent for fagfolk på området (f.eks. som beskrevet nedenfor);

20

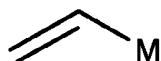
(b) NaCN eller KCN, for eksempel i nærvær av  $NaHSO_3$  og vann, fulgt av hydrolyse;

25

(c) kloroform, for eksempel ved forhøyet temperatur (f.eks. over romtemperatur men under  $100^\circ C$ ) i nærvær av et egnet organisk løsningsmiddel (f.eks. kloroform) og, hvis nødvendig, i nærvær av et egnet katalysator-system (f.eks. benzylammoniumklorid), fulgt av hydrolyse;



(d) en forbindelse med formel VIII,

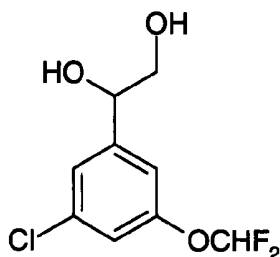


VIII

5 hvor M representerer Mg eller Li, fulgt av oksydativ spaltning (f.eks. ozonolyse eller osmium- eller ruthenium-katalysert) under betingelser som er velkjent for fagfolk på området; eller

(e) tris(metyltio)metan under betingelser som er velkjent for fagfolk på  
10 området, fulgt av hydrolyse i nærvær av f.eks. HgO og HBF<sub>4</sub>.

Forbindelser med formel II kan alternativt fremstilles ved oksydasjon av en forbindelse med formel IX,



IX

15

eller et derivat derav som eventuelt er beskyttet ved den sekundære hydroksylgruppe, i nærvær av et egnet oksydasjonsmiddel (f.eks. en kombinasjon av en egnet friradikal-oksydant (så som TEMPO) og et  
20 passende hypokloritt-salt (så som natrium-hypokloritt)) under betingelser kjent for fagfolk på området, for eksempel ved mellom -10°C og romtemperatur, i nærvær av et egnet løsningsmiddel (f.eks. vann, aceton eller en blanding derav), et passende salt (f.eks. et alkalimetallhalogenid så som kaliumbromid) og en egnet base (f.eks. et alkalimetallkarbonat  
25 eller hydrogenkarbonat så som natriumhydrogenkarbonat).

Enantiomert rene former av forbindelser med formel II (dvs. de forbindelser som har forskjellige konfigurasjoner av substituenten omkring C-atomet  $\alpha$ - til  $\text{CO}_2\text{H}$ -gruppen) kan separeres ved et enantiospesifikt derivatiseringstrinn. Dette kan for eksempel oppnås ved en enzymatisk prosess. Slike enzymatiske prosesser omfatter for eksempel omestring av  $\alpha$ -OH-gruppen ved mellom rom- og tilbakeløpstemperatur (f.eks. ved mellom 45 og 65°C) i nærvær av et egnet enzym (f.eks. Lipase PS Amano), en passende ester (f.eks. vinylacetat) og et egnet løsningsmiddel (f.eks. metyl-*tert*-butyleter). Den derivatiserte isomer kan deretter separeres fra den uomsatte isomer ved konvensjonelle separeringsteknikker (f.eks. kromatografi).

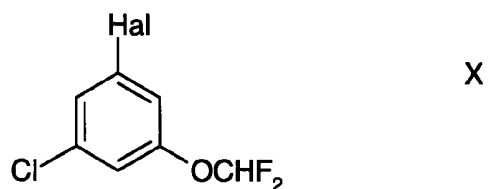
Grupper satt til forbindelser med formel II i et slikt derivatiseringstrinn kan fjernes enten før hvilke som helst ytterligere reaksjoner eller på hvilket som helst senere trinn i syntesen av forbindelser med formel I. De ytterligere grupper kan fjernes ved anvendelse av konvensjonelle teknikker (f.eks. for estere av  $\alpha$ -OH-gruppen, hydrolyse under betingelser kjent for fagfolk på området (f.eks. ved mellom rom- og tilbakeløpstemperatur i nærvær av en egnet base (f.eks. NaOH) og et passende løsningsmiddel (f.eks. MeOH, vann eller blandinger derav))).

Forbindelser med formel III kan fremstilles ved kobling av azetidin-2-karboksylysyre til en forbindelse med formel V, som ovenfor definert, for eksempel under lignende betingelser som de beskrevet her for fremstilling av forbindelser med formel I.

Forbindelser med formel IV kan fremstilles ved kobling av en forbindelse med formel II som ovenfor definert til azetidin-2-karboksylysyre, for eksempel under lignende betingelser som de beskrevet her for fremstilling av forbindelser med formel I.

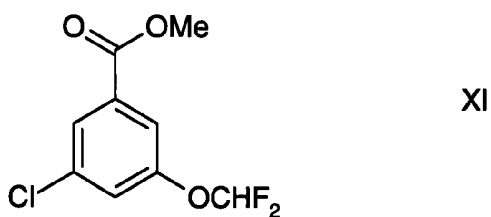
Forbindelsen med formel VI er tilgjengelig ved anvendelse av kjente og/eller standard teknikker. For eksempel kan den fremstilles ved:

(i) metallering (hvor metallet for eksempel kan være et alkalimetall så som Li eller, fortrinnsvis, et divalent metall så som Mg) av en forbindelse med formel X,



5 hvor Hal representerer et halogenatom valgt fra Cl, Br og I, fulgt av omsetning med en egnet kilde for formylgruppen (så som *N,N*-dimetylformamid), for eksempel under betingelser beskrevet nedenfor;

(ii) reduksjon av en forbindelse med formel XI,

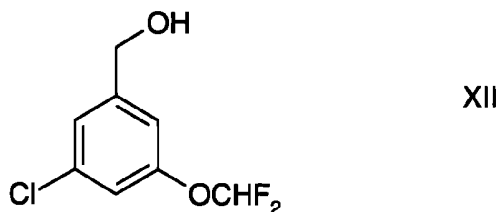


10

i nærvær av et egnet reduksjonsmiddel (f.eks. DIBAL-H); eller

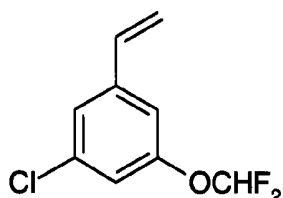
(iii) oksydasjon av en forbindelse med formel XII,

15



20 i nærvær av et egnet oksydasjonsmiddel (f.eks. MnO<sub>2</sub>, pyridinium-klorokromat, en kombinasjon av DMSO og oksalyklorid eller SO<sub>3</sub>-pyridin-kompleks i DMSO).

Forbindelser med formel IX kan fremstilles ved dihydroksylering av en tilsvarende forbindelse med formel XIII



XIII

i nærvær av et egnet dihydroksyleringsmiddel (f.eks. et reagens eller en  
 5 reagensblanding som tilveiebringer  $\text{OsO}_4$ , så som AD-mix- $\alpha$  eller, spesielt, AD-mix- $\beta$ ), for eksempel under betingelser kjent for fagfolk på området, så som ved mellom  $-10^\circ\text{C}$  og romtemperatur i nærvær av et passende løsningsmiddel (f.eks. vann, *tert*-butanol eller en blanding derav). Når asymmetriske oksydanter så som AD-mix- $\alpha$  eller AD-mix- $\beta$  blir anvendt,  
 10 kan denne metoden anvendes for å fremstille forbindelser med formel IX som har spesifikke konfigurasjoner av grupper (dvs. *R* eller *S*) omkring begge C-atomene til hvilke de primære og sekundære hydroksylgrupper er tilknyttet.

