

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. August 2002 (01.08.2002)

PCT

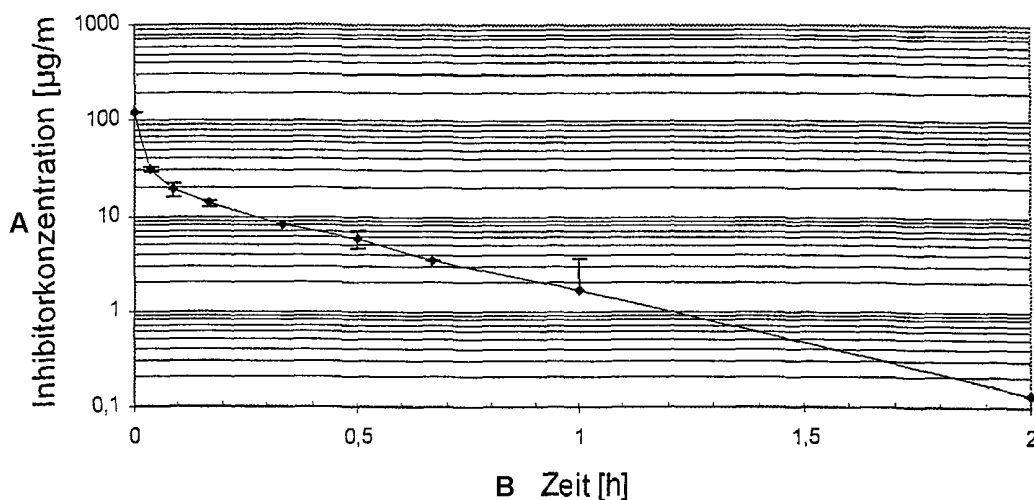
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/059065 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07C** (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STEINMETZER, Torsten** [DE/DE]; Ricarda-Huch-Weg 23, 07743 Jena (DE). **NOWAK, Götz** [DE/DE]; Kirchhoffweg 7, 99097 Erfurt (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00652
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Januar 2002 (23.01.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: **VOSSIUS & PARTNER**; Siebertstrasse 4, 81675 München (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): CA, JP, US.
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 02 878.4 23. Januar 2001 (23.01.2001) DE (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **HAEMOSYS GMBH** [DE/DE]; Winzerlaer Strasse 2a, 07745 Jena (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: OLIGO OR POLYALKYLENE GLYCOL-COUPLED THROMBIN INHIBITORS

(54) Bezeichnung: OLIGO- ODER POLYALKYLENGLYCOLKOPPELTE THROMBININHIBITOREN



A...INHIBITOR CONCENTRATION  
B...TIME

(57) Abstract: The invention relates to novel, covalent oligo and polyalkylene glycol conjugates containing synthetic inhibitors of trypsin-type serine protease, in particular inhibitors of the haemocoagulation protease thrombin. The invention also relates to synthetic intermediate stages required in the production of said conjugates and to the use of the latter for producing active agents for the treatment or prophylaxis of thrombotic complications.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neuartige, kovalente Oligo- und Polyalkylenglykolkonjugate mit synthetischen Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen, insbesondere Inhibitoren der Blutgerinnungsprotease Thrombin, synthetische Zwischenstufen zu deren Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Wirkstoffen für die Therapie oder Prophylaxe thrombotischer Komplikationen.

WO 02/059065 A2



**Erklärung gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für den folgenden Bestimmungsstaat US

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

### Oligo- oder Polyalkylenglycolgekoppelte Thrombininhibitoren

5 Die Erfindung betrifft neuartige, kovalente Oligo- und Polyalkylenglykolkonjugate mit synthetischen Inhibitoren trypsinartiger Serinproteasen, insbesondere Inhibitoren der Blutgerinnungsprotease Thrombin, synthetische Zwischenstufen zu deren Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Wirkstoffen für die Therapie oder Prophylaxe  
10 thrombotischer Komplikationen.

Die trypsinartige Serinprotease Thrombin ist das zentrale Enzym der Blutgerinnungskaskade. Unter anderem spaltet es Fibrinogen, wodurch ein Fibringerinnsel entsteht, dass durch folgende Quervernetzung, katalysiert durch Faktor XIIIa, stabilisiert  
15 wird (Davie et al., 1991 *Biochemistry* **30**, 10363-10370). Auch der Faktor XIIIa selbst wird durch die katalytische Wirkung des Thrombins aus seiner Zymogenform aktiviert. Thrombin kann die Blutgerinnungskaskade zusätzlich durch die Aktivierung der Faktoren V und VIII beschleunigen. Weiterhin ist Thrombin in der Lage, den auf der Thrombocytenoberfläche befindlichen Thrombinrezeptor spezifisch zu stimulieren, was zu  
20 einer Plättchenaktivierung führt. Zu hohe Thrombinaktivitäten können zu verschiedenen thrombotischen Komplikationen führen, wie z.B. Myocardinfarkt, tiefer Venenthrombose, peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten oder Lungenembolie. Thrombotische Komplikationen können auch bei Therapien auftreten, bei denen Blut in Kontakt mit nichtphysiologischen Oberflächen kommt, wie z.B. bei operativen Eingriffen, bei der  
25 Hämodialyse oder in Herz-Lungenmaschinen.

Durch die Verwendung des Thrombininhibitors Hirudin konnte nachgewiesen werden, daß spezifische Thrombinhemmer blutgerinnungshemmende Eigenschaften besitzen und für die Vermeidung thrombotischer Komplikationen geeignet sind (Markwardt, 1970 *Methods in Enzymol.* **19**, 924-932). Hirudin ist ein natürlich vorkommendes Protein, das aus dem  
30 medizinischen Blutegel isoliert wurde und seit einigen Jahren in rekombinanter Form vorliegt. Inzwischen wurde rekombinant hergestelltes Hirudin für einige Indikationen, wie z.B. zur Vermeidung von Thrombosen nach Hüftgelenksoperationen oder bei Heparin-induzierter Thrombocytopenia, zugelassen (Menear, 1999 *Expert Opinion on Investigational Drugs* **8**, 1373-1384).

35 Da rekombinante Proteine kostenintensiv hergestellt werden müssen, nur parenteral appliziert werden können und körperfremde Proteine eine antigene Wirkung besitzen, wird

intensiv an der Entwicklung niedermolekularer, synthetischer Thrombinhemmstoffe zur Verwendung als oral wirksame Antikoagulantien geforscht. Trotz intensiver Bemühungen sind bisher nur zwei niedermolekulare Thrombininhibitoren, Argatroban und Gabexate Mesilate, in Japan zugelassen, jedoch sind auch diese Verbindungen nur parenteral wirksam und besitzen eine sehr kurze Verweildauer im Blut. Argatroban erhielt im Jahr 2000 auch die Zulassung in den USA.

Aus der Literatur ist bekannt, dass man durch kovalente Konjugation mit Makromolekülen, wie z.B. Polysacchariden oder Polyethylenglykolen (PEG), die Verweildauer von Proteinen, Inhibitoren und anderen Wirkstoffen im Blut verlängern kann. Dies gilt z.B. auch für ein PEG-gekoppeltes Hirudin (Kurfürst et al., WO 91/08229) oder einen PEG-gekoppelten, niedermolekularen Thrombinhemmstoff basierend auf der CRC-220 (Stüber et al. *Peptide Research* **8**, 78-85, (1995); Stüber und Koschinsky EP 0658 585 A2). Beide PEG-Inhibitoren besitzen eine längere Halbwertszeit im Blut von Versuchstieren im Vergleich zu den freien, unmodifizierten Verbindungen.

Aus der Entwicklung niedermolekularer Thrombinhemmstoffe ist bekannt, dass man die für die Bindung notwendigen basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, als auch deren Mimetika 4-Amidinophenylglycin oder 3- und 4-Amidinophenylalanin durch geeignete decarboxylierte Analoga ersetzen kann, ohne dass ein Verlust an Thrombinaffinität auftritt. Beispiele dafür sind Verbindungen mit C-terminalem Agmatin (D-Phe-Pro-Agmatin; Bajusz et al., 1982 *Folia Haematol., Leipzig* **109**, 16-21), Noragmatin (Inogatran; Teger-Nilsson, WO 93/11152), 4-Amidinobenzylamin (Melagatran, Antonsson et al., WO 94/29336 oder Böhm et al., US 5,852,051) oder 4-Aminomethyl-N(Amidino)Piperidin Sanderson et al., 1997 *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7**, 1497-1500).

Ein Problem bei der Anwendung von Thrombininhibitoren ist oftmals, dass die Leber diese Stoffe rasch aufnimmt, metabolisiert und sezerniert. Dabei können neue Metabolite mit unerwünschten Nebenwirkungen entstehen, die teilweise wieder in den Blutkreislauf abgegeben werden und so z.B. für eine Medikamentenentwicklung nur bedingt geeignet sind. Eine Aufnahme in die Leber wurde z. B. für Thrombininhibitoren aus völlig verschiedenen Substanzklassen gezeigt, wie z.B. für CRC220, TAPAP, NAPAP, Argatroban oder Efegatran.

- Überraschenderweise konnten wir feststellen, dass die hier beschriebenen Oligo- oder Polyalkylenglykol-gebundenen Inhibitoren (Inhibitor-Konjugate) in verstärktem Maß bzw. nahezu vollständig über die Niere eliminiert werden. Das heißt, dass die kovalente Kopplung eines Oligo- oder Polyalkylenglykolanteils an die von uns verwendeten niedermolekularen, synthetischen Thrombininhibitoren deren Ausscheidungsweg verändert. Gleichzeitig erhöht sich die Verweildauer der Inhibitor-Konjugate im Blut im Vergleich zu den freien Inhibitoren und damit auch ihre gerinnungshemmende Wirkung, die strikt von der Konzentration im Blut abhängig ist (Hauptmann und Stürzebecher, 1999 *Thrombosis Research* **93**, 203-241).
- 10 Unter der Bezeichnung Inhibitor werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung Moleküle verstanden die spezifisch an das aktive Zentrum des Zielenzym binden und so zu dessen Hemmung führen. Werden solche Moleküle zusammen mit Oligo- oder Polyalkylenglykolen in die erfindungsgemäßen Inhibitor-Konjugate integriert, so bilden sie die Inhibitorstruktur, d.h. den Teil der erfindungsgemäßen Konjugate, dessen Struktur eine spezifische Wechselwirkung mit dem Zielenzym erlaubt. Als bivalente Inhibitor-Konjugate werden solche bezeichnet, deren Oligo- oder Polyalkylenanteil mit zwei Inhibitorstrukturen verknüpft ist.

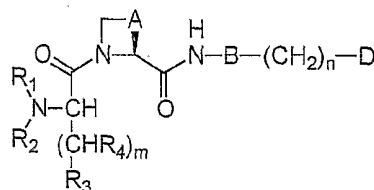
- Wir haben gefunden, dass man durch Einbau von decarboxylierten, basischen P1-Resten in Oligo- und Polyalkylenglykol-gekoppelte Verbindungen hochpotente Thrombininhibitor-Konjugate erhalten kann. Zusätzlich haben wir gefunden, dass man auch Thrombininhibitoren mit Oligo- und Polyalkylenglykolen modifizieren kann, die als P1-Rest substituierte Arginylketonderivate besitzen. Bei Einsatz solcher Verbindungen ist man weder auf das im aus dem Stand der Technik bekannten PEG-gekoppelten CRC-220 verwendete, kostenintensive D-4-Amidinophenylalanin noch auf nur unter großem Aufwand herzustellendes rekombinantes Hirudin angewiesen.

- Diese Oligo- und Polyalkylenglykol-gekoppelten Inhibitoren werden im Gegensatz zu den freien Inhibitoren nicht bzw. nur in geringem Umfang in die Leberzellen aufgenommen und dort verstoffwechselt oder in die Galle überführt, sondern fast ausschließlich über die Niere eliminiert. Nach subkutaner Applikation der Oligo- und Polyalkylenglykol-gekoppelten Inhibitoren wurden lang anhaltende und für eine Gerinnungshemmung notwendige Blutspiegel der Inhibitoren bestimmt und es wurde festgestellt, dass hierfür die stark verzögerte Transferrate der Substanzen zwischen Extravasalraum und Intravasalraum verantwortlich

ist. Die gleichmäßige Verteilung nach Resorption aus einem subkutanen Injektionsdepot führt zu einem ausschließlichen Ausfüllen des extrazellulären Wasserraumes, da die Kopplung der Inhibitoren mit Oligo- oder Polyalkylenglykolen zu Substanzen mit vergrößerten Hydrathüllen führt.

5

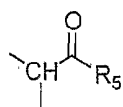
Die von uns entwickelten Verbindungen besitzen die allgemeine Struktur (I)



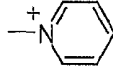
10 wobei

A entweder eine Methylen-, Ethylen oder Propylengruppe ist und der damit gebildete Ring  
 15 entweder unsubstituiert oder mit einer Hydroxylgruppe substituiert sein kann, die gegebenenfalls mit einem Alkyl- oder Aralkylrest verethert ist, oder eine der Gruppen  $-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{SO}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-$  ist;

20 B eine Bindung oder



ist, wobei  $\text{R}_3$  ein Alkylrest ist der 1 bis 4, bevorzugt 1 oder 2 und besonders bevorzugt ein C-Atom umfasst und mit einem oder mehreren gleichen oder unterschiedlichen

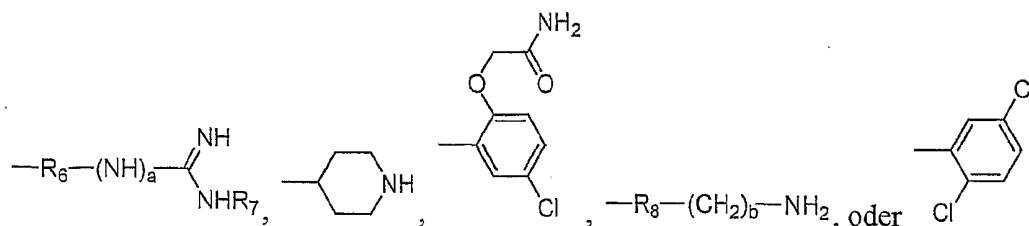
Halogenatomen, bevorzugt Cl oder F, oder mit einem Rest  substituiert sein kann;

25

$n$  0, 1, 2, 3, 4 oder 5 ist,

30

D einen Rest



darstellt, wobei  $R_6$  und  $R_8$  unabhängig voneinander bivalente Reste sind, ausgewählt aus

- 5 aromatischen oder gesättigten 6-Ringen, die neben Kohlenstoff noch ein Heteroatom, bevorzugt ein Stickstoffatom, enthalten können und einen oder mehrere gleiche oder unterschiedliche Alkylsubstituenten tragen können, und  $R_6$  darüberhinaus  $-NH-$  sein kann falls  $a$  0 ist,  $R_7$  ein Wasserstoffatom oder  $-NH_2$  ist und  $a$  0 oder 1 und  $b$  0, 1 oder 2 ist;

- 10  $R_1$  ein Wasserstoffatom oder ein Arylsulfonyl-, Aralkylsulfonyl-, Cycloalkylmethylsulfonyl-, Cycloalkylethylsulfonyl- oder ein Alkylsulfonylrest ist, deren Arylteil gegebenenfalls einen, zwei, drei, vier oder fünf Substituenten, die unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten, tragen kann, oder mit einem weiteren Arylrest verknüpft ist;

15

und entweder

$R_2$   $-(CH_2)_p-CO-NH-(CH_2)_q-X$ ,  $-(CH_2)_r-NH-CO-(CH_2)_s-V-X$  oder  $-(CH_2)_r-NH-CO-O-(CH_2)_s-V-X$  ist

wobei

- 20  $p$  eine ganze Zahl von 1 bis 5 und  $q$  eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist,

$r$  eine ganze Zahl von 2 bis 5 und  $s$  ist eine ganze Zahl von 1-5 ist,

$V$  eine Bindung oder  $-CO-NH-(CH_2)_c-$  und  $c$  eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist, und

$X$  einen Oligo- oder Polyalkylenglykol der Struktur  $-[O-(CH_2)_d]_e-OZ$  oder  $-[O-CH(CH_3)-CH_2]_e-OZ$  oder einen Cyclus der Struktur  $-CH-(CH_2)_{f-1}-[O-(CH_2)_f]_g-O$  darstellt und  $d$

25

eine ganze Zahl von 2 bis 6,  $e$  eine ganze Zahl von 3 bis 1000,  $Z$  ein Wasserstoffatom oder ein Alkylrest ist oder die gesamte Inhibitorstruktur repliziert, die an die freie Valenz des Restes  $X$  gebunden ist,  $f$  eine ganze Zahl von 2 bis 6 ist und  $g$  eine ganze Zahl von 3 bis 10, bevorzugt 3-7 ist; und

$R_3$  ein Phenyl- oder Cyclohexylrest ist, der mit 1 bis 5 gleichen oder unterschiedlichen Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten oder Hydroxylgruppen substituiert sein kann und

5  $R_4$  ein Wasserstoffatom, Phenyl- oder Cyclohexylrest ist, der mit 1 bis 5 gleichen oder unterschiedlichen Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten oder Hydroxylgruppen substituiert sein kann, wobei das Wasserstoffatom bevorzugt wird wenn  $m$  größer als 1 ist,

$m$  0, 1, 2, 3 oder 4 ist und

am mit \* gekennzeichneten Kohlenstoffatom eine D-Konfiguration vorliegt;

10

oder

$R_2$  ein Wasserstoffatom ist und

15  $R_3$   $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_q-\text{X}$ ,  $-\text{CO}-\text{W}_1-\text{W}_2-(\text{CH}_2)_q-\text{X}$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_s-\text{V}-\text{X}$ ,  
 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-(\text{CH}_2)_s-\text{V}-\text{X}$ ,  $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_t-\text{X}$  oder  $-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{X}$  ist,

wobei  $q$ ,  $s$   $X$  und  $V$  wie vorstehend definiert sind und  $t$  eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist, und der Rest  $W_1$   $-\text{O}-$  oder  $-\text{NH}-$  ist, und  $W_2$  eine Bindung darstellt oder die Struktur  $-(\text{CH}_2)_v-\text{Ph}-$   $(\text{CH}_2)_{v'}$ -Amid- aufweist, in der  $v$  und  $v'$  unabhängig von einander 0, 1 oder 2 sind,  $\text{Ph}$  einen 1,2-, 1,3- oder 1,4-substituierten Phenylrest und Amid  $-\text{HN}-(\text{O})\text{C}-$  oder  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$  darstellt,

20  $R_4$  ein Wasserstoffatom ist,

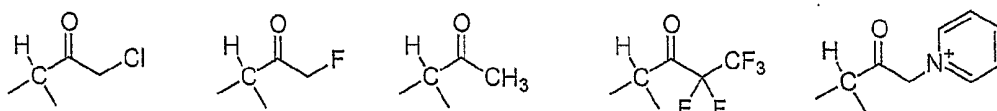
$m$  1, 2, 3, 4 oder 5 ist und

am mit \* gekennzeichneten Kohlenstoffatom eine L-Konfiguration vorliegt.

