

Q.f.



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

04-16754

54. TITULO

NUEVOS DERIVADOS DEL ACIDO MANDELICO Y SU USO COMO INHIBIDORES DE
LA TROMBINA

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K31/397

71. SOLICITANTE

ASTRAZENECA AB

DOMICILIO

SODERTALJE, SUECIA

74. APODERADO

RAMIRO CASTRO DUQUE

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

25-02-04

PETITORIO

AS: 93.280

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

04 016754 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Indicacion: 04016754 00000000 Folios: 166
Fecha (MM/AA): 2004-02-25 17:20:06
Asunto: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: ENDO DIVISION DE NUEVOS CREACIONESFORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ASTRAZENECA AB

Dirección: S-151 85 Sodertälje, Suecia

Nacionalidad o Domicilio: Suecia

Lugar de Constitución: Suecia

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: RAMIRO CASTRO DUQUE

Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9

Teléfono: 380-2200

Fax: 380-2700

E-mail:

IDENTIFICACION

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 170.322 TP 1003

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Tord Inghardt, Anders Johansson, Arne Svensson

Dirección: AstraZeneca R&D Mölndal, S-431 83 Mölndal, SE; AstraZeneca R&D Mölndal, S-431 83 Mölndal, SE; AstraZeneca R&D Mölndal, S-431 83 Mölndal, SE; AstraZeneca R&D Mölndal, S-431 83 Mölndal, Suecia (Respectivamente)

Nacionalidad o Domicilio: Suecia (Respectivamente)

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/SE02/01557Fecha 30-08-2002Publicación Internacional No. WO 03/018551 A1Fecha 06-03-2003

6

Título (54): NUEVOS DERIVADOS DEL ÁCIDO MANDELICO Y SU USO COMO INHIBIDORES DE LA TROMBINA7 Clasificación Internacional (51) A61K31/397; A61P7/02; C07D 265/04

8 Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

SE

SE

(32) Fecha

30-08-2001

30-11-2001

(31) Número de Solicitud

0102921-4

PCT/SE01/02857

9 Comprobante de pago No. 044.132Fecha 24-02-2004

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

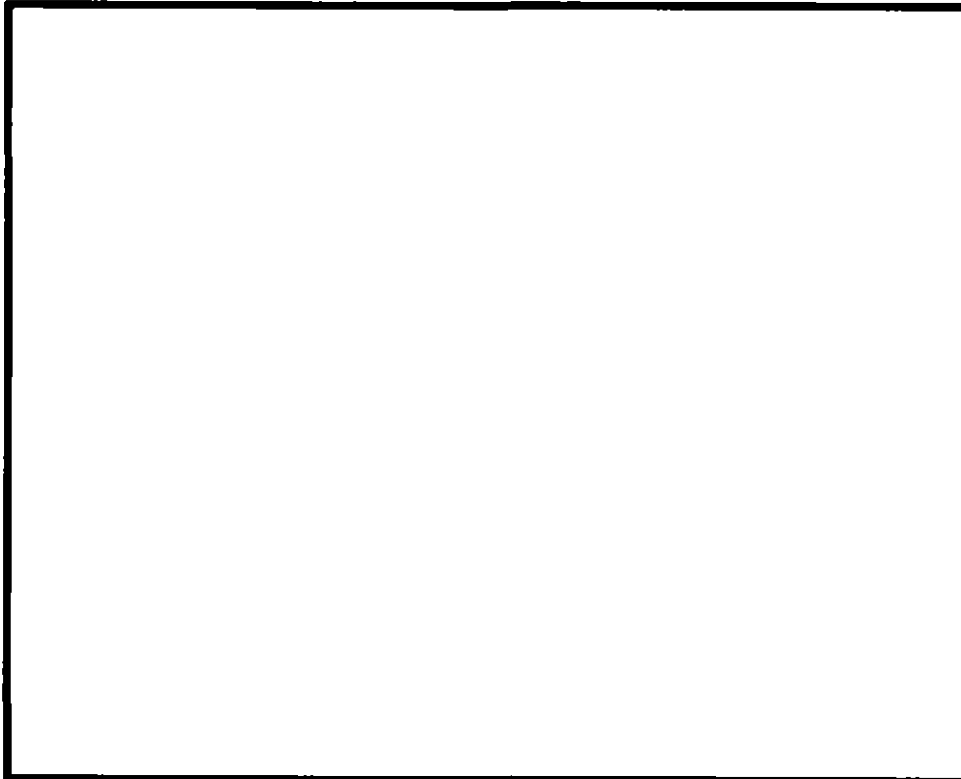
2020-F08(01-11-15)

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$422.000
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada anexa
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, Descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, Descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☒ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arie final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros. Tarjeta de Propietarios.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: RAMIRO CASTRO DUCHE

FIRMA:

C.C. 170.322 de Bogotá - I.P. 1003 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

42

3
A

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicecion : 04016754 00000000 Folios: 166
NIT : 800176089- Fecha (HEB): 2004-02-23 17:29:06
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NNC1 411 PRESENTAC
Dependencia: 8020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 4,132
FECHA : ENERO 20 DE 2004

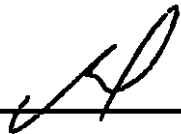
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	21589772	20/01/2004	12,762,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	\$ 422,0 .00

SOM: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____ 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/018551 A1

- (51) International Patent Classification: C07D 205/04, A61K 31/397, A61P 7/02
- (21) International Application Number: PCT/SI03/01557
- (22) International Filing Date: 30 August 2002 (30.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0102921-4 30 August 2001 (30.08.2001) SI;
PCT/SI01/02657
30 November 2001 (30.11.2001) SI
- (71) Applicant (for all designated States except US): AstraZeneca AB [SI/SI]; S-151 85 Södertälje (SI).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): INGARDT, Tord [SI/SI]; AstraZeneca R & D Mölndal, S-431 83 Mölndal (SI); JOHANSSON, Anders [SI/SI]; AstraZeneca R & D Mölndal, S-431 83 Mölndal (SI); SVENSSON, Arne [SI/SI]; AstraZeneca R & D Mölndal, S-431 83 Mölndal (SI).
- (74) Agent: GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY: AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje (SI).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, ~~CO~~ CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HN, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NH, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:**
as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations: AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HN, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW. ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SI, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR). OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NH, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NEW MANDULIC ACID DERIVATIVES AND THEIR USE AS THROMBIN INHIBITORS

(57) Abstract: There is provided a compound of formula (I) and pharmaceutically-acceptable derivatives (including prodrugs) thereof, which compound and derivatives are useful as, or are useful as prodrugs of, competitive inhibitors of trypsin-like proteases, such as thrombin, and thus, in particular, in the treatment of conditions where inhibition of thrombin is required (e.g. thrombosis) or as anticoagulants.

WO 03/018551 A1

NEW MANDELIC ACID DERIVATIVES AND THEIR USE AS THROMBIN INHIBITORS

Field of the Invention

5

This invention relates to novel pharmaceutically useful compounds, in particular compounds that are, and/or compounds that are metabolised to compounds which are, competitive inhibitors of trypsin-like serine proteases, especially thrombin, their use as medicaments, pharmaceutical
10 compositions containing them and synthetic routes to their production.

Background

Blood coagulation is the key process involved in both haemostasis (i.e. the
15 prevention of blood loss from a damaged vessel) and thrombosis (i.e. the formation of a blood clot in a blood vessel, sometimes leading to vessel obstruction).

Coagulation is the result of a complex series of enzymatic reactions. One of
20 the ultimate steps in this series of reactions is the conversion of the proenzyme prothrombin to the active enzyme thrombin.