Forbindelsen med formel XIII kan fremstilles ved omsetning av en  
 15 tilsvarende forbindelse med formel X, som ovenfor definert, med en egnet kilde for vinyl-anion (f.eks. tributyl(vinyl)tinn) under betingelser kjent for fagfolk på området, for eksempel ved mellom rom- og tilbakeløpstemperatur (f.eks.  $50^\circ\text{C}$ ) i nærvær av et passende løsningsmiddel (f.eks. toluen), et egnet koblingsmiddel (f.eks. et  
 20 palladium(0) koordinasjonskompleks så som tetrakis(trifenylfosfin)palladium(0)) og eventuelt i nærvær av en passende katalysator (f.eks. 2,6-di-*tert*-butyl-4-metylphenol).

Forbindelser med formlene V, VII, VIII, X, XI, XII og azetidin-2-karboksylysyre er enten kommersielt tilgjengelige, er kjent i litteraturen eller  
 25 kan oppnås enten analogt med prosessene beskrevet her eller ved konvensjonelle synteseprosedyrer, i henhold til standard teknikker, fra lett tilgjengelige utgangsmaterialer ved anvendelse av passende reagenser og

reaksjonsbetingelser. Forbindelser med formel XVI kan oppnås ved prosesser beskrevet nedenfor.

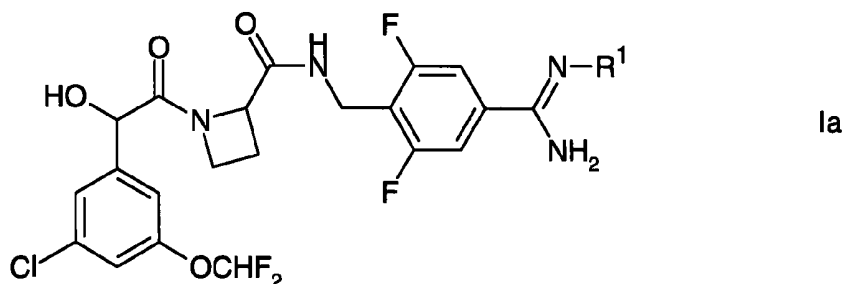
Substituenten på fenylingen i forbindelser med formlene I, II, III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII og XIII kan innføres ved anvendelse av teknikker velkjent for fagfolk på området ved interomdannelse av standard funksjonelle grupper, i henhold til standard teknikker, fra lett tilgjengelige utgangsmaterialer ved anvendelse av passende reagenser og reaksjonsbetingelser.

For eksempel kan forbindelser med formlene I, II, IV, VI, X, XI og XII fremstilles fra forbindelser svarende til de forbindelser, hvor, istedenfor -OCHF<sub>2</sub>-gruppen, en -OH gruppe er til stede (nedenfor referert til som "de relevante fenol-forløper-forbindelser"), for eksempel ved omsetning av en slik relevant fenol-forløper-forbindelse med et passende fluorert halogenalkan (så som ClCHF<sub>2</sub>), f.eks. ved romtemperatur eller over (f.eks. ved tilbakeløp) i nærvær av en egnet base (f.eks. kalium-*tert*-butoksyd, KOH eller NaOH, for eksempel i vandig løsning) og et passende organisk løsningsmiddel (f.eks. THF, kloroform eller *i*-propanol), for eksempel som beskrevet nedenfor.

Fagfolk vil forstå at slike funksjonell gruppe-transformasjoner også kan utføres ved et tidligere trinn i den totale syntese av forbindelser med formlene II, IV, VI, X, XI og XII (dvs. på passende forløpere for de relevante fenol-forløper-forbindelser). De relevante fenol-forløper-forbindelser er enten kommersielt tilgjengelige, er kjent i litteraturen eller kan oppnås enten analogt med prosessene beskrevet her eller ved konvensjonelle syntese-prosedyrer, i henhold til standard teknikker, fra lett tilgjengelige utgangsmaterialer ved anvendelse av passende reagenser og reaksjonsbetingelser. For eksempel kan de relevante fenol-forløper-forbindelser oppnås ved avbeskyttelse av de tilsvarende beskyttede fenoler (hvor beskyttelsesgruppen for eksempel kan være metyl, allyl, benzyl eller *tert*-butyl) under standard betingelser.

Forbindelser med formel I kan isoleres fra deres reaksjonsblandinger ved anvendelse av konvensjonelle teknikker.

Foreliggende oppfinnelse omfatter et farmasøytisk akseptabelt derivat av forbindelsen med formel Ia



5

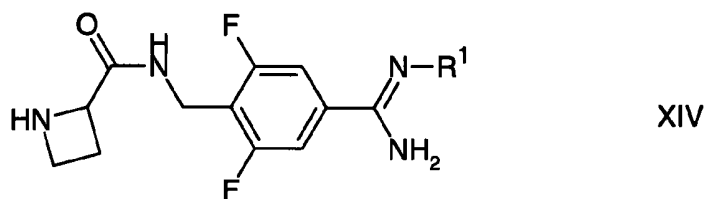
hvor  $R^1$  representerer  $OR^2$ ;

$R^2$  representerer H det vil si forbindelsen ifølge oppfinnelsen.

Forbindelser med formel Ia kan fremstilles ved én eller flere av de følgende metoder:

10

(a) omsetning av en tilsvarende forbindelse med formel II som ovenfor definert med en forbindelse med formel XIV,



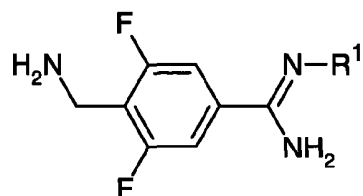
15

hvor  $R^1$  er som ovenfor definert, for eksempel under lignende betingelser som de beskrevet ovenfor for syntese av forbindelser med formel I;

(b) omsetning av en tilsvarende forbindelse med formel IV som ovenfor definert med en forbindelse med formel XV,

20

14

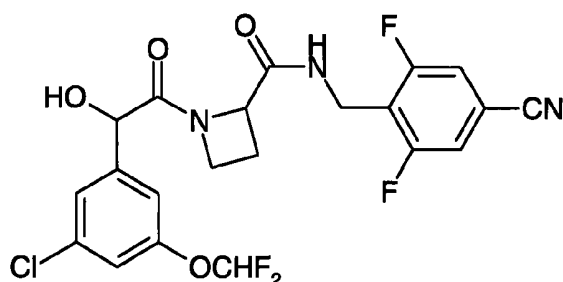


XV

hvor  $R^1$  er som ovenfor definert, for eksempel under lignende betingelser som de beskrevet ovenfor for syntese av forbindelser med formel I;

5

(c) for forbindelser med formel Ia hvor  $R^1$  representerer OH, omsetning av en tilsvarende forbindelse med formel XVI,



