SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(11), (21) Číslo dokumentu:

32-2003

(22) Dátum podania prihlášky: **9. 7. 2001**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **00202491.7**

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **12. 7. 2000**

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **EP**

(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **3. 6. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **6/2003**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP01/07887**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/04423**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:

C07D217/22,
C07D401/12,
C07K 5/06,
A61K 31/4725

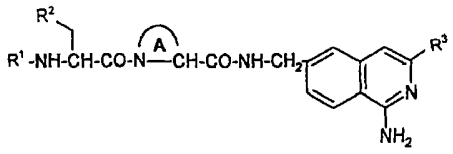
(71) Prihlasovateľ: **Akzo Nobel N.V., Arnhem, NL;**

(72) Pôvodca: **Rewinkel Johannes Bernardus Maria, Oss, NL;**
Timmers Cornelis Marius, Berghem, NL;
Conti Paolo Giovanni Martino, Heesch, NL;

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Trombínové inhibítory, farmaceutický prostriedok s ich obsahom a ich použitie**

(57) Anotácia:
Trombínové inhibítory všeobecného vzorca (I), kde R^1 je cyklopentyl, cyklohexyl alebo rozvetvený (C_{3-4})alkyl; R^2 je cyklohexyl alebo fenyl; R^3 je H alebo metyl; A je nesubstituovaný nasýtený 4-, 5- alebo 6-členný kruh a ich farmaceuticky prijateľné soli, ktoré majú antikoagulačný účinok a môžu byť použité na liečenie alebo prevenciu trombínom sprostredkovaných a s trombínom súvisiacich chorôb; farmaceutické prostriedky, ktoré ako účinnú látku obsahujú zlúčeniny podľa vynálezu, a ich použitie.



(I)

SK 32-2003 A3

PP 02-2003

Trombínové inhibítory, farmaceutický prostriedok s ich obsahom a ich použitie

Oblasť techniky

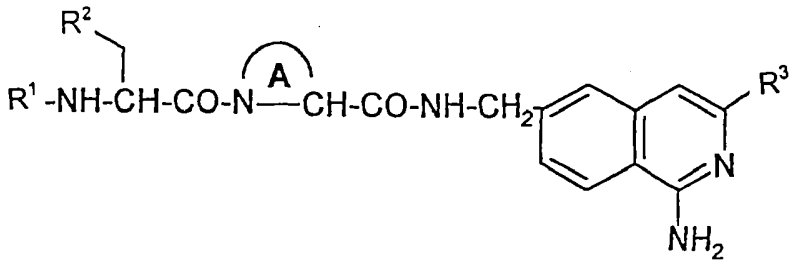
Vynález sa týka trombínových inhibítorov obsahujúcich aminoizochinolínovú skupinu, farmaceutického prostriedku s obsahom takéhoto inhibítora a taktiež použitia uvedeného inhibítora na výrobu lieku na prevenciu a liečenie chorôb súvisiacich s trombínom.

Doterajší stav techniky

V literatúre je opísané množstvo trombínových inhibítorov peptidickej povahy. Väčšina týchto trombínových inhibítorov obsahuje bázické skupiny v takzvanej P_1-polohe, ako napríklad bázické aminokyseliny arginín a lyzín, ale taktiež benzamidín a im podobné. Takáto bázická skupina je považovaná za najpodstatnejšiu pre antitrombínový účinok. Na druhej strane, v prípade, že sa zlúčeniny podávajú orálnou cestou, môže bazicita zhoršiť absorpciu v črevách. Vo WO 98/47876 je opísaná trieda inhibítorov, ktorá má ako bázickú skupinu aminoizochinolínovú skupinu, ktorá vykazuje zlepšené vlastnosti pri transepiteliálnom transporte. V rámci tejto skupiny zlúčenín sa v súčasnosti identifikoval nový výber zlúčenín, ktoré majú ďalšie zlepšené farmakologické vlastnosti.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu sú zlúčeniny všeobecného vzorca I



(I)

kde

R^1 je cyklopentyl, cyclohexyl alebo rozvetvený (C_{3-4})alkyl;
R^2 je cyklohexyl alebo fenyl;
R^3 je H alebo metyl; a
A je nesubstituovaný nasýtený 4, 5 alebo 6-členný kruh;
alebo ich farmaceuticky prijateľné soli,
ktoré sú možnými trombínovými inhibítormi so značne zvýšeným plazmovým polčasom rozpadu. Vo väčšine klinických situácií, pri ktorých sú potrebné anti-trombotické lieky je potrebný vo všeobecnosti predĺžený polčas rozpadu (pozri Sixma, J. J. a kol., Thromb. Res. 67; 305 až 311 (esp. 307), 1992). Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu sú teda dôležitým prínosom v danej oblasti techniky.