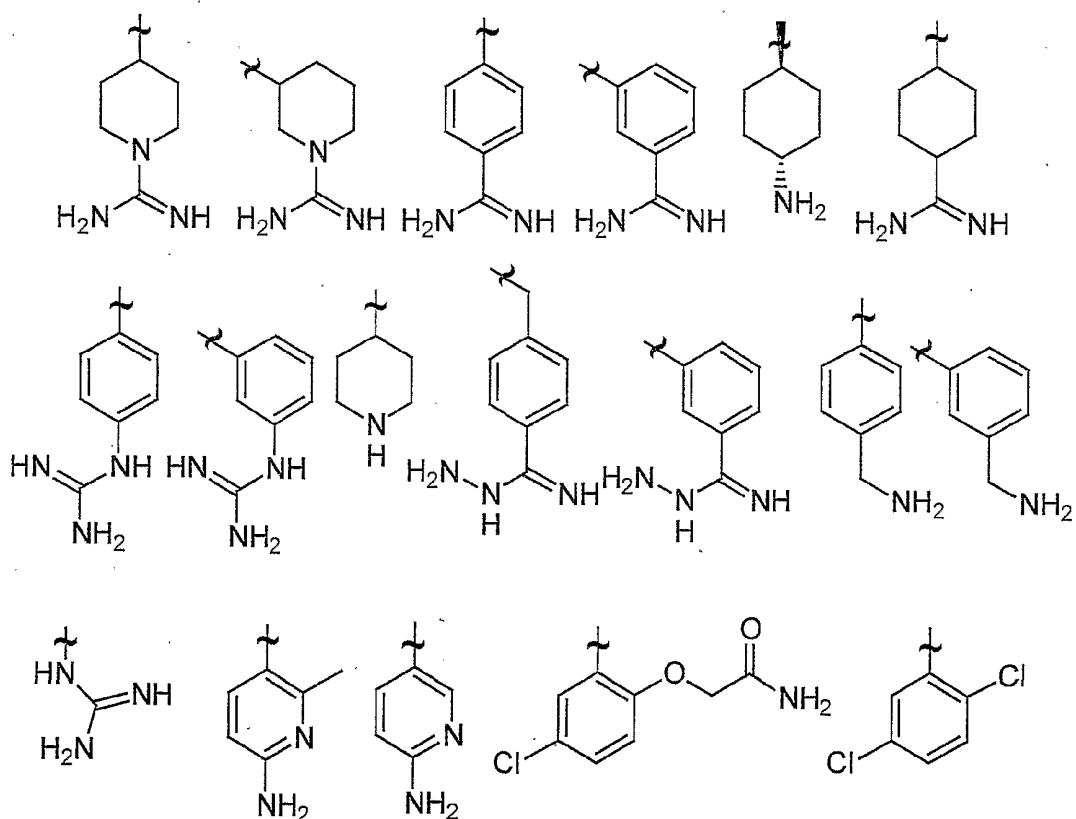
25 Trägt die Ringstruktur, die A umfasst, einen Substituenten, so befindet sich dieser im Falle eines 5-Ringes bevorzugt an Position 4, im Falle eines 6-Ringes bevorzugt an einer der Positionen 4 oder 5. 5-Ringe, in deren Ringstruktur durch A ein zweites Heteroatom eingefügt wird, tragen dieses Heteroatom vorzugsweise in der Position 4. Bildet A zusammen mit seinen Valenzen einen 4-Ring, so ist dieser vorzugsweise unsubstituiert.

30 Bevorzugt stellt B in der allgemeinen Formel (I) eine Bindung oder eine der folgenden Strukturen dar:





- 5 Im Rest D in der allgemeinen Formel (I) ist R<sub>6</sub> bevorzugt 1,4-Piperidindiyl, 1,3-Piperidindiyl, 1,4-Phenylen, 1,3-Phenylen, 1,4-Cyclohexandiyl, 1,3-Cyclohexandiyl oder -NH-. R<sub>8</sub> ist bevorzugt 1,4-Phenylen, 1,3-Phenylen, 1,4-Cyclohexandiyl, 1,3-Cyclohexandiyl oder 2,5-Pyridindiyl.
- 10 Besonders bevorzugt sind für D die folgenden Strukturen, die über die mit ~ markierte Bindung mit dem Rest der allgemeinen Struktur (I) verknüpft sind



Bevorzugte Substituenten des Arylanteils von R<sub>1</sub> sind Methyl, Ethyl, Propyl, Methoxy oder Ethoxygruppen. Als Halogenatome werden bevorzugt Cl, Br oder F eingesetzt. Bevorzugte  
20 Reste R<sub>1</sub> sind damit beispielsweise 3-Methoxy-phenylsulfonyl, 3,4-Dichlor-phenylsulfonyl,

Benzylsulfonyl, 3,4-Dimethoxy-phenylsulfonyl, 2,4,5-Trichlor-phenylsulfonyl, 2-Naphtylsulfonyl, 4-Chlor-phenylsulfonyl, Pentamethyl-phenylsulfonyl, 2,4,6-Triisopropyl-phenylsulfonyl. Als besonders bevorzugter Rest  $R_1$  ist ein 4-methoxysubstituierter Phenylsulfonylrest zu nennen, oder ein 4-methoxy-substituierter Phenylsulfonylrest, der an Position 3  
5 zusätzlich mit einem Chloratom oder mit einer Methylgruppe substituiert ist. Er kann auch an den Positionen 2, und/oder 6 gegebenenfalls weitere Methylreste tragen.

Der von X umfasste Oligo- oder Polyalkylenglykolanteil der erfindungsgemäßen Verbindungen wird bevorzugt durch ein Polyethylenglykol oder Polypropylenglykol dargestellt,  
10 d.h. die Parameter d und f sind vorzugsweise 2 oder 3. Bevorzugte Kettenlängen ergeben sich aus Werten des Parameters e von 3 und 500, besonders bevorzugt hat das resultierende Polyalkylenglykol ein mittleres Molekulargewicht, das zwischen 750 und 20000 Da liegt, insbesondere um 750, 2000, 3000, 3400, 5000 6000, 10000 oder 20000 Da. Bildet X eine cyclische Struktur, d.h. einen Kronenether der Struktur  $-\text{CH}-(\text{CH}_2)_{f-1}-[\text{O}-(\text{CH}_2)_g]_g-\text{O}-$ , so  
15 nimmt f ebenfalls bevorzugt die Werte 2 und 3 an. Besonders bevorzugte Werte für g sind hier 3, 4, 5 oder 6.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass die Wirkung solcher Kronenether der von Polyalkylenglykolketten eines erheblich höheren Molekulargewichtes entspricht. So  
20 besitzen beispielsweise Kronenetherkonjugate die aus 5 PEG-Einheiten aufgebaut sind eine Eliminierungskinetik im Blut von Ratten, die der von Polyethylenglykol (PEG)-Konjugaten mit einem Molekulargewicht des PEG Anteils von 5000 bis 10000 Da entspricht. Darüber hinaus stellen Kronenether im Vergleich zu linearen Polyalkylenglykolen, die notwendigerweise eine gewisse Breite der Molekulargewichtsverteilung aufweisen,  
25 chemisch einheitlich definierte Verbindungen dar, was insbesondere bei der Bereitstellung von Medikamenten Vorteile mit sich bringt.

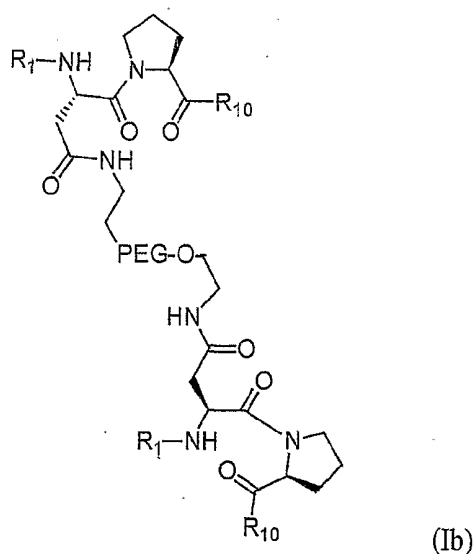
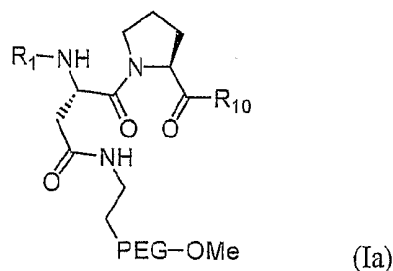
Besitzt X die Struktur  $-\text{[O}-(\text{CH}_2)_d]_e-\text{OZ}$  oder  $-\text{[O-CH(CH}_3\text{)-CH}_2]_e-\text{OZ}$  und wird Z so gewählt, dass es der Inhibitorstruktur entspricht, an welche der Rest X mit seiner freien  
30 Valenz gebunden ist, die sich an dem Ende der Oligo- oder Polyalkylenglykolstruktur befindet, welche Z entgegengesetzt liegt, so entsteht ein zweifach inhibitorfunktionalisiertes Oligo- oder Polyalkylenglykol. Mittels solcher bifunktionalen Konjugate läßt sich die Hemmwirkung bezogen auf die Anzahl der vorhandenen Moleküle der Struktur (I) erhöhen. Dies kann unter anderem bei der Modifizierung von Oberflächen mit Molekülen der

Struktur (I) von Vorteil sein, wenn eine möglichst hohe Inhibitordichte pro Flächeneinheit erreicht werden soll.

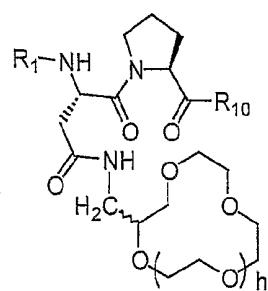
Soweit nicht gesondert definiert bezieht sich der Begriff "Alkyl-" im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf lineare oder verzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> Alkylreste, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, besonders bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>. Cycloalkylreste beinhalten 3-8, bevorzugt 3 bis 6 C-Atome. "Alkoxy-" bezieht sich auf solche Reste, deren Kohlenstoffkette 1 bis 8, bevorzugt 1 bis 5, besonders bevorzugt 1 bis 3 C-Atome umfasst. "Aralkyl-" beschreibt Strukturen mit 7 bis 19, bevorzugt 7 bis 13, besonders bevorzugt 7 bis 9 C-Atomen. Arylreste sind Reste mit 6 bis 18, bevorzugt 6 bis 12, besonders bevorzugt 6 C-Atomen. Diese Definition gilt unabhängig voneinander für jeden Fall des Auftretens der obigen Bezeichnungen.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung die folgenden Verbindungen der Formel (Ia-h)

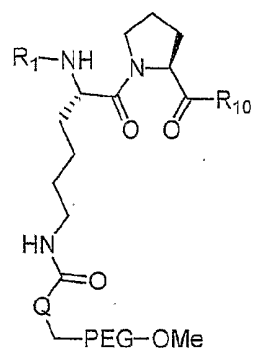
15



20

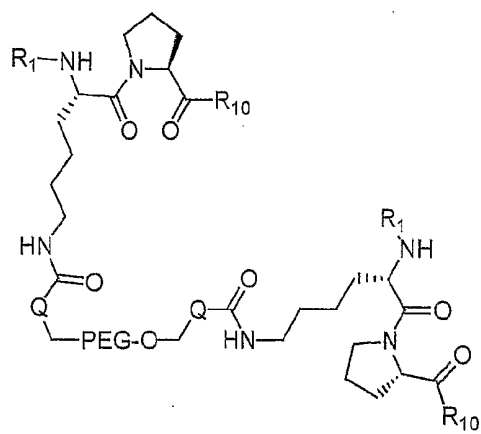


(Ic)



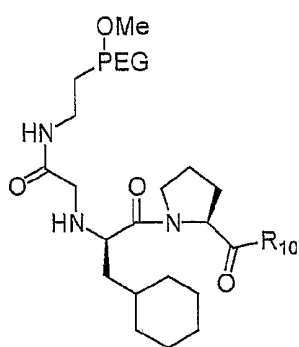
5

(Id)



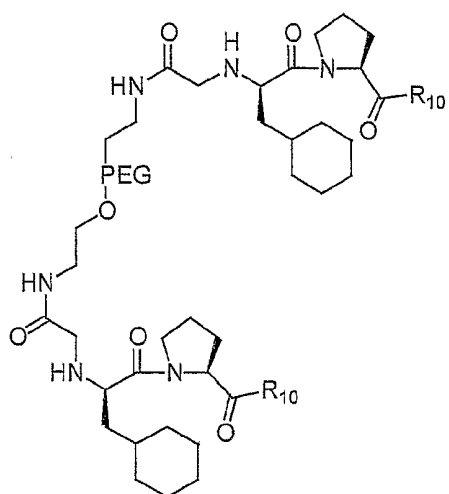
10

(Ie)

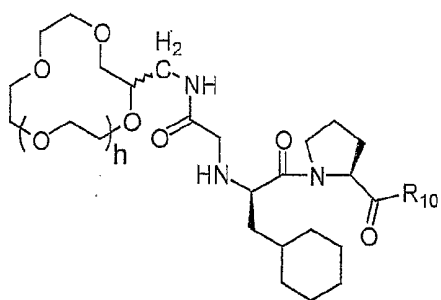


(If)

5



(Ig)



(Ih)

10

in denen R<sub>1</sub> ein 4-Methoxy-phenylsulfonyl-, 4-Methoxy-3-Chlor-phenylsulfonyl-, 4-Methoxy-3-Methyl-phenylsulfonyl- oder 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenylsulfonylrest (Mtr) ist,

15 Q -(CH<sub>2</sub>)<sup>s'</sup>- mit s' = 0, 1, 2, 3 oder 4, -O-CH<sub>2</sub>- oder -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub> ist und

PEG eine Polyethylenglykolstruktur der Formel  $-\text{[O-C}_2\text{H}_4\text{]}_i-$  darstellt, mit Werten für i von 3 bis 1000, bevorzugt 3 bis 500, wobei solche Werte für i bevorzugt sind, die ein durchschnittliches Molekulargewicht des PEG um von 750 bis 20000 Da, bevorzugt um 750, 2000, 3000, 3400, 5000, 6000, 10000 oder 20000 Da ergeben. Die Variable h steht für 1, 2, 3 oder 4 und R<sub>10</sub> ist

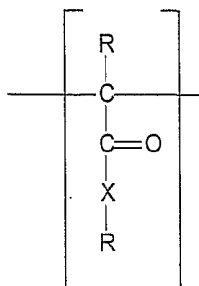


Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) werden in einer pharmazeutisch geeigneten, nicht-toxischen Salzform hergestellt, wie z. B. als Hydrochlorid-, Hydrobromid-, Acetat-, Lactat-, Zitrat-, Tosylat- oder Trifluoracetat-Salz. Sie können in den gebräuchlichen galenischen Applikationsformen fest oder flüssig angewendet werden, z.B. als Lösungen, Sprays, Salben oder Cremes. Diese werden in üblicher Weise hergestellt. Die Wirkstoffe können dabei mit den üblichen galenischen Hilfsmitteln wie Füllstoffen, Konservierungsmitteln, Fließregulierungsmitteln, Netzmitteln, Dispergiermitteln, Emulgatoren, Lösungsmitteln und/oder Treibgasen verarbeitet werden (vgl. H. Sucker et al., Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1978).

Die Verbindungen können in üblicher Weise oral oder parenteral (subkutan, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal) verabreicht werden. Sie können für diagnostische Zwecke verwendet werden oder sind auch für biotechnologische Prozesse, wie z.B. Affinitätsreinigungen von Proteasen oder das Entfernen von Proteasen aus Lösungen jeglicher Art geeignet.

Verbindungen der Struktur (I) sind auch besonders für eine Beschichtung oder Modifikation der Oberfläche makromolekularer Träger geeignet, um die Gerinnung an diesen Trägern zu verhindern bzw. zu reduzieren. Diese makromolekularen Träger, insbesondere Oberflächen medizinischer Gegenstände und Geräte wie z.B. Hämodialysatoren, Oxygenatoren und deren Schlauchsysteme, bestehen bevorzugt aus Polymethylmethacrylat, Copolymeren mit Polymethylmethacrylat und analogen Kunststoffen, wie sie in WO 98/46648 (Bucha und Nowak) definiert sind. Zum Einsatz kommen hier Homo- oder Copolymere, zu deren Herstellung mindestens ein Monomertyp eingesetzt wird, der neben einer polymerisierbaren Doppelbindung oder einer polykondensierbaren funktionellen Gruppe eine weitere

Carbonylgruppe in Form eines Ketons oder eines Carbonsäurederivats enthält, die nicht an der Polymerisationsreaktion teilnimmt. Bevorzugt enthält das Polymer eine wiederkehrende Einheit der Formel (A):



- 5 wobei die Reste R gleich oder verschieden sein können und einen Alkyl oder Arylrest oder ein Wasserstoffatom darstellen. Der Alkylrest kann linear oder verzweigt sein und besteht bevorzugt aus 1 bis 20 Kohlenstoffatomen. Der Arylrest besteht bevorzugt aus 6 bis 18, besonders bevorzugt aus 6 bis 12 Kohlenstoffatomen. Der Rest X ist fakultativ und bedeutet O, N oder CH<sub>2</sub>. Für den Fall X = N trägt N zusätzlich zu dem in Formel (A) vermerkten  
 10 einen weiteren Rest R, der unabhängig von den anderen Resten R wie vorstehend definiert ist.