Thrombin is known to play a central role in coagulation. It activates platelets, leading to platelet aggregation, converts fibrinogen into fibrin
25 monomers, which polymerise spontaneously into fibrin polymers, and activates factor XIII, which in turn crosslinks the polymers to form insoluble fibrin. Furthermore, thrombin activates factor V and factor VIII leading to a "positive feedback" generation of thrombin from prothrombin.

By inhibiting the aggregation of platelets and the formation and crosslinking of fibrin, effective inhibitors of thrombin would be expected to exhibit antithrombotic activity. In addition, antithrombotic activity would be expected to be enhanced by effective inhibition of the positive feedback
5 mechanism.

Prior Art

The early development of low molecular weight inhibitors of thrombin has
10 been described by Claesson in Blood Coagul. Fibrinol. (1994) 5, 411.

Blombäck *et al* (in J. Clin. Lab. Invest. 24, suppl. 107, 59, (1969)) reported thrombin inhibitors based on the amino acid sequence situated around the cleavage site for the fibrinogen A α chain. Of the amino acid sequences
15 discussed, these authors suggested the tripeptide sequence Phe-Val-Arg (P9-P2-P1, hereinafter referred to as the P3-P2-P1 sequence) would be the most effective inhibitor.

Thrombin inhibitors based on dipeptidyl derivatives with an α,ω -aminoalkyl
20 guanidine in the P1-position are known from US Patent N° 4,346,078 and International Patent Application WO 93/11152. Similar, structurally related, dipeptidyl derivatives have also been reported. For example International Patent Application WO 94/29336 discloses compounds with, for example, aminomethyl benzamidines, cyclic aminoalkyl amidines and
25 cyclic aminoalkyl guanidines in the P1-position (International Patent Application WO 97/23499 discloses prodrugs of certain of these compounds); European Patent Application 0 648 780, discloses compounds with, for example, cyclic aminoalkyl guanidines in the P1-position.

Thrombin inhibitors based on peptidyl derivatives, also having cyclic aminoalkyl guanidines (e.g. either 3- or 4- aminomethyl-1-amidino-piperidine) in the P1-position are known from European Patent Applications 0 468 231, 0 559 046 and 0 641 779.

5

Thrombin inhibitors based on tripeptidyl derivatives with arginine aldehyde in the P1-position were first disclosed in European Patent Application 0 185 390.

- 10 More recently, arginine aldehyde-based peptidyl derivatives, modified in the P3-position, have been reported. For example, International Patent Application WO 93/18060 discloses hydroxy acids, European Patent Application 0 526 877 des-amino acids, and European Patent Application 0 542 525 O-methyl mandelic acids in the P3-position.

15

- Inhibitors of serine proteases (e.g. thrombin) based on electrophilic ketones in the P1-position are also known. For example, European Patent Application 0 195 212 discloses peptidyl α -keto esters and amides, European Patent Application 0 362 002 fluoroalkylamide ketones, European
20 Patent Application 0 364 344 α,β,δ -triketocompounds, and European Patent Application 0 530 167 α -alkoxy ketone derivatives of arginine in the P1-position.

- Other, structurally different, inhibitors of trypsin-like serine proteases based
25 on C-terminal boronic acid derivatives of arginine and isothiuronium analogues thereof are known from European Patent Application 0 293 881.

- More recently, thrombin inhibitors based on peptidyl derivatives have been disclosed in European Patent Application 0 669 317 and International Patent
30 Applications WO 95/35309, WO 95/23609, WO 96/25426, WO 97/02284,

WO 97/46577, WO 96/32110, WO 96/31504, WO 96/03374, WO 98/06740, WO 97/49404, WO 98/57932, WO 99/29664, WO 00/35869 and WO 00/42059.

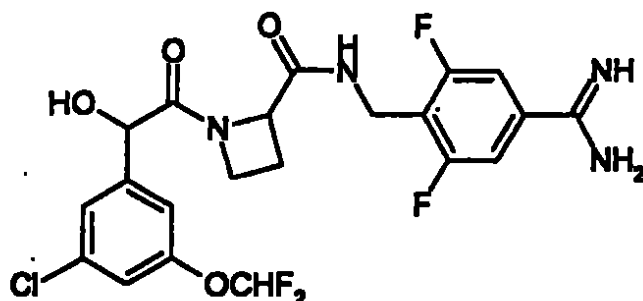
- 5 In particular, WO 97/02284 and WO 00/42059 disclose thrombin inhibitors with substituted mandelic acids in the P3 position.

However, there remains a need for effective inhibitors of trypsin-like serine proteases, such as thrombin. There is also a need for compounds which
10 have a favourable pharmacokinetic profile and are selective in inhibiting thrombin over other serine proteases, in particular those involved in haemostasis. Compounds which exhibit competitive inhibitory activity towards thrombin would be expected to be especially useful as anticoagulants and therefore in the therapeutic treatment of thrombosis and
15 related disorders.

Disclosure of the Invention

According to the invention there is provided a compound of formula I

20



(i.e. Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-CH(OH)C(O)-Aze-Pab(2,6-diF)),
or a pharmaceutically-acceptable derivative thereof.

25

The term "pharmaceutically-acceptable derivative" includes pharmaceutically-acceptable salts (e.g. acid addition salts).

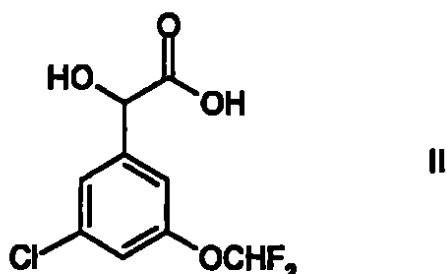
Abbreviations are listed at the end of this specification.

5

The compound of formula I may be made in accordance with techniques well known to those skilled in the art, for example as described hereinafter.

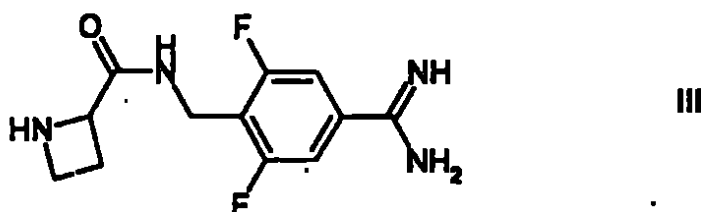
According to a further aspect of the invention there is provided a process for
10 the preparation of the compound of formula I, which comprises:

(i) the coupling of a compound of formula II,



15

with a compound of formula III,

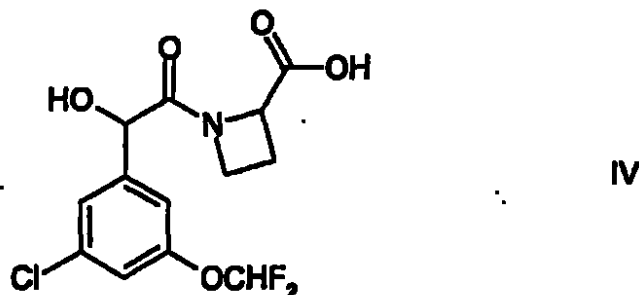


20 for example in the presence of a coupling agent (e.g. oxalyl chloride in DMF, EDC, DCC, HBTU, HATU, PyBOP or TBTU), an appropriate base

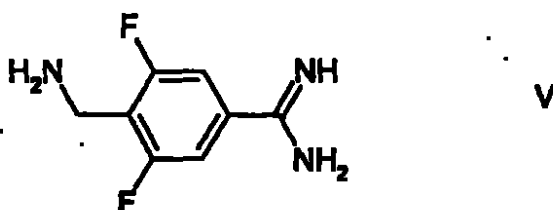
(e.g. pyridine, DMAP, TEA, 2,4,6-collidine or DIPEA) and a suitable organic solvent (e.g. dichloromethane, acetonitrile, EtOAc or DMF);

(ii) the coupling of a compound of formula IV,

5.



with the compound of formula V,



10

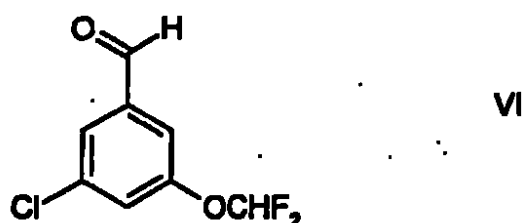
for example under conditions as described in process (i) above; or

(iii) reaction of a corresponding compound of formula XVI, as defined
15 hereinafter, with a suitable source of ammonia (e.g. ammonium acetate or ammonia gas) under conditions known to those skilled in the art, such as by reaction of an ethylimidoate intermediate (formed by reaction of a compound of formula XVI with HCl(g) in ethanol) with ammonia gas in ethanol, or under those conditions described in *Tetrahedron Lett.* 40, 7067 (1999), the
20 disclosures in which document are hereby incorporated by reference.