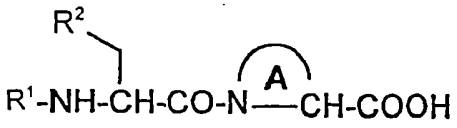
Zlúčeniny podľa vynálezu sú užitočné na liečenie a prevenciu trombínom sprostredkovaných a s trombínom súvisiacich chorôb. Toto zahrnuje množstvo trombotických a protrombotických stavov, v ktorých sa aktivuje koagulačná kaskáda, príklady ktorých zahrnujú, ale nie sú obmedzené len na rozsiahlu žilovú trombózu, pľúcnu embóliu, tromboflebitídu, upchatie tepien spôsobené trombózou alebo embóliou, opätovné upchatie tepien počas alebo po angioplastike alebo trombolýze, restenózu po tepnovom poranení alebo agresívnej kardiologickej procedúre, pooperačnú žilovú trombózu alebo embóliu, akútnu alebo chronickú aterosklerózu, mozgovú porážku, infarkt myokardu, rakovinu a metastázy, a neurodegeneratívne choroby. Zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť taktiež použité ako antikoagulanty v mimotelovom krvnom obehu, ako je to potrebné pri dialýze a pri operácii. Zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť taktiež použité ako *in vitro* antikoagulanty.

Výhodnými trombínovými inhibítormi podľa predkladaného vynálezu sú zlúčeniny, v ktorých A je päťčlenný kruh. Výhodne, R^2 je cyklohexyl. Inými výhodnými zlúčeninami sú tie, v ktorých R^3 je H. Výhodnejšie sú zlúčeniny, v ktorých R^1 je cyklohexyl. Najvýhodnejším trombínovým inhibítorom podľa predkladaného vynálezu je zlúčenina, kde R^1 je cyklohexyl, R^2 je cyklohexyl, R^3 je H a A je päťčlenný kruh.

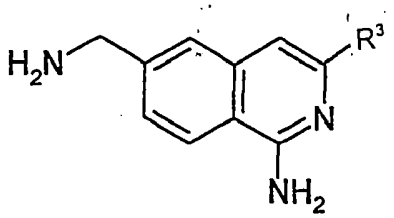
Výraz rozvetvený C_{3-4}-alkyl znamená rozvetvenú alkylovú skupinu s 3 alebo 4 atómami uhlíka, akou je napríklad izopropyl.

Vynález ďalej zahrnuje spôsob prípravy trombínových inhibítorov, ktorý zahrnuje väzbovú reakciu vhodne chránených aminokyselín a aminoizochinolínových derivátov, po ktorej nasleduje odstránenie ochranných skupín.

Zlúčeniny všeobecného vzorca I môžu byť pripravené spôsobom, ktorý je bežný pre takéto zlúčeniny. Tieto môžu byť pripravené vytvorením peptidovej väzby medzi zlúčeninami všeobecného vzorca II a zlúčeninami všeobecného vzorca III, pričom sa použije väzbové činidlo, akým je napríklad *N*,*N*-dicyklohexylkarbodiimid (DCCI) a 1-hydroxybenzotriazol (HOBT) alebo 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluróniumtetrafluórboritan (TBTU), v ktorých R^1, R^2, R^3 and A majú význam uvedený vyššie. *N*-ukončenie zlúčenín všeobecného vzorca II môže ale nemusí niesť ochrannú skupinu, akou je napríklad *terc*-butyloxykarbonylová skupina (Boc). Arylamínová skupina zlúčenín všeobecného vzorca III môže ale nemusí niesť ochrannú skupinu, akou je benzoyl, ktorý môže byť po reakcii, pri ktorej sa vytvorí väzba, odstránený.

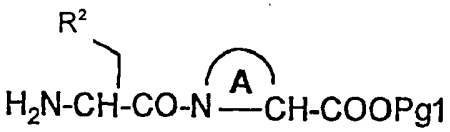


(II)



(III)

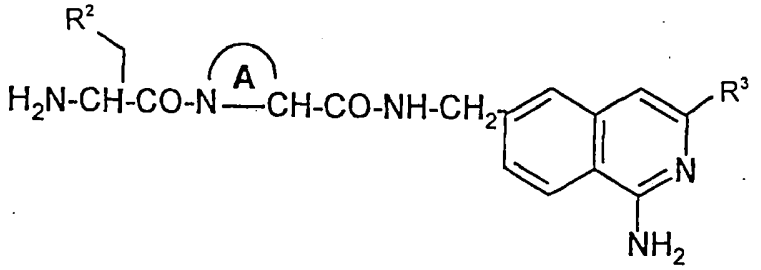
Zlúčeniny všeobecného vzorca II môžu byť pripravené zo zlúčenín všeobecného vzorca IV, kde Pg1 je karboxylátová ochranná skupina, akou je napríklad benzylester, pôsobením na zlúčeninu všeobecného vzorca IV vhodným ketónom, akým je napríklad cyklohexanón alebo acetón a s redukčným činidlom, akým je napríklad triacetoxybórhydrid sodný za kyslých podmienok a následným odstránením karboxylátovej ochrannej skupiny.



(IV)

Zlúčenina všeobecného vzorca III, kde R^3 = H (1-amino-6-(aminometyl)izochinolín) je opísaná vo WO 98/47876. Zlúčenina všeobecného vzorca III, kde R^3 = Me (1-amino-6-(aminometyl)-3-metylizochinolín) môže byť pripravená z 1-amino-6-metoxy-3-metylizochinolínu, použitím postupov opísaných vo WO 98/47876, na transformáciu 1-amino-6-metoxy-izochinolínu na 1-amino-7-(aminometyl)izochinolín. 1-Amino-6-metoxy-3-metylizochinolín môže byť pripravený z 3-metoxyfenylacetónu, použitím spôsobu opísaného W. Zielinskim a M. Mazikom v Heterocycles 38, 375 (1994).