- Besonders bevorzugt als Alkylrest ist ein geradkettiger oder verzweigter, gegebenenfalls substituierter C<sub>1-8</sub>-Alkylrest, beispielsweise ein Methyl-, Ethyl- oder Propylrest. Beispiele  
 15 für gegebenenfalls vorhandene Substituenten umfassen ein oder mehrere Halogenatome, z.B. Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodatome oder Hydroxylgruppen, C<sub>1-6</sub>-Alkylreste oder C<sub>1-6</sub>-Alkoxyreste oder C<sub>1-6</sub>-Alkylthiolreste. Der Arylrest ist besonders bevorzugt ein monocyclischer oder bicyclischer, gegebenenfalls substituierter Arylrest, der gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome enthalten kann. Beispiele für solche Arylreste sind Phenyl, 1-  
 20 oder 2-Naphthyl, Indenyl- oder Isoindenylreste. Beispiele für heteroatomhaltige Arylreste sind C<sub>3-9</sub>-Heteroarylreste, die Heteroatome, ausgewählt aus Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatomen, enthalten. Monocyclische Heteroarylreste umfassen beispielsweise Pyrolyl-, Furyl-, Thienyl-, Imidazolyl-, N-Methylimidazolyl-, N-Ethylimidazolyl-, Benzo-thiazolyl-, Chinazolinyl-, Naphthylpyridinyl-, Chinolinylnyl-, Isochinolinylnyl- und  
 25 Tetrazolylreste.

Ein bevorzugtes Polymer, das solche Gruppen enthält, ist ein Polyalkylmethacrylat (PAMA) mit einem Alkylrest, der vorzugsweise 1-6 C-Atome umfasst, wie z.B.

Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyethylmethacrylat (PEMA) oder Polypropylmethacrylat. Weiterhin können Polyvinylacetat, Polycyclohexylmethacrylate oder Polyphenylmethacrylat eingesetzt werden. Besonders bevorzugt wird Polymethylmethacrylat eingesetzt.

5

Auch Copolymere oder Polymermischungen aus beliebigen Anteilen der vorstehend genannten Polymere untereinander oder mit einer oder mehrerer weiterer Polymerkomponenten, beispielsweise Polystyrol, Polyacrylnitril oder Polyamiden können eingesetzt werden. Bevorzugt beträgt der Anteil der Monomere, die ein Strukturelement (A) aufweisen an solchen Mischpolymeren mindestens 20 %, besonders bevorzugt mindestens 40 % und ganz besonders bevorzugt mindestens 60 %.

10

Zur Modifikation solcher Oberflächen wird die Oberfläche mit den erfindungsgemäßen Inhibitor-konjugaten, z.B. in Form einer Lösung, in Kontakt gebracht. Dabei können auch Gemische unterschiedlicher Inhibitor-konjugate der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden.

15

#### Experimentelle Methoden:

20 Abkürzungen

ACN = Acetonitril

Amba = Amidinobenzylamid

Cha = Cyclohexylalanin

CKIBE = Chlorkohlensäureisobutylester

25 DIEA = Diisopropylethylamin

DMF = Dimethylformamid

EE = Essigsäureethylester

AcOH = Essigsäure

HBTU = 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium Hexafluorophosphat

30 4-MeO-bs = 4-Methoxy-benzensulfonyl

4-MeO-3-Cl-bs = 4-Methoxy-3-Chlor-benzensulfonyl

4-MeO-3-Me-bs = 4-Methoxy-3-Methyl-benzensulfonyl

Mtr = 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-benzensulfonyl

NMM = N-Methyl-Morpholin



OSu = Succinimidester

OtBu = tert. Butylester

PyBOP = Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat

TFA = Trifluoressigsäure

5 THF = Tetrahydrofuran

Analytische HPLC: Shimadzu LC-10A System, Säule: Vydac C<sub>18</sub>, 5 µm (250 x 4 mm)

Lösungsmittel A: 0,1 % TFA in Wasser, B: 0,1 % TFA in ACN, Gradient: 10 % B bis 60 % B in 50 min, 1 ml/min Fluß, Detektion bei 220 oder 215 nm.

10

Präparative HPLC: Shimadzu LC-8A System, Säule: Vydac C<sub>18</sub>, 10 µm (250 x 22 mm)

Lösungsmittel A: 0,1 % TFA in Wasser, B: 0,1 % TFA in ACN, Gradient: 20 % B bis 65 % B in 120 min, 10 ml/min Fluß, Detektion bei 220 nm.

15 Massenspektroskopie:

Die Massenspektren wurden auf einem Compact Probe der Firma Kratos (Manchester, England) mit einem Flugzeitmessungsdetektor und  $\alpha$ -Cyano-Hydroxyzimtsäure als Matrix gemessen.

20 Bestimmung der kinetischen Konstanten

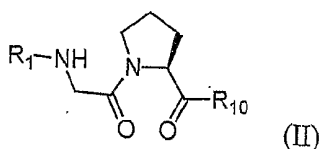
Zur Bestimmung der Thrombinhemmwirkung durch alle reversibel bindenden Inhibitoren und Inhibitor-Konjugate mit Hemmkonstanten  $\geq 1$  nM wurden 175 µl Tris-Puffer (0,05 mM, 0,1 M NaCl, pH 7,8; enthält den Inhibitor) und 50 µl Substrat (d-Phe-Gly-Arg-pNA in H<sub>2</sub>O, Konzentrationen im Messansatz 360, 120 und 60 µM) bei Raumtemperatur

25 gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl humanes  $\alpha$ -Thrombin (Kordia, finale Thrombinkonzentration im Messansatz 0,16 nM) gestartet. Über einen Zeitraum von 5 min wurde die Änderung der Absorption bei 405 nm mittels eines Microplate Readers (Labsystems iEMS Reader MF) bestimmt. Nach Berechnung der Anstiege (Reaktionsgeschwindigkeiten) wurden die K<sub>i</sub>-Werte nach Dixon (Biochem. J. 55, 170-171, 30 1953) durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K<sub>i</sub>-Werte sind das Mittel aus mindestens drei Bestimmungen.

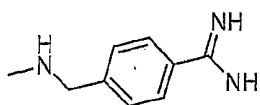
Auf analoge Weise wurden die K<sub>i</sub>-Werte für Trypsin bestimmt.

Zur Bestimmung der Thrombinhemmwirkung durch alle reversibel bindenden Inhibitoren und Inhibitor-Konjugate mit Hemmkonstanten kleiner 1 nM wurde ein

- Fluoreszenzspektrometer (LS50B der Firma Perkin Elmer) verwendet. Der Messansatz besteht aus 880  $\mu$ l Tris-Puffer (0,05 mM, 0,1 M NaCl, pH 7,8; enthält den Inhibitor, die Inhibitorkonzentration im Messansatz ist größer 200 pM) und 100  $\mu$ l Substrat (Tos-Gly-Pro-Arg-AMC, Konzentrationen im Messansatz 5-30  $\mu$ M). Die Messung wird durch Zugabe von 20  $\mu$ l humanes  $\alpha$ -Thrombin (Kordia, finale Thrombinkonzentration im Messansatz 21 pM) gestartet. Über einen Zeitraum von 7 min wurde die Zunahme der Fluoreszenzintensität verfolgt ( $\lambda_{\text{Ex}}$  365 nm,  $\lambda_{\text{Em}}$  455 nm). Nach Berechnung der Anstiege (Reaktionsgeschwindigkeiten) wurden die  $K_i$ -Werte nach Dixon (Biochem. J. 55, 170-171, 1953) durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die  $K_i$ -Werte sind das Mittel aus mindestens drei Bestimmungen.
- Wurde für die Inhibitoren ein slow-binding beobachtet, erfolgte die Auswertung analog einer früher beschriebenen Prozedur (Steinmetzer et al., Potent bivalent thrombin inhibitors: Replacement of the scissile peptide bond at P1-P1' with arginyl ketomethylene isosteres. J. Med. Chem. (1999) 42, 3109-3115).
- Für die Optimierung der Inhibitor-Konjugate, insbesondere aus den nachfolgenden Beispielen 1 und 2, wurde nach geeigneten Resten  $R_1$  gesucht, die eine möglichst starke Thrombinhemmung ermöglichen. Um die Selektivität der Verbindungen zu untersuchen wurden auch die Hemmkonstanten für Trypsin bestimmt. Je größer der Quotient  $[K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}]$ , desto selektiver ist die Verbindung als Thrombininhibitor. Um die Synthese zu erleichtern, wurde diese Optimierung zunächst ohne Kopplung mit einem Polyalkylenglykolrest an Inhibitormolekülen der Formel (II), wie in Tabelle I aufgeführt, vorgenommen. Diese Verbindungen, die selbst als Thrombininhibitoren aktiv sind, können als synthetische Zwischenstufen für die Inhibitor-konjugate der Formel (I) verwendet werden. Als zentraler Baustein wurde konstant ein Glycyl-Prolyl-Dipeptid in die Inhibitoren eingebaut.



Die Ergebnisse der Selektivitätsbestimmung sind für beispielhafte Verbindungen in Tabelle I gezeigt; wobei  $R_{10}$  für die Verbindungen der Tabelle die Struktur



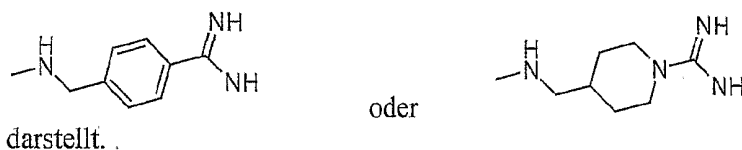
einnimmt.

Tabelle 1:

Nr.	R <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> Thrombin (nM)	K <sub>i</sub> Trypsin (nM)	K <sub>i</sub> Trypsin/ K <sub>i</sub> Thrombin
1a	4-Methoxy-3-Chlor-bs	0,44	20	45
1b	4-Methoxy-3-Methyl-bs	0,64	13	20
1c	4-Methoxy-bs*	0,97	22,7	23,4
2	Mtr**	1,3	15,7	12,1
3	3-Methoxy-bs	1,9	3	1,6
4a	3,4-Dichlor-bs	2,5	5,8	2,3
4b	3-Methyl-bs	2,8	8	2,9
5	3-Chlor,4-Methyl-bs	3,5	6,2	1,8
6	Benzylsulfonyl	3,6	7,4	2,1
7	3-Chlor-bs	3,8	3,7	0,97
8	3,4-DiMethoxy-bs	4,7	19,6	4,2
9	2,4,5-TriChlor-bs	5,9	19,5	3,3
10	1-Naphthylsulfonyl	7,8	3,9	0,5
11	3,5-DiChlor-bs	8,5	3,4	0,4
12	2-Naphthylsulfonyl	8,5	58	6,8
13	4-Chlor-bs	10,0	27,3	2,7
14	2,4-DiChlor, 5-Methyl-bs	10,5	11,8	1,1
15	Bs	10,8	10,4	0,96
16	PentaMethyl-bs	12,7	27,8	2,2
17	2,3-DiChlor-bs	12,7	11,1	0,87
18	2,3,5,6-TetraMethyl-bs	13,4	34,0	2,5
19	2,4,6-TriIsopropyl-bs	13,5	9,1	0,67
20	Cyclohexylmethylsulfonyl	13,6	3,1	0,22
21	2,4-DiChlor-bs	15,1	17,5	1,2
22	4-Methyl-bs	16,1	14,2	0,88
23	2,3,4-TriChlor-bs	16,4	11,7	0,71
24	2,4,6-TriMethyl-bs	16,6	13,4	0,80
25	2,4-DiChlor, 6-Methyl-bs	16,9	19	1,1
26	4-Ethyl-bs	19,1	50,2	2,6
27	2-Chlor-bs	19,3	19,1	0,98
28	Pbf***	30,3	37,1	1,2
29	4-tert.Butyl-bs	32,2	10,4	0,32
30	3-Nitro-bs	38,0	16,1	0,42
31	Phenylethylsulfonyl	41,9	16,5	0,39
32	trans-Styrensulfonyl	44,3	2,1	0,05
33a	3-Cyano-bs	48	22,5	0,47
33b	4-Ethoxy-bs	66	28	0,42
34	4-Cyano-bs	76	24,9	0,33
35	4-Nitro-bs	115	12,6	0,11

\*bs = Benzensulfonyl; \*\*Mtr = 2,3,6-Trimethyl-4-methoxy-bs, \*\*\*Pbf = 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-Sulfonyl

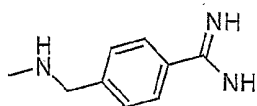
Als besonders geeignete Thrombininhibitoren mit guter Trypsinselektivität erwiesen sich die Verbindungen der Struktur (II), bei denen R<sub>1</sub> einen 4-Methoxy-3-Chlor-benzensulfonyl-, 4-Methoxy-3-Methyl-benzensulfonyl-, 4-Methoxy-benzensulfonyl- oder 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenylsulfonylrest und R<sub>10</sub> einen Rest



10

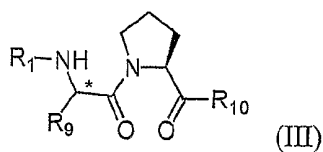
In Folge dieser Arbeiten wurde das Glycin durch trifunktionelle Aminosäuren ausgetauscht. Selektivitätswerte für die entstehenden Verbindungen der Struktur (III), die analog zu den in Tabelle I angegebenen Werten erhalten wurden, sind in Tabelle II aufgeführt. Dabei sind in Spalte 3 diejenigen Säurereste und Aminosäurereste aufgeführt, die von R<sub>9</sub> zusammen mit der Aminogruppe am benachbarten C-Atom und der Carbonylgruppe gebildet werden, die mit dem Stickstoff des Heterocyclus eine Amidbindung bildet. Auch für die Verbindungen der Tabelle II ist R<sub>10</sub>

15



Besonders geeignete Verbindungen der Struktur (III), die selbst als Thrombininhibitoren aktiv sind, sind als synthetische Zwischenstufen ebenfalls von dieser Anmeldung umfaßt.

20



Dies gilt insbesondere für Verbindungen der Struktur III, für die

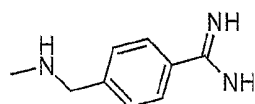
R<sub>1</sub> einen 4-Methoxy-3-Chlor-benzensulfonyl-, 4-Methoxy-3-Methyl-benzensulfonyl-, 4-Methoxy-phenylsulfonyl- oder einen 4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfonylrest darstellt, R<sub>9</sub> einen der Reste -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-C(O)OR<sub>11</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-R<sub>12</sub>, oder -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-C(O)NH-R<sub>11</sub>

25

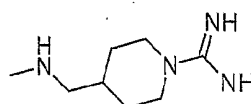
darstellt, wobei  $R_{11}$  ein Wasserstoffatom, oder ein C1-C6 Alkylrest, C7-C13 Aralkylrest oder ein C6 bis C12 Arylrest ist der gegebenenfalls substituiert sein kann,  $R_{12}$  eine der Gruppen  $NH_2$ , OH oder SH ist, und j 1, 2, 3 oder 4 ist,

$R_{10}$

5



oder



ist und

am mit \* gekennzeichneten C-Atom eine L-Konfiguration vorliegt.

- 10 Geeignete Substituenten des Restes  $R_{11}$  sind Halogenatome wie z.B. Chlor oder Brom, lineare oder verzweigte Alkylgruppen, Carboxylgruppen, Cyanogruppen, Carboxyalkylgruppen oder Aminoalkylgruppen, die im Falle des Aralkylrestes am Aromaten, aber auch am Alkylteil vorliegen können.
- 15 Beispielhafte Verbindungen der Formel (III) sind in Tabelle 2 zusammen mit ihren Selektivitätswerten aufgeführt.

Tabelle 2:

Nr.	$R_1$	-NH-CHR <sub>9</sub> -CO-	K <sub>i</sub> Thrombin (nM)	K <sub>i</sub> Trypsin (nM)	K <sub>i</sub> Trypsin/ K <sub>i</sub> Thrombin
36	2-Naphthylsulphonyl	Asp(OBzl)	1,3	17,6	13,6
37	2-Naphthylsulphonyl	Diaminopropionsäure	2,4	10,3	4,3
38	2-Naphthylsulphonyl	Ser	2,54	27,6	10,9
39	2-Naphthylsulphonyl	Asn	3,4	37,4	11
40	2-Naphthylsulphonyl	Gln	3,8	16,1	4,2
41	2-Naphthylsulphonyl	Thr	5,24	54,5	10,4
12	2-Naphthylsulphonyl	Gly	8,5	58	6,8
42	2-Naphthylsulphonyl	Asp	24,1	69	2,9
43	2-Naphthylsulphonyl	D-Asn	52,5	22,4	0,42
44	4-Methoxy-bs	Asn(4-Cyano-Benzyl)	0,045	41	911
45	4-Methoxy-bs	Asn(4-Aminomethyl-Benzyl)	0,061	39	639
46	4-Methoxy-bs	Asn(3-Cyano-Benzyl)	0,061	71	1163

47	4-Methoxy-bs	Asn(Benzyl)	0,065	39	600
48	4-Methoxy-bs	Asn(3-Aminomethyl-Benzyl)	0,08	41	512
49	4-Methoxy-bs	Asp(OBzl)	0,21	38	181
50	4-Methoxy-bs	Asn	0,36	53	147
51	4-Methoxy-bs	Ser	0,255	17	67
52	4-Methoxy-bs	Asp(OMe)	0,68	21,4	31
53	4-Methoxy-bs	Lys	0,73	82	112
1c	4-Methoxy-bs	Gly	0,97	22,7	23,4
55	4-Methoxy-bs	Asp	1,6	77	48

## Beispiele

## Beispiel 1

Herstellung von 4-Methoxy-benzensulfonyl-Asn(PEG2000-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid (Die Synthese der Verbindung ist in der nachstehenden Abbildung 1 weiter veranschaulicht):

## A) Z-Pro-4-(Cyano)Benzylamid

7,27 g (29,16 mmol) Z-Pro-OH und 3,2 ml (29,16 mmol) NMM wurden in 200 ml THF unter Rühren gelöst. Der Ansatz wurde danach auf  $-15^{\circ}\text{C}$  gekühlt und mit 3,79 ml (29,16 mmol) CKIBE versetzt. Nach ca. 10 min bei  $-15^{\circ}\text{C}$  wurden 4,24 g (32 mmol) 4-(Cyano)Benzylamin hinzugefügt und eine weitere Stunde bei  $-15^{\circ}\text{C}$  und weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 500 ml EE gelöst und 3 x mit 5 %  $\text{KHSO}_4$ -Lösung, 1 x mit NaCl-gesättigter Lösung, 3 x mit  $\text{NaHCO}_3$ -gesättigter Lösung und 3 x mit NaCl-gesättigter Lösung gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeengt.