11
12

Compounds of formula II are available using known and/or standard techniques.

For example, compounds of formula II may be prepared by reaction of the
5 aldehyde of formula VI,



with:

10

(a) a compound of formula VII,



VII

15 wherein R'' represents H or $(CH_3)_3Si$, for example at room, or elevated, temperature (e.g. below $100^\circ C$) in the presence of a suitable organic solvent (e.g. chloroform or methylene chloride) and, if necessary, in the presence of a suitable base (e.g. TEA) and/or a suitable catalyst system (e.g. benzylammonium chloride or zinc iodide, or using a chiral catalyst, for
20 example as described in *Chem. Rev.*, (1999) 99, 3649), followed by hydrolysis under conditions that are well known to those skilled in the art (e.g. as described hereinafter);

(b) NaCN or KCN, for example in the presence of $NaHSO_3$ and water,
25 followed by hydrolysis;

(c) chloroform, for example at elevated temperature (e.g. above room temperature but below 100°C) in the presence of a suitable organic solvent (e.g. chloroform) and, if necessary, in the presence of a suitable catalyst system (e.g. benzylammonium chloride), followed by hydrolysis;

(d) a compound of formula VIII,

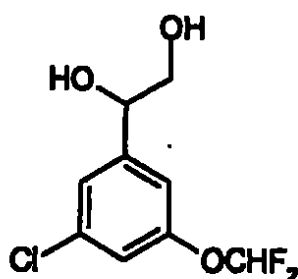


VIII

wherein M represents Mg or Li, followed by oxidative cleavage (e.g. ozonolysis or osmium or ruthenium catalysed) under conditions which are well known to those skilled in the art; or

(e) tris(methylthio)methane under conditions which are well known to those skilled in the art, followed by hydrolysis in the presence of e.g. HgO and HBF₄.

Compounds of formula II may alternatively be prepared by oxidation of a compound of formula IX,



IX

or a derivative thereof that is optionally protected at the secondary hydroxyl group, in the presence of a suitable oxidising agent (e.g. a combination of a suitable free radical oxidant (such as TEMPO) and an appropriate

hypochlorite salt (such as sodium hypochlorite)) under conditions known to those skilled in the art, for example at between -10°C and room temperature, in the presence of a suitable solvent (e.g. water, acetone or a mixture thereof), an appropriate salt (e.g. an alkali metal halide such as potassium bromide) and a suitable base (e.g. an alkali metal carbonate or hydrogen carbonate such as sodium hydrogen carbonate).

Enantiomerically-pure forms of compounds of formula II (i.e. those compounds having different configurations of substituents about the C-atom α - to the CO₂H group) may be separated by an enantiospecific derivatisation step. This may be achieved, for example by an enzymatic process. Such enzymatic processes include, for example, transesterification of the α -OH group at between room and reflux temperature (e.g. at between 45 and 65°C) in the presence of a suitable enzyme (e.g. Lipase PS Amano), an appropriate ester (e.g. vinyl acetate) and a suitable solvent (e.g. methyl *tert*-butyl ether). The derivatised isomer may then be separated from the unreacted isomer by conventional separation techniques (e.g. chromatography).

Groups added to compounds of formula II in such a derivatisation step may be removed either before any further reactions or at any later stage in the synthesis of compounds of formula I. The additional groups may be removed using conventional techniques (e.g. for esters of the α -OH group, hydrolysis under conditions known to those skilled in the art (e.g. at between room and reflux temperature in the presence of a suitable base (e.g. NaOH) and an appropriate solvent (e.g. MeOH, water or mixtures thereof))).

Compounds of formula III may be prepared by coupling azetidine-2-carboxylic acid to a compound of formula V, as hereinbefore defined, for example under similar conditions to those described herein for preparation of compounds of formula I.

5

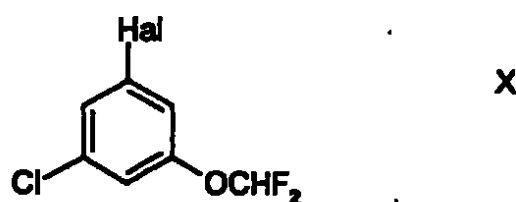
Compounds of formula IV may be prepared by coupling a compound of formula II as hereinbefore defined to azetidine-2-carboxylic acid, for example under similar conditions to those described herein for preparation of compounds of formula I.

10

The compound of formula VI is available using known and/or standard techniques. For example, it may be prepared by:

- (i) metallation (wherein the metal may be, for example, an alkali metal such as Li or, preferably, a divalent metal such as Mg) of a compound of formula X,

15

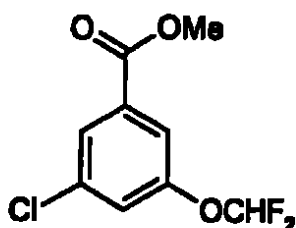


- wherein Hal represents a halogen atom selected from Cl, Br and I, followed by reaction with a suitable source of the formyl group (such as *N,N*-dimethylformamide), for example under conditions described hereinafter;

20

- (ii) reduction of a compound of formula XI,

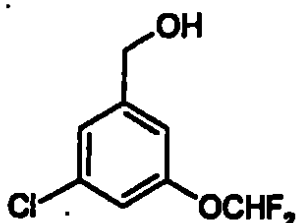
25

15
76

XI

in the presence of a suitable reducing agent (e.g. DIBAL-H); or

- 5 (iii) oxidation of a compound of formula XII,

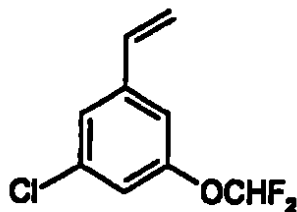


XII

10 in the presence of a suitable oxidising agent (e.g. MnO_2 , pyridinium chlorochromate, a combination of DMSO and oxalyl chloride, or SO_3 pyridine complex in DMSO).

Compounds of formula IX may be prepared by dihydroxylation of a corresponding compound of formula XIII

15



XIII

20 in the presence of a suitable dihydroxylating agent (e.g. a reagent or reagent mixture that provides OsO_4 , such as AD-mix- α or, particularly, AD-mix- β), for example under conditions known to those skilled in the art, such as at

16
T

between -10°C and room temperature in the presence of an appropriate solvent (e.g. water, *tert*-butanol or a mixture thereof). When asymmetric oxidants such as AD-mix- α or AD-mix- β are employed, this method may be used to prepare compounds of formula IX that have specific configurations of groups (i.e. *R* or *S*) about both of the C-atoms to which the primary and secondary hydroxyl groups are attached.