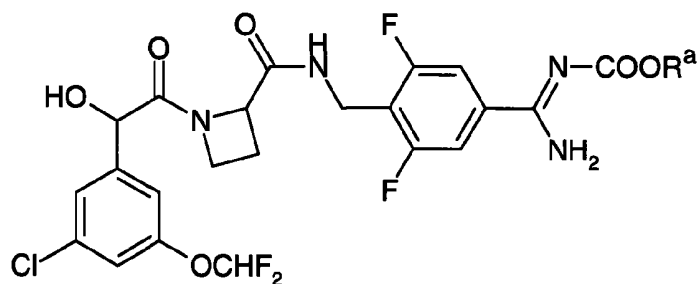
XVI

10

med hydroksylamin, for eksempel under betingelser kjent for fagfolk på området;

(d) for forbindelser med formel Ia hvor  $R^1$  representerer  $OR^2$ , omsetning av et beskyttet derivat av en tilsvarende forbindelse med formel I som er for eksempel en forbindelse med formel XVII,

15



XVII

hvor  $R^a$  representerer for eksempel  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  eller benzyl eller en tautomer derav, med en forbindelse med formel XVIII,



XVIII

5

hvor  $R^2$  er som ovenfor definert eller et syreaddisjonssalt derav, for eksempel ved mellom rom- og tilbakeløpstemperatur i nærvær av et passende organisk løsningsmiddel (f.eks. THF,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , DMF eller DMSO), fulgt av fjerning av  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ -gruppen under betingelser kjent for fagfolk på området (f.eks. ved omsetning med QF eller TFA (f.eks. som beskrevet nedenfor));

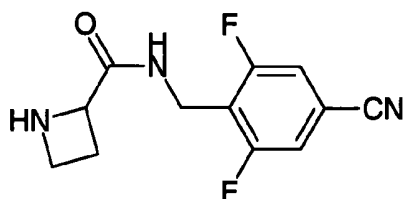
10

(e) for forbindelser med formel Ia hvor  $R^1$  representerer OH, omsetning av en forbindelse med formel XVII, som ovenfor definert, hvor  $R^a$  representerer benzyl, med hydroksylamin eller et syreaddisjonssalt derav, for eksempel under betingelser som vil være velkjent for fagfolk på området;

15

Forbindelser med formel XVI kan fremstilles ved omsetning av en tilsvarende forbindelse med formel II, som ovenfor definert, med en forbindelse med formel XX,

20



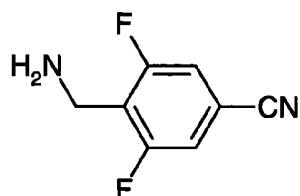
XX

25

for eksempel under lignende betingelser som de beskrevet ovenfor for syntese av forbindelser med formel I.

Forbindelser med formlene XVI kan alternativt fremstilles ved omsetning av en tilsvarende forbindelse med formel IV, som ovenfor definert, med en forbindelse med formel XXI,

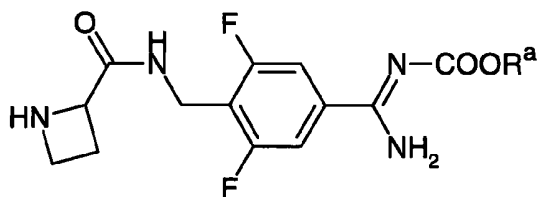




XXI

for eksempel under lignende betingelser som de beskrevet ovenfor for  
5 syntese av forbindelser med formel I.

Forbindelser med formel XVII kan fremstilles ved omsetning av en  
tilsvarende forbindelse med formel II, som ovenfor definert, med en  
forbindelse med formel XXII,



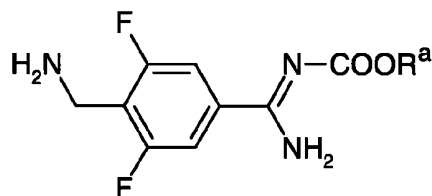
XXII

10

hvor  $R^a$  er som ovenfor definert, for eksempel under lignende betingelser  
som de beskrevet ovenfor for syntese av forbindelser med formel I.

15

Forbindelser med formlene XIV og XXII kan fremstilles ved  
omsetning av azetidin-2-karboksylyse med, henholdsvis en forbindelse  
med formel XV som ovenfor definert eller en forbindelse med formel XXIII,



XXIII

20

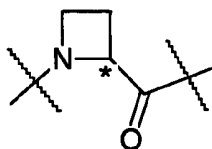
hvor  $R^a$  er som ovenfor definert, for eksempel under lignende betingelser  
som de beskrevet ovenfor for syntese av forbindelser med formel I.

Forbindelser med formel XV, XVIII, XX, XXI og XXIII er enten kommersielt tilgjengelige, er kjent i litteraturen eller kan oppnås enten analogt med prosessene beskrevet her eller ved konvensjonelle syntese-prosedyrer, i henhold til standard teknikker, fra lett tilgjengelige  
5 utgangsmaterialer ved anvendelse av passende reagenser og reaksjonsbetingelser. For eksempel kan forbindelser med formel XX fremstilles ved omsetning av en tilsvarende forbindelse med formel XXI med azetidin-2-karbonsyre, for eksempel under lignende betingelser som de beskrevet ovenfor.

10 Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kan oppvise tautomerisme. Alle tautomere former og blandinger derav omfattes av omfanget av foreliggende oppfinnelse. Spesielle tautomere former som kan nevnes omfatter de forbundet med stillingen av dobbeltbindingen i amidin-funksjonaliteten og stillingen av OH.

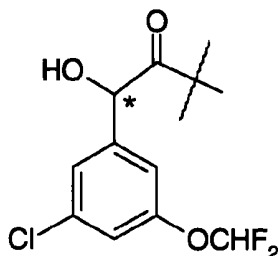
15 Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse kan også inneholde to eller flere asymmetriske karbonatomer og kan derfor oppvise optisk og/eller diastereoisomerisme. Diastereoisomerer kan separeres ved anvendelse av konvensjonelle teknikker, f.eks. kromatografi. De forskjellige stereoisomerer kan isoleres ved separering av en racemisk  
20 eller annen blanding av forbindelsene ved anvendelse av konvensjonelle, f.eks. HPLC-teknikker. Alternativt kan de ønskede optiske isomerer fremstilles ved omsetning av de passende optisk aktive utgangsmaterialer under betingelser som ikke vil forårsake racemisering eller epimerisering eller ved derivatisering, for eksempel med en homochiral syre fulgt av  
25 separering av diastereomere derivater ved konvensjonelle metoder (f.eks. HPLC, kromatografi over silika). Alle stereoisomerer omfattes av omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse hvor fragmentet



er i *S*-konfigurasjon er foretrukket.

Foretrukne forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter også de hvor det strukturelle fragment



5

er i *R*-konfigurasjon.

De bølgede linjer på bindingene i de to fragmenter ovenfor angir bindings-stillinger av fragmentene.

10 Således omfatter foretrukne forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse:

$\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-}(R)\text{CH}(\text{OH})\text{C}(\text{O})\text{-}(S)\text{Aze-Pab}(2,6\text{-diF})(\text{OH})$ .

15 Det vil forstås av fagfolk på området at i prosessene beskrevet ovenfor og nedenfor kan de funksjonelle gruppene i mellomproduktforbindelser trenge å være beskyttet med beskyttelsesgrupper.