Ausbeute: 9,9 g (27,2 mmol) Öl, 93 %, HPLC: 31,67 min

## B) Z-Pro-4(Acetyl-oxamidino)Benzylamid

9,5 g (26,1 mmol) Z-Pro-4-(Cyano)Benzylamid wurden in 300 ml Methanol gelöst und mit 3,1 g (45 mmol) Hydroxylamin Hydrochlorid und 7,83 ml (45 mmol) DIEA unter Rühren versetzt. Der Ansatz wurde 4 h unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das ausgefallene Zwischenprodukt (HPLC 18,18 min) wurde abgesaugt, im Vakuum getrocknet, bei Raumtemperatur in 200 ml AcOH gelöst und in 3 Portionen mit 75 mmol Acetanhydrid versetzt. Nach 30 Minuten wurde das Lösungsmittel und überschüssiges Acetanhydrid im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand in EE gelöst. Es wurde 3 x mit 5 %  $\text{KHSO}_4$ -Lösung und 3 x mit NaCl-gesättigter Lösung gewaschen, dabei fällt bereits das Produkt als Feststoff aus, das abgesaugt, mit Wasser auf der Fritte gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: 6,4 g (14,6 mmol) 56 %; weiße Kristalle, HPLC: 24,37 min

## C) H-Pro-4(Amidino)Benzylamid x 2 HCl

6 g (13,6 mmol) Z-Pro-4(Acetyl-oxamidino)Benzylamid werden in 200 ml 90%iger AcOH unter Rühren gelöst und unter Schutzgas mit 0,5 g 10 %igem Palladium auf Aktivkohle

versetzt. Dann wird mittels Wasserstoff 12 h hydriert und der Katalysator abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in 100 ml 0,5 N HCl gelöst und danach wieder im Vakuum eingeeengt und getrocknet.

Ausbeute: 3,3 g (10,3 mmol) 76 % Feststoff, HPLC: 11,3 min (Start bei 0 % B)

5

D) 4-MeO-benzensulfonyl-Asp-OtBu

- 10 g (52,8 mmol) H-Asp-OtBu (Novabiochem) wurden in 250 ml H<sub>2</sub>O und 150 ml ACN unter Rühren bei Raumtemperatur suspendiert und mit 13 ml (75 mmol) DIEA versetzt. Der Ansatz wurde im Eisbad gekühlt. Dann wurden innerhalb einer Stunde 11,7 g (55 mmol) 4-Methoxy-benzensulfonylchlorid, gelöst in 100 ml ACN, zugetropft. Der pH-Wert wurde während dieses Zeitraums kontrolliert und durch zusätzliche DIEA-Zugabe auf 8-9 eingestellt. Danach wurde der Ansatz weitere 6 Stunden bei Raumtemperatur und bei einem pH-Wert von 8-9 gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der verbleibende Rückstand in 300 ml Wasser bei einem pH-Wert von ca. 9 gelöst. Die wässrige Phase wurde 2 x mit Ether extrahiert und danach durch Zusatz von 5 %iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf einen pH-Wert von ca. 3 eingestellt. Die saure, wässrige Phase wurde anschließend 3 x mit EE extrahiert, die vereinigte EE-Phase wurde danach noch 2 x mit 5 %iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 3 x mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Danach wurde der EE im Vakuum entfernt, das verbleibende Öl wurde in heißem EE gelöst und mit Hexan überschichtet. Das Produkt kristallisierte bei ca. 4 °C.
- 15
- 20
- Ausbeute: 13,6 g, HPLC bei 28,9 min

E) 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-OtBu

- 5 g (ca. 2,5 mmol) Amino-PEG<sub>2000</sub>-Monomethylether (Rapp Polymere, Tübingen) und 2,7 g (7,5 mmol) 4-MeO-bs-Asp-OtBu wurden in 200 ml DMF und 50 ml ACN bei Raumtemperatur gelöst und danach im Eisbad abgekühlt. Dann wurden 2,84 g (7,5 mmol) HBTU und 3,48 ml (20 mmol) DIEA hinzugegeben und der Ansatz für weitere 30 min unter Eiskühlung und anschließend weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt und der verbleibende Rückstand in wenig heißem Methanol gelöst und mit einem großen Überschuß an Ether versetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde ins Eisbad gestellt, danach wurde das ausgefallene Produkt abgesaugt und mit Ether gewaschen und getrocknet. Die Festsubstanz wird wieder in wenig, heißem Methanol gelöst und mit einem großen Überschuß an Isopropanol versetzt. Beim Stehen im Eisbad fällt das Produkt aus, es wird abgesaugt und auf der Fritte mit Isopropanol gewaschen und danach im
- 25
- 30



Vakuum getrocknet. Die Verbindung wird getrocknet und in dieser Form für die weitere Synthese verwendet.

Ausbeute: 5,5 g, HPLC 35,1 min

5 F) 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-OH

5 g 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-OtBu wurden bei Raumtemperatur in 150 ml 1 N HCl in Essigsäure gelöst, der Ansatz wurde 4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Toluol gelöst und danach das Lösungsmittel wieder im Vakuum abgedampft, um Säurespuren zu entfernen. Dieser

10 Schritt wird noch 2 x wiederholt, der Rückstand in wenig heißem Methanol gelöst und das Produkt mit Ether in der Kälte gefällt. Nach Absaugen und Waschen mit Ether wird das Produkt im Vakuum getrocknet und in dieser Form für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Ausbeute: 4,7 g, HPLC 30,5 min

15

G) 4-Methoxy-benzensulfonyl-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid

2 g (ca. 0,9 mmol) 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-OH und 0,57 g (1,8 mmol) des unter C) beschriebenen H-Pro-4-Amidinobenzylamids x 2 HCl werden in 50 ml DMF unter Rühren gelöst. Nach Kühlung mit einem Eisbad werden 0,94 g (1,8 mmol) PyBOP und 0,93 ml (5,4 mmol) DIEA hinzugefügt. Der Ansatz wurde 30 Minuten unter Eiskühlung und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt und der verbleibende Rückstand an Biogel P2 (Firma Biorad) mit 2 %iger Essigsäure als Laufmittel getrennt. Die Produkt-enhaltenden Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum eingeengt und aus 80 %igem tert. Butanol lyophilisiert. In einem zweiten Schritt wurde anschließend das Produkt

20

25 durch Ionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD COO<sup>-</sup> oder Source 30S mit einem Ammoniumacetatgradienten getrennt und die vereinten Fraktionen 3 x nacheinander lyophilisiert.

HPLC: 30,66 min

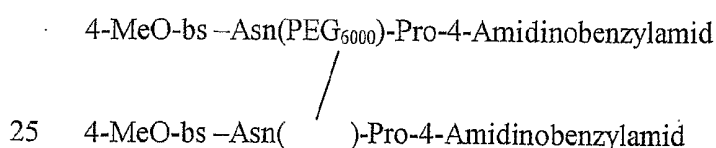
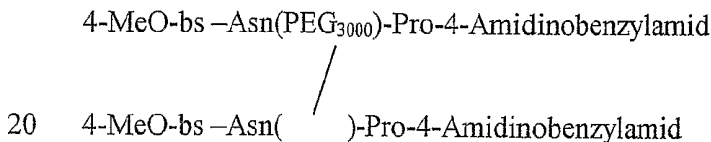
30

Beispiel 2:

In analoger Weise zu Beispiel 1 wurden die folgenden Verbindungen synthetisiert, wobei für die Synthese Amino-PEG-Verbindungen mit verschiedenen Molekulargewichten verwendet wurden.

- 5 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>5000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>10000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 4-MeO-bs-Asn(PEG<sub>20000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 Mtr-Asn(PEG<sub>2000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 Mtr-Asn(PEG<sub>5000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 10 Mtr-Asn(PEG<sub>10000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 Mtr-Asn(PEG<sub>20000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid

- Durch Verwendung eines bifunktionalisierten Amino-PEG wurden die beiden folgenden Verbindungen hergestellt, wobei die Verbindungslinie in dieser und den folgenden Formeln  
 15 die Verknüpfung der beiden Inhibitoreinheiten mittels des angegebenen bifunktionellen Polyalkylenglykols darstellt.



Durch Verwendung von Aminomethyl-Crown-Ethern wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:

- 30 4-MeO-bs-Asn(CH<sub>2</sub>-Crown5)-Pro-4-Amidinobenzylamid  
 4-MeO-bs-Asn(CH<sub>2</sub>-Crown6)-Pro-4-Amidinobenzylamid

Herstellung von D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-Amidinobenzylamid

(Die Synthese der Zielverbindung ist in der nachfolgenden Abbildung 2 weiter veranschaulicht):

5 A) D-N(Benzyloxycarbonylmethyl)Cha-OtBu

Der Ausgangsstoff D-N(Benzyloxycarbonylmethyl)Cha-OtBu wurde entsprechend der beschriebenen Literaturmethode hergestellt (Preville et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 7, 1563-1566 (1997)).

10 B) D-N(Carboxymethyl)Cha-OtBu x Acetat

3,75 g (10 mmol) D-N(Benzyloxycarbonylmethyl)Cha-OtBu wurden in einer Mischung aus 100 ml Methanol, 5 ml Essigsäure und 5 ml H<sub>2</sub>O bei Raumtemperatur und Normaldruck 3 h mit 0,3 g 10 % Pd/C als Katalysator wie üblich hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, und das Filtrat unter Zusatz von Toluol 3Mal im Vakuum eingeengt. Die verbleibende  
15 Substanz wird in 15 ml Essigsäure gelöst und unter Zusatz von 200 ml Diethylether gefällt (weißer Feststoff).

C) Z-D-N(Carboxymethyl)Cha-OtBu x Cyclohexylamin

2 g (5,8 mmol) D-N(Carboxymethyl)Cha-OtBu x Acetat wurden in 75 ml Wasser, 15 ml 1  
20 N NaOH und 75 ml Dioxan unter starkem Rühren suspendiert und im Eisbad gekühlt. Danach wurden 7 mmol Z-Cl<sub>1</sub> gelöst in 30 ml Dioxan, im Verlauf von 30 Minuten zugetropft, noch 30 Minuten unter Eiskühlung und weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 N NaOH auf ca. 9-10 mehrmals nachgestellt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in  
25 EE und Wasser aufgenommen und 3 x mit 5 %iger KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 3 x mit NaCl-gesättigter Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der ölige Rückstand wurde in Ether gelöst und als Cyclohexylamin-Salz kristallisiert, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

30 D) Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-OtBu

0,62 g (1,2 mmol) Z-D-N(Carboxymethyl)Cha-OtBu x Cyclohexylamin wurden in 200 ml EE suspendiert und 3 x mit 50 ml 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung und 3 x mit NaCl-gesättigter Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der ölige Rückstand und 2 g (0,4 mmol) Amino-PEG5000-OMe wurden in 100 ml DMF unter Rühren gelöst und im

Eisbad abgekühlt. Dazu wurden 0,62 g (1,2 mmol) PyBOP und 3 mmol DIEA gegeben, weitere 30 Minuten unter Eiskühlung und danach 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft, der Rückstand in wenig, heißem Methanol gelöst und in der Kälte mit Isopropanol gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Die Festschubstanz wurde wieder in wenig, heißem Methanol gelöst und in der Kälte mit Ether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet (Feststoff).

Ausbeute: 1,9 g

E) Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-OH

- 10 Der tert. Butylester wurde wie im Beispiel 1F beschrieben abgespalten.

Ausbeute: 1,7 g (Feststoff)

F) Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

- Das unter Beispiel 1C hergestellte H-Pro-4(Amidino)Benzylamid x 2 HCl wurde entsprechend der Vorschrift aus Beispiel 1G an 1 g Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-OH angekoppelt. Das Produkt wurde nacheinander mit Isopropanol und Ether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet (Rohprodukt: 0,9 g).

- 20 G) H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

- 0,9 g Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid wurden wie in Beispiel 1C beschrieben 4 h hydriert, nach abfiltrieren des Katalysators, einengen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde der Rückstand in wenig heißem Methanol gelöst und mit viel Ether gefällt und abgesaugt. Das gefällte Rohprodukt wurde an Biogel P2 mit 2 % AcOH als Laufmittel gereinigt. In einem zweiten Schritt wurde anschließend das Produkt durch Ionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD COO<sup>-</sup> oder Source 30S mit einem Ammoniumacetatgradienten getrennt und die vereinten Fraktionen 3 x nacheinander lyophilisiert.

## Beispiel 4

In analoger Weise zum Beispiel 3 wurden die folgenden Verbindungen synthetisiert, wobei für die Synthese Amino-PEG-Verbindungen mit verschiedenen Molekulargewichten verwendet wurden.

5

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>10000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>20000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

- 10 Durch Verwendung eines bifunktionalisierten Amino-PEG wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>6000</sub>)Cha-Pro-4-Amidinobenzylamid

- 15 H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH- / )-Pro-4-Amidinobenzylamid

Durch Verwendung von Aminomethyl-Crown-Ethern wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:

20

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Crown5)-Pro-4-Amidinobenzylamid

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Crown6)-Pro-4-Amidinobenzylamid

25

## Beispiel 5

D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)N(Amidino)Benzylamid

(Die Synthese der Zielverbindung ist in der nachfolgenden Abbildung 3 weiter veranschaulicht):

- 30 A) 4-(Trifluoroacetyl-Amidomethyl)-Piperidin

166 mmol (18,95 g, 19,91 ml) 4-Aminomethylpiperidin werden in 100 ml DCM gelöst und unter magnetischen Rühren im Eisbad gekühlt. Über einen Zeitraum von einer Stunde werden 182,6 mmol (25,94 g, 21,78 ml) Trifluoroessigsäureethylester zugetropft. Danach

wird der Ansatz eine weitere Stunde im Eisbad gekühlt und danach noch 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das während der Reaktion ausfallende Produkt wird abgesaugt.

Ausbeute: 18.68 g = 53.55 %

MS: berechnet, 210.17; gefunden 211,3  $[M+H]^+$  (Maldi)

5 DC: Rf n-Butanol/Eisessig/Wasser 4/1/1 = 0.51

B) 4-(Trifluoroacetyl-Amidomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin

Zu einer Lösung von 18 g (85.6 mmol) 4-(Trifluoroacetyl-Amidomethyl)-Piperidin in 150 ml DMF werden 14.89 ml (85.6 mmol) DIEA hinzugegeben. Unter Rühren im Eisbad gibt  
10 man zu dieser Mischung 22.36 g (89.75 mmol) Z-Osu, das vorher in 75 ml DMF gelöst wurde. Der Ansatz wird 1 Stunde im Eisbad und danach 7 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und der verbleibende Rest in Essigester aufgenommen und 3 x mit 5%iger  $KHSO_4$ -Lösung und 3 x mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die EE-Phase wird über  $Na_2SO_4$  getrocknet, und das Lösungsmittel  
15 eingeeengt. Umkristallisation aus Essigester/Hexan (weiße Kristalle).

Ausbeute: 28.15 g = 95.52 %

MS: berechnet: 344.27; gefunden: 345,1

DC: Rf n-Butanol/Eisessig/Wasser 4/1/1 = 0.83

Benzen/Aceton/Eisessig 27/10/0.5 = 0.73

20

C) 4-(Aminomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin

27.5 g (79.88 mmol) 4-(Trifluoroacetyl-Amidomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin werden in 150 ml Dioxan gelöst und mit 150 ml 1 n NaOH-Lösung versetzt. Der Ansatz wird 3 Stunden bei 40° C gerührt und danach das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der  
25 Rest wird in Wasser aufgenommen und 3 x mit DCM extrahiert. Die vereinigten DCM-Phasen werden über  $Na_2SO_4$  getrocknet, danach wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 13.92 g Öl, 56.09 mmol = 70.2 %

MS: berechnet, 248,13; gefunden, 249,3  $[M+H]^+$

30

D) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin

0,86 g Boc-Pro-OH werden in 60 ml absolutem THF unter magnetischem Rühren gelöst und mit 0.44 ml (4 mmol) NMM versetzt. Der Ansatz wird auf -15° C gekühlt und dann mit 4 mmol (0.52 ml) CKIBE versetzt. Nach weiteren 10 Minuten Rühren bei -15° C werden 1.1

- g (4.4 mmol) 4-(Aminomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin zugesetzt und der Ansatz eine weitere Stunde bei  $-15^{\circ}\text{C}$  und weiter über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt und der verbleibende Rest in Essigester aufgenommen und nacheinander 3 x mit 5%  $\text{KHSO}_4$ -Lösung, 1 x mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung, 3 x mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und nochmals 3 x mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen. Danach wird die Essigesterphase mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeeengt.
- 5 Umkristallisation aus Essigester/Hexan.
- Ausbeute: 1.5 g, 3,3 mmol (82,5 %)
- 10 E) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)Piperidin x Acetat
- 1 g (2,2 mmol) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Benzyloxycarbonyl)-Piperidin werden in Analogie zum Beispiel 1C mit 150 mg Pd/C als Katalysator in Eisessig hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und das Lösungsmittel weitestgehend im Vakuum eingeeengt, und das Produkt durch Zusatz mit Diethylether gefällt.
- 15 Ausbeute: 0,6 g
- F) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x TFA
- 0,5 g (1,34 mmol) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)Piperidin x Acetat werden mit 0,4 g (2,7 mmol) Pyrazol-Carboxamidin-Hydrochlorid und 0,7 ml (4 mmol) DIEA in 4 ml DMF bei
- 20 Raumtemperatur für 24 h gerührt. Das DMF wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels präparativer Reversed-Phase-HPLC von Salzen und nicht umgesetzten Pyrazol-Carboxamidin-Hydrochlorid getrennt.
- Ausbeute: 0,35 g
- 25 G) H-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 2 HCl
- 0,3 g (0,64 mmol) Boc-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x TFA werden mit 5 ml 1 N HCl/Eisessig übergossen und bei Raumtemperatur 1 Stunde stehen gelassen. Der Eisessig wird im Vakuum weitestgehend eingeeengt und der Rückstand durch Zugabe von Diethylether gefällt. Das Produkt wird abgesaugt, mit weiterem Diethylether gewaschen und
- 30 im Vakuum getrocknet.
- Ausbeute: 0,18 g
- H) Z-D-N( $\text{CH}_2\text{-CO-NH-PEG}_{5000}\text{-OMe}$ )Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x HCl

0,15 g (0,46 mmol) des unter Beispiel 5G hergestellten H-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 2 HCl wurde entsprechend der Vorschrift aus Beispiel 1G an 1 g Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-OH mittels PyBop/DIEA angekoppelt. Das Produkt wurde nacheinander mit Isopropanol und Ether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet (Rohprodukt: 0,9 g).