Alternatívne, zlúčeniny všeobecného vzorca I môžu byť pripravené zo zlúčenín všeobecného vzorca V, pôsobením na zlúčeniny všeobecného vzorca V vhodným ketónom, akým je napríklad cyklohexanón alebo acetón a redukčným činidlom, akým je napríklad triacetoxybórhydrid sodný za kyslých podmienok. V tejto reakcii môže byť arylamínová skupina zlúčenín všeobecného vzorca V chránená skupinou, akou je napríklad benzoyl, ktorý môže byť po redukčnej aminácii odstránený.



(V)

Zlúčeniny všeobecného vzorca V môžu byť pripravené pomocou vytvorenia peptidovej väzby medzi dipeptidom s ochrannou skupinou, akou je napríklad Boc skupina na *N*-ukončení a zlúčeninami všeobecného vzorca III, pričom sa použijú väzbové činidlá opísané vyššie.

Ochrana α-amino funkčných skupín sa všeobecne uskutočňuje prostredníctvom uretánových funkčných skupín, akými sú napríklad v kyslom prostredí nestála *terc*-butyloxykarbonylová skupina (Boc), benzyloxykarbonylová (Cbz) skupina a substituované analógy, v zásaditom prostredí nestála 9-fluorenylmetyloxykarbonylová (Fmoc) skupina alebo ftaloylová (Phth) skupina. Iné vhodné amino ochranné skupiny zahrnujú Nps, Bpoc, Msc, etc. Odstránenie ochranných

skupín sa môže uskutočniť rôznymi spôsobmi, v závislosti od povahy týchto ochranných skupín. Zvyčajne sa odstránenie ochranných skupín uskutočňuje za kyslých podmienok a v prítomnosti scavengerov. Cbz skupina môže byť taktiež odstránená prostredníctvom katalytickej hydrogenácie. Prehľad amino ochranných skupín a spôsobov na ich odstránenie je uvedený v The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, zväzok 3 E. Gross and J. Meienhofer, Eds., (Academic Press, New York, 1981).

Ochrana karboxylových skupín sa môže uskutočniť prostredníctvom tvorby esteru, napr. v zásaditom prostredí nestálych esterov, akými sú napríklad metyl- alebo etylester, v kyslom prostredí nestálych esterov, akými sú napríklad *terc*-butylestery, alebo hydrogenolyticky nestále estery, akými sú napríklad benzylestery.

Zlúčeniny podľa predkladaného vynálezu, ktoré môžu byť vo forme voľnej bázy, môžu byť izolované z reakčnej zmesi vo forme farmaceuticky prijateľnej soli. Farmaceuticky prijateľné soli môžu byť taktiež získané pôsobením organickej alebo anorganickej kyseliny, akými sú napríklad kyselina chlorovodíková, bromovodíková, jodovodíková, sírová, fosforečná, octová, propiónová, glykolová, maleínová, malónová, metánsulfónová, fumárová, jantárová, vínna, citrónová, benzoová a askorbová na voľnú bázu všeobecného vzorca I.

Zlúčeniny podľa vynálezu majú jeden alebo viacero chirálnych uhlíkových atómov, a preto môžu byť získané vo forme čistých enantiomérov, čistých diastereomérov, vo forme zmesi enantiomérov, alebo vo forme zmesi obsahujúcej diastereoméry. Spôsoby získania čistých enantiomérov sú v danej oblasti techniky dobre známe, sú nimi napríklad kryštalizácia solí, ktoré sú získané z opticky aktívnych kyselín a racemických zmesí, alebo chromatografia s použitím chirálnych stĺpcov. Pre diastereoméry môže byť použité stĺpce s normálnymi alebo obrátenými fázami.

Zlúčeniny podľa vynálezu môžu byť podávané enterálne alebo parenterálne, a u ľudí výhodne v denných dávkach od 0,001 do 100 mg na kg telesnej hmotnosti, výhodne od 0,01 do 10 mg na kg telesnej hmotnosti. Zmiešané s farmaceuticky prijateľnými pomocnými látkami, opísanými napríklad v štandardnom odkaze Gennaro a kol., Remington's Pharmaceutical Sciences, (18. vydanie, Mack Publishing Company, 1990, pozri najmä časť 8: Pharmaceutical Preparations and

Their Manufacture) môžu byť zlúčeniny zlisované do tuhých dávkových jednotiek, akými sú napríklad pilulky, tablety, alebo môžu byť spracované do kapsúl alebo čapíkov. Prostredníctvom farmaceuticky prijateľných kvapalín môžu byť zlúčeniny podávané aj vo forme roztokov, suspenzií, emulzií, napríklad na použitie ako injekčný prostriedok, alebo sprej, napr. na použitie ako nazálny sprej.

Pri výrobe dávkových jednotiek, napr. tabliet je potrebné uvažovať o použití bežných prísad, akými sú napríklad plnivá, farbivá, polymérne spojivá a podobne. Vo všeobecnosti je možné použiť akúkoľvek farmaceuticky prijateľnú prísadu, ktorá neinterferuje s funkčnou skupinou účinných zlúčenín.

Vhodné nosiče, s ktorými je možné prostriedok podať zahrnujú laktózu, škrob, celulózové deriváty a podobne, alebo ich zmesi, použité vo vhodných množstvách.