The compound of formula XIII may be prepared by reaction of a corresponding compound of formula X, as hereinbefore defined, with a suitable source of the vinyl anion (e.g. tributyl(vinyl)tin) under conditions known to those skilled in the art, for example at between room and reflux temperature (e.g. 50°C) in the presence of an appropriate solvent (e.g. toluene), a suitable coupling agent (e.g. a palladium(0) co-ordination complex such as tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)) and optionally in the presence of an appropriate catalyst (e.g. 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol).

Compounds of formulae V, VII, VIII, X, XI, XII and azetidine-2-carboxylic acid are either commercially available, are known in the literature, or may be obtained either by analogy with the processes described herein, or by conventional synthetic procedures, in accordance with standard techniques, from readily available starting materials using appropriate reagents and reaction conditions. Compounds of formula XVI may be obtained by processes described hereinafter.

25

Substituents on the phenyl ring in compounds of formulae I, II, III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII and XIII may be introduced using techniques well known to those skilled in the art by way of standard functional groups interconversions, in accordance with standard techniques, from readily

available starting materials using appropriate reagents and reaction conditions.

For example, compounds of formulae I, II, IV, VI, X, XI and XII may be
5 prepared from compounds corresponding to those compounds, in which, in
place of the $-OCHF_2$ group, an $-OH$ group is present (hereinafter referred
to as "the relevant phenol precursor compounds"), for example by reaction
of such a relevant phenol precursor compound with an appropriate
fluorinated haloalkane (such as $ClCHF_2$), e.g. at room temperature or above
10 (e.g. at reflux) in the presence of a suitable base (e.g. potassium *tert*-
butoxide, KOH or NaOH, for example in aqueous solution) and an
appropriate organic solvent (e.g. THF, chloroform or *i*-propanol), for
example as described hereinafter.

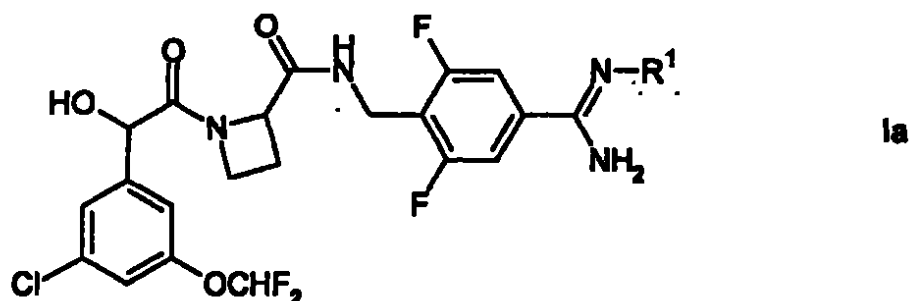
15 The skilled person will appreciate that such functional group
transformations may also be carried out at an earlier stage in the overall
synthesis of compounds of formulae II, IV, VI, X, XI and XII (i.e. on
appropriate precursors of the relevant phenol precursor compounds). The
relevant phenol precursor compounds are either commercially available, are
20 known in the literature, or may be obtained either by analogy with the
processes described herein, or by conventional synthetic procedures, in
accordance with standard techniques, from readily available starting
materials using appropriate reagents and reaction conditions. For example,
the relevant phenol precursor compounds may be obtained by deprotection
25 of the corresponding protected phenols (where the protecting group may be,
for example, methyl, allyl, benzyl or *tert*-butyl) under standard conditions.

Compounds of formula I may be isolated from their reaction mixtures using
conventional techniques.

10
fy

In accordance with the present invention, pharmaceutically acceptable derivatives of compounds of formula I also include "protected" derivatives, and/or compounds that act as prodrugs, of compounds of formula I.

- 5 Compounds that may act as prodrugs of compounds of formula I that may be mentioned include compounds of formula Ia,



- 10 wherein R^1 represents OR^2 or $C(O)OR^3$;
 R^2 represents H, C_{1-10} alkyl, C_{1-3} alkylaryl or C_{1-3} alkyloxyaryl (the alkyl parts of which latter two groups are optionally interrupted by one or more oxygen atoms, and the aryl parts of which latter two groups are optionally substituted by one or more substituents selected from halo, phenyl, methyl or methoxy, which latter three groups are also optionally substituted by one
 15 or more halo-substituents); and
 R^3 represents C_{1-10} alkyl (which latter group is optionally interrupted by one or more oxygen atoms), or C_{1-3} alkylaryl or C_{1-3} alkyloxyaryl (the alkyl parts of which latter two groups are optionally interrupted by one or more
 20 oxygen atoms, and the aryl parts of which latter two groups are optionally substituted by one or more substituents selected from halo, phenyl, methyl or methoxy, which latter three groups are also optionally substituted by one or more halo substituents),
 and pharmaceutically-acceptable derivatives thereof.

The term "pharmaceutically-acceptable derivatives" of compounds of formula Ia includes pharmaceutically-acceptable salts (e.g. acid addition salts).

- 5 Alkyloxyaryl groups that R^2 and R^3 may represent comprise an alkyl and an aryl group linked by way of an oxygen atom. Alkylaryl and alkyloxyaryl groups are linked to the rest of the molecule *via* the alkyl part of those groups, which alkyl parts may (if there is a sufficient number (i.e. three) of carbon atoms) be branched-chain. The aryl parts of alkylaryl and
- 10 alkyloxyaryl groups which R^2 and R^3 may represent, or be substituted by, include carbocyclic and heterocyclic aromatic groups, such as phenyl, naphthyl, pyridinyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiadiazolyl, indolyl and benzofuranyl and the like.
- 15 Alkyl groups which R^2 and R^3 may represent may be straight-chain or, when there is a sufficient number (i.e. a minimum of three) of carbon atoms, be branched-chain and/or cyclic. Further, when there is a sufficient number (i.e. a minimum of four) of carbon atoms, such alkyl groups may also be part cyclic/acyclic. Such alkyl groups may also be saturated or, when there
- 20 is a sufficient number (i.e. a minimum of two) of carbon atoms, be unsaturated.

Halo groups with which R^2 and R^3 may be substituted include fluoro, chloro, bromo and iodo.

25

When R^1 represents $C(O)OR^3$, preferred R^3 groups include:

- (a) linear, branched or cyclic C_{1-6} alkyl, for example C_{4-6} cycloalkyl;
- (b) C_{1-2} alkylaryl groups, such as benzyl, optionally substituted as indicated hereinbefore.

30

20
N

Preferred compounds of formula Ia include those in which R^1 represents OR^2 .

When R^1 represents OR^2 , preferred R^2 groups include:

- 5 (a) H;
- (b) unsubstituted, linear, branched or cyclic C_{1-8} (e.g. C_{1-6}) alkyl, such as linear C_{1-3} alkyl (e.g. ethyl or, particularly, methyl), branched C_{3-8} alkyl (e.g. *i*-propyl, *i*-butyl or 4-heptyl) or cyclic C_{4-7} alkyl (i.e. C_{4-7} cycloalkyl, e.g. cyclobutyl or cyclohexyl);
- 10 (c) C_{1-3} alkyloxyphenyl (e.g. C_2 alkyloxyphenyl), which phenyl group is optionally substituted by one or more substituents as indicated hereinbefore (e.g. trifluoromethyl);
- (d) C_{1-2} alkylaryl (e.g. methylaryl), wherein the aryl group is phenyl, pyridinyl, oxazolyl or isoxazolyl, which latter three groups are
15 optionally substituted by one or more substituents as indicated hereinbefore (e.g. methoxy, methyl, bromo and/or chloro).

Preferred compounds of formula Ia include those in which R^1 represents OR^2 and R^2 represents linear, branched (as appropriate), or cyclic (as
20 appropriate), C_{1-6} (e.g. C_{1-4}) alkyl, such as methyl, ethyl, *n*-propyl, *i*-propyl or cyclobutyl.