I) D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 2 HCl

0,8 g Z-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x HCl werden in 90 %iger Essigsäure analog der Vorschrift 1C hydriert. Das Produkt wird aus Methanol/Ether gefällt und über Biogel P2 und Ionenaustauschchromatographie (Fractogel EMD COO<sup>-</sup> oder Source 30S) gereinigt und lyophilisiert.

Ausbeute: 0,46 g

15

#### Beispiel 6

In analoger Weise zum Beispiel 5 wurden die folgenden Verbindungen synthetisiert, wobei für die Synthese Amino-PEG-Verbindungen mit verschiedenen Molekulargewichten verwendet wurden.

20

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 2 HCl

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>10000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 2 HCl

25 H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>20000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 2 HCl

Durch Verwendung eines bifunktionalisierten Amino-PEG wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:

30

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>6000</sub>)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 4 HCl

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH- )-Pro-4-Amidinobenzylamid



Durch Verwendung von Aminomethyl-Crown-Ethern wurden die folgenden Verbindungen hergestellt:

- 5 H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Crown5)-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 2 HCl  
H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-Crown6)-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin x 2 HCl

### Beispiel 7

10

Herstellung von D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>Cl

(Die Synthese der Zielverbindung ist in der nachfolgenden Abbildung 4 weiter veranschaulicht):

- 15 A) H-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl x HCl

Boc-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl wurde analog der Literaturvorschrift für Boc-Arg(Z<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-Cl (Steinmetzer et al., 1999 *J. Med. Chem.* **42**, 3109-3115) hergestellt. Durch versetzen von 5g Boc-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl mit 75 ml 1 N HCl in Eisessig wurde selektiv die Boc-Gruppe abgespalten, das Lösungsmittel weitestgehend im Vakuum entfernt und das Produkt durch

- 20 Zusatz von kaltem Diethylether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,7 g

- B) Boc-d-Cha-Pro-OH.

Die Verbindung wird entsprechend der in der Literatur beschriebenen Synthesestrategie

- 25 hergestellt (Steinmetzer et al., 1999 *J. Med. Chem.* **42**, 3109-3115).

- C) Boc-d-Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl

Aus 3 g (8.14 mmol) Boc-d-Cha-Pro-OH, 0.9 ml (8.14 mmol) NMM und 1,06 ml (8.14 mmol) CKIBE in 100 ml THF wird bei -15 °C das gemischte Anhydrid gebildet. Nach 10

- 30 min werden 4,03 g (8.14 mmol) H-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl x HCl hinzugefügt und der Ansatz eine weitere Stunde bei -15 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und wie unter Beispiel 1A beschrieben, aufgearbeitet.

Ausbeute: 4.6 g (5.7 mmol)

D) H-d-Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl x HCl

Die Boc-Gruppe wird analog der Vorschrift aus Beispiel 5G abgespalten, das Produkt mit Ether gefällt, abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.86 g (5.2 mmol)

5

E) H-d-N(CH<sub>2</sub>-CO-OtBut)Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl x HCl

3 g (4 mmol) H-d-Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl x HCl werden in 100 ml DMF gelöst und bei Raumtemperatur mit 0,74 ml (4.15 mmol) Bromessigsäure-tert. Butylester und 1,16 g (5 mmol) Silber(I)Oxid versetzt. Der Ansatz wird über Nacht gerührt und danach die ausgefallenen Silbersalze abzentrifugiert. Das DMF wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und 2 x mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeengt.

10

Ausbeute: 2.7 g (3.1 mmol) Rohprodukt

15 F) H-d-N(CH<sub>2</sub>-COOH)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl x 2 Trifluoressigsäure

2,5 g (2,87 mmol) des Rohproduktes an H-d-N(CH<sub>2</sub>-CO-OtBut)Cha-Pro-Arg(Pbf)-CH<sub>2</sub>-Cl x HCl werden bei Raumtemperatur mit 50 ml 90% Trifluoressigsäure in Wasser versetzt und 1,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum weitestgehend entfernt und der Rückstand mit kaltem Diethylether gefällt. Das Rohprodukt wird abgesaugt, mit Ether gewaschen, getrocknet und mit präparativer reversed-phase HPLC gereinigt.

20

G) H-d-N(CH<sub>2</sub>-CONH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl x 2 Trifluoressigsäure

40 mg (0,054 mmol) HPLC gereinigtes H-d-N(CH<sub>2</sub>-COOH)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl x 2 Trifluoressigsäure und 80,75 mg (0,04 mmol) Amino-PEG<sub>2000</sub>-OMe werden in 3 ml DMF gelöst und unter Eiskühlung mit 57 µl Propanphosphonsäureanhydrid, sowie 55 µl DIEA versetzt. Nach einer Stunde wird das Eisbad entfernt, und der Ansatz weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittel präparativer Umkehrphasenchromatographie gereinigt.

30

Ausbeute: 45 mg

## Beispiel 8

## Bestimmung der kinetischen Konstanten

Bis auf die im Beispiel 6 beschriebene Verbindung sind sämtliche Inhibitoren reversibel bindende Thrombininhibitoren. Die bestimmten  $K_i$ -Werte sind nur in geringem Maße von  
 5 der Kettenlänge des PEG abhängig, daher ist für alle Verbindungstypen exemplarisch jeweils nur ein Inhibitor mit seinem  $K_i$ -Wert angegeben, als Referenz werden die kinetischen Konstanten für die Verbindungen mit freier Carboxylgruppe, die keine PEG-Kette gebunden haben, angegeben.

10

*Kinetische Konstanten für den reversibel bindenden Inhibitor aus Beispiel 1/2*

4-Methoxy-benzensulfonyl-Asn(PEG2000-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid

$K_{i\text{Thrombin}}$ : 0,53 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}$ : 92,53 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}$ : 174

Referenz: 4-Methoxy-benzensulfonyl-Asp-Pro-4-Amidinobenzylamid

15

$K_{i\text{Thrombin}}$ : 1,6 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}$ : 77 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}$ : 48

Bei den Inhibitoren dieses Typs führt die Einführung der PEG-Kette zu einer Verbesserung der Thrombinhemmung im Vergleich zu der gewählten Referenzverbindung und auch zu einer verbesserten Selektivität gegenüber Trypsin.

20

4-Methoxy-benzensulfonyl-Asn(4-[MeO-PEG<sub>5000</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-NHCH<sub>2</sub>]-Benzyl)-Pro-4-Amidinobenzylamid

$K_{i\text{Thrombin}}$  0,19 nM

Referenz: 4-Methoxy-benzensulfonyl-Asp-Pro-4-Amidinobenzylamid

25

$K_{i\text{Thrombin}}$ : 1,6 nM;

4-Methoxy-benzensulfonyl-Lys(Propionyl-PEG<sub>5000</sub>-OMe)-Pro-4-Amidinobenzylamid

$K_{i\text{Thrombin}}$  0,95 nM,  $K_{i\text{Trypsin}}$  61 nM,  $K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}$  64

30

Referenz: 4-Methoxy-benzensulfonyl-Lys-Pro-4-Amidinobenzylamid

$K_{i\text{Thrombin}}$  0,73 nM,  $K_{i\text{Trypsin}}$  82 nM,  $K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}$  = 112

*Kinetische Konstanten für den reversibel bindenden Inhibitor aus Beispiel 3/4*

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid

$K_{i\text{Thrombin}}$ : 0,97 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}$ : 3,4 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}$ : 3,5

Referenz: H-D-N(CH<sub>2</sub>-COOH)Cha-Pro-4-(Amidino)Benzylamid (Diese nicht PEG-gekoppelte Referenzverbindung ist identisch mit dem von der Firma Astra beschriebenen Inhibitor H317/86; Gustafsson et al., 1998 *Thromb. Haemost.* **79**, 110-118).

5  $K_{i\text{Thrombin}}$ : 0,3 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}$ : 3,6 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}$ : 12

Bei den Inhibitoren dieses Typs führt die Einführung der PEG-Kette zu einer leichten Verschlechterung der Thrombinhemmung, die Trypsinhemmung bleibt unbeeinflusst.

10

*Kinetische Konstanten für den reversibel bindenden Inhibitor aus Beispiel 5 und 6*

H-D-N(CH<sub>2</sub>-CO-NH-PEG<sub>5000</sub>-OMe)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin

$K_{i\text{Thrombin}}$ : 2,4 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}$ : 239 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}$ : 100

Referenz: H-D-N(CH<sub>2</sub>-COOH)Cha-Pro-4-(Amidomethyl)-N(Amidino)Piperidin

15  $K_{i\text{Thrombin}}$ : 1,3 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}$ : 226 nM;  $K_{i\text{Trypsin}}/K_{i\text{Thrombin}}$ : 173

Auch bei den Inhibitoren dieses Typs führt die Einführung der PEG-Kette zu einer leichten Verschlechterung der Thrombinhemmung, die Trypsinhemmung bleibt dagegen nahezu unbeeinflusst.

20

*Kinetische Konstanten für den irreversibel bindenden Inhibitor aus Beispiel 7*

Die folgenden kinetischen Konstanten wurden entsprechend dem in der Literatur beschriebenen Verfahren (Stein und Trainor, 1986 *Biochemistry* **25**, 5414-5419) bestimmt.

25

H-d-N(CH<sub>2</sub>-CONH-PEG<sub>2000</sub>-OMe)Cha-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl x 2 Trifluoressigsäure:

$K_i = 10,6 \text{ nM}$ ;  $k_{\text{inact}} = 0,08 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{inact}}/K_i = 7,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Als Referenz wurde die analoge, nicht PEG-gekoppelte Verbindung gemessen:

30  $K_i = 3,8 \text{ nM}$ ;  $k_{\text{inact}} = 0,079 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{inact}}/K_i = 2,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Aus der Literatur wurden die Daten für die Chlormethylketon-Leitstruktur D-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>-Cl (PPACK) entnommen (Walker et al., 1985 *Biochem. J.* **230**, 645-650):

$K_i = 25 \text{ nM}$ ;  $k_{\text{inact}} = 0,11 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{inact}}/K_i = 4,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

Die PEG-gekoppelte Verbindung ist etwas weniger aktiv, als die analoge freie Verbindung, andererseits ist sie jedoch ein stärkerer Thrombinhemmstoff als das in der Literatur bereits beschriebene PPACK.

5

### Beispiel 8a

Wirksame Thrombinhemmstoffe sollten bevorzugt die plasminolytischen Enzyme Plasmin, Urokinase und tPA kaum hemmen, da diese Proteasen an der Auflösung von Fibringerinnseln beteiligt sind und deshalb antithrombotische Eigenschaften besitzen. Deshalb wurden 2 ausgewählte Vertreter der in den Tabellen 1 und 2 beschriebenen Inhibitoren ohne PEG und ein PEG-gekoppelter Inhibitor bezüglich ihrer Hemmwirkung auf diese Enzyme untersucht.

15

Hemmkonstanten ausgewählter Inhibitoren bezüglich der Enzyme Thrombin, Plasmin, Urokinase und tPA (Werte in nM).

Nr.	Sequenz	K <sub>i</sub> Thrombin	K <sub>i</sub> Plasmin	K <sub>i</sub> Urokinase	K <sub>i</sub> tPA
1c	4-MeO-bs-Gly-Pro-4-Amba	0,97	5800	225000	630
50	4-MeO-bs-Asn-Pro-4-Amba	0,36	17500	52000	47000
	4-MeO-bs-Asn(PEG <sub>2000</sub> -OMe)-Pro-4-Amba	0,53	33500	157000	599000

Interessanterweise zeigt sich aus den K<sub>i</sub>-Werten der in der obigen Tabelle aufgelisteten Inhibitoren, dass die Einführung einer geeigneten L-Aminosäure mit Seitenkette nicht nur eine Verstärkung der Thrombinhemmung bewirkt, sondern zusätzlich auch die Hemmung der fibrinolytischen Enzyme Plasmin und tPA abschwächt. Demzufolge sind die in der Tabelle aufgeführte Verbindung mit Asparagin und der PEG-gekoppelte Inhibitor sehr wirksame und gleichzeitig auch sehr selektive Thrombinhemmstoffe.

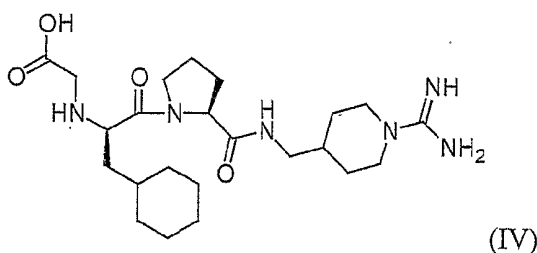
25

## Beispiel 9

## Eliminierung der Inhibitorkonjugate an Ratten

5 Vorbemerkungen: Für die Versuche wurden weibliche Wistarratten mit einem Körpergewicht zwischen 150-250 g verwendet. Die Tiere wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten und erhielten Standardfutter und Trinkwasser ad libitum. Die Narkotisierung erfolgte mittels 1,5 g/kg Körpermasse Ethylurethan. Anschließend wurden die rechte und linke Vena jugularis präpariert und Katheter eingebunden, um zu  
10 unterschiedlichem Zeitpunkt Blut entnehmen zu können. Der Urin wurde über die gesamte Versuchsdauer gesammelt und die Inhibitorkonzentration mit einem Gerinnungstest bestimmt.

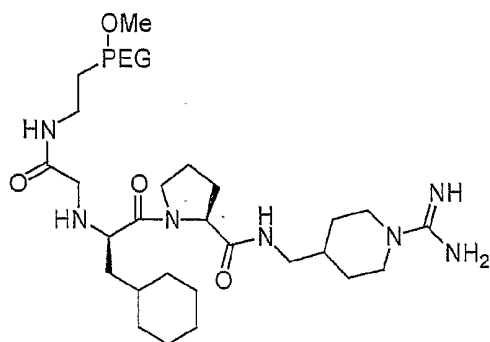
Abb. 5 zeigt die Eliminierung der in Formel (IV) dargestellten Verbindung nach  
15 intravenöser Gabe von 10 mg/kg an der Ratte. Die Eliminierungshalbwertszeit beträgt ca. 16.5 min.



20 Abb. 6 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der kumulativen Wiederfindung im Urin der in Formel (IV) dargestellten Verbindung nach subkutaner Gabe an der Ratte. Es werden ca. 58 % der Verbindung im Urin wiedergefunden.

25 Zum Vergleich ist ein Beispiel mit einer analogen Verbindung angegeben, an die ein PEG5000 kovalent gekoppelt wurde.

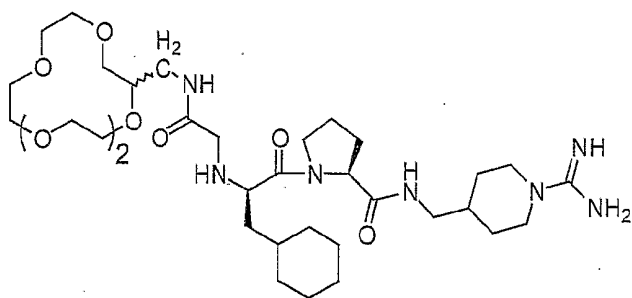
Abb. 7 zeigt den Blutspiegel der unten dargestellten Verbindung der Formel (V) (die PEG-Kette hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 5000 Da) nach subkutaner Gabe von  
30 10 mg/kg. Die bestimmte Eliminierungshalbwertszeit beträgt ca. 2,6 Stunden und ist somit deutlich länger im Vergleich zur freien, nicht pegylierten Verbindung (siehe Abb. 5).



(V)

- 5 Abb.8 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der kumulativen Wiederfindung im Urin der Verbindung (V) nach subkutaner Gabe an der Ratte (n=4). Es werden nahezu 100 % der Verbindung im Urin wiedergefunden.

- Abb. 9 zeigt eine halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurve nach subkutaner Gabe von 5 mg/kg der Inhibitorstruktur (VI) an der Ratte. Die berechnete Eliminierungshalbwertszeit beträgt ca. 350 min. Die Halbwertszeit dieser Verbindung ist somit deutlich verlängert.
- 10



(VI)

15

#### Beispiel 10

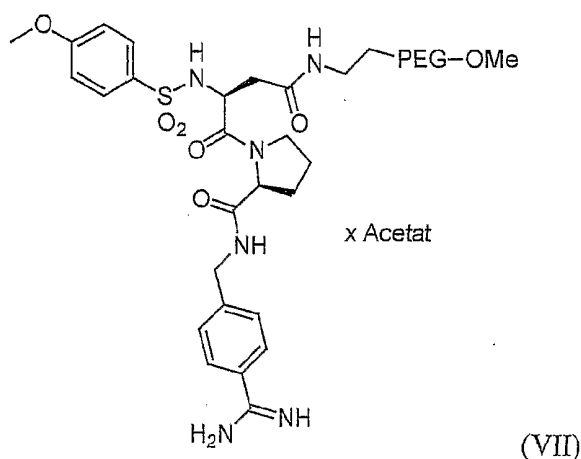
#### Eliminierung der Inhibitor-Konjugate an Schweinen

20

- Vorbemerkungen: Für die Versuche wurden weibliche und männliche Schweine mit einem Körpergewicht zwischen 12 und 15 kg verwendet. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte durch intravenöse Gabe von 20 mg/kg Pentobarbital. In die linke oder rechte Vena jugularis wurde ein Katheter zur Blutentnahme und in die Luftröhre ein Trachealkatheter eingebunden, um eine gute Atmung der Tiere während der Versuche aufrechtzuerhalten. Die
- 25

Blase der Tiere wurde ebenfalls mit einem Katheter versehen, so dass der Urin über die gesamte Versuchsdauer gesammelt werden konnte. Bei den männlichen Tieren wurde zusätzlich die Harnröhre abgebunden, so dass der Urin nur durch den Blasenkatheter in ein Sammelgefäß abfließen konnte. Die Inhibitorkonzentrationen wurden im Blut, im Plasma und im Urin mittels des Ecarin-Clotting-Tests (Nowak und Bucha, (1996) Quantitative determination of hirudin in blood and body fluids. *Semin. Thromb.* 22, 197-202) bestimmt.