Eliminačný polčas rozpadu a percento biodostupnosti zlúčenín podľa vynálezu môže byť vhodne testované podľa nasledujúceho testu na psoch.

Doba zotrvania a percento biodostupnosti priamych trombínových inhibítorov u samíc psov plemena beagle sa môže merať prostredníctvom stanovenia anti-IIa účinku v plazme po intravenóznom alebo orálnom podaní. S ohľadom na selektivitu proteázových inhibítorov podľa vynálezu je inhibícia trombínu lineárne závislá od koncentrácie meraného proteázového inhibítora. Po intravenóznom alebo orálnom podaní serínového proteázového inhibítora sa v rôznych časových okamihoch počas dňa zbiera krv z krčnej žily. Po centrifugácii krvi sa vo vzorkách plazmy stanovia plazmové anti-IIa účinky v chromogenickej skúške na mikrotitračných doštičkách s použitím kalibračnej krivky samotnej testovanej zlúčeniny. Získané hodnoty sa analyzovali z krivky plazma vs čas, napr. prostredníctvom počítačového iteračného postupu, založeného na Simplexovej metóde. Následne sa s použitím modelu relatívnej chyby nezávislej od koncentrácie vypočítali eliminačné polčasy rozpadu, a plocha pod krivkou (AUC) sa stanovila pomocou lichobežníkového pravidla. Za predpokladu lineárnej kinetiky sa percento biodostupnosti vypočítalo vydelením AUC získanej po p.o. podaní priemernou očakávanou normalizovanou AUC po i.v. podaní tejto dávky (x 100 %).

Vynález je ďalej demonštrovaný na nasledujúcich príkladoch.

Príklady uskutočnenia vynálezu

^{1}H NMR merania sa uskutočnili na BRUKER DRX 400 spektrofotometri, pracujúcom pri ^{1}H frekvencii 400 MHz. Hmotnostné spektrá (MS) sa zaznamenali prostredníctvom PE-sciex API-165.

Príklad 1

N-Cyklohexyl-3-cyklohexyl-D-alanyl-*N*-[(1-amino-6-izochinolinyl)metyl]-L-prolínamid, hydrochlorid (*N*-cyklohexyl-D-Cha-Pro-6Aiq.HCl)

Po 2-hodinovom miešaní 0,91 g fenylmetylesteru 3-cyklohexyl-*N*-[(1,1-dimetyletoxy)karbonyl]-D-alanyl-L-prolínu (Boc-D-Cha-Pro-OBzl) v 2,5 ml dichlórmetánu a 2,5 ml kyseliny trifluóroctovej pri teplote miestnosti sa reakčná zmes skoncentrovala vo vákuu, čo poskytlo 0,94 g oleja. Tento olej sa rozpustil v 10 ml *N*,*N*-dimetylformamidu, obsahujúceho 1 % objemové kyseliny octovej a pridalo sa 0,26 ml cyklohexanónu a 0,64 g triacetoxybórhydridu sodného. Po 16-hodinovom miešaní pri teplote miestnosti sa k reakčnej zmesi pridalo 5 ml vody a zmes sa extrahovala dichlórmetánom. Organický extrakt sa vysušil nad síranom horečnatým a skoncentroval sa, čo poskytlo 0,90 g oleja (TLC; silikagél, dichlórmetán/metanol = 95/5 (objemovo) Rf = 0,8). Tento olej sa rozpustil v 50 ml etylacetátu, pH roztoku sa nastavilo na hodnotu päť použitím kyseliny octovej, pridalo sa 0,10 g paládia na uhlíku (10%) a suspenzia sa hydrogenovala pri atmosferickom tlaku pri teplote miestnosti jednu hodinu. Paládiový katalyzátor sa odstránil filtráciou a rozpúšťadlo sa odstránilo odparením pri zníženom tlaku. Zvyšok sa rozpustil v toluéne a toluén sa odparil pri zníženom tlaku, čo poskytlo 0,56 g *N*-cyklohexyl-D-Cha-Pro-OH. Táto kyselina (0,35 g) sa rozpustila v 10 ml *N*,*N*-dimetylformamidu a pridalo sa 0,19 mg 1-amino-6-aminometylizochinolínu (WO 9847876) a 0,4 g 2-(1*H*-benztriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluróniumtetrafluórboritanu (TBTU). pH reakčnej zmesi sa nastavilo na hodnotu 8 použitím *N*,*N*-diizopropyletylamínu (DIPEA). Po 24-hodinovom miešaní pri teplote miestnosti sa pridalo ďalších 0,1 g TBTU a reakčná zmes sa miešala pri teplote miestnosti ďalších 18 hodín. Následne sa reakčná zmes skoncentrovala vo vákuu. Zvyšok sa rozpustil v 50 ml dichlórmetánu, a dvakrát sa

premyl vodným roztokom hydrogenuhličitanu sodného, vysušil sa nad síranom horečnatým a skoncentroval sa. Zvyšok sa rozpustil vo vode a priamo sa nadávkoval na preparatívnu HPLC DeltaPak RP-Cis s použitím gradientového elučného systému 20 % A/80 % B až 20 % A/30 % B/50 % C počas 60 minút pri rýchlosti prietoku 40 ml/min (A: 0,5M fosfátový tlmivý roztok pH 2,1, B: voda, C: zmes acetonitril/voda = 6/4 (objemovo)), čo poskytlo 0,25 g zlúčeniny z názvu tohto odseku.