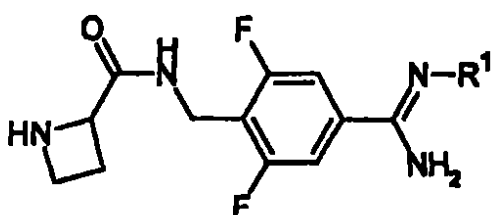
Compounds of formula Ia may be prepared by one or more of the following methods:

25

- (a) reaction of a corresponding compound of formula II as hereinbefore defined with a compound of formula XIV,

21

17

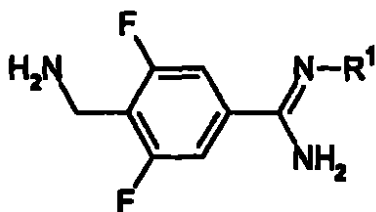


XIV

wherein R^1 is as hereinbefore defined, for example under similar conditions to those described hereinbefore for synthesis of compounds of formula I;

5

(b) reaction of a corresponding compound of formula IV as hereinbefore defined with a compound of formula XV,

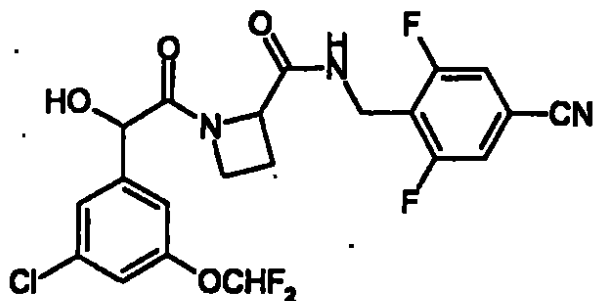


XV

10

wherein R^1 is as hereinbefore defined, for example under similar conditions to those described hereinbefore for synthesis of compounds of formula I;

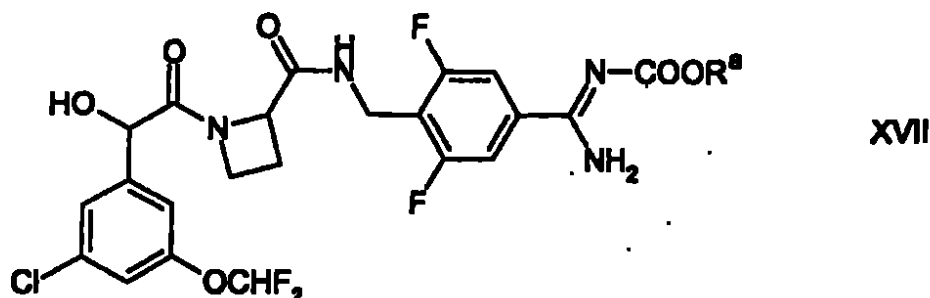
(c) for compounds of formula Ia in which R^1 represents OH, reaction of a
15 corresponding compound of formula XVI,



XVI

with hydroxylamine, for example under conditions known to those skilled in the art;

- (d) for compounds of formula Ia in which R^1 represents OR^2 , reaction of a protected derivative of a corresponding compound of formula I which is, for example, a compound of formula XVII,



- wherein R^2 represents, for example, $-CH_2CH_2Si(CH_3)_3$ or benzyl, or a tautomer thereof, with a compound of formula XVIII,



XVIII

- wherein R^2 is as hereinbefore defined, or an acid addition salt thereof, for example at between room and reflux temperature in the presence of an appropriate organic solvent (e.g. THF, CH_3CN , DMF or DMSO), followed by removal of the $-C(O)OR^2$ group under conditions known to those skilled in the art (e.g. by reacting with QF or TFA (e.g. as described hereinafter));

- (e) for compounds of formula Ia in which R^1 represents OH, reaction of a compound of formula XVII, as hereinbefore defined, in which R^2 represents benzyl with hydroxylamine, or an acid addition salt thereof, for example under conditions that will be well known to those skilled in the art;

(f) for compounds of formula Ia in which R^1 represents $COOR^3$, reaction of a corresponding compound of formula I as hereinbefore defined with a compound of formula XIX,

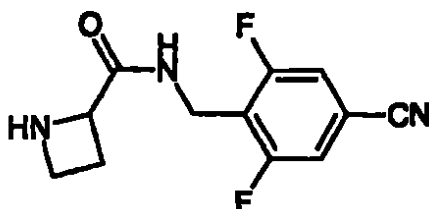


XIX

wherein L^1 represents a suitable leaving group, such as halo or nitrophenyl (e.g. 4-nitrophenyl), and R^3 is as hereinbefore defined, for example at or around room temperature in the presence of suitable base (e.g. NaOH, for example in aqueous solution) and an appropriate organic solvent (e.g. methylene chloride); or

(g) for compounds of formula Ia in which R^1 represents OCH_3 or OCH_2CH_3 , reaction of a corresponding compound of formula Ia in which R^1 represents OH with dimethylsulfate or diethylsulfate, respectively, for example in the presence of a suitable base (e.g. an alkali metal hydroxide such as KOH (for example in aqueous solution at e.g. 50 wt.%) and an appropriate catalyst (e.g. a quaternary ammonium halide such as benzyltrimethylammonium chloride (for example in CH_2Cl_2 or THF solution at e.g. 10 wt.%)).

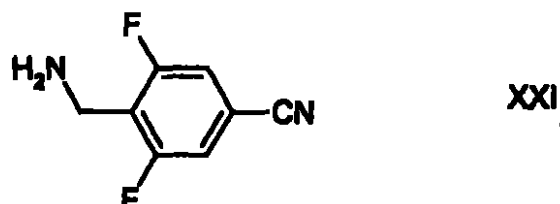
Compounds of formula XVI may be prepared by reaction of a corresponding compound of formula II, as hereinbefore defined, with a compound of formula XX,



XX

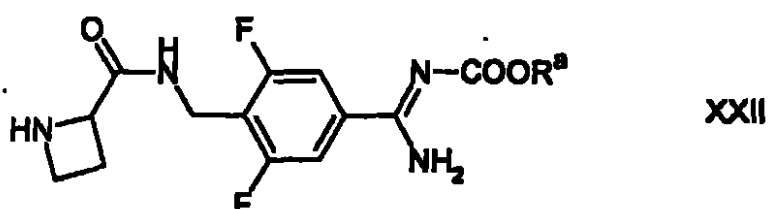
for example under similar conditions to those described hereinbefore for synthesis of compounds of formula I.

Compounds of formulae XVI may alternatively be prepared by reaction of a
5 corresponding compound of formula IV, as hereinbefore defined, with a compound of formula XXI,



10 for example under similar conditions to those described hereinbefore for synthesis of compounds of formula I.

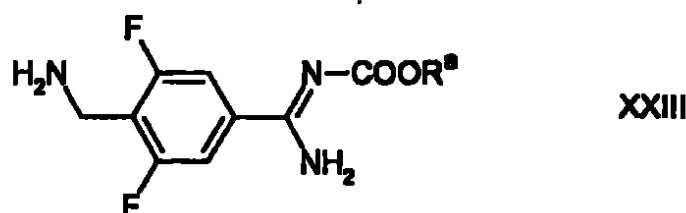
Compounds of formula XVII may be prepared by reaction of a
corresponding compound of formula II, as hereinbefore defined, with a
15 compound of formula XXII,



wherein R^a are as hereinbefore defined, for example under similar
20 conditions to those described hereinbefore for synthesis of compounds of formula I.