Funksjonelle grupper som det er ønskelig å beskytte omfatter hydroksy, amino og karboksylsyre. Egnede beskyttelsesgrupper for hydroksy omfatter eventuelt substituerte og/eller umettede alkylgrupper (f.eks. metyl, allyl, benzyl eller *tert*-butyl), trialkylsilyl- eller diarylalkylsilyl-grupper (f.eks. *t*-butyldimetylsilyl, *t*-butyldifenylsilyl eller trimetylsilyl) og  
20 tetrahydropyranyl. Egnede beskyttelsesgrupper for karboksylsyre omfatter  $\text{C}_{1-6}$  alkyl eller benzylestere. Egnede beskyttelsesgrupper for amino og amidino omfatter *t*-butyloksykarbonyl, benzyloksykarbonyl eller 2-trimetylsilyletoksykarbonyl (Teoc). Amidino-nitrogener kan også være

beskyttet med hydrokso- eller alkoksoygrupper og kan være enten mono- eller dibeskyttet.

Beskyttelse og avbeskyttelse av funksjonelle grupper kan skje før eller etter kobling eller før eller etter hvilken som helst annen reaksjon i  
5 ovennevnte skjemaer.

Beskyttelsesgrupper kan fjernes i henhold til teknikker som er velkjent for fagfolk på området og som beskrevet nedenfor.

Fagfolk på området vil forstå at for å oppnå forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse på en alternativ og, i noen tilfeller, mer  
10 hensiktsmessig, måte, kan de individuelle prosessstrinn nevnt ovenfor utføres i en forskjellig rekkefølge og/eller de individuelle reaksjoner kan utføres ved et forskjellig trinn i den totale rute (dvs. substituenten kan tilsettes til og/eller kjemiske transformasjoner utføres på, forskjellige mellomprodukter til de nevnt ovenfor i sammenheng med en spesiell  
15 reaksjon). Dette kan oppheve eller nødvendiggjøre behov for beskyttelsesgrupper.

Typen kjemi involvert vil diktere behovet og typen av beskyttelsesgrupper så vel som sekvensen for utføring av syntesen.

Anvendelse av beskyttelsesgrupper er fullstendig beskrevet i  
20 "Protective Groups in Organic Chemistry", ed. J W F McOmie, Plenum Press (1973) og "Protective Groups in Organic Synthesis", 3. ed., T.W. Greene & P.G.M. Wutz, Wiley-Interscience (1999).

Beskyttede derivater av forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse kan omdannes kjemisk til forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse ved  
25 anvendelse av standard avbeskyttelsesteknikker (f.eks. hydrogenering). Fagfolk vil også forstå at visse forbindelser med formel Ia også kan refereres til som "beskyttede derivater" av forbindelser med formel I.

### **Medisinsk og farmasøytisk anvendelse**

30 Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha farmakologisk aktivitet som sådanne. Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse som kan ha slik aktivitet omfatter forbindelsen ifølge oppfinnelsen.

I henhold til et ytterligere aspekt ved foreliggende oppfinnelse er således tilveiebragt forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse for anvendelse som farmasøytiske middel.

Spesielt er forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kraftige  
5 inhibitor av trombin enten som.

Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse er således forventet å være anvendelige ved de lidelser hvor hemning av trombin er nødvendig og/eller lidelser hvor antikoagulerende terapi er indikert, omfattende de følgende:

10 Behandling og/eller forebygging av trombose og hyperkoagulering i blod og/eller vev fra dyr omfattende mennesker. Det er kjent at hyperkoagulerbarhet kan føre til trombo-emboliske sykdommer. Lidelser forbundet med hyperkoagulerbarhet og trombo-emboliske sykdommer som kan nevnes omfatter arvet eller ervervet aktivert protein C-resistens, så  
15 som faktor V-mutasjon (faktor V Leiden) og arvede eller ervervede mangler i antitrombin III, protein C, protein S, heparin kofaktor II. Andre lidelser kjent å være forbundet med hyperkoagulerbarhet og trombo-embolisk sykdom omfatter sirkulerende antifosfolipid-antistoffer (Lupus anticoagulant), homocysteinemi, heparinfremkalt trombocytopeni og  
20 defekter i fibrinolyse, så vel som koagulerings-syndromer (f.eks. disseminert intravaskulær koagulering (DIC)) og vaskulær skade generelt (f.eks. på grunn av kirurgi).

Behandling av lidelser hvor det er et uønsket overskudd av trombin uten tegn på hyperkoagulering, for eksempel ved neurodegenerative  
25 sykdommer så som Alzheimer's sykdom.

Spesielle sykdomstilstander som kan nevnes omfatter terapeutisk og/eller profylaktisk behandling av venøs trombose (f.eks. DVT) og pulmonalt emboli, arteriell trombose (f.eks. ved myokardialt infarkt, ustabil angina, trombose-basert slag og perifer arteriell trombose) og systemisk  
30 emboli vanligvis fra atrium under atriell fibrillering (f.eks. ikke-valvulær atriell fibrillering) eller fra det venstre hjertekammer etter transmuralt myokardialt infarkt eller forårsaket av kongestiv hjertesvikt; forebygging av

re-okklusjon (dvs. trombose) etter trombolyse, perkutan trans-luminal angioplasti (PTA) og koronar bypass operasjoner; forhindring av re-trombose etter mikrokirurgi og vaskulær kirurgi generelt.

Ytterligere indikasjoner omfatter terapeutisk og/eller profylaktisk  
5 behandling av disseminert intravaskulær koagulering forårsaket av bakterier, multippelt traume, forgiftning eller hvilken som helst annen mekanisme; antikoagulant-behandling når blod kommer i kontakt med fremmede overflater i kroppen så som vaskulære implantater, vaskulære stent, vaskulære katetere, mekaniske og biologiske protetiske ventiler eller  
10 hvilken som helst annen medisinsk anordning; og antikoagulant-behandling når blod kommer i kontakt med medisinske anordninger utenfor kroppen så som i løpet av kardiovaskulær kirurgi ved anvendelse av en hjerte-lunge-maskin eller ved hemodialyse; terapeutisk og/eller profylaktisk behandling av idiopatisk og voksen åndenødssyndrom,  
15 pulmonal fibrose etter behandling med stråling eller kjemoterapi, septisk sjokk, septikemi, inflammatoriske responser, som omfatter, men er ikke begrenset til, ødem, akutt eller kronisk aterosklerose så som koronar arteriell sykdom og dannelse av aterosklerotisk plaque, cerebral arteriell sykdom, cerebralt infarkt, cerebral trombose, cerebralt emboli, perifer  
20 arteriell sykdom, ischemi, angina (omfattende ustabil angina), reperfusjonsskade, restenose etter perkutan trans-luminal angioplasti (PTA) og koronar arterie bypass kirurgi.

Forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse som hemmer trypsin og/eller trombin kan også være anvendelige ved behandling av pankreatitt.

25 Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse er således indikert både for terapeutisk og/eller profylaktisk behandling av disse lidelser.

I henhold til et ytterligere aspekt ved foreliggende oppfinnelse, tilveiebringes anvendelse av forbindelsen ifølge oppfinnelsen for fremstilling av medikament for behandling av en lidelse hvor hemning av  
30 trombin er nødvendig, hvilken metode omfatter administrering av en terapeutisk effektiv.

Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse vil normalt administreres oralt, intravenøst, subkutant, bukkalt, rektalt, dermalt, nasalt, trakealt, bronkialt, ved hvilken som helst annen parenteral rute eller via inhalering, i form av farmasøytiske preparater omfattende forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse i en farmasøytisk akseptabel doseform.

Avhengig av lidelsen og pasienten som skal behandles og administreringsveien, kan preparatene kan administreres i varierende doser.

Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kan også være kombinert og/eller sam-administrert med hvilket som helst antitrombotisk middel (midler) med en forskjellig virkningsmekanisme, så som én eller flere av de følgende: anti-blodplate-midler acetylsalicylsyre, ticlopidin og clopidogrel; tromboksan-reseptor og/eller syntetase-inhibitorer; fibrinogen reseptorantagonister; prostacyklin-mimetika; fosfodiesterase-inhibitorer; ADP-reseptor- ( $P_2T$ ) antagonist; og inhibitorer av karboksypeptidase U (CPU).

Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kan videre kombineres og/eller sam-administreres med trombolytika så som én eller flere av vev-plasminogen-aktivator (naturlig, rekombinant eller modifisert), streptokinase, urokinase, prourokinase, anisoylert plasminogen-streptokinase-aktivator-kompleks (APSAC), dyr-spyttkjertel-plasminogen-aktivatorer og lignende, ved behandling av trombotiske sykdommer, spesielt myokardialt infarkt.

I henhold til et ytterligere aspekt ved foreliggende oppfinnelse tilveiebringes et farmasøytisk preparat omfattende en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, i blanding med et farmasøytisk akseptabelt adjuvans, fortynningsmiddel eller bærer.

Egnede daglige doser av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse for terapeutisk behandling av mennesker er ca. 0,001-100 mg/kg kroppsvekt ved peroral administrering og 0,001-50 mg/kg kroppsvekt ved parenteral administrering, med utelukkelse av vekten til et eventuelt syre-motion.

For å unngå tvil, som anvendt her omfatter betegnelsen “behandling” terapeutisk og/eller profylaktisk behandling.

Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse har fordelen at den kan være mer effektive, være mindre toksiske, være lenger-virkende, ha et bredere aktivitetsområde, være kraftigere, gi færre bivirkninger, bli lettere absorbert og/eller ha en bedre farmakokinetisk profil (f.eks. høyere oral biotilgjengelighet og/eller lavere utskilling) og/eller ha andre nyttige farmakologiske, fysiske eller kjemiske, egenskaper fremfor forbindelser kjent fra tidligere teknikk. Forbindelsen ifølge foreliggende oppfinnelse kan ha den ytterligere fordel at de kan administreres mindre ofte enn forbindelser kjent fra tidligere teknikk.

### **Biologiske tester**

De følgende testprosedyrer kan anvendes.

#### 15 Test A

##### Bestemmelse av trombin-størkningstid (TT)

Inhibitor-løsningen (25 µl) blir inkubert med plasma (25 µl) i tre minutter. Human trombin (T 6769; Sigma Chem. Co eller Hematologic Technologies) i bufferløsning, pH 7,4 (25 µl, 4,0 NIH enheter/ml), blir deretter tilsatt og størkningstiden målt i en automatisk anordning (KC 10; Amelung).

Trombin-størkningstid (TT) er uttrykt som absolutte verdier (sekunder) så vel som forholdet av TT uten inhibitor (TT<sub>0</sub>) til TT med inhibitor (TT<sub>i</sub>). Det sistnevnte forhold (område 1-0) blir plottet mot konsentrasjonen av inhibitor (log-transformert) og tilpasset til sigmoidale dose-respons-kurver i henhold til ligningen

$$y = a/[1+(x/IC_{50})^s]$$

hvor: a = maksimum-område, dvs. 1; s = helling av dose-respons-kurven; og IC<sub>50</sub> = konsentrasjonen av inhibitor som doubler størkningstiden.

30 Beregningene blir prosessert på en PC ved anvendelse av programvaren program GraFit Versjon 3, idet ligningen settes lik: Start ved 0, definer end



= 1 (Erithacus Software, Robin Leatherbarrow, Imperial College of Science, London, UK).

### Test B

#### 5 Bestemmelse av trombin-hemning med et kromogen, robotforsøk

Trombin-inhibitor-potens blir målt ved en kromogen-substrat-metode, i en Plato 3300 robot mikroplate prosessor (Rosys AG, CH-8634 Hombrechtikon, Sveits), ved anvendelse av 96-brønn, halvt volum mikrotiter-plater (Costar, Cambridge, MA, USA; Kat nr. 3690).

- 10 Lagerløsninger av test-substans i DMSO (72  $\mu$ l), 0,1 - 1 mmol/l, blir fortynnet serielt 1:3 (24 + 48  $\mu$ l) med DMSO for å oppnå ti forskjellige konsentrasjoner, som blir analysert som prøver i forsøket. 2  $\mu$ l av testprøve blir fortynnet med 124  $\mu$ l forsøksbuffer, 12  $\mu$ l kromogen-substrat-løsning (S-2366, Chromogenix, Mölndal, Sverige) i forsøksbuffer og til slutt
- 15 12  $\mu$ l av  $\alpha$ -trombin-løsning (Human  $\alpha$ -trombin, Sigma Chemical Co. eller Hematologic Technologies) i forsøksbuffer, blir tilsatt og prøvene blandet. De endelige forsøkskonsentrasjoner er: test-substans 0,00068 - 13,3  $\mu$ mol/l, S-2366 0,30 mmol/l,  $\alpha$ -trombin 0,020 NIHU/ml. Den lineære absorbans-økning i løpet av 40 minutters inkubering ved 37°C blir
- 20 anvendt for beregning av prosentdel hemning for testprøvene, sammenlignet med blanke uten inhibitor. IC<sub>50</sub>-robot-verdi, svarende til inhibitorkonsentrasjonen som forårsaker 50% hemning av trombin-aktivitet, blir beregnet fra en log konsentrasjon vs. % hemningskurve.

#### 25 Test C

#### Bestemmelse av hemningskonstant K<sub>i</sub> for human trombin

- K<sub>i</sub>-bestemmelser blir utført ved anvendelse av en kromogen-substrat-metode, utført ved 37°C på en Cobas Bio sentrifugalanalysator (Roche, Basel, Sveits). Resterende enzym-aktivitet etter inkubering av
- 30 human  $\alpha$ -trombin med forskjellige konsentrasjoner av testforbindelse blir bestemt ved tre forskjellige substratkonsentrasjoner og blir målt som forandring i optisk absorbans ved 405 nm.

Testforbindelse-løsninger (100  $\mu$ l; normalt i buffer eller saltvann inneholdende BSA 10 g/l) blir blandet med 200  $\mu$ l av human  $\alpha$ -trombin (Sigma Chemical Co) i forsøksbuffer (0,05 mol/l Tris-HCl pH 7,4, ionestyrke 0,15 regulert med NaCl) inneholdende BSA (10 g/l) og analysert som prøver i Cobas Bio. En 60  $\mu$ l prøve, sammen med 20  $\mu$ l vann, blir satt til 320  $\mu$ l av substratet S-2238 (Chromogenix AB, Mölndal, Sverige) i forsøksbuffer og absorbansforandringen ( $\Delta A/\text{min}$ ) blir overvåket. De endelige konsentrasjoner av S-2238 er 16, 24 og 50  $\mu\text{mol/l}$  og av trombin 0,125 NIH U/ml.

Likevekts-reaksjonshastighet blir anvendt for å konstruere Dixon plott, dvs. diagrammer av inhibitor-konsentrasjon vs.  $1/(\Delta A/\text{min})$ . For reversible, kompetitive inhibitorer, danner datapunktene for de forskjellige substratkonsentrasjoner typisk rette linjer som avskjæres ved  $x = -K_i$ .