Für die Eliminierungsuntersuchungen an Schweinen wurden die Inhibitoren der allgemeinen Formel (VII) mit einer durchschnittlichen PEG-Kettenlänge von 2000 oder 10000 Da verwendet.



In den Untersuchungen zeigte sich überraschenderweise, dass in Abhängigkeit der Länge der PEG-Kette der Inhibitoren der allgemeinen Formel (VII) große Unterschiede in der Eliminierungsgeschwindigkeit der Inhibitoren aus dem Blut auftreten. Im Falle der Inhibitoren mit einer durchschnittlichen PEG-Kettenlänge um 10000 Da (Abb. 12 und 13) konnten bis zu 28 h nach subkutaner Inhibitorgabe lang anhaltende, antithrombotisch wirksame Blutspiegel gemessen werden. Interessanterweise wurden bis zu diesem Zeitpunkt nur ca. 35 % des Inhibitors im Urin wiedergefunden.

Im Gegensatz dazu wurde der Inhibitor der allgemeinen Formel (VII) mit einer durchschnittlichen PEG-Kettenlänge von 2000 Da bereits nach ca. 12 h nahezu vollständig über die Niere eliminiert (Abb. 10 und 11).

Abb. 10 zeigt die Plasmaspiegel des Inhibitors der allgemeinen Struktur (VII) mit einer durchschnittlichen PEG-Kette um 2000 Da nach subcutaner Gabe von 2,5 mg/kg in Schweinen.



Abb. 11 zeigt die kumulative Ausscheidung des Inhibitors der allgemeinen Struktur (VII) mit einer durchschnittlichen PEG-Kette um 2000 Da nach subcutaner Gabe von 2,5 mg/kg im Urin von Schweinen.

5

Abb. 12 zeigt die Plasmaspiegel des Inhibitors der allgemeinen Struktur (VII) mit einer durchschnittlichen PEG-Kette um 10000 Da nach subcutaner Gabe von 20 mg/kg in Schweinen.

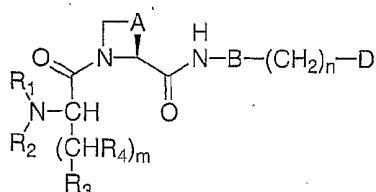
10 Abb. 13 zeigt die kumulative Ausscheidung des Inhibitors der allgemeinen Struktur (VII) mit einer durchschnittlichen PEG-Kette um 10000 Da nach subcutaner Gabe von 20 mg/kg im Urin von Schweinen.

15

## Patentansprüche

5

### 1) Verbindung der allgemeinen Struktur (I)



10 in der

m 0, 1, 2, 3 oder 4 ist;

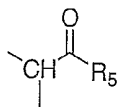
n 0, 1, 2, 3, 4 oder 5 ist;

A entweder eine Methylen-, Ethylen oder Propylengruppe ist und der damit gebildete Ring entweder unsubstituiert oder mit einer Hydroxylgruppe substituiert sein kann, die


15 gegebenenfalls mit einem Alkyl- oder Aralkylrest verethert ist,

oder eine der Gruppen  $-\text{CH}_2\text{-O-}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-S-}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-SO-}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-}$ ,  $-\text{CH}_2\text{-SO-CH}_2\text{-}$  ist;

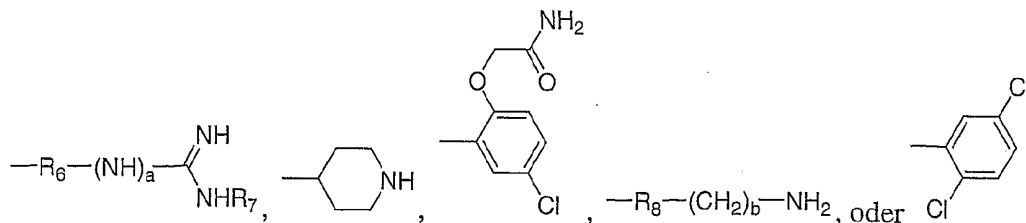
B eine Bindung oder



20 ist, wobei R<sub>5</sub> ein Alkylrest ist der 1 bis 4, bevorzugt 1 oder 2 und besonders bevorzugt ein C-Atom umfasst und mit einem oder mehreren gleichen oder unterschiedlichen

Halogenatomen oder mit einem Rest  substituiert sein kann;

D einen Rest



25 darstellt, wobei a 0 oder 1 und b 0, 1 oder 2 ist und R<sub>6</sub> und R<sub>8</sub> unabhängig voneinander bivalente Reste sind, ausgewählt aus aromatischen oder gesättigten 6-Ringen, die neben Kohlenstoff noch ein Heteroatom enthalten können und einen oder mehrere gleiche oder

unterschiedliche Alkylsubstituenten tragen können, und  $R_6$  darüberhinaus  $-NH-$  sein kann falls  $a$  0 ist,  $R_7$  ein Wasserstoffatom oder  $-NH_2$  ist;

- $R_1$  ein Wasserstoffatom oder ein Arylsulfonyl-, Aralkylsulfonyl-, Cycloalkylmethylsulfonyl-, Cycloalkylethylsulfonyl- oder ein Alkylsulfonylrest ist, deren
- 5 Arylteil gegebenenfalls einen, zwei, drei, vier oder fünf Substituenten, die unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten, tragen kann, oder mit einem weiteren Arylrest verknüpft ist;

und entweder

- 10  $R_2-(CH_2)_p-CO-NH-(CH_2)_q-X$ ,  $-(CH_2)_r-NH-CO-(CH_2)_s-V-X$  oder  $-(CH_2)_r-NH-CO-O-(CH_2)_s-V-X$  ist

wobei

$p$  eine ganze Zahl von 1 bis 5 und  $q$  eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist,

$r$  eine ganze Zahl von 2 bis 5 und  $s$  ist eine ganze Zahl von 1-5 ist,

- 15  $V$  eine Bindung oder  $-CO-NH-(CH_2)_c-$  und  $c$  eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist, und
- $X$  ein Oligo- oder Polyalkylenglykol der Struktur  $-[O-(CH_2)_d]_e-OZ$  oder  $-[O-CH(CH_3)-CH_2]_e-OZ$  oder einen Cyclus der Struktur  $-CH-(CH_2)_{f-1}-[O-(CH_2)_f]_g-O$  darstellt und  $d$

eine ganze Zahl von 2 bis 6,  $e$  eine ganze Zahl von 3 bis 1000 ist,  $Z$  ein Wasserstoffatom

- 20 oder ein Alkylrest ist oder die gesamte Inhibitorstruktur repliziert, die an die freie Valenz des Restes  $X$  gebunden ist,  $f$  eine ganze Zahl von 2 bis 6 ist und  $g$  eine ganze Zahl von 3 bis 10, ist; und

$R_3$  ein Phenyl- oder Cyclohexylrest ist, der mit 1 bis 5 gleichen oder unterschiedlichen Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus Halogenatomen, Alkyl- oder

- 25 Alkoxyresten oder Hydroxylgruppen substituiert sein kann und

$R_4$  ein Wasserstoffatom, Phenyl- oder Cyclohexylrest ist, der mit 1 bis 5 gleichen oder unterschiedlichen Substituenten, unabhängig voneinander ausgewählt aus Halogenatomen, Alkyl- oder Alkoxyresten oder Hydroxylgruppen substituiert sein kann,

$m$  0, 1, 2, 3 oder 4 ist und

- 30 am mit \* gekennzeichneten Kohlenstoffatom eine D-Konfiguration vorliegt;

oder

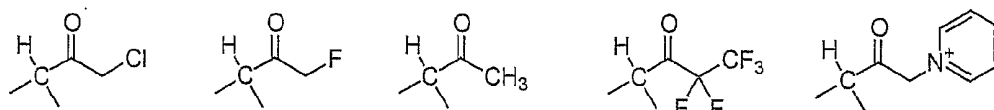
$R_2$  ein Wasserstoffatom ist und

$R_3-CO-NH-(CH_2)_q-X$ ,  $-CO-W_1-W_2-(CH_2)_q-X$ ,  $-NH-CO-(CH_2)_s-V-X$ ,

-NH-CO-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-V-X, -S-CH<sub>2</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-X oder -S-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-X ist,  
 wobei q, s, X und V wie vorstehend definiert sind und t eine ganze Zahl von 2 bis 5 ist, und  
 der Rest W<sub>1</sub> -O- oder -NH- ist, und W<sub>2</sub> eine Bindung darstellt oder die Struktur -(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>-Ph-  
 (CH<sub>2</sub>)<sub>v'</sub>-Amid- aufweist, in der v und v' unabhängig von einander 0, 1 oder 2 sind, Ph einen  
 1,2-, 1,3- oder 1,4-substituierten Phenylrest und Amid -HN-(O)C- oder -C(O)NH- darstellt,  
 und  
 R<sub>4</sub> ein Wasserstoffatom ist  
 m 1, 2, 3, 4 oder 5 ist und  
 am mit \* gekennzeichneten Kohlenstoffatom eine L-Konfiguration vorliegt.

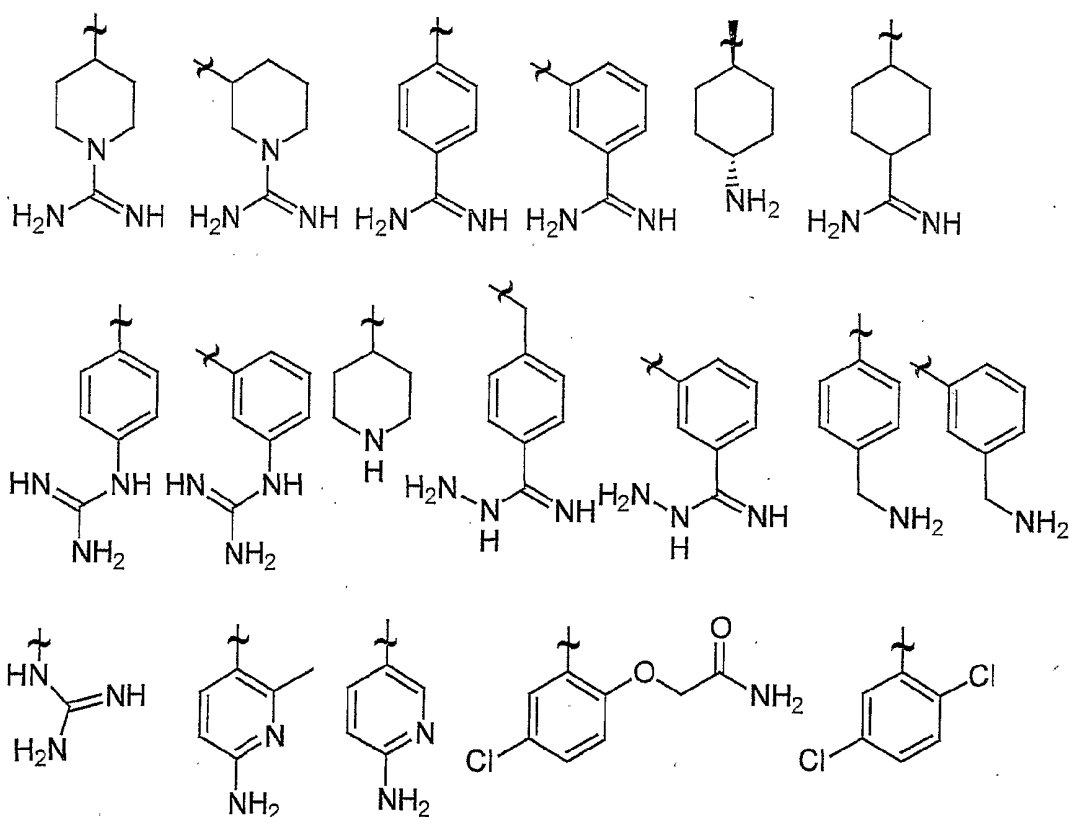
10

2) Verbindung gemäß Anspruch 1, wobei B eine der folgenden Strukturen darstellt



3) Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei D eine der folgenden Strukturen darstellt

15

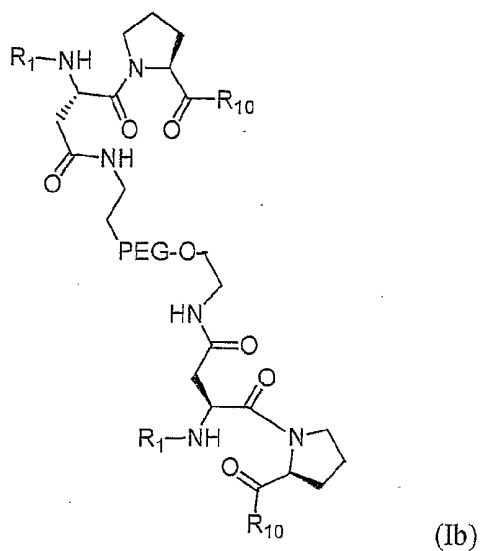
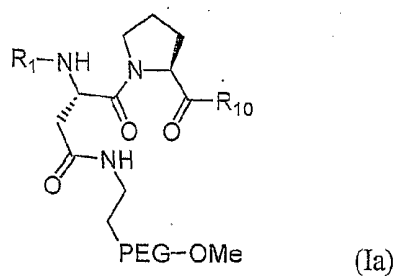


20

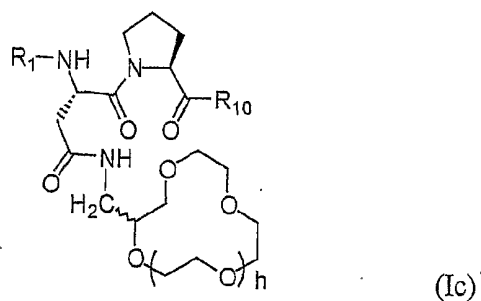
4) Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei X eine cyclische Struktur der Formel -  $\text{CH}-(\text{CH}_2)_{f-1}-[\text{O}-(\text{CH}_2)_g]_g-\text{O}$  aufweist und f und g wie in Anspruch 1 definiert sind

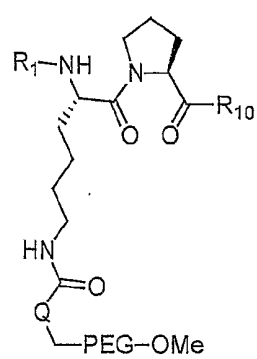
5

5) Verbindung gemäß Anspruch 1 mit einer der folgenden Formeln Ia-Ih



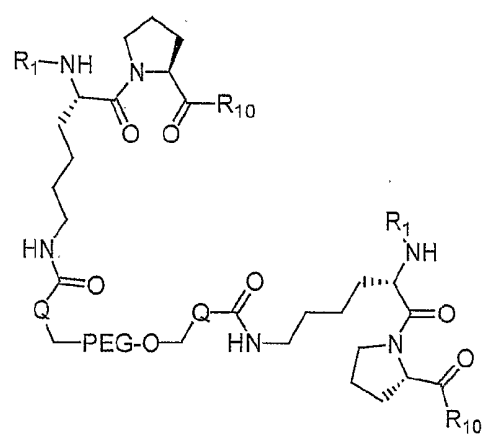
10





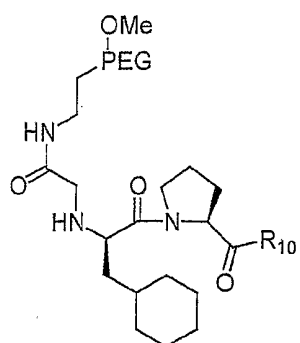
(Id)

5

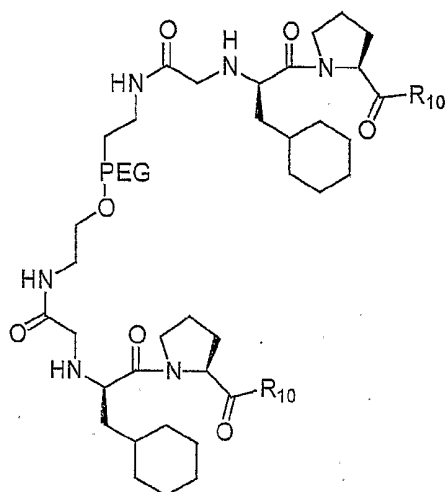


(Ie)

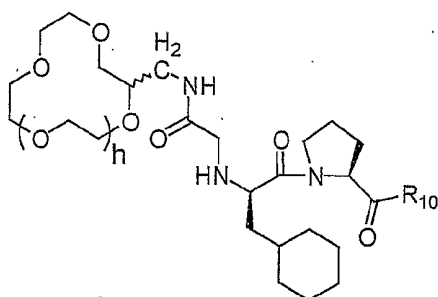
10



(If)



(Ig)



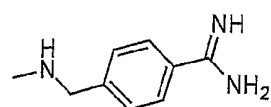
(Ih)

in denen  $R_1$  ein 4-Methoxy-phenylsulfonyl-, 4-Methoxy-3-Chlor-phenylsulfonyl-, 4-Methoxy-3-Methyl-phenylsulfonyl- oder 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenylsulfonylrest ist,  
 $Q-(CH_2)_{s'}$ - mit  $s' = 0, 1, 2, 3$  oder  $4$ ,  $-O-CH_2-$  oder  $-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2$  ist  
 und

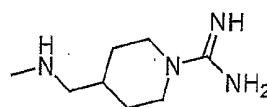
PEG eine Polyethylenglykolstruktur der Formel  $-[O-C_2H_4]_i-$  darstellt, mit Werten für  $i$  von 3 bis 1000,

$h$  für 1, 2, 3 oder 4 steht

und  $R_{10}$



oder



ist.

6) Verfahren zur Erleichterung der renalen Eliminierung eines Thrombininhibitors, dadurch gekennzeichnet daß der Inhibitor in ein Oligo- oder Polyalkylenglykokonjugat integriert wird, in dem eine kovalente Bindung zwischen dem Inhibitor und einer der Strukturen  $-[O-$

$(\text{CH}_2)_d\text{-OZ}$ ,  $-\text{[O-CH(CH}_3\text{)-CH}_2\text{]}_e\text{-OZ}$  oder  $-\text{CH-}(\text{CH}_2)_{f-1}\text{-[O-(CH}_2\text{)]}_g\text{-O}$  vorliegt, wobei d, e, f, g und Z wie in Anspruch 1 definiert sind.