^{1}H-NMR 400 MHz (CD_3OD) δ: 0,84 - 2,41 (27H, m), 2,91 - 3,01 (1H, m), 3,57 - 3,65 (1H, m), 3,81 - 3,88 (1H, m), 4,30 (1H, t, J = 7 Hz), 4,49 - 4,77 (3H, m), 7,26 (1H, d, J = 7 Hz), 7,57 (1H, d, J = 7Hz), 7,73 (1H, dd, J = 2 Hz a J = 9 Hz), 7,92 (1H, d, J = 2 Hz), 8,38 (1H, d, J = 9 Hz).

Príklad 2

N-Cyklohexyl-3-cyklohexyl-D-alanyl-*N*-[(1-amino-3-metyl-6-izochinolinyl)metyl]-L-prolínamid, hydrochlorid (*N*-cyklohexyl-D-Cha-Pro-6(3Me)Aiq.HCl)

2a. 1-Amino-6-metoxy-3-metyl-izochinolín

Roztok 2,12 g 3-metoxyfenylacetónu a 1,26 ml fosforylchloridu v 45 ml bezvodého toluénu sa zohrieval pod refluxom. Po 30-tich minútach sa zmes ochladila na 0 °C a po kvapkách sa pridal roztok 0,57 g kyánamidu v 23 ml bezvodého éteru. Reakčná zmes sa ponechala ohriať na teplotu miestnosti a pri tejto teplote sa miešala jednu hodinu. Potom sa miešaná zmes ochladila na 0 °C po kvapkách sa pridalo 1,5 ml titániumtetrachloridu. Reakčná zmes sa ohrievala pod refluxom 2,5 hodiny, ochladila sa, pridalo sa 34 ml vody, zmes sa prefiltrovala a sediment sa premyl etylacetátom. Filtrát sa zalkalizoval použitím 2N vodného roztoku hydroxidu sodného a extrahoval sa etylacetátom. Organické extrakty sa premyli soľankou, vysušili sa nad síranom horečnatým a skoncentrovali sa. Zvyšok sa čistil pomocou chromatografie na silikagéli (zmes dichlórmetán/metanol = 95/5), čo poskytlo 0,42 g zlúčeniny z názvu tohto odseku. ^{1}H-NMR 400 MHz ($CDCl_3$) δ: 2,45 (3H, s), 3,91 (3H, s), 5,0 (2H, široký s), 6,81 (1H, s), 6,90 (1H, d, J = 3 Hz), 7,02 (1H, dd, J = 3 Hz a J = 9Hz), 7,65 (1H, d, J= 9 Hz).

2b. 1-Amino-6-hydroxy-3-metyl-izochinolín

K miešanému roztoku 1-amino-6-metoxy-3-metylizochinolínu (2 g) v 10 ml dichlórmetánu sa pri teplote 0 °C po kvapkách pridal bromid boritý (4 ml) v 6 ml dichlórmetánu. Po 16-hodinovom miešaní pri teplote miestnosti sa reakčná zmes vliala na ľad, organická vrstva sa odstránila a pH vodnej vrstvy sa nastavilo na hodnotu 9 prídavkom koncentrovaného vodného amoniaku. Vyzrážaná látka sa zozbierala prostredníctvom filtrácie a vysušila sa vo vákuu, čo poskytlo 1,6 g zlúčeniny z názvu tohto odseku. ESI-MS: 175 (MH^+).

2c. 1-Amino-3-metylizochinolín-6-yl ester kyseliny trifluórmetánsulfónovej

Zmes 1,4 g 1-amino-6-hydroxy-3-metyl-izochinolínu a 4,3 g *N*-fenyl-bis(trifluórmetánsulfónimid)-u v 19,5 ml dichlórmetánu a 19,5 ml dioxánu sa ochladila v ľadovom kúpeli a po kvapkách sa pridalo 2,8 ml *N*,*N*-diizopropyletylamínu. Výsledná zmes sa 24 hodín ohrievala pri teplote 70 °C, po čom nasledovalo odstránenie prchavých zložiek vo vákuu. Zostávajúci zvyšok sa rozpustil v etylacetáte, premyl sa po sebe nasledujúcimi podielmi 2N vodného hydroxidu sodného, vody a soľanky a vysušil sa (síran sodný). Filtrácia a skoncentrovanie poskytlo bezfarebný olej, ktorý sa trituroval v toluéne, čo poskytlo 1,3 g tuhej látky. Toluénový roztok sa čistil prostredníctvom chromatografie na silikagéli (zmes toluén/etanol = 95/5), čo poskytlo ďalších 0,6 g zlúčeniny z názvu tohto odseku. Úplný výťažok bol 1,9 g. ESI-MS: 307 (MH^+).

2d. 1-Amino-6-kyano-3-metylizochinolín

K ohrievanej zmesi 1-amino-3-metylizochinolín-6-yl esteru kyseliny trifluórmetánsulfónovej (1,9 g), kyanidu zinočnatého (0,74 g) a trifenylfosfínu (0,33 g) v 24 ml *N*-metyl-pyrolidónu sa pri teplote 190 °C pridal paládiumacetát (0,28 g) (exotermická reakcia !). Miešanie pri teplote 190 °C pokračovalo 2 hodiny. Po ochladení na teplotu miestnosti sa pridal etylacetát a organická zmes sa premyla 2N vodným amoniakom, vodou a soľankou a vysušila sa (síran horečnatý). Filtrácia a skoncentrovanie poskytli hnedastý olej, ktorý sa čistil prostredníctvom chromatografie na silikagéli (zmes dichlórmetán/metanol =98/2), čo poskytlo 0,68 g zlúčeniny z názvu tohto odseku. ESI-MS: 184 (MH^+).

