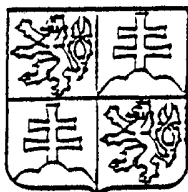


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 01064-92

(13) A3

(22) 08.04.92

(32) 09.04.91

(31) 91/4111394

(33) DE

(40) 14.10.92

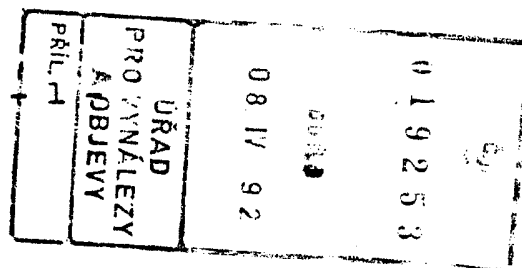
5(51) C 07 C 311/15,
257/18,
C 07 D 295/185,
211/32,
311/04,
405/12,
A 61 K 31/18,
31/195

(71) BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, Marburg, DE

(72) Stüber Werner dr., Lahntal, DE
Dickneite Gerhard dr., Marburg, DE

(54) Deriváty amidinofenylalaninu, způsob jejich výro-
by, jejich použití a prostředky obsahující tyto
deriváty

(57) Jsou popsány deriváty amidinofenylalaninu,
způsob jejich výroby, jejich použití, stejně
jako farmaceutické prostředky, které obsahují
tyto sloučeniny.



Deriváty amidinofenylalaninu, způsob jejich výroby, jejich použití a prostředky obsahující tyto deriváty

Oblast techniky

Vynález se týká derivátů amidinofenylalaninu, způsobu jejich výroby, jejich použití, stejně jako farmaceutických prostředků, které tyto sloučeniny obsahují.

Dosavadní stav techniky

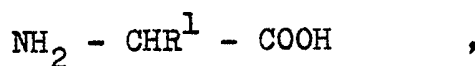
Jak známo, řada patofyziologických podmínek vede ke spotřebě antithrombinu III (AT III), nejdůležitějšího inhibitoru thrombinu v plasmě. Pokles AT III vede ke zvýšenému riziku trombozy, jak je zřejmé mimo jiné také z případů s vrozeným nedostatkem AT III. Pokles na hodnotu pod 75 % pravidelné úrovně způsobuje thromboembolické komplikace. Tyto komplikace se vyskytují často ve formě diseminovaného intravasálního srážení po operacích a při šokových stavech. V mnoha případech nastává přitom tvorba krevní sedliny, která ohrožuje život. K terapii a profylaxi trombotických onemocnění se až dosud používaly v lékařství antikoagulační prostředky s rozdílnými způsoby účinku. K akutnímu potlačování rizika trombozy se používají látky, jako je AT III, heparin a nově také hirudin. Dlouhodobá profylaxe se provádí deriváty kumarinu a deriváty indandionu. Uvedené antikoagulační prostředky jsou však z části zatíženy značnými nedostatky.

Heparin se například může na základě své poly-

sacharidové struktury aplikovat pouze parenterálně a jeho účinek je také odkázán na hladinu funkčně schopného anti-thrombinu III. Kumarin působí přímo proti biologické syntéze proteinu, jestliže srážecí faktory II, VII, IX a X, které jsou závislé na vitaminu K, již nejsou v dostatečném rozsahu k dispozici a tím se snižuje srážecí potenciál. Kromě toho se projevuje předčasné zpomalování účinku. Jako známé vedlejší účinky se uvádí hemorrhagická nekroza kůže, pocit nevolnosti a vypadávání vlasů.

Naproti tomu mají nízko molekulární inhibitory thrombinu tu výhodu, že působí přímo na thrombin nezávisle na kofaktorech, tím, že se přímo váží na aktivní centrum a tím se takřka utlumí enzym. Na základě své chemické struktury se mohou tyto látky podávat perorálně a tak se hned projeví jejich účinek.

Zvláštní známost dosahují deriváty aminokyselin na bázi argininu nebo na bázi amidinofenylalaninu. K první skupině se počítají sloučeniny, jako je D-fenylalanyl-L-prolylagrininaldehyd a monohydrát kyseliny (2R,4R)-4-methyl-1-[N2-(3-methyl-1,2,3,4 tetrahydro-8-chinolinsulfonyl-L-arginylyl)-2-piperidinkarboxylové ("MD 805"). MD 805 je soutěže schopný specifický inhibitor thrombinu, který je také terapeuticky použitelný. Další známý derivát amidinofenylalaninu je β -naftylsulfonyl-glycyl-R,S-4-amidinofenylalanylpiperidid (NAPAP). V evropském patentu č. 0 236 163 a evropském patentu č. 0 236 164 jsou popsány deriváty NAPAP. V těchto derivátech je glycin nahrazen amonokyselinou obecného vzorce