#### 15 Test D

##### Bestemmelse av aktivert partiell tromboplastin-tid (APTT)

APTT blir bestemt i samlet normalt humant citrert plasma med reagenset PTT Automated 5 fremstilt av Stago. Inhibitorene blir satt til plasmaet (10  $\mu$ l inhibitor-løsning til 90  $\mu$ l plasma) og inkubert med APTT-reagens i 3 minutter fulgt av tilsetning av 100  $\mu$ l av kalsiumklorid-løsning (0,025 M) og APTT blir bestemt ved anvendelse av koagulerings-analysator KC10 (Amelung) i henhold til instruksjoner fra reagensprodusenten.

Størkningstiden er uttrykt som absolutt-verdier (sekunder) så vel som forholdet av APTT uten inhibitor ( $\text{APTT}_0$ ) til APTT med inhibitor ( $\text{APTT}_i$ ). Det sistnevnte forhold (område 1-0) blir plottet mot konsentrasjonen av inhibitor (log transformert) og tilpasset til sigmoidale dose-respons-kurver i henhold til ligningen

$$y = a/[1+(x/IC_{50})^s]$$

30 hvor: a = maksimum-område, dvs. 1; s = helning av dose-respons-kurven; og  $IC_{50}$  = konsentrasjonen av inhibitor som fordobler størkningstiden. Beregningene blir prosessert på en PC ved anvendelse av programvaren

program GraFit Versjon 3, ved å sette ligningen lik: Start ved 0, definer end = 1 (Erithacus Software, Robin Leatherbarrow, Imperial College of Science, London, UK).  $IC_{50}$ APTT er definert som den konsentrasjon av inhibitor i humant plasma som dobler den aktiverte partielle tromboplastin-  
5 tid.

### Test E

#### Bestemmelse av trombin-tid *ex vivo*

Hemning av trombin etter oral eller parenteral administrering av  
10 forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, oppløst i etanol:SolutoIK:vann (5:5:90), er undersøkt i bevisste rotter som, én eller to dager før forsøket, blir utstyrt med et kateter for blodprøvetagning fra karotid-arterien. På forsøksdagen blir blodprøver tatt på fastsatte tider etter administreringen av forbindelsen i plastrør inneholdende 1 del  
15 natriumcitrat løsning (0,13 mol pr. l) og 9 deler blod. Rørene blir sentrifugert for å oppnå blodplatefattig plasma.

50  $\mu$ l av plasmaprøver blir utfelt med 100  $\mu$ l kald acetonitril. Prøvene blir sentrifugert i 10 minutter ved 4000 rpm. 75  $\mu$ l av supernatanten blir fortynnet med 75  $\mu$ l av 0,2% maursyre. 10  $\mu$ l volumer  
20 av de resulterende løsninger blir analysert ved LC-MS/MS og konsentrasjonene av trombin-inhibitor blir bestemt ved anvendelse av standard kurver.

### Test F

#### Bestemmelse av plasma-utskilling i rotte

Plasma-utskilling blir beregnet i Sprague Dawley hannrotter. Forbindelsen blir oppløst i vann og administrert som en subkutan bolus-injeksjon i en dose på 4  $\mu$ mol/kg. Blodprøver blir oppsamlet med korte intervaller opptil 5 timer etter medikament-administrering. Blodprøver blir  
30 sentrifugert og plasma blir separert fra blodcellene og overført til medisinglass inneholdende citrat (10% endelig konsentrasjon). 50  $\mu$ l av plasmaprøver blir utfelt med 100  $\mu$ l kald acetonitril. Prøvene blir

sentrifugert i 10 minutter ved 4000 rpm. 75 µl av supernatanten blir fortynnet med 75 µl av 0,2% maursyre. 10 µl volumer av de resulterende løsninger blir analysert ved LC-MS/MS og konsentrasjonene av trombin-inhibitor blir bestemt ved anvendelse av standard-kurver. Området under plasmakonsentrasjon-tid profilen blir beregnet ved anvendelse av log/lineær trapesregel og ekstrapolering til uendelig tid. Plasma-utskilling (CL) av forbindelsen blir deretter bestemt som

$$CL = \text{Dose}/AUC$$

Verdiene er angitt i ml/min/kg.

10

### Test G

#### Bestemmelse av *in vitro* stabilitet

Lever-mikrosomer blir fremstilt fra Sprague-Dawley rotter og humane leverprøver i henhold til intern SOP. Forbindelsene blir inkubert ved 37°C med en total mikrosom-proteinkonsentrasjon på 3 mg/ml i en 0,05 mol/l TRIS buffer ved pH 7,4, i nærvær av kofaktorene NADH (2,5 mmol/l) og NADPH (0,8 mmol/l). Den innledende konsentrasjon av forbindelsen er 5 eller 10 µmol/l. Prøver blir tatt for analyse opptil 60 minutter etter starten av inkuberingen. Den enzymatiske aktivitet i den oppsamlede prøve blir umiddelbart stanset ved tilsetning av 20% myristinsyre ved et volum svarende til 3,3% av det totale prøvevolum. Konsentrasjonen av forbindelse igjen (ENDELIG KONS.) i 60 min. prøven blir bestemt ved hjelp av LCMS ved anvendelse av en prøve oppsamlet ved tid null som referanse (START KONS.). % av nedbrutt trombin-inhibitor blir beregnet som:

25

$$100\% \times \frac{[\text{START KONS}] - [\text{ENDELIG KONS}]}{[\text{START KONS}]}$$

### Test H

#### Arteriell trombose modell

Karskade blir fremkalt ved påføring av jern(III)klorid (FeCl<sub>3</sub>) topisk til karotid-arterien. Rotter blir anestetisert med en intraperitoneal injeksjon

30

av natrium-pentobarbital (80 mg/kg; Apoteksbolaget; Umeå, Sverige), fulgt av kontinuerlig infusjon (12 mg/kg/t) gjennom hele forsøket. Rottens kroppstemperatur blir holdt ved 38°C gjennom hele forsøket ved ytre oppvarming. Forsøket starter med en 5 minutters kontrollperiode. Fem minutter senere blir human <sup>125</sup>I-fibrinogen (80 kBq; IM53; Amersham International, Buckinghamshire, UK) gitt intravenøst og blir anvendt som en markør for den påfølgende innføring av fibrin(ogen) i tromben. Den proksimale enden av karotidarterie-segmentet blir plassert i et plastrør (6 mm; Silastic®; Dow Corning, MI, USA) åpnet lengdeveis, inneholdende FeCl<sub>3</sub>-bløtet (2 µl; 55% vekt/vekt; Merck, Darmstadt, Tyskland) filterpapir (diameter 3 mm; 1F; Munktell, Grycksbo, Sverige). Venstre karotidarterie blir eksponert for FeCl<sub>3</sub> i 10 minutter og blir deretter fjernet fra plastrøret og bløtet i saltvann. 50 minutter senere blir karotidarterien fjernet og skyllet i saltvann. Referanse-blodprøver blir også tatt for bestemmelse av blod <sup>125</sup>I-aktivitet, 10 minutter etter injeksjonen av <sup>125</sup>I-fibrinogen og ved slutten av forsøket. <sup>125</sup>I-aktiviteten i referanse-blodprøver og karsegmentet blir målt i en gamma-teller (1282 Compugamma; LKB Wallac Oy, Turku, Finland) på samme dag som forsøket blir utført. Trombe-størrelsen blir bestemt som mengden av <sup>125</sup>I-aktivitet innført i karsegmentet i forhold til <sup>125</sup>I-aktivitet i blodet (cpm/mg).