2e. 1-Amino-6-(aminometyl)-3-metylizochinolín

K miešanému roztoku 1-amino-6-kyano-3-metylizochinolínu (0,68 g) v 15 ml tetrahydrofuránu sa pri teplote miestnosti a pod dusíkovou atmosférou pridalo 8,4 ml 2M komplexu boran-metylsulfid v tetrahydrofuráne a následne sa potom ohrieval 50 minút pri teplote 60 °C. Reakčná zmes sa ochladila v ľadovom kúpeli a pomaly sa pridalo 7,5 ml metanolu. Po 15 minútach sa pridalo 18,8 ml 1M HCl v éteri. Reakčná zmes sa ponechala ohriať na teplotu miestnosti a miešala sa ďalších 16 hodín. Tuhá fáza sa izolovala, čo poskytlo 0,34 g hydrochloridu 1-amino-6-(aminometyl)-3-metylizochinolínu. Filtrát sa čistil prostredníctvom stĺpcovej chromatografie (silikagél; zmes metanol/amoniak = 98/2), čo poskytlo ďalších 0,15 g 1-amino-6-(aminometyl)-3-metylizochinolínu. ESI-MS: 188 (MH^+).

2f. *N*-cyklohexyl-3-cyklohexyl-D-alanyl-*N*-[(1-amino-3-metyl-6-izochinolinyl)metyl]-L-prolínamid, hydrochlorid (*N*-cyklohexyl-D-Cha-Pro-6(3Me)Aiq.HCl)

K miešanej zmesi 0,17 g hydrochloridu 1-amino-6-(aminometyl)-3-metylizochinolínu, 0,30 g *N*-cyklohexyl-D-Cha-Pro-OH, 0,5 ml acetonitrilu a 0,37 ml *N,N*-diizopropyletylamínu v 3 ml *N,N*-dimetylformamidu sa pri teplote miestnosti počas jednej hodiny pridal roztok 0,35 g brómtripyrolidónfosfóniumhexafluórfosfátu (PyBroP) v 13 ml *N,N*-dimetylformamidu. Po 24-hodinovom miešaní pri teplote miestnosti sa reakčná zmes skoncentrovala vo vákuu. Zvyšok sa rozpustil v etylacetáte a premyl sa vodným hydrogenuhličitanom sodným a soľankou, vysušil sa nad síranom horečnatým a skoncentroval sa. Zvyšok sa čistil prostredníctvom chromatografie na silikagéli (zmes dichlórmetán/metanol = 9/1) a lyofilizácia zo zmesi *terc*-butanol/kyselina chlorovodíková poskytla 0,13 g zlúčeniny z názvu tohto odseku. ^{1}H-NMR 400 MHz (CD_3OD) δ: 0,85 - 2,40 (27H, m), 2,50 (0,3H, s), 2,51 (2,7H, s), 2,92 - 3,00 (1H, m), 3,54 - 3,68 (1H, m), 3,81 - 3,88 (1H, m), 4,30 (1H, t, J = 7 Hz), 4,46 - 4,74 (3H, m), 7,02 (1H, s), 7,64 (1H, dd, J = 2 Hz a J = 9 Hz), 7,80 (1H, d, J = 2 Hz), 8,32 (1H, d, J= 9 Hz).

Príklad 3

N-Cyklohexyl-D-fenylalanyl-*N*-[(1-amino-6-izochinolinyl)metyl]-L-prolínamid, hydrochloride (*N*-cyklohexyl-D-Phe-Pro-6Aiq.HCl)

Pomocou postupov uvedených v príklade 1 pre *N*-cyklohexyl-D-Cha-Pro-OH za použitia východiskovej zlúčeniny, ktorou je 0,85 g fenylmetylesteru *N*-[(1,1-dimetyletoxy)karbonyl]-D-fenylalanyl-L-prolínu (Boc-D-Phe-Pro-OBzl) sa poskytlo 0,82 g *N*-cyklohexyl-D-fenylalanyl-L-prolínu (*N*-cyklohexyl-D-Phe-Pro-OH). *N*-cyklohexyl-D-Phe-Pro-OH (0,82 g) sa rozpustil v 10 ml *N*,*N*-dimetylformamidu a pridalo sa 0,33 mg 1-amino-6-aminometylizochinolínu a 1,1 g *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametyluróniumhexafluórfosfátu (HATU) a hodnota pH sa nastavila na 8 použitím *N*,*N*-diizopropyletylamínu (DIPEA). Po 16-hodinovom miešaní pri teplote miestnosti sa reakčná zmes skoncentrovala vo vákuu. Zvyšok sa rozpustil v 50 ml dichlórmetánu a dvakrát sa premyl vodou a soľankou, vysušil sa nad síranom horečnatým a skoncentroval sa. Zvyšok sa čistil prostredníctvom chromatografie na silikagéli (zmes dichlórmetán/metanol (obsahujúci 2 % amoniaku) = 9/1) a lyofilizácia zo zmesi *terc*-butanol/kyselina chlorovodíková poskytla 0,19 mg zlúčeniny z názvu tohto odseku. ^{1}H-NMR 400 MHz (CD_3OD) δ: 0,87 - 2,13 (14H, m), 2,38 - 2,45 (1H, m), 2,94 - 3,03 (1H, m), 3,06 - 3,13 (1H, m), 3,25 - 3,38 (2H, m), 4,33 - 4,73 (4H, m), 7,25 - 7,40 (6H, m), 7,58 (1H, d, J = 7 Hz), 7,71 (1H, dd, J = 2 Hz a J = 9,Hz), 7,92 (1H, d, J = 2 Hz), 8,35 (1H, d, J = 9 Hz).