ve kterém

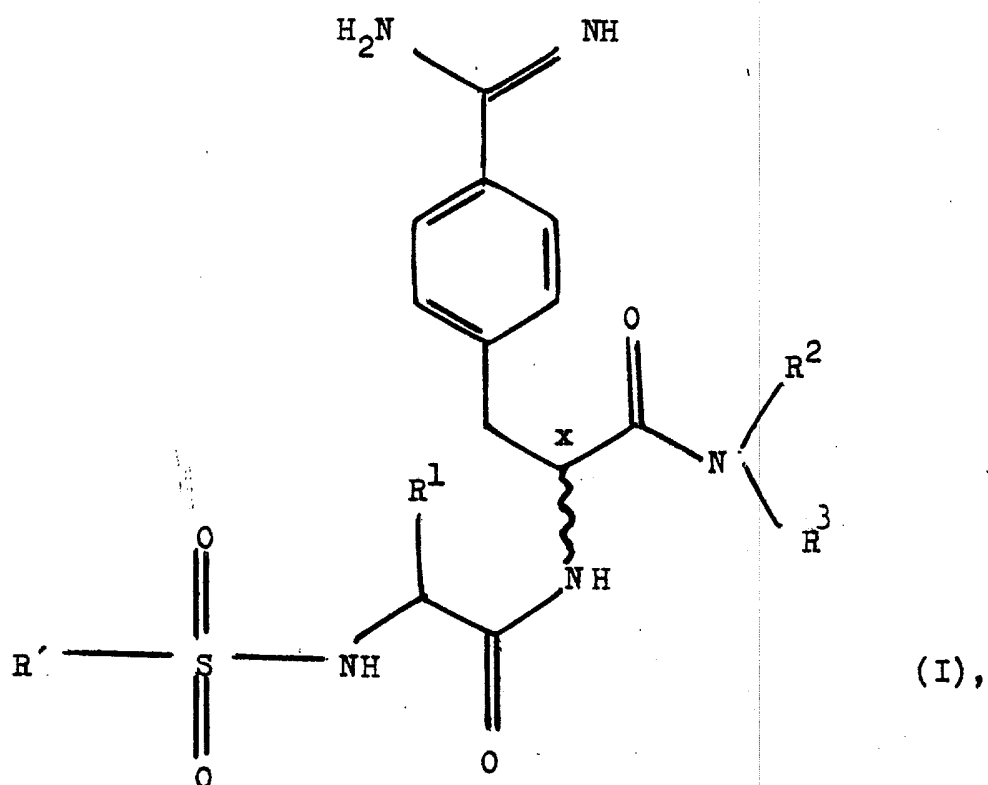
R^1 znamená nižší alkylovou skupinu, nižší hydroxyalkylovou skupinu, fenylovou skupinu nebo 4-hydroxyfenylovou skupinu.

4-Amidinofenylalanin (Aph) může být N-methylován na N-methyl-Aph. Kromě toho pro NAPAP jsou popsány různé derivatizace na arylsulfonylu, "mástkovém" glycinu a na piperidinovém kruhu. Nejvhodnější jsou tudíž α - nebo β -naftylsulfonylové skupiny na dusíkovém konci, kdežto heteroarylsulfonylové skupiny, jako 8-chinolinsulfonyl, jsou horší o desítky mocnin. Nevýhodou v přírodě se vyskytujících aminokyselin jako mástkového členu mezi hydrofobním naftylovým zbytkem a Aph je enzymatická štěpitelnost amidové vazby na Aph. Tato nevýhoda přichází v úvahu zvláště při perorálním podávání. Náhrada jiným mástkovým členem, jako β -alaninem na místo glycinu, však vede ke zřetelné ztrátě účinnosti ve vztahu k inhibici thrombinu. Také náhrada iminokyselinami, jako je prolin, vede ke ztrátě účinku.

Cílem tohoto vynálezu je proto připravit nové sloučeniny na bázi amidinofenylalaninu, které předčí známé sloučeniny svojí antitrombotickou účinností a které projevují vysokou enzymatickou rezistenci při současně zlepšené snášenlivosti.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou tudíž sloučeniny obecného vzorce I



ve kterém

R' znamená naftylovou skupinu nebo fenylovou skupinu, které mohou být derivatizovány jednou až třemi alkokyskupinami, které obsahují až 3 atomy uhlíku, nebo až pěti alkylovými skupinami, které

obsahují 1 nebo 2 atomy uhlíku, nebo znamená chromanovou skupinu, která může být derivatizována až pěti methylovými skupinami,