#### Generelle eksperimentelle detaljer

TLC ble utført på silikagel. Chiral HPLC-analyse ble utført ved anvendelse av en 46 mm X 250 mm Chiralcel OD kolonne med en 5 cm beskyttelseskolonne. Kolonne-temperaturen ble holdt ved 35°C. En strømningshastighet på 1,0 ml/min ble anvendt. En Gilson 115 UV detektor ved 228 nm ble anvendt. Den mobile fasen besto av heksaner, etanol og trifluoroeddiksyre og det passende forhold er angitt for hver forbindelse. Typisk ble produktet oppløst i en minimal mengde av etanol og dette ble fortynnet med den mobile fasen.

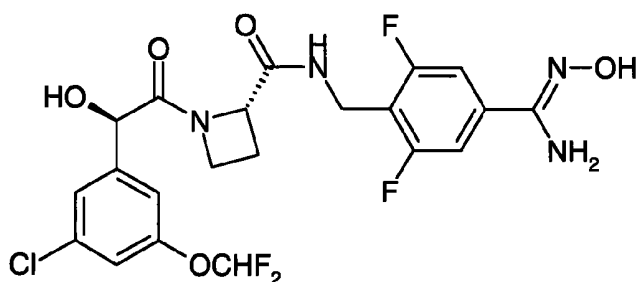
LC-MS/MS ble utført ved anvendelse av et HP-1100 instrument utstyrt med en CTC-PAL injektor og en 5 µm, 4x100 mm ThermoQuest,

Hypersil BDS-C18 kolonne. En API-3000 (Sciex) MS detektor ble anvendt. Strømningshastigheten var 1,2 ml/min og den mobile fasen (gradient) besto av 10-90% acetonitril med 90-10% av 4 mM vandig ammoniumacetat, begge inneholdende 0,2% maursyre.

- 5  $^1\text{H}$  NMR-spektra ble registrert ved anvendelse av tetrametylsilan som den indre standard.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektra ble registrert ved anvendelse av de angitte deutererte løsningsmidler som den indre standard.

Eksempel

- 10 Ph(3-Cl)(5-OCHF<sub>2</sub>)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH)



(i) Boc-(S)Aze-NHCH<sub>2</sub>-Ph(2,6-diF, 4-CN)

- 15 Boc-(S)Aze-OH (1,14 g, 5,6 mmol) ble oppløst i 45 ml DMF. 4-aminometyl-2,6-difluorbenzonitril (1,00 g, 5,95 mol, se Eksempel 1(xiv) ovenfor), PyBOP (3,10 g, 5,95 mmol) og DIPEA (3,95 ml, 22,7 mmol) ble tilsatt og løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer. Løsningsmidlet ble avdampet og residuet ble fordelt mellom H<sub>2</sub>O og EtOAc (75 ml hver).
- 20 Den vandige fasen ble ekstrahert med 2 x 50 ml EtOAc og den samlede organiske fase ble vasket med saltvann og tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. "Flash" kromatografi (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/heptan (3/1)) ga undertittelforbindelsen (1,52 g, 77%) som en olje som krystalliserte i kjøleskap.
- 25  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7,19 (m, 2H), 4,65-4,5 (m, 3H), 3,86 (m, 1H), 3,73 (m, 1H), 2,45-2,3 (m, 2H), 1,39 (s, 9H)

(ii) H-(S)Aze-NHCH<sub>2</sub>-Ph(2,6-diF, 4-CN) x HCl

Boc-(S)Aze-NHCH<sub>2</sub>-Ph(2,6-diF, 4-CN) (0,707 g, 2,01 mmol, se trinn (i) ovenfor) ble oppløst i 60 ml EtOAc mettet med HCl(g). Etter omrøring ved romtemperatur i 15 minutter ble løsningsmidlet avdampet. Residuet ble oppløst i CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1/1) og ble frysetørket, hvilket ga undertittelforbindelsen (0,567 g, 98%) som et gråhvitt amorft pulver.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD): δ 7,49 (m, 2H), 4,99 (m, 1H), 4,58 (m, 2H), 4,12 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 2,80 (m, 1H), 2,47 (m, 1H)  
MS (m/z) 252,0 (M + 1)<sup>+</sup>

(iii) Ph(3-Cl)(5-OCHF<sub>2</sub>)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-NHCH<sub>2</sub>-Ph(2,6-diF, 4-CN)

Ph(3-Cl)(5-OCHF<sub>2</sub>)-(R)CH(OH)C(O)OH (0,40 g, 1,42 mmol, se Eksempel 1(viii) ovenfor) ble oppløst i 10 ml DMF og H-(S)Aze-NHCH<sub>2</sub>-Ph(2,6-diF, 4-CN) x HCl (0,43 g, 1,50 mmol, se trinn (ii) ovenfor) og PyBOP (0,779 g, 1,50 mmol) ble tilsatt, fulgt av DIPEA (1,0 ml, 5,7 mmol). Etter omrøring ved romtemperatur i 2 timer ble løsningsmidlet avdampet. Residuet ble fordelt mellom H<sub>2</sub>O (200 ml) og EtOAc (75 ml). Den vandige fasen ble ekstrahert med 2 x 75 ml EtOAc og den samlede organiske fase ble vasket med saltvann og tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. "Flash" kromatografi (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/heptan (4/1)) ga undertittelforbindelsen (0,56 g, 81%) som en olje.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz; CD<sub>3</sub>OD) rotamerer: δ 7,43 (m, 2H), 7,31 (m, 1H, hoved-rotamer), 7,26 (m, 1H, mindre rotamer), 7,2-7,1 (m, 2H), 6,90 (t, 1H, hoved-rotamer), 6,86 (t, 1H, mindre rotamer), 5,14 (s, 1H, hoved-rotamer), 5,11 (m, 1H, mindre rotamer), 5,04 (s, 1H, mindre rotamer), 4,71 (m, 1H, hoved-rotamer), 4,6-4,45 (m, 2H), 4,30 (m, 1H, hoved-rotamer), 4,2-3,9 (m, 1H; og 1H, mindre rotamer), 2,62 (m, 1H, mindre rotamer), 2,48 (m, 1H, hoved-rotamer), 2,21 (m, 1H, hoved-rotamer), 2,09 (m, 1H, mindre rotamer)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): (karbonylkarbonatomer)  $\delta$  171,9, 171,8  
 MS (m/z) 484,0, 485,9 ( $\text{M} - 1$ )<sup>-</sup>, 486,0, 487,9 ( $\text{M} + 1$ )<sup>+</sup>

(iv) Ph(3-Cl)(5-OCHF<sub>2</sub>)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH)

5            Ph(3-Cl)(5-OCHF<sub>2</sub>)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-NHCH<sub>2</sub>-Ph(2,6-diF, 4-  
 CN) (0,555 g, 1,14 mmol, fra trinn (iii) ovenfor) ble oppløst i 10 ml EtOH  
 (95%). Til denne løsningen ble satt hydroksylamin-hydroklorid (0,238 g,  
 3,42 mmol) og Et<sub>3</sub>N (0,48 ml, 3,44 mmol). Etter omrøring ved  
 romtemperatur i 14 timer ble løsningsmidlet fjernet og residuet ble oppløst  
 10 i EtOAc. Den organiske fasen ble vasket med saltvann og H<sub>2</sub>O og ble  
 tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Råproduktet ble rensset ved preparativ RPLC med  
 CH<sub>3</sub>CN:0,1 M NH<sub>4</sub>OAc som elueringsmiddel, hvilket ga tittelforbindelsen  
 som et amorft pulver (0,429 g, 72%) etter frysetørking.