Alternatively, compounds of formula XVII may be prepared by reaction of a corresponding compound of formula I with a compound corresponding to a compound of formula XIX in which, in place of R³, the group R^a is present, in which R^a is as hereinbefore defined, for example under conditions described above in respect of the preparation of compounds of formula Ia.

Compounds of formulae XIV and XXII may be prepared by reaction of azetidine-2-carboxylic acid with, respectively, a compound of formula XV as hereinbefore defined, or a compound of formula XXIII,



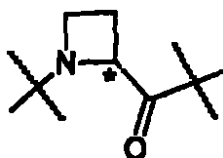
wherein R^a is as hereinbefore defined, for example under similar conditions to those described hereinbefore for synthesis of compounds of formula I.

Compounds of formula XV, XVIII, XIX, XX, XXI and XXIII are either commercially available, are known in the literature, or may be obtained either by analogy with the processes described herein, or by conventional synthetic procedures, in accordance with standard techniques, from readily available starting materials using appropriate reagents and reaction conditions. For example, compounds of formula XX may be prepared by reaction of a corresponding compound of formula XXI with azetidine-2-carboxylic acid, for example under similar conditions to those described hereinbefore.

Compounds of formulae I and Ia, as defined above, and derivatives of either, are referred to hereinafter as "the compounds of the invention".

- The compounds of the invention may exhibit tautomerism. All tautomeric forms and mixtures thereof are included within the scope of the invention. Particular tautomeric forms that may be mentioned include those connected with the position of the double bond in the amidine functionality in a compound of formula Ia, and the position of the substituent R¹.
- Compounds of the invention also contain two or more asymmetric carbon atoms and may therefore exhibit optical and/or diastereoisomerism. Diastereoisomers may be separated using conventional techniques, e.g. chromatography. The various stereoisomers may be isolated by separation of a racemic or other mixture of the compounds using conventional, e.g. HPLC techniques. Alternatively the desired optical isomers may be made by reaction of the appropriate optically active starting materials under conditions which will not cause racemisation or epimerisation, or by derivatisation, for example with a homochiral acid followed by separation of the diastereomeric derivatives by conventional means (e.g. HPLC, chromatography over silica). All stereoisomers are included within the scope of the invention.

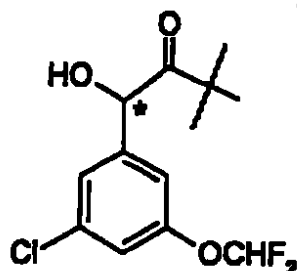
Compounds of the invention in which the



fragment is in the *S*-configuration are preferred.

27
22

Preferred compounds of the invention also include those in which the structural fragment



5

is in the *R*-configuration.

The wavy lines on the bonds in the above two fragments signify the bond positions of the fragments.

10

Thus, preferred compounds of the invention include:

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF);

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe); and

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH).

15

It will be appreciated by those skilled in the art that in the processes described above and hereinafter the functional groups of intermediate compounds may need to be protected by protecting groups.

20 Functional groups that it is desirable to protect include hydroxy, amino and carboxylic acid. Suitable protecting groups for hydroxy include optionally substituted and/or unsaturated alkyl groups (e.g. methyl, allyl, benzyl or *tert*-butyl), trialkylsilyl or diarylalkylsilyl groups (e.g. *t*-butyldimethylsilyl, *t*-butyldiphenylsilyl or trimethylsilyl) and tetrahydropyranyl. Suitable
25 protecting groups for carboxylic acid include C₁₋₆ alkyl or benzyl esters.

20
12

Suitable protecting groups for amino and amidino include *t*-butyloxycarbonyl, benzyloxycarbonyl or 2-trimethylsilylethoxycarbonyl (Teoc). Amidino nitrogens may also be protected by hydroxy or alkoxy groups, and may be either mono- or diprotected.

5

The protection and deprotection of functional groups may take place before or after coupling, or before or after any other reaction in the above-mentioned schemes.

- 10 Protecting groups may be removed in accordance with techniques that are well known to those skilled in the art and as described hereinafter.

Persons skilled in the art will appreciate that, in order to obtain compounds of the invention in an alternative, and, on some occasions, more convenient,
15 manner, the individual process steps mentioned hereinbefore may be performed in a different order, and/or the individual reactions may be performed at a different stage in the overall route (i.e. substituents may be added to and/or chemical transformations performed upon, different
intermediates to those mentioned hereinbefore in conjunction with a
20 particular reaction). This may negate, or render necessary, the need for protecting groups.

The type of chemistry involved will dictate the need, and type, of protecting groups as well as the sequence for accomplishing the synthesis.

25

The use of protecting groups is fully described in "Protective Groups in Organic Chemistry", edited by J W F McOmie, Plenum Press (1973), and "Protective Groups in Organic Synthesis", 3rd edition, T.W. Greene & P.G.M. Wutz, Wiley-Interscience (1999).

30

29
0
h

Protected derivatives of compounds of the invention may be converted chemically to compounds of the invention using standard deprotection techniques (e.g. hydrogenation). The skilled person will also appreciate that certain compounds of formula Ia may also be referred to as being "protected
5 derivatives" of compounds of formula I.

Medical and pharmaceutical use

Compounds of the invention may possess pharmacological activity as such.
10 Compounds of the invention that may possess such activity include, but are not limited to, compounds of formula I.

However, other compounds of the invention (including compounds of formula Ia) may not possess such activity, but may be administered
15 parenterally or orally, and may thereafter be metabolised in the body to form compounds that are pharmacologically active (including, but not limited to, corresponding compounds of formula I). Such compounds (which also includes compounds that may possess some pharmacological activity, but that activity is appreciably lower than that of the "active"
20 compounds to which they are metabolised), may therefore be described as "prodrugs" of the active compounds.

Thus, the compounds of the invention are useful because they possess pharmacological activity, and/or are metabolised in the body following oral
25 or parenteral administration to form compounds which possess pharmacological activity. The compounds of the invention are therefore indicated as pharmaceuticals.

According to a further aspect of the invention there is thus provided the
30 compounds of the invention for use as pharmaceuticals.

30
X
h

In particular, compounds of the invention are potent inhibitors of thrombin either as such and/or (e.g. in the case of prodrugs), are metabolised following administration to form potent inhibitors of thrombin, for example
5 as may be demonstrated in the tests described below.

By "prodrug of a thrombin inhibitor", we include compounds that form a thrombin inhibitor, in an experimentally-detectable amount, and within a predetermined time (e.g. about 1 hour), following oral or parenteral
10 administration (see, for example, Test E below) or, alternatively, following incubation in the presence of liver microsomes (see, for example, Test G below).

The compounds of the invention are thus expected to be useful in those
15 conditions where inhibition of thrombin is required, and/or conditions where anticoagulant therapy is indicated, including the following:

The treatment and/or prophylaxis of thrombosis and hypercoagulability in blood and/or tissues of animals including man. It is known that
20 hypercoagulability may lead to thrombo-embolic diseases. Conditions associated with hypercoagulability and thrombo-embolic diseases which may be mentioned include inherited or acquired activated protein C resistance, such as the factor V-mutation (factor V Leiden), and inherited or acquired deficiencies in antithrombin III, protein C, protein S, heparin
25 cofactor II. Other conditions known to be associated with hypercoagulability and thrombo-embolic disease include circulating antiphospholipid antibodies (Lupus anticoagulant), homocysteinemi, heparin induced thrombocytopenia and defects in fibrinolysis, as well as coagulation syndromes (e.g. disseminated intravascular coagulation (DIC))
30 and vascular injury in general (e.g. due to surgery).

31
A

The treatment of conditions where there is an undesirable excess of thrombin without signs of hypercoagulability, for example in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.