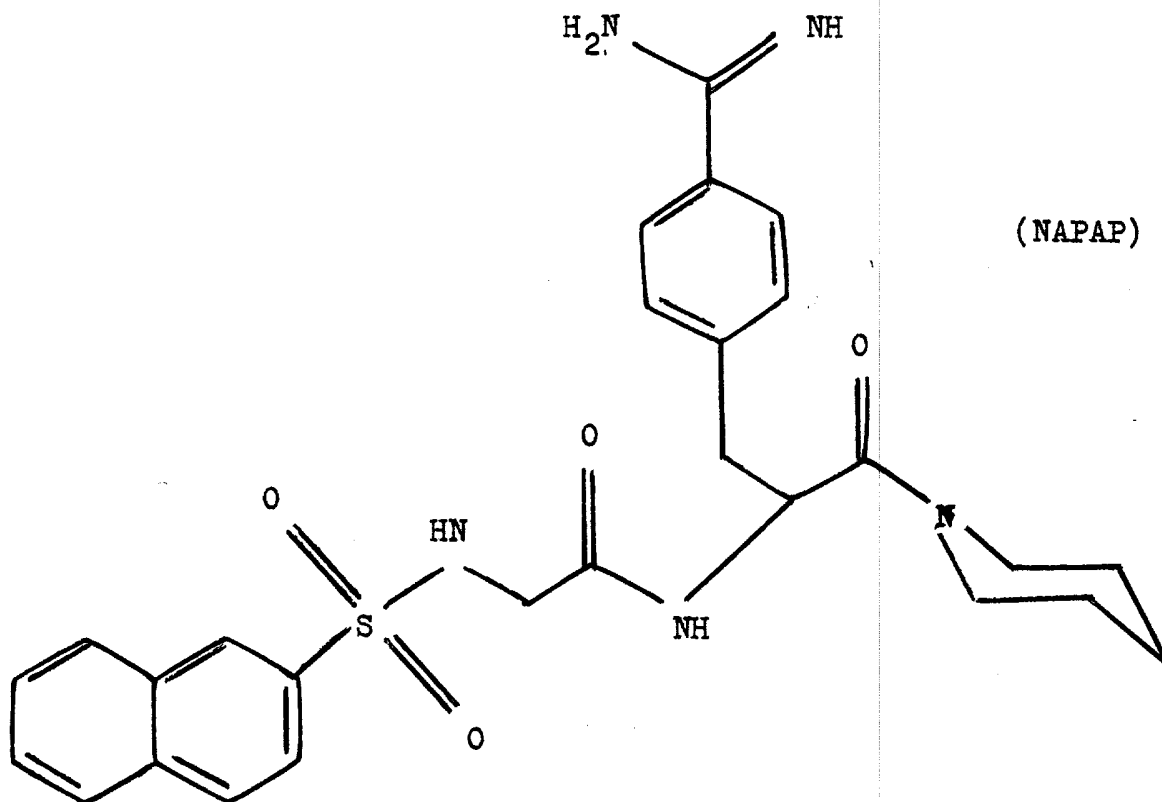
R^1 znamená atom vodíku, nižší alkylovou skupinu až 4 atomy uhlíku, hydroxyalkylovou skupinu, aralkylovou skupinu s až 7 atomy uhlíku nebo karboxyalkylovou skupinu s až 4 atomy uhlíku,

R^2 a R^3 , které jsou stejné nebo rozdílné, znamenají vždy alkylovou skupinu s až 4 atomy uhlíku, přičemž R^2 a R^3 mohou tvořit s atomem dusíku kruh, který může být derivatizován karboxyskupinou, hydroxyskupinou nebo hydroxyalkylovou skupinou až 3 atomy uhlíku a

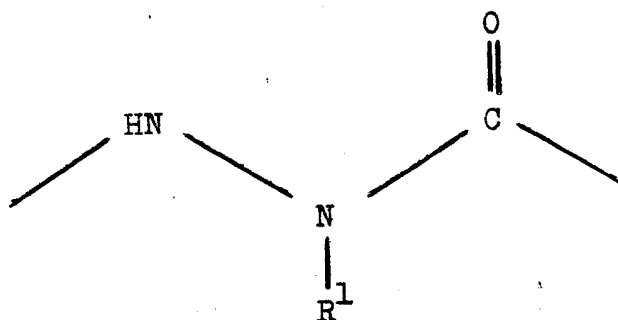
x označuje R nebo S strukturu, s výhodou však jde o R strukturu.

Podstatný rozdíl od sloučenin známé struktury spočívá v tom, že atom, na který je vázán substituent R^1 , je atom dusíku místo atomu uhlíku.

NAPAP má strukturu odpovídající vzorci



S překvapením se může značně zvýšit antitrombotický účinek tím, že se nahradí glycin v NAPAP zbytkem azaaminokyseliny. Zbytky azaaminokyselin jsou odvozeny od známých sloučenin, které se dají představit obecným vzorcem



Strukturní prvek azaaminokyseliny se zavádí do struktury vzorce, který je uveden výše pod I.

S překvapením bylo zjištěno, že β -naftylsulfonyl-azaglycyl-D-amidinofenylalanylpiperidid předčí účinností pětinasobně účinnost glycinové sloučeniny. Kombinace azaaminokyselin s hydrofobními zbytky R' z obecného vzorce I vede ke sloučeninám, které mají hodnoty Kⁱ a IC₅₀ v pikomolárním rozsahu. Kromě toho sloučeniny obsahující zbytek azaaminokyselin projevují odolnost proti enzymatickému odbourávání, takže sloučeniny podle vynálezu vedle značného zvýšení účinku se vyznačují zvýšenou stabilitou.