- 7) Verfahren zur Verbesserung der Löslichkeit eines Thrombininhibitors im extrazellulären Wasserraum, dadurch gekennzeichnet daß der Inhibitor in ein Oligo- oder Polyalkylenglykolkonjugat integriert wird, in dem eine kovalente Bindung zwischen dem Inhibitor und einer der Strukturen  $-\text{[O-(CH}_2\text{)]}_d\text{-OZ}$ ,  $-\text{[O-CH(CH}_3\text{)-CH}_2\text{]}_e\text{-OZ}$  oder  $-\text{CH-}(\text{CH}_2)_{f-1}\text{-[O-(CH}_2\text{)]}_g\text{-O}$  vorliegt, wobei d, e, f, g und Z wie in Anspruch 1 definiert sind.

10

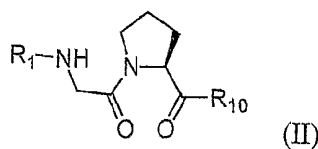
- 8) Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 als Wirkstoff zur Therapie oder Prophylaxe thrombotischer Komplikationen, der überwiegend renal eliminiert wird.

- 9) Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Beschichten einer Oberfläche.

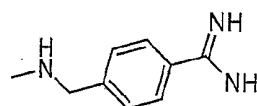
- 10) Verfahren zur Modifikation einer Oberfläche, umfassend das in Kontakt bringen der Oberfläche mit einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.

20

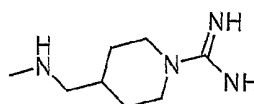
- 11) Verbindung der Struktur



- wobei  $R_1$  einen 4-Methoxy-phenylsulfonyl-, 4-Methoxy-3-Chlor-phenylsulfonyl-, 4-Methoxy-3-Methyl-phenylsulfonyl oder einen 4-Methoxy-2,3,6-trimethyl-phenylsulfonyl-rest darstellt und  $R_{10}$



oder

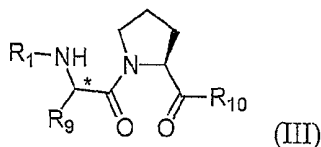


ist.

30



## 12) Verbindung der Struktur



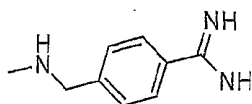
5 wobei

$R_1$  einen 4-Methoxy-phenylsulfonyl-, 4-Methoxy-3-Chlor-phenylsulfonyl-, 4-Methoxy-3-Methyl-phenylsulfonyl- oder einen 4-Methoxy-1,3,6-trimethyl-phenylsulfonylrest darstellt, und

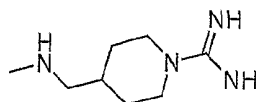
$R_9$  einen der Reste  $-(CH_2)_j-C(O)OR_{11}$ ,  $-(CH_2)_j-R_{12}$ , oder  $-(CH_2)_j-C(O)NH-R_{11}$  darstellt,

10 wobei  $R_{11}$  ein Wasserstoffatom, oder ein  $C_1-C_6$  Alkylrest,  $C_7-C_{13}$  Aralkylrest oder  $C_6$  bis  $C_{12}$  Arylrest ist, die mit einem Halogenatom, einem linearen oder verzweigten Alkylrest, einer Carboxylgruppe, Cyanogruppe, einem Carboxyalkylrest oder einem Aminoalkylrest substituiert sein können,  $R_{12}$  eine der Gruppen  $NH_2$ ,  $OH$  oder  $SH$  ist, und  $j$  1, 2, 3 oder 4 ist,  $R_{10}$

15



oder



ist,

und am mit \* gekennzeichneten C-Atom eine L-Konfiguration vorliegt.

20

13) Verbindung gemäß Anspruch 12, wobei  $R_{11}$  eine substituierte oder unsubstituierte Methyl-, Ethyl- oder eine substituierte oder unsubstituierte Benzylgruppe ist.