15             $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) rotamerer:  $\delta$  7,35-7,1 (m, 5H), 6,90 (t, 1H,  
 hoved-rotamer), 6,85 (t, 1H, mindre rotamer), 5,15 (s, 1H, hoved-rotamer),  
 5,12 (m, 1H, mindre rotamer), 5,08 (s, 1H, mindre rotamer), 4,72 (m, 1H,  
 hoved-rotamer), 4,6-4,4 (m, 2H), 4,30 (m, 1H, hoved-rotamer), 4,12 (m,  
 1H, hoved-rotamer), 4,04 (m, 1H, mindre rotamer), 3,94 (m, 1H, mindre  
 20 rotamer), 2,62 (m, 1H, mindre rotamer), 2,48 (m, 1H, hoved-rotamer), 2,22  
 (m, 1H, hoved-rotamer), 2,10 (m, 1H, mindre rotamer)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): (karbonyl- og amidin-karbonatomer,  
 rotamerer)  $\delta$  172,4, 171,9, 171,0, 152,3, 151,5  
 MS (m/z) 517,1, 519,0 ( $\text{M} - 1$ )<sup>-</sup>, 519,1, 521,0 ( $\text{M} + 1$ )<sup>+</sup>

25

#### Forkortelser

Ac	=	acetyl
APCI	=	atmosfærisk trykk kjemisk ionisasjon (i forbindelse med MS)
30 API	=	atmosfærisk trykk ionisasjon (i forbindelse med MS)
aq.	=	vandig
AUC	=	område under kurven



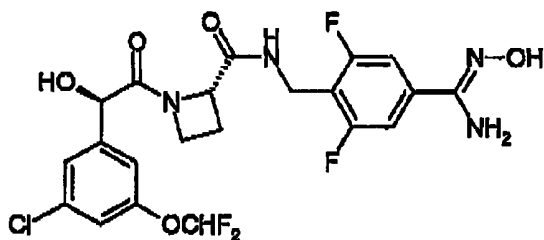
	Aze	=	azetidin-2-karboksylat
	AzeOH	=	azetidin-2-karboksytsyre
	Boc	=	<i>tert</i> -butyloksykarbonyl
	BSA	=	bovint serumalbumin
5	Cl	=	kjemisk ionisasjon (i forbindelse med MS)
	d	=	dag(er)
	DCC	=	dicykloheksyl-karbodiimid
	DIBAL-H	=	di-isobutylaluminiumhydrid
	DIPEA	=	diisopropyletylamin
10	DMAP	=	4-( <i>N,N</i> -dimetylamino)-pyridin
	DMF	=	dimetylformamid
	DMSO	=	dimetylsulfoksyd
	DVT	=	dypvene-trombose
	EDC	=	1-(3-dimetylamino-propyl)-3-etylkarbodiimid-hydroklorid
15	Et	=	etyl
	eter	=	dietyleter
	EtOAc	=	etylacetat
	EtOH	=	etanol
	Et <sub>2</sub> O	=	dietyleter
20	h	=	time(r)
	HATU	=	<i>O</i> -(azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetrametyluronium- heksafluorofosfat
	HBTU	=	[ <i>N,N,N,N</i> -tetrametyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium- heksafluorofosfat]
25	HCl	=	saltsyre, hydrogenkloridgass eller hydrokloridsalt (avhengig av sammenhengen)
	Heks	=	heksaner
	HOAc	=	eddiksyre eller eddiksyresalt
	HPLC	=	høyytelse væskekromatografi
30	LC	=	væskekromatografi
	Me	=	metyl
	MeOH	=	metanol

	min	=	minutt(er)
	MS	=	massespektroskopi
	MTBE	=	metyl- <i>tert</i> -butyleter
	NADH	=	nikotinamid-adenin-dinukleotid, redusert form
5	NADPH	=	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat, redusert form
	NIH	=	National Institute of Health (US)
	NIHU	=	National Institute of Health units
	NMR	=	kjernemagnetisk resonans
	OAc	=	acetat
10	Pab	=	<i>para</i> -amidinobenzylamino
	H-Pab	=	<i>para</i> -amidinobenzylamin
	Ph	=	fenyl
	PyBOP	=	(benzotriazol-1-yl)oxy)tripyrrolidinofosfonium- heksafluorofosfat
15	QF	=	tetrabutylammonium-fluorid
	RPLC	=	revers fase høyttelse væskekromatografi
	rt/RT	=	romtemperatur
	SOPs	=	standard operasjonsprosedyrer
	TBTU	=	[ <i>N,N,N,N</i> -tetrametyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium- 20 tetrafluorborat]
	TEA	=	trietylamin
	Teoc	=	2-(trimetylsilyl)etoksykarbonyl
	TEMPO	=	2,2,6,6-tetrametyl-1-piperidinyloksy fri rest
	TFA	=	trifluoreddiksyre
25	THF	=	tetrahydrofuran
	TLC	=	tynnskiktskromatografi
	UV	=	ultrafiolett

Prefiksene *n*, *s*, *i* og *t* har deres vanlige betydninger: normal, sekundær,  
30 iso og tertiær. Prefikset *c* betyr cyklo.

**Patentkrav**

1. Forbindelse Ph(3-Cl)(5-OCHF<sub>2</sub>)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH) med formel



5

eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav.

2. Farmasøytisk formulering, karakterisert ved at den utviser aktiviteten av trombininhibisjon inkludert forbindelsen som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, dannet sammen med en farmasøytisk akseptabel adjuvant, fortynningsmiddel eller bærer.

3. Forbindelse som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse som et farmasøytisk middel som har trombininhibisjonsaktivitet.

4. Forbindelse som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse ved behandling av en tilstand hvor inhibisjon av trombin er nødvendig.

5. Forbindelse som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse ved behandling av en tilstand hvor antikoagulerende terapi er indikert.

25

6. Forbindelse som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse ved behandling av trombose.

7. Forbindelse som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, for anvendelse som et antikoaguleringsmiddel.
- 5 8. Anvendelse av forbindelsen som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, som en aktiv ingrediens for fremstilling av et medikament for behandling av en tilstand hvor inhibisjon av trombin er nødvendig.
- 10 9. Anvendelse av forbindelsen som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, som en aktiv ingrediens for fremstilling av et medikament for behandling av en tilstand hvor antikoagulerende terapi er indikert.
- 15 10. Anvendelse ifølge krav 8 eller krav 9, hvor tilstanden er trombose.
11. Anvendelse ifølge krav 8 eller krav 9, hvor tilstanden er hyperkoagulabilitet i blod og/eller vev.
- 20 12. Anvendelse av forbindelsen som definert i krav 1, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav, som et aktivt ingrediens for fremstilling av et antikoaguleringsmiddel.