Výroba sloučenin podle vynálezu se provádí podle způsobů, které jako takové jsou známy a jsou například popsány v publikaci Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", sv. 15 (1 + 2), nakl. Georg Thieme, Stuttgart /SRN/, 1974 od Ericha Wünsche nebo v Pharmazie 39, 228 /1984/.

S výhodou se nejprve Boc-kyanfenylalanin váže na "aminovou složku". Jako aminové složky se s výhodou používají cyklické aminy, jako je piperidin, methylpiperidin nebo hydroxymethylpiperidin. Výroba peptidové vazby se dosahuje podle obvyklých standardně používaných způsobů, přičemž s výhodou se pracuje s karbodiimidem v přítomnosti hydroxybenzotriazolu v dimethylformamidu nebo podobném rozpouštědle. Po izolaci N- α -chráněné sloučeniny se chránicí skupina, v tomto případě skupina Boc, odstraní pomocí acidolýzy. K tomu se s výhodou používá kyselina trifluoroctová, popřípadě v rozpouštědle, jako je dichlormethan, nebo kyselina chlorovodíková v kyselině octové a přitom dochází k odštěpení.

Nakondenzování azaaminokyseliny se provádí popřípadě podle o sobě známých způsobů, jako například způsobem založeným na aktivním esteru a přitom se chráněný hydrazinový derivát nechá reagovat s estery kyseliny chlormravenčí na aktivní ester. Jako aktivní ester se zvláště používá p-nitrofenylester. Jako další možnost přichází v úvahu aktivace aminoskupiny kyanfenylového zbytku na isokyanát s následující reakcí s hydrazinovým derivátem. N β -funkce hydrazinů jsou při reakci blokovány známými chránicími skupinami, k čemu se zvláště používá benzyloxykarbonylová skupina a zejména terc.-butyloxykarbonylová skupina. Po acidolytickém odštěpení chránicí skupiny se váže chlorid aromatické, heteroaromatické nebo heterocyklické sulfonové kyseliny v rozpouštědle, jako je tetrahydrofuran, dioxan, dichlormethan nebo dimethylformamid za přídavku báze, jako je N-methylmorfolin, tri-

ethylamin nebo diisopropylethylamin. Ve větším počtu případů se však jako příznivé ukazuje nejprve vázat na hydrazinový derivát chlorid sulfonové kyseliny. S tím může se obejít zavedení chránicí skupiny. Reakce kyanové funkční skupiny na amidinovou funkční skupinu se provádí známými reakčními postupy. S výhodou se na odpovídající kyanfenylalaninový derivát ve směsi triethylaminu a pyridinu působí po dobu jednoho dne sirovočím. Thioamid vzniklý tímto způsobem se izoluje a pomocí methylačního činidla, jako je methyljodid, převede na methylester thioimidokyseliny. Zpracováním s aminosloučeninou, jako je například octan amonný, s výhodou v methanolu jako v rozpouštědle, se může získat požadovaná amidinofenylalaninová sloučenina.

Sloučeniny se mohou čistit obvyklými způsoby. S výhodou se k tomu používá gelové chromatografie na látkách jako je ^RSephadex LH-20 nebo iontoměničové chromatografie na látkách jako je karboxymethylcelulóza, přičemž zvláště výhodně se přitom používá acetátový pufr. Sloučeniny podle tohoto vynálezu se na svoji čistotu zkouší chromatografií na tenké vrstvě nebo vysoko účinnou kapalinovou chromatografií. Identita sloučenin se zkouší pomocí elementární analýzy a NMR spektrální analýzy.

Inhibitory podle tohoto vynálezu se k posouzení své účinnosti zkouší podle různých kritérií, s výhodou se u těchto sloučenin stanovuje hodnota K^i , hodnota IC_{50} nebo dílčí doba ke vzniku thromboplastinu (PTT) in vivo a in vitro. Podle toho jsou sloučeniny podle tohoto vynálezu specifické a vysoce aktivní inhibitory thromboninu se znač-

nou antitrombotickou schopností, která zřetelně předčí až dosud známé nízko molekulární sloučeniny.

Předmětem tohoto vynálezu jsou také diagnostické prostředky nebo terapeutické prostředky s antitrombotickým účinkem, které obsahují popsané inhibitory, a použití těchto sloučenin jako diagnostik nebo při způsobu výroby léčiv s antitrombotickým účinkem.

Příklady provedení vynálezu

Dále uvedené příklady popisují blíže tento vynález.

Příklad 1

β -Naftylsulfonilazaglycyl-D-p-amidinofenylalanylpiperidid

1. Boc-D-p-kyanfenylalanylpiperidid

50 g (255 mmol) p-kyanbenzylbromidu, 55 g (255 mmol) diethylesteru kyseliny acetamidomalonové a 2 g jodidu draselného se zahřívají k varu ve 250 ml absolutního dioxanu. K reakční směsi se během 3 hodin přikape čerstvě vyrobený roztok 6 g (260 mmol) sodíku v ethanolu. Po dalším tříhodinovém varu pod zpětným chladičem se přidá 170 ml 3-normálního roztoku hydroxidu sodného. Vzniklá směs se 4 hodiny zahřívá na teplotu 95 °C. Po ochlazení se hodnota pH upraví na 1 přidávkem 6-normální kyseliny chlorovodíko-

vé a dioxan se odpaří. Případně vysrážená sraženina se odfiltruje. Pomocí roztoku hydroxidu sodného se upraví hodnota pH na 9 a reakční směs se dvakrát extrahuje ethylacetátem. Hodnota pH vodné fáze se ještě jednou upraví na 1 pomocí kyseliny chlorovodíkové, přičemž vykristaluje N-acetylkyanfenylalanin. Krystaly se zachytí na jednom místě, několikrát promyjí vodou a vysuší za vysokého vakua.