Príklad 4

N-Cyklopentyl-3-cyklohexyl-D-alanyl-*N*-[(1-amino-6-izochinolinyl)metyl]-L-prolínamid, hydrochlorid (*N*-cyklopentyl-D-Cha-Pro-6Aia.HCl)

Pomocou postupov uvedených v príklade 1 za použitia východiskovej zlúčeniny, ktorou je 0,30 g Boc-D-Cha-Pro-OBzl použitím cyklopentanónu namiesto cyklohexanónu sa poskytol surový *N*-cyklopentyl-D-Cha-Pro-6Aiq, ktorý sa čistil za pomoci stĺpcovej chromatografie (silikagél, zmes dichlórmetán/metanol = 10/1, gradient do 5/1). Lyofilizácia zo zmesi *terc*-butanol/kyselina chlorovodíková poskytla 0,16 g zlúčeniny z názvu tohto odseku. ^{1}H-NMR 400 MHz (CD_3OD) δ: 0,85 - 2,41

(25H, m), 3,43 - 3,52 (1H, m), 3,59 - 3,65 (1H, m), 3,80 - 3,86 (1H, m), 4,20 (1H, t, J = 7 Hz), 4,51 - 4,73 (3H, m), 7,25 (1H, d, J = 7 Hz), 7,57 (1H, d, J = 7 Hz), 7,73 (1H, dd, J = 2,Hz a J = 9 Hz), 7,90 (1H, d, J = 2 Hz), 8,38 (1H, d, J = 9 Hz).

Príklad 5

N-(1-Metyletyl)-3-cyklohexyl-D-alanyl-*N*-[(1-amino-6-izochinolinyl)metyl]-L-prolín-amid, hydrochlorid (*N*-(1-metyletyl)-D-Cha-Pro-6Aiq.HCl)

Pomocou postupov uvedených v príklade 1 za použitia východiskovej zlúčeniny, ktorou je 0,92 g Boc-D-Cha-Pro-Obzl, použitím acetónu namiesto cyklohexanónu sa poskytlo 0,04 g *N*-(1-metyletyl)-D-Cha-Pro-6Aiq.HCl.
^{1}H-NMR 400 MHz (CD_3OD) δ: 0,85 - 2,41 (23H, m), 3,27 - 3,35 (1H, m), 3, 59 - 3,65 (1H, m), 3,82 - 3,89 (1H, m), 4,27 (1H, t, J = 7 Hz), 4,51 - 4,74 (3H, m), 7,26 (1H, d, J = 7 Hz), 7,57 (1H, d, J = 7 Hz), 7,72 (1H, dd, J = 2 Hz a J = 9 Hz), 7,91 (1H, d, J = 2 Hz), 8,38 (1H, d, J = 9 Hz).

Anti-trombínová skúška

Antitrombínový účinok zlúčenín podľa vynálezu sa stanovil spektrofotometrickým meraním rýchlosti hydrolýzy chromogenického substrátu s-2238 trombínom. Táto skúška na stanovenie antitrombínového účinku v tlmivom systéme sa použila na vyhodnotenie IC_{50}-hodnoty testovanej zlúčeniny.

Testovacie médium: Trometamín-NaCl-polyetylénglykol 6000 (TNP) tlmivý roztok
Referenčná zlúčenina: I2581 (Kabi)
Nosné médium: TNP tlmivý roztok. Rozpustiteľnosť sa môže podporiť dimetylsulfoxidom, metanolom, etanolom, acetonitrilom alebo *terc*-butylalkoholom, ktoré nemajú nepriaznivé účinky pri koncentráciách do 2,5 % v konečnej reakčnej zmesi.

Postup

Reakčné činidlá*: 1. Trometamín-NaCl (TN) tlmivý roztok [zloženie tlmivého roztoku: trometamín (Tris) 6,057 g (50 mmol), NaCl 5,844 g (100 mmol), voda do 1 l. pH roztoku je nastavené na hodnotu 7,4 pri teplote 37 °C prostredníctvom HCl (10

mmol.l^{-1})]; 2. TNP tlmivý roztok (polyetylénglykol 6000 sa rozpustil v TN tlmivom roztoku, čo poskytlo koncentráciu 3 g.l^{-1}); 3. S-2238 roztok [jedna ampulka S-2238 (25 mg; Kabi Diagnostica, Švédsko) sa rozpustila v 20 ml TN tlmivého roztoku, čo poskytlo koncentráciu 1,25 mg.ml^{-1} (2 mmol.l^{-1})]; 4. Trombínový roztok [ľudský trombín (16000 nKat/ampulku; Centraal Laboratorium voor Bloedtransfusie, Amsterdam, Holandsko) sa rozpustil v TNP tlmivom roztoku, čo poskytlo zásobný roztok 835 nKat.ml^{-1}. Bezprostredne pred použitím sa tento roztok zriedil s TNP tlmivým roztokom, čo poskytlo koncentráciu 3,34 nKat.ml^{-1}.]