5

Particular disease states which may be mentioned include the therapeutic and/or prophylactic treatment of venous thrombosis (e.g. DVT) and pulmonary embolism, arterial thrombosis (e.g. in myocardial infarction, unstable angina, thrombosis-based stroke and peripheral arterial
10 thrombosis), and systemic embolism usually from the atrium during atrial fibrillation (e.g. non-valvular atrial fibrillation) or from the left ventricle after transmural myocardial infarction, or caused by congestive heart failure; prophylaxis of re-occlusion (i.e. thrombosis) after thrombolysis, percutaneous trans-luminal angioplasty (PTA) and coronary bypass
15 operations; the prevention of re-thrombosis after microsurgery and vascular surgery in general.

Further indications include the therapeutic and/or prophylactic treatment of disseminated intravascular coagulation caused by bacteria, multiple trauma,
20 intoxication or any other mechanism; anticoagulant treatment when blood is in contact with foreign surfaces in the body such as vascular grafts, vascular stents, vascular catheters, mechanical and biological prosthetic valves or any other medical device; and anticoagulant treatment when blood is in contact with medical devices outside the body such as during cardiovascular
25 surgery using a heart-lung machine or in haemodialysis; the therapeutic and/or prophylactic treatment of idiopathic and adult respiratory distress syndrome, pulmonary fibrosis following treatment with radiation or chemotherapy, septic shock, septicemia, inflammatory responses, which include, but are not limited to, edema, acute or chronic atherosclerosis such
30 as coronary arterial disease and the formation of atherosclerotic plaques,

32
A
M

cerebral arterial disease, cerebral infarction, cerebral thrombosis, cerebral embolism, peripheral arterial disease, ischaemia, angina (including unstable angina), reperfusion damage, restenosis after percutaneous trans-luminal angioplasty (PTA) and coronary artery bypass surgery.

5

Compounds of the invention that inhibit trypsin and/or thrombin may also be useful in the treatment of pancreatitis.

The compounds of the invention are thus indicated both in the therapeutic
10 and/or prophylactic treatment of these conditions.

According to a further aspect of the present invention, there is provided a method of treatment of a condition where inhibition of thrombin is required which method comprises administration of a therapeutically effective
15 amount of a compound of the invention to a person suffering from, or susceptible to, such a condition.

The compounds of the invention will normally be administered orally, intravenously, subcutaneously, buccally, rectally, dermally, nasally,
20 tracheally, bronchially, by any other parenteral route or *via* inhalation, in the form of pharmaceutical preparations comprising compound of the invention in a pharmaceutically acceptable dosage form.

Depending upon the disorder and patient to be treated and the route of
25 administration, the compositions may be administered at varying doses.

The compounds of the invention may also be combined and/or co-administered with any antithrombotic agent(s) with a different mechanism of action, such as one or more of the following: the antiplatelet agents
30 acetylsalicylic acid, ticlopidine and clopidogrel; thromboxane receptor

33
X
M

and/or synthetase inhibitors; fibrinogen receptor antagonists; prostacyclin mimetics; phosphodiesterase inhibitors; ADP-receptor (P_2T) antagonists; and inhibitors of carboxypeptidase U (CPU).

- 5 The compounds of the invention may further be combined and/or co-administered with thrombolytics such as one or more of tissue plasminogen activator (natural, recombinant or modified), streptokinase, urokinase, prourokinase, anisoylated plasminogen-streptokinase activator complex (APSAC), animal salivary gland plasminogen activators, and the like, in the
10 treatment of thrombotic diseases, in particular myocardial infarction.

According to a further aspect of the invention there is provided a pharmaceutical formulation including a compound of the invention, in admixture with a pharmaceutically acceptable adjuvant, diluent or carrier.

15

Suitable daily doses of the compounds of the invention in therapeutic treatment of humans are about 0.001-100 mg/kg body weight at peroral administration and 0.001-50 mg/kg body weight at parenteral administration, excluding the weight of any acid counter-ion.

20

For the avoidance of doubt, as used herein, the term "treatment" includes therapeutic and/or prophylactic treatment.

- Compounds of the invention have the advantage that they may be more
25 efficacious, be less toxic, be longer acting, have a broader range of activity, be more potent, produce fewer side effects, be more easily absorbed, and/or have a better pharmacokinetic profile (e.g. higher oral bioavailability and/or lower clearance), than, and/or have other useful pharmacological, physical, or chemical, properties over, compounds known in the prior art.

34
/

Compounds of the invention may have the further advantage that they may be administered less frequently than compounds known in the prior art.

Biological Tests

- 5 The following test procedures may be employed.

Test A

Determination of Thrombin Clotting Time (TT)

- 10 The inhibitor solution (25 μ L) is incubated with plasma (25 μ L) for three minutes. Human thrombin (T 6769; Sigma Chem. Co or Hematologic Technologies) in buffer solution, pH 7.4 (25 μ L, 4.0 NIH units/mL), is then added and the clotting time measured in an automatic device (KC 10; Amelung).

- 15 The thrombin clotting time (TT) is expressed as absolute values (seconds) as well as the ratio of TT without inhibitor (TT₀) to TT with inhibitor (TT_i). The latter ratios (range 1-0) are plotted against the concentration of inhibitor (log transformed) and fitted to sigmoidal dose-response curves according to the equation

20
$$y = a/[1+(x/IC_{50})^s]$$

- where: a = maximum range, i.e. 1; s = slope of the dose-response curve; and IC₅₀ = the concentration of inhibitor that doubles the clotting time. The calculations are processed on a PC using the software program GraFit Version 3, setting equation equal to: Start at 0, define end = 1 (Erithacus Software, Robin Leatherbarrow, Imperial College of Science, London, UK).
- 25

Test B

Determination of Thrombin Inhibition with a Chromogenic, Robotic Assay

- 30 The thrombin inhibitor potency is measured with a chromogenic substrate method, in a Plato 3300 robotic microplate processor (Rosys AG, CH-8634

Hombrechtikon, Switzerland), using 96-well, half volume microtitre plates (Costar, Cambridge, MA, USA; Cat No 3690). Stock solutions of test substance in DMSO (72 μ L), 0.1 - 1 mmol/L, are diluted serially 1:3 (24 + 48 μ L) with DMSO to obtain ten different concentrations, which are analysed as samples in the assay. 2 μ L of test sample is diluted with 124 μ L assay buffer, 12 μ L of chromogenic substrate solution (S-2366, Chromogenix, Mölndal, Sweden) in assay buffer and finally 12 μ L of α -thrombin solution (Human α -thrombin, Sigma Chemical Co. or Hematologic Technologies) in assay buffer, are added, and the samples mixed. The final assay concentrations are: test substance 0.00068 - 13.3 μ mol/L, S-2366 0.30 mmol/L, α -thrombin 0.020 NIHU/mL. The linear absorbance increment during 40 minutes incubation at 37°C is used for calculation of percentage inhibition for the test samples, as compared to blanks without inhibitor. The IC_{50} -robotic value, corresponding to the inhibitor concentration which causes 50% inhibition of the thrombin activity, is calculated from a log concentration vs. % inhibition curve.

Test C

20 Determination of the Inhibition Constant K_i for Human Thrombin

K_i -determinations are made using a chromogenic substrate method, performed at 37°C on a Cobas Bio centrifugal analyser (Roche, Basel, Switzerland). Residual enzyme activity after incubation of human α -thrombin with various concentrations of test compound is determined at three different substrate concentrations, and is measured as the change in optical absorbance at 405 nm.