Výtěžek činí 47 g (79,2 % teorie).

Zkouška čistoty: chromatografií na tenté vrstvě stanovená hodnota $R_f = 0,5$ (směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v objemovém poměru 50:10:2,5).

24 g této látky se rozpustí ve 3 litrech vody za přídavku 3-normálního roztoku hydroxidu sodného a hodnota pH se upraví na 6 až 6,5. K roztoku se přidá 500 mg acylázy a vzniklá směs se inkubuje za teploty 37 °C po dobu 4 dnů. Poté se roztok zbaví acylázy ultrafiltrací a nakonec se odpaří na objem 1 litru. Po úpravě hodnoty pH na 1 se provede několikanásobná extrakce ethylacetátem. Organické fáze se promyjí malým množstvím koncentrovaného roztoku chloridu sodného, suší Na_2SO_4 a rozpouštědlo odpaří. Získá se 8,2 g N-acetyl-D-kyanfenylalaninu. Výtěžek odpovídá 82 % teorie.

K 8 g takto získané sloučeniny se přidá 22 ml ledové kyseliny octové a 4,3 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové se 40 ml vody a vše se zahřívá k varu po dobu

24 hodin. Po odpaření roztoku vznikého při štěpení a odstranění stop ulpělé kyseliny se provede přesrážení ze směsi methanolu a diethyletheru. Výtěžek činí 6,6 g (85 % teorie).

5 g hydrochloridu D-kyanfenylalaninu se rozpustí ve 14 ml vody za přídavku 7,5 ml diisopropylethylaminu. K vzniklému roztoku se přidá roztok 6 g terc.-butyloxykarbonyl-oxyimino-2-fenylacetonitrilu v 17 ml dioxanu a vše se míchá přes noc. K reakční směsi se potom přidá 40 ml vody a 50 ml ethylacetátu. Vodná fáze se oddělí a organická fáze se ještě jednou extrahuje 1-molárním roztokem hydrogenuhličitanu draselného. Spojené vodné fáze se opakovaně promyjí 10 ml diethyletheru a nakonec se upraví hodnota pH na 3 pomocí kyseliny chlorovodíkové. Reakční směs se třikrát extrahuje ethylacetátem, promyje roztokem chloridu sodného a organická fáze se vysuší síranem sodným. Po odpaření rozpouštědla se dostane 5,6 g Boc-D-kyanfenylalaninu (78 % teorie).

3,26 g (10 mmol) Boc-D-kyanfenylalaninu, 1,49 g (11 mmol) HOBt a 2,42 g (12 mmol) DCCI se rozpustí v 50 ml dimethylformamidu a vše se míchá po dobu jedné hodiny. K reakční směsi se přidá 1 ml piperidinu a vše se míchá přes noc. Vysrážená dicyklohexylmočovina se odfiltruje, dimethylformamid se oddestiluje a odparek se výjme ethylacetátem. Extrakt se promyje třikrát hydrogenuhličitanem draselným, třikrát 1-molárním roztokem hydrogensíranu draselného a třikrát nasyceným roztokem chloridu sodného. Po vysušení organické fáze síranem sodným a oddestilování roz-

pouštědla se dostane 3,16 g Boc-D-kyanfenylalanylpiperididu (80 % teorie).

Zkouška čistoty: chromatografie na tenké vrstvě, $R_f = 0,27$ (chloroform).

2. D-Kyanfenylalanylpiperidin-hydrochlorid

3 g Boc-chráněné sloučeniny se rozpustí v 50 ml 1,2-normální kyseliny chlorovodíkové v ledové kyselině octové a míchá za teploty místnosti po dobu 30 minut. Reakční činidlo použité ke štěpení se oddestiluje za sníženého tlaku, provede zpracování s toluenem a odparek se trituruje s malým množstvím diethyletheru. Krystaly se zachytí a shromáždí a odpaří za sníženého tlaku.

Výtěžek: 2,2 g.