* - všetky prísady sú analytickej kvality,

- na prípravu vodných roztokov sa použila ultračistá voda (Milli-Q kvalita).

Príprava roztoku testovanej a referenčnej zlúčeniny

Testovaná a referenčná zlúčenina sa rozpustili v Milli-Q vode, čo poskytlo koncentráciu zásobných roztokov 10^{-2} mol.l^{-1}. Každá koncentrácia sa krokovo nariedila nosným médiom, čo poskytlo koncentrácie 10^{-3}, 10^{-4} a 10^{-5} mol.l^{-1}. Riedenia, zahrnujúce zásobný roztok, sa použili v skúške (jednotlivé konečné koncentrácie v reakčnej zmesi: 3.10^{-3}; 10^{-3}; 3.10^{-4}; 10^{-4}; 3.10^{-5}; 10^{-5}; 3.10^{-6} a 10^{-6} mol.l^{-1}).

Postup

0,075 ml a 0,025 ml roztoku testovanej zlúčeniny alebo roztoku referenčnej zlúčeniny alebo nosného média sa pri teplote miestnosti striedavo pipetovalo do jamôk mikrotitračnej platne a tieto roztoky sa jednotlivo zriedili s 0,115 ml a 0,0165 ml TNP tlmivého roztoku. Do každej jamky sa pridal alikvot 0,030 ml S-2238 roztoku a platňa sa predhriala a predinkubovala za pretrepávania v inkubátore (Amersham) 10 minút pri teplote 37 °C. Po predinkubácii sa prídavkom 0,030 ml trombínového roztoku do každej jamky začala hydrolýza S-2238. Platňa sa inkubovala (za pretrepávania počas 30 sekúnd) pri teplote 37 °C. Každé dve minúty v priebehu 90 minút, pričom sa začalo po 1 minúte inkubácie, sa merala absorbancia každej vzorky pri 405 nm použitím kinetického čítača (Twinreader plus, Flow Laboratories) mikrotitračnej platne.

Všetky údaje sa zbierali v IBM osobnom počítači použitím LOTUS-MEASURE. Pre každú koncentráciu zlúčeniny (vyjadrenú v $mol.l^{-1}$ reakčnej zmesi) a pre slepú vzorku sa zakreslila absorbancia versus reakčný čas v minútach.

Ohodnotenie odoziev

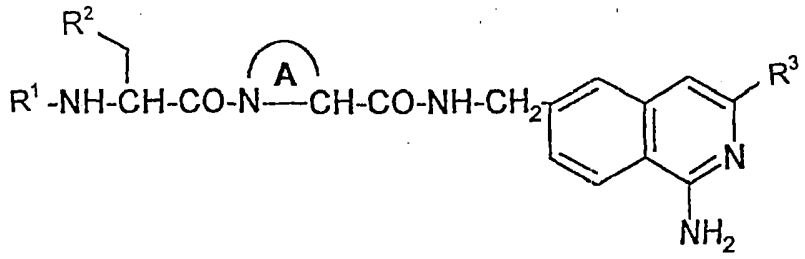
Pre každú konečnú koncentráciu sa zo získaného diagramu vypočítala maximálna absorbancia. Hodnota IC_{50} (konečná koncentrácia, vyjadrená v $mol.l^{-1}$, spôsobujúca 50% inhibíciu maximálnej absorbancie slepej vzorky) sa vypočítala použitím logaritmickej transformačnej analýzy podľa Hafnera a kol. (Arzneim.-Forsch./Drug Res. 1977; 27 (IT): 1871-3).

Antitrombínový účinok

Príklad	IC_{50} ($mol.l^{-1}$)
1	0,03
2	0,14
3	0,13
4	0,12
5	0,29

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Trombínový inhibítor všeobecného vzorca I



(I)

kde

R^1 je cyklopentyl, cyclohexyl alebo rozvetvený (C_{3-4})alkyl;

R^2 je cyklohexyl alebo fenyl;

R^3 je H alebo metyl; a

A je nesubstituovaný nasýtený 4, 5 alebo 6-členný kruh;

alebo jeho farmaceuticky prijateľná soľ.

2. Trombínový inhibítor podľa nároku 1, kde A je päťčlenný kruh.

3. Trombínový inhibítor podľa nároku 1, kde R^2 je cyklohexyl.

4. Trombínový inhibítor podľa nároku 1, kde R^3 je H.

5. Trombínový inhibítor podľa nároku 1, kde R^1 je cyklohexyl.

6. Trombínový inhibítor podľa nároku 5, kde R^1 je cyklohexyl, R^2 je cyklohexyl, R^3 je H a A je päťčlenný kruh.

7. Farmaceutický prostriedok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje trombínový inhibítor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6 a farmaceuticky prijateľné pomocné látky.

8. Trombínový inhibítor podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6 na použitie na liečenie.

9. Použitie trombínového inhibítora podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 6 na výrobu lieku na liečenie alebo prevenciu chorôb súvisiacich s trombínom.