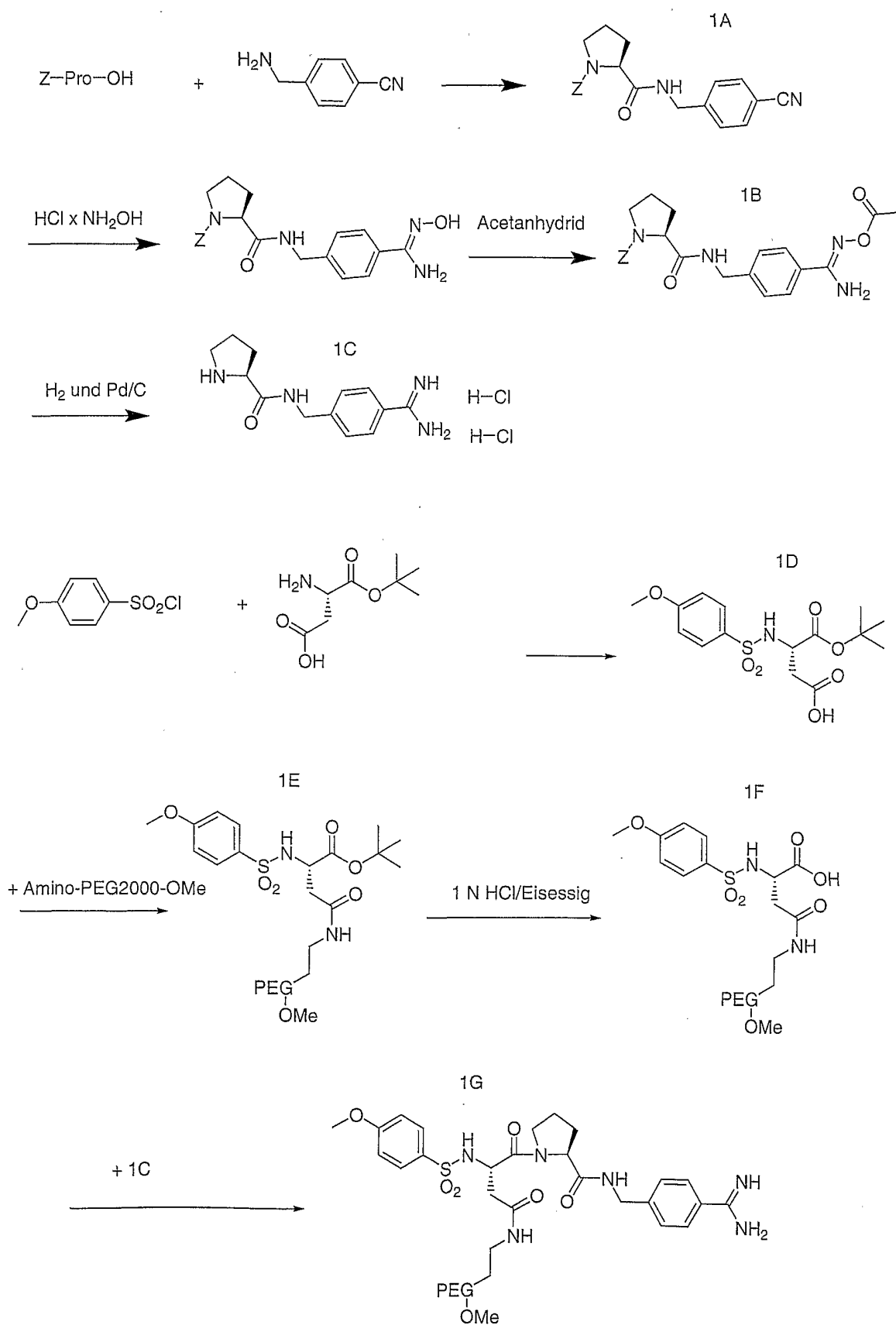


Abb.1

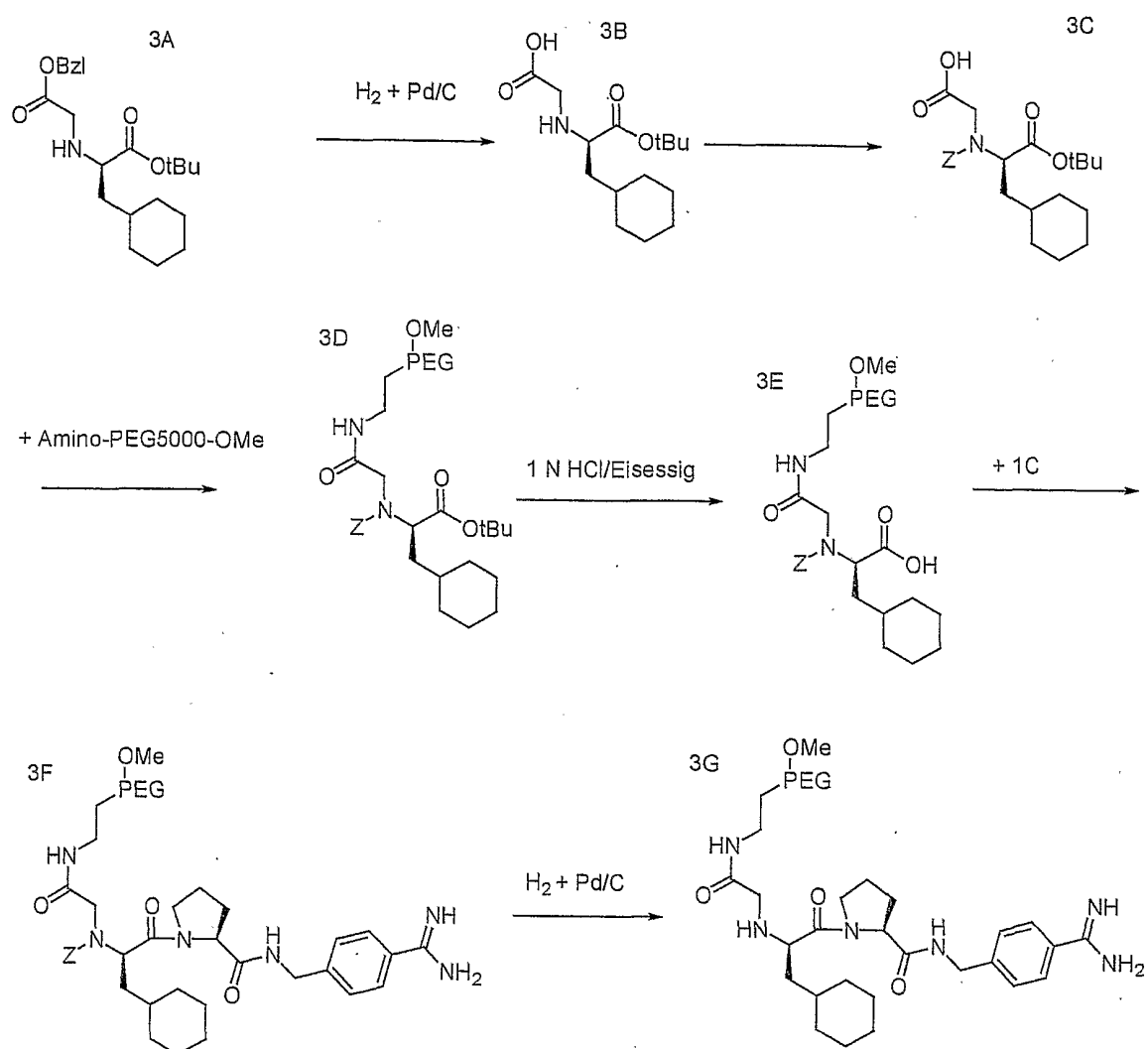


Abb.2

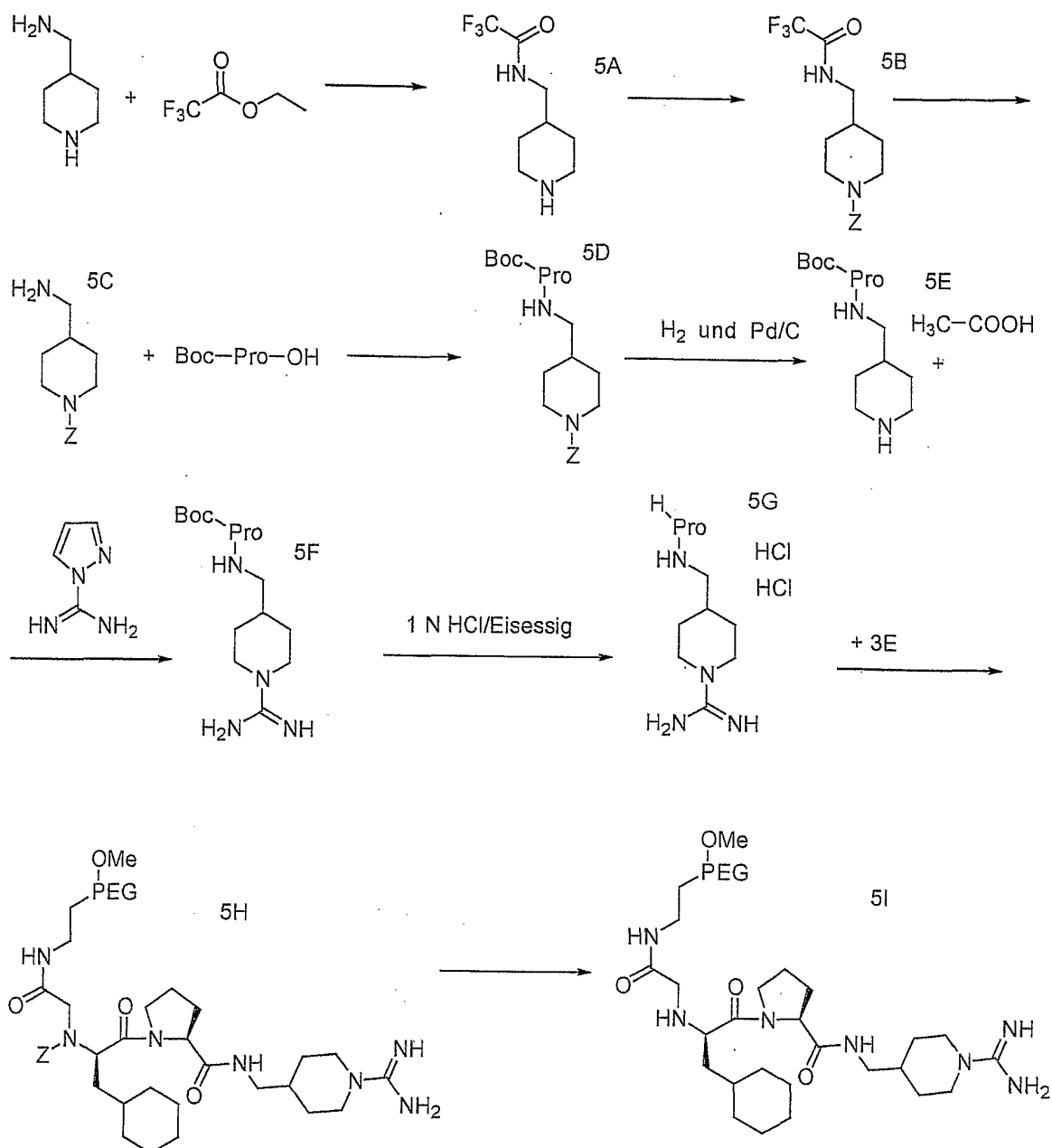


Abb.3

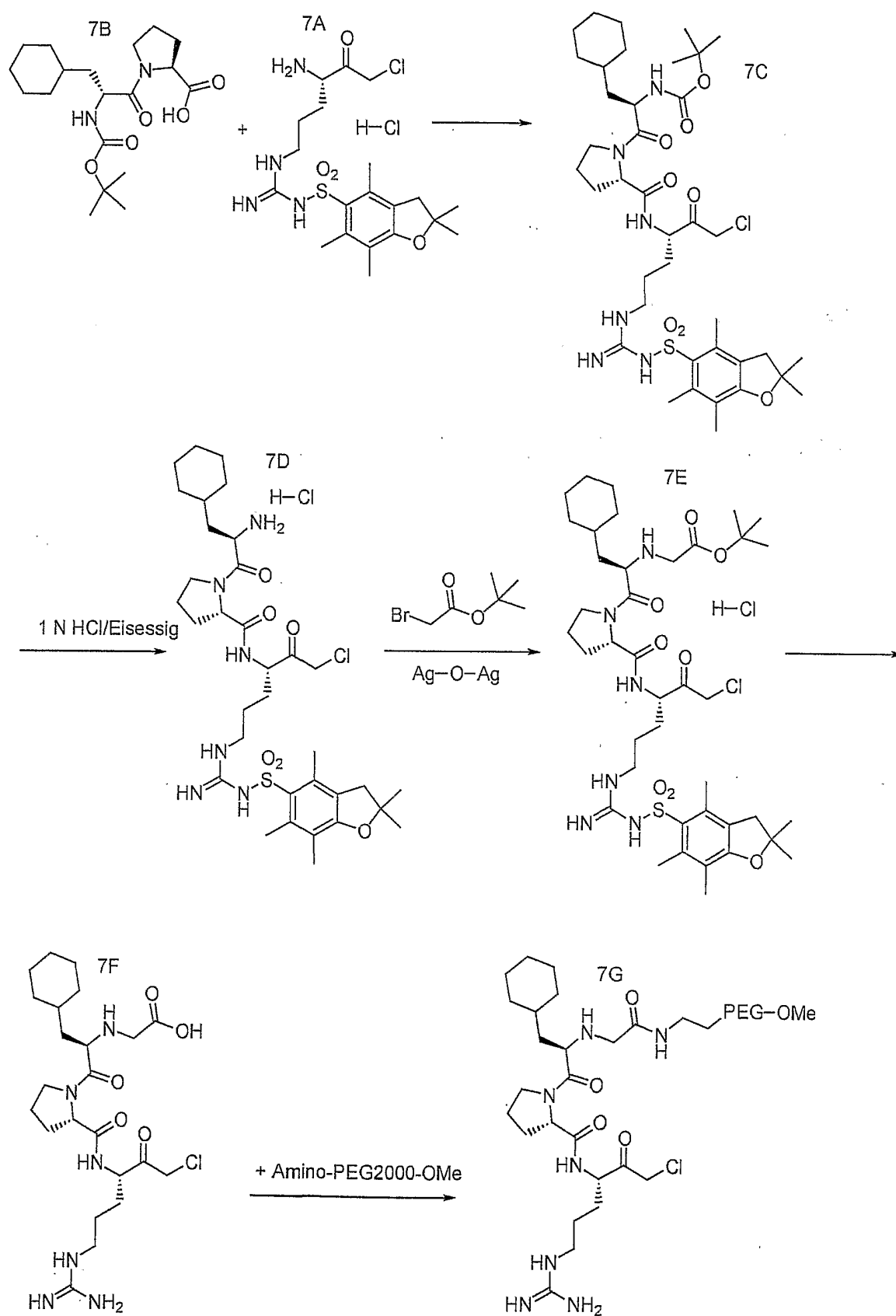


Abb.4

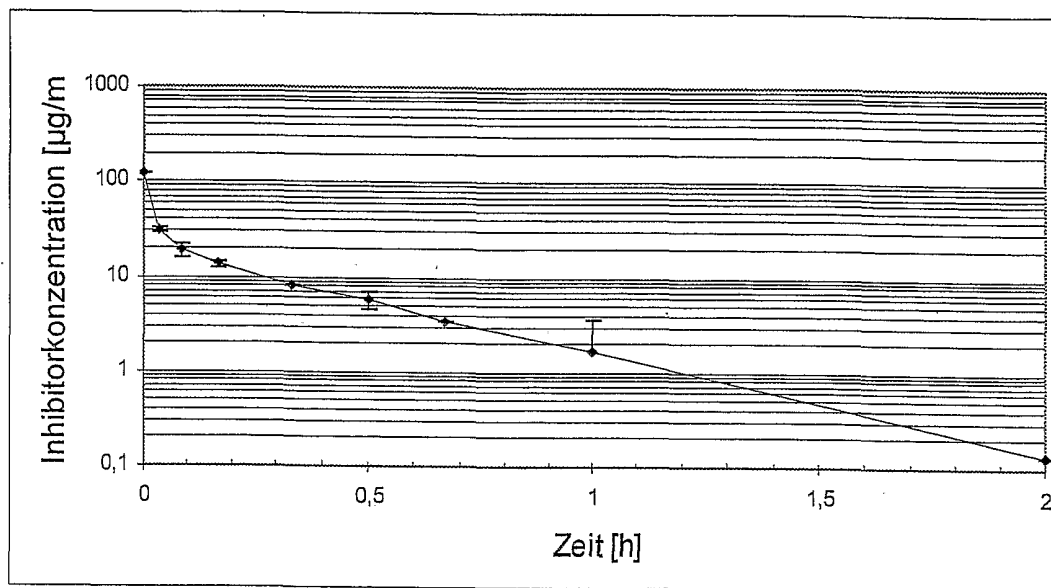


Abb. 5

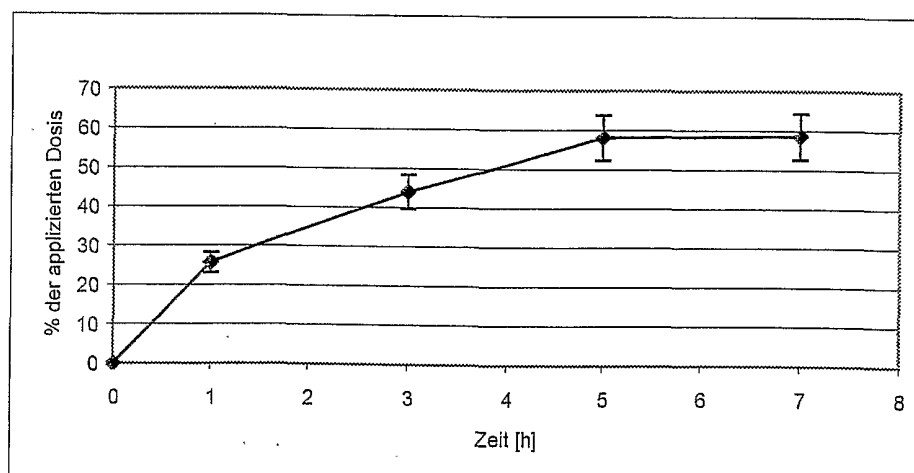


Abb. 6

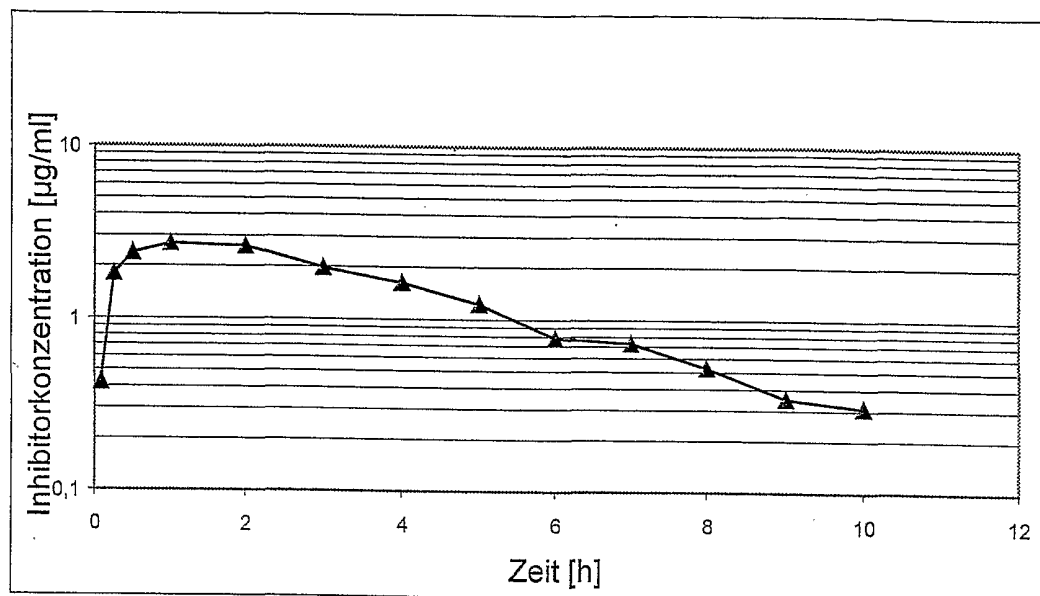


Abb.7

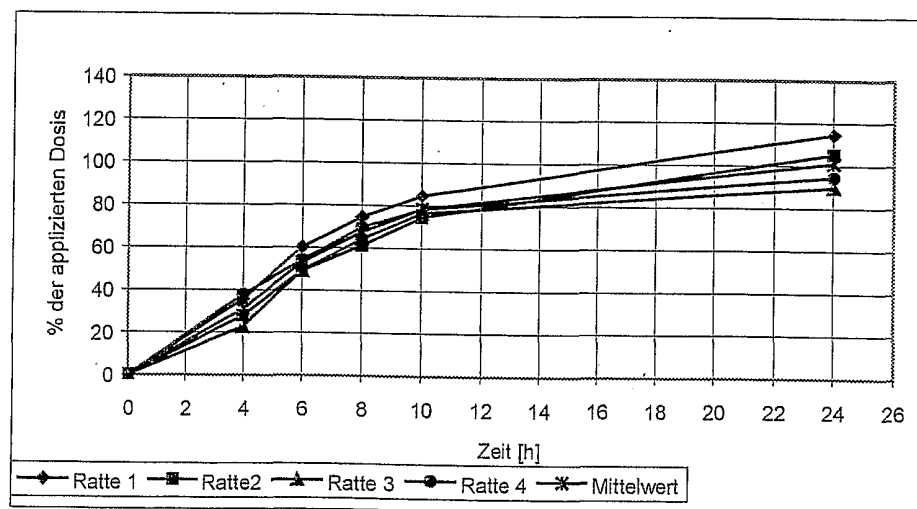


Abb.8

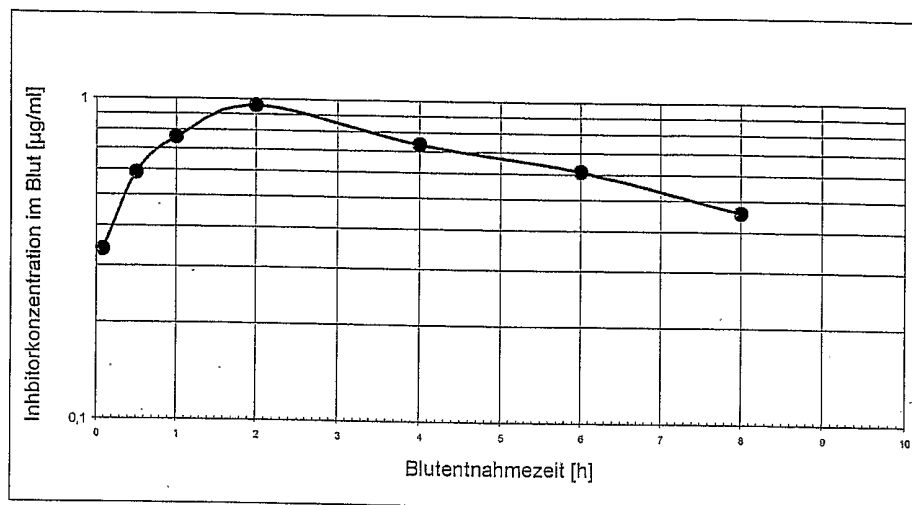


Abb.9

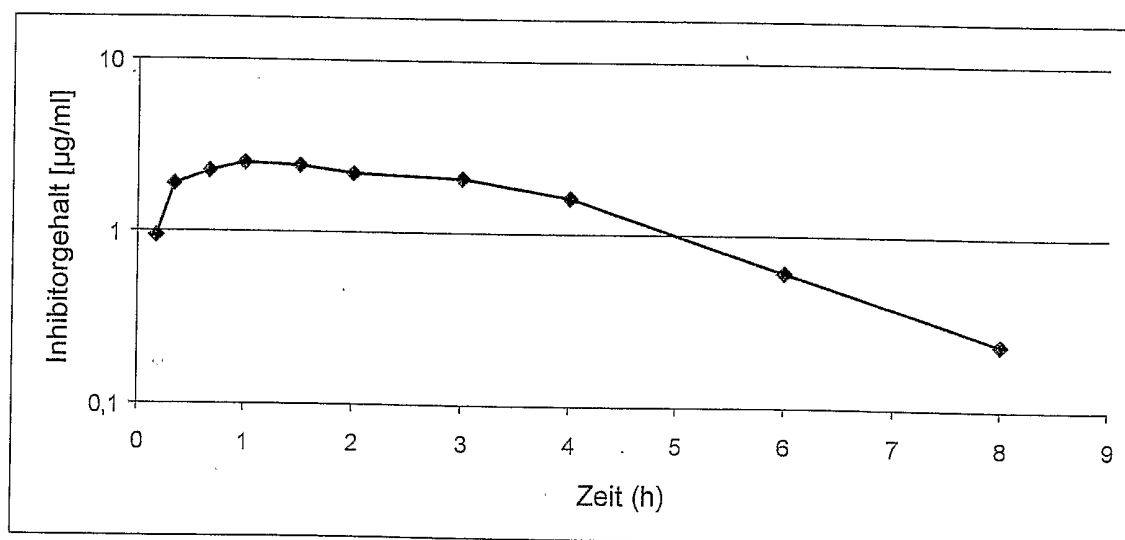


Abb. 10



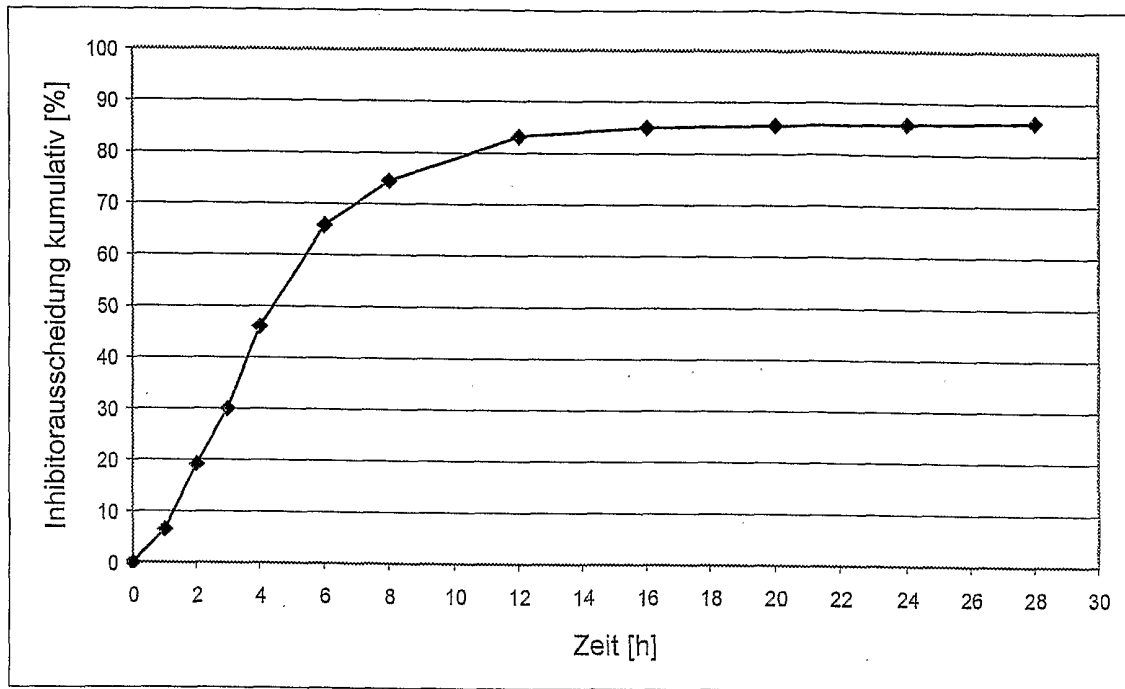


Abb. 11

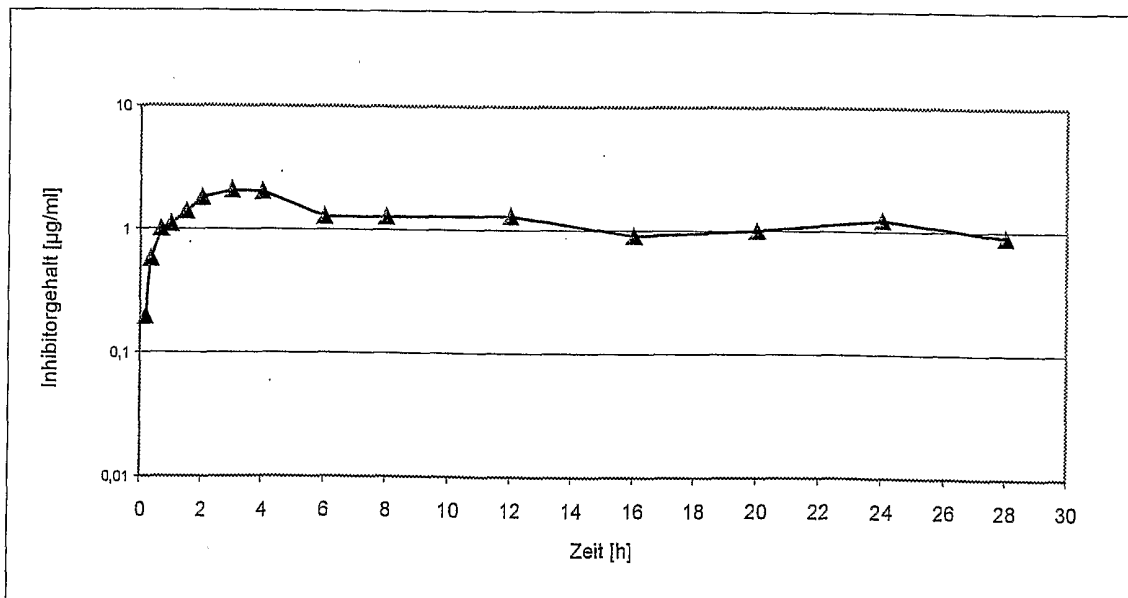


Abb. 12

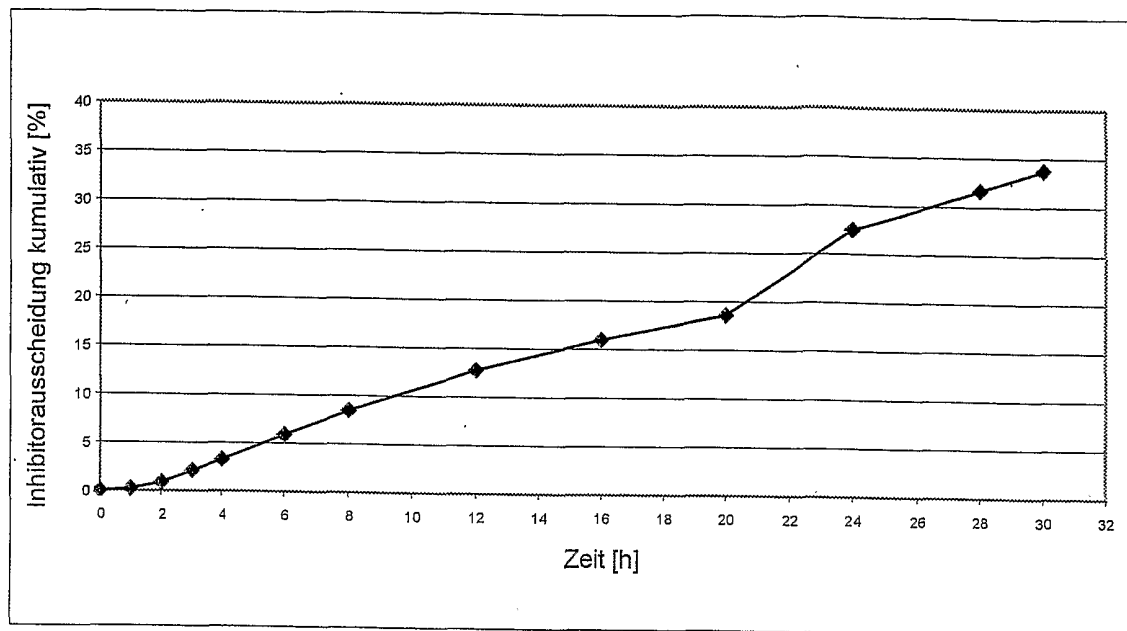


Abb. 13