3. Boc-Azaglycyl-D-kyanfenylalanylpiperidid

2,08 g (7 mmol) Boc-azaglycin-p-nitrofenylesteru a 2,06 g (7 mmol) kyanfenylalanylpiperididu se rozpustí v 50 ml dimethylformamidu. Po přidavku 2,4 ml (14 mmol) diisopropylethylaminu se reakční směs míchá za teploty místnosti v temnu po dobu 1 dne. Rozpouštědlo se oddestiluje za sníženého tlaku a odparek se výjmě ethylacetátem. Extrakt se promyje třikrát 1-molárním roztokem hydrogensíranu draselného, třikrát roztokem hydrogenuhlíčitanu draselného a dvakrát koncentrovaným roztokem chloridu sodného. Organická fáze se vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se odpaří. Odparek se rozmíchá v diisopropyletheru, krys-

taly se zachytí a vysuší. Získá se 2,29 g Boc-azaglycyl-D-kyanfenylalanylpiperididu.

4. β -Naftylsulfonlazaglycyl-D-kyanfenylalanylpiperidid

2,08 g (5 mmol) Boc-azaglycyl-D-kyanfenylalanylpiperididu se rozpustí v 50 ml 1,2-normální kyseliny chlorovodíkové v ledové kyselině octové a roztok se míchá za teploty místnosti po dobu 30 minut. Po odpaření prostředku použitého ke štěpení a zpracování s toluenem za sníženého tlaku se odparek trituruje s etherem a krystaly se zachytí. Poté se krystaly rozpustí v 50 ml dichlormethanu za přídavku 1,7 ml (10 mmol) diisopropylethylaminu. K roztoku se přidá 1,134 g β -naftylsulfonchloridu a reakční směs se míchá za teploty místnosti přes noc. Rozpouštědlo se oddestiluje, odparek se výjme ethylacetátem a promyje třikrát 1-molárním roztokem hydrogen-síranu draselného, třikrát roztokem hydrogenuhlíčitanu draselného a dvakrát koncentrovaným roztokem chloridu sodného. Organická fáze se vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se oddestiluje. Získá se 1,75 g β -naftylsulfonlazaglycyl-D-kyanfenylalanylpiperididu.

5. β -Naftylsulfonlazaglycyl-D-amidinofenylalanylpiperidid

1 g sloučeniny získané ve stupni 4 se rozpustí ve 30 ml vysušeného pyridinu a po přidání 1 ml triethylaminu se zavádí plynný sirovodík po dobu 3 hodin. Reakční

směs se nechá stát za teploty místnosti po dobu 3 dnů a poté se vylije na směs 100 g ledu a 50 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Sraženina se odsaje a promyje vodou. Thioamid se po vysušení výjme 50 ml acetonu a uvede do styku s 1,5 ml methyljodidu. Vše se vaří pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Po ochlazení se provede vysrážení sraženiny diethyletherem. Sraženina se rozpustí v dichlormethanu a dvakrát promyje vodou. Po vysušení organické fáze sáranem sodným a odpaření rozpouštědla se odparek výjme 30 ml vysušeného methanolu a přidá se 200 mg octanu amonného. Reakční směs se ohřívá na teplotu 60 °C po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Vyrobená sloučenina se podrobí chromatografickému čištění na ^RSephadexu LH-20 v methanolu.

Výtěžek je 590 mg.

Zkouška čistoty: teplota tání: 182 °C,
chromatografie na tenké vrstvě,

$R_f = 0,48$ (směs chloroformu, methanolu a ledové kyseliny octové v poměru 50:10:2,5).

Zkouška identity sloučeniny: stanovení molární hmotnosti (bombardování rychlými atomy), $M^+ + H^+ = 523$.

Příklad 2

Pmc-Azaglycyl-D-p-amidinofenylalanylpiperidid

Stupně 1 až 3 jsou stejné jako v předcházejícím příkladě.

4. Pmc-Azaglycyl-D-kyanfenylalaninipiperidid

1,67 g (4 mmol) Boc-azaglycyl-D-kyanfenylalaninipiperididu se rozpustí v 50 ml 1,2-normální kyseliny chlorovodíkové v ledové kyselině octové a míchá za teploty místnosti po dobu 30 minut. Po odpaření činidla použitého ke štěpení a zpracování s toluenem za sníženého tlaku se odparek trituruje s etherem a krystaly se zachytí. Krystaly se rozpustí v 50 ml dichlormethanu za přídavku 1,36 ml (8 mmol) diisopropylethylaminu. K reakční směsi se přidá 1,35 g Pmc-chloridu a vše se nechá míchat za teploty místnosti přes noc. Rozpouštědlo se oddestiluje, odparek výjme ethylacetátem a promyje třikrát 1-molárním roztokem hydrogensíranu draselného, třikrát roztokem hydrogenuhličitanu draselného a dvakrát koncentrovaným roztokem chloridu sodného. Organická fáze se vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se oddestiluje. Získá se 1,95 g Pmc-azaglycyl-D-kyanfenylalaninipiperididu.

5. Pmc-Azaglycyl-D-amidinofenylalaninipiperidid

1,5 g sloučeniny získané ve stupni 4 se rozpustí ve 30 ml vysušeného pyridinu a po přidání 1 ml triethylaminu se zavádí plynný sirovodík po dobu 3 hodin. Reakční směs se nechá stát za teploty místnosti po dobu 3 dnů a poté se vylije na směs 100 g ledu a 50 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Sraženina se odsaje a promyje vodou. Thioamid se po vysušení výjme 50 ml acetonu a uvede do styku s 1,5 ml methyljodidu. Reakční směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Po ochlazení se provede vy-

srážení sraženiny diethyletherem. Sraženina se rozpustí v dichlormethanu a dvakrát promyje vodou. Po vysušení organické fáze síranem sodným a odstranění rozpouštědla odpařením se odparek výjme 30 ml vysušeného methanolu a uvede do styku s 300 mg octanu sodného. Reakční směs se zahřívá na teplotu 60 °C po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a vyrobená sloučenina se podrobí chromatografickému čistění na ^RSephadexu LH-20 v methanolu. Výtěžek činí 990 mg.

Zkouška čistoty: teplota tání: 149 až 155 °C
(slinutí, octan jako sůl),

chromatografie na tenké vrstvě,
 $R_F = 0,52$ (chloroform, methanol a ledová kyselina octová,
jako směs v objemovém poměru 50:10:2,5).

Stanovení hodnoty IC_{50} při inhibici thrombinu

Sloučeniny se inkubují ve vzrůstajících koncentracích s lidským thrombinem v 0,1 mol tris-HCl-pufu s 0,15 mol chloridu sodného o hodnotě pH 8,2. Po jedné hodině se zahájí enzymatická reakce přidáním substrátu Chromozym^R TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, 5×10^{-5} mol/litr). Uvolňování pNA se stanovuje po jedné hodině jako přírůstek optické hustoty při vlnové délce 405 nm ve fotometru. Koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% potlačení účinku enzymu, se označí jako hodnota IC_{50} (100 % odpovídá enzymatické reakci, u které nedochází k inhibici).

Stanovení hodnoty K^i pro thrombin

S roztokem thrombinu, uvedeným svrchu se zjišťují hodnoty K^i pro rozličné sloučeniny. K tomu se inkubuje thrombin s koncentrací inhibitoru, která přibližně odpovídá hodnotě IC_{50} stanovené při svrchu popsaném testu. Reakce se zahájí s rozdílnými koncentracemi substrátu Chro-mozym^R TH ($0,7 - 45 \times 10^{-5}$ mol/litr). Typ potlačení (Hemmtyp) a hodnota K^i se stanoví způsobem, který popsal Lineweaver a Burk (J. Am. Chem. Soc., 56, 658 - 666 /1934/).

Tabulka 1

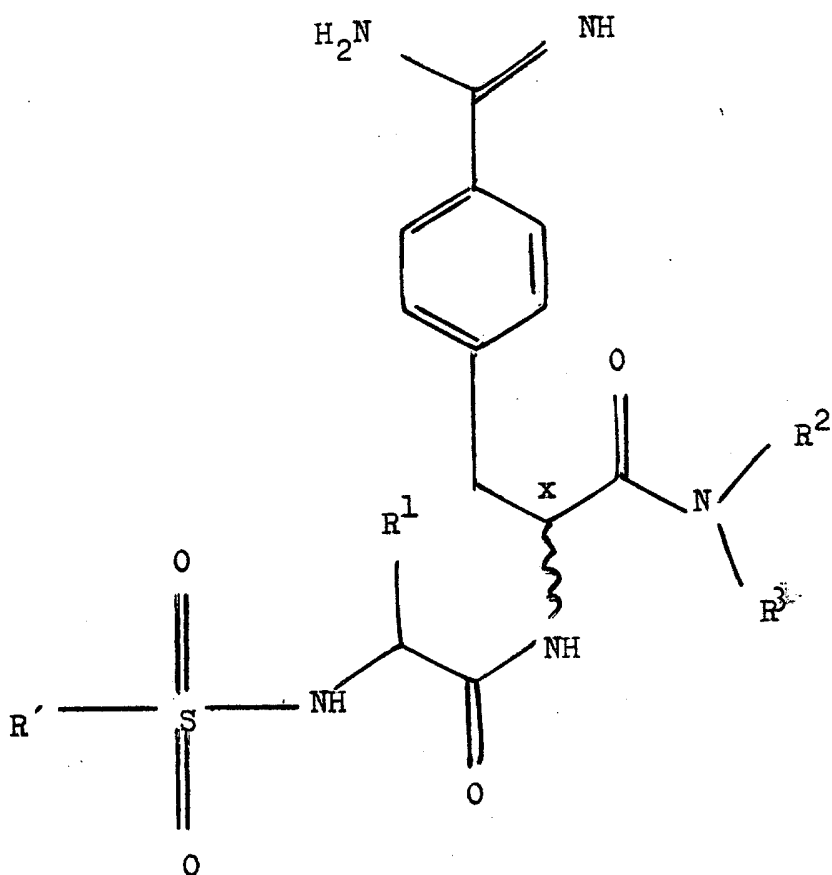
Sloučenina	Potlačení thrombinu	
	IC ₅₀ (mol/litr)	K ⁱ (mol/litr)
Pmc-Gly-Aph-Pip	1,4 x 10 ⁻⁹	1,3 x 10 ⁻⁹
Nas-AGly-Aph-Pip	1,3 x 10 ⁻⁹	2,6 x 10 ⁻⁹
Pmc- AGly-Aph-Pip	1,6 x 10 ⁻¹²	9,2 x 10 ⁻¹¹
NAPAP	2,8 x 10 ⁻⁹	1,4 x 10 ⁻⁸

Zkratky

Boc	terc.-butyloxykarbonyl
DC	chromatografie na tenké vrstvě
R _f	retenční faktor (doba retence)
HOBT	hydroxybenzotriazol
DCCI	dicyklohexylkarbodiimid
DMF	dimethylformamid
Pmc	2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina obecného vzorce I

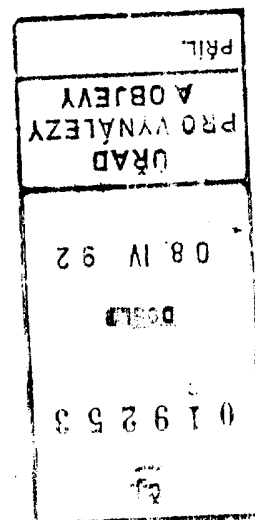


(I),

ve kterém

R'

znamená naftylovou nebo fenylovou skupinu, které mohou být derivatizovány jednou až třemi alkoxy-skupinami, které obsahují až 3 atomy uhlíku, nebo až pěti alkylovými skupinami, které obsahu-



jí 1 nebo 2 atomy uhlíku, nebo znamená chromanovou skupinu, která může být derivatizována až pěti methylovými skupinami,

R^1 znamená atom vodíku, nižší alkylovou skupinu s až 4 atomy uhlíku, hydroxyalkylovou skupinu, aralkylovou skupinu s až 7 atomy uhlíku nebo karboxyalkylovou skupinu s až 4 atomy uhlíku,

R^2 a R^3 , které jsou stejné nebo rozdílné, znamenají vždy alkylovou skupinu s až 4 atomy uhlíku, přičemž R^2 a R^3 mohou tvořit s atomem dusíku kruh, který může být derivatizován karboxyskupinou, hydroxyskupinou nebo hydroxyalkylovou skupinou s až 3 atomy uhlíku a

x označuje R nebo S strukturu, s výhodou však jde o R strukturu.

2. Sloučenina podle nároku 1, kde R' představuje β -naftylovou skupinu, R^1 znamená atom vodíku a R^2 a R^3 dohromady představují piperidinový zbytek.

3. Sloučenina podle nároku 1, kde R' představuje 2,2,5,7,8-pentamethylchromanovou skupinu, R^1 znamená atom vodíku a R^2 a R^3 tvoří dohromady piperidinový zbytek.

4. Sloučenina podle nároku 1, kde R' znamená β -naftylovou skupinu, R^1 představuje skupinu vzorce $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ a R^2 a R^3 tvoří dohromady piperidinový zbytek.

5. Sloučenina podle nároku 1, kde R' znamená β -naftylovou skupinu, R¹ představuje methylovou skupinu a R² a R³ tvoří dohromady piperidinový zbytek.

6. Sloučenina podle nároku 1, kde R' znamená 6,7-dimethoxy- β -naftylovou skupinu, R¹ představuje atom vodíku a R² a R³ tvoří dohromady piperidinový zbytek.

7. Sloučenina podle nároku 1, kde R' znamená 5-methoxy- α -naftylovou skupinu, R¹ představuje methylovou skupinu a R² a R³ tvoří dohromady piperidinový zbytek.

8. Sloučenina podle nároku 1, kde R' znamená β -naftylovou skupinu, R¹ představuje atom vodíku a R² a R³ tvoří dohromady 3-piperidinový zbytek.

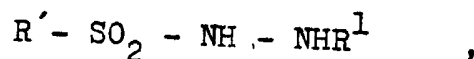
9. Sloučenina podle nároku 1, kde R' znamená 5,6,7,8-tetrahydro- β -naftylovou skupinu, R¹ představuje skupinu vzorce -CH₂-COOH a R² a R³ tvoří dohromady piperidinový zbytek.

10. Sloučenina podle nároku 1, kde R' představuje methoxytrimethylfenylovou skupinu.

11. Sloučenina podle nároku 1, kde R' znamená pentamethylfenylovou skupinu, R¹ představuje atom vodíku a R² a R³ tvoří dohromady piperidinový zbytek.

12. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se hydrazinový

derivát obecného vzorce



ve kterém

R' a R^1 mají významy uvedené v nároku 1,

nechá reagovat s obvyklým karbonylačním činidlem, s výhodou s p-nitrofenylesterem kyseliny chlormravenčí, v roztoku a reakční produkt se nechá reagovat s p-amidinofenyldialkylamidem, ve kterém alkylové skupiny mají významy R^2 a R^3 uvedené v nároku 1.

13. Diagnostický nebo terapeutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje sloučeninu podle nároku 1.

14. Použití sloučeniny podle nároku 1 při způsobu výroby diagnostika nebo léčiva s antitrombotickým účinkem.