Test compound solutions (100 μ L; normally in buffer or saline containing BSA 10 g/L) are mixed with 200 μ L of human α -thrombin (Sigma Chemical Co) in assay buffer (0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.4, ionic strength

0.15 adjusted with NaCl) containing BSA (10 g/L), and analysed as samples in the Cobas Bio. A 60 μ L sample, together with 20 μ L of water, is added to 320 μ L of the substrate S-2238 (Chromogenix AB, Mölndal, Sweden) in assay buffer, and the absorbance change ($\Delta A/\text{min}$) is monitored. The final concentrations of S-2238 are 16, 24 and 50 $\mu\text{mol/L}$ and of thrombin 0.125 NIH U/mL.

The steady state reaction rate is used to construct Dixon plots, i.e. diagrams of inhibitor concentration vs. $1/(\Delta A/\text{min})$. For reversible, competitive inhibitors, the data points for the different substrate concentrations typically form straight lines which intercept at $x = -K_i$.

Test D

Determination of Activated Partial Thromboplastin Time (APTT)

APTT is determined in pooled normal human citrated plasma with the reagent PTT Automated 5 manufactured by Stago. The inhibitors are added to the plasma (10 μ L inhibitor solution to 90 μ L plasma) and incubated with the APTT reagent for 3 minutes followed by the addition of 100 μ L of calcium chloride solution (0.025 M) and APTT is determined by use of the coagulation analyser KC10 (Amelung) according to the instructions of the reagent producer.

The clotting time is expressed as absolute values (seconds) as well as the ratio of APTT without inhibitor (APTT_0) to APTT with inhibitor (APTT_i). The latter ratios (range 1-0) are plotted against the concentration of inhibitor (log transformed) and fitted to sigmoidal dose-response curves according to the equation

$$y = a/[1+(x/\text{IC}_{50})^s]$$

where: a = maximum range, i.e. 1; s = slope of the dose-response curve; and IC_{50} = the concentration of inhibitor that doubles the clotting time. The

37
26

calculations are processed on a PC using the software program GraFit Version 3, setting equation equal to: Start at 0, define end = 1 (Erithacus Software, Robin Leatherbarrow, Imperial College of Science, London, UK). IC₅₀APTT is defined as the concentration of inhibitor in human plasma that
5 doubles the Activated Partial Thromboplastin Time.

Test E

Determination of Thrombin Time *ex vivo*

The inhibition of thrombin after oral or parenteral administration of the
10 compounds of the invention, dissolved in ethanol:SolutolK:water (5:5:90), is examined in conscious rats which, one or two days prior to the experiment, are equipped with a catheter for blood sampling from the carotid artery. On the experimental day blood samples are withdrawn at fixed times after the administration of the compound into plastic tubes
15 containing 1 part sodium citrate solution (0.13 mol per L) and 9 parts of blood. The tubes are centrifuged to obtain platelet poor plasma.

50 µL of plasma samples are precipitated with 100 µL of cold acetonitrile. The samples are centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. 75 µL of the
20 supernatant is diluted with 75 µL of 0.2% formic acid. 10 µL volumes of the resulting solutions are analysed by LC-MS/MS and the concentrations of thrombin inhibitor are determined using standard curves.

Test F

Determination of Plasma Clearance in Rat

Plasma clearance is estimated in male Sprague Dawley rats. The compound is dissolved in water and administered as a subcutaneous bolus injection at a dose of 4 µmol/kg. Blood samples are collected at frequent intervals up to 5 hours after drug administration. Blood samples are centrifuged and plasma
30 is separated from the blood cells and transferred to vials containing citrate

(10% final concentration). 50 µL of plasma samples are precipitated with 100 µL of cold acetonitrile. The samples are centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. 75 µL of the supernatant is diluted with 75 µL of 0.2% formic acid. 10 µL volumes of the resulting solutions are analysed by LC-MS/MS and the concentrations of thrombin inhibitor are determined using standard curves. The area under the plasma concentration-time profile is estimated using the log/linear trapezoidal rule and extrapolated to infinite time. Plasma clearance (CL) of the compound is then determined as

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

The values are reported in mL/min/kg.

Test G

Determination of *in vitro* Stability

Liver microsomes are prepared from Sprague-Dawley rats and human liver samples according to internal SOPs. The compounds are incubated at 37°C at a total microsome protein concentration of 3 mg/mL in a 0.05 mol/L TRIS buffer at pH 7.4, in the presence of the cofactors NADH (2.5 mmol/L) and NADPH (0.8 mmol/L). The initial concentration of compound is 5 or 10 µmol/L. Samples are taken for analysis up to 60 minutes after the start of the incubation. The enzymatic activity in the collected sample is immediately stopped by adding 20% myristic acid at a volume corresponding to 3.3% of the total sample volume. The concentration of compound remaining (FINAL CONC) in the 60 min. sample is determined by means of LCMS using a sample collected at zero time as reference (START CONC). The % of degraded thrombin inhibitor is calculated as:

$$100\% \times \frac{[\text{START CONC}] - [\text{FINAL CONC}]}{[\text{START CONC}]}$$

39
✓

Test H

Arterial Thrombosis Model

Vessel damage is induced by applying ferric chloride (FeCl_3) topically to the carotid artery. Rats are anaesthetised with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (80 mg/kg; Apoteksbolaget; Umeå, Sweden), followed by continuous infusion (12 mg/kg/h) throughout the experiment. Rat body temperature is maintained at 38°C throughout the experiment by external heating. The experiment starts with a 5 minutes control period. Five minutes later, human ^{125}I -fibrinogen (80 kBq; IM53; Amersham International, Buckinghamshire, UK) is given intravenously and is used as a marker for the subsequent incorporation of fibrin(ogen) into the thrombus. The proximal end of the carotid artery segment is placed in a plastic tube (6 mm; Silastic®; Dow Corning, MI, USA) opened lengthways, containing FeCl_3 -soaked (2 µL; 55% w/w; Merck, Darmstadt, Germany) filter paper (diameter 3 mm; 1F; Munktel, Grycksbo, Sweden). The left carotid artery is exposed to FeCl_3 for 10 minutes and is then removed from the plastic tube and soaked in saline. Fifty minutes later, the carotid artery is removed and rinsed in saline. Reference blood samples are also taken for determination of blood ^{125}I -activity, 10 minutes after the injection of ^{125}I -fibrinogen, and at the end of the experiment. The ^{125}I -activity in the reference blood samples and the vessel segment are measured in a gamma counter (1282 Compugamma; LKB Wallac Oy, Turku, Finland) on the same day as the experiment is performed. The thrombus size is determined as the amount of ^{125}I -activity incorporated in the vessel segment in relation to the ^{125}I -activity in the blood (cpm/mg).

General Experimental Details

TLC was performed on silica gel. Chiral HPLC analysis was performed using a 46 mm X 250 mm Chiralcel OD column with a 5 cm guard column.

Tf 40

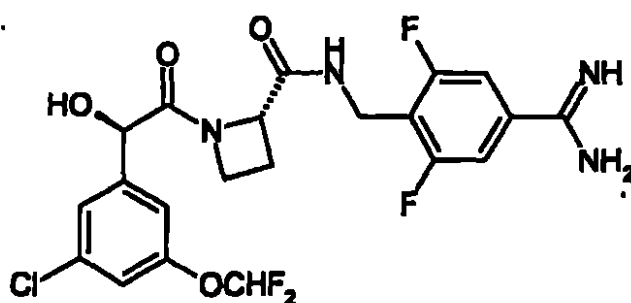
The column temperature was maintained at 35°C. A flow rate of 1.0 mL/min was used. A Gilson 115 UV detector at 228 nm was used. The mobile phase consisted of hexanes, ethanol and trifluoroacetic acid and the appropriate ratios are listed for each compound. Typically, the product was dissolved in a minimal amount of ethanol and this was diluted with the mobile phase.

LC-MS/MS was performed using a HP-1100 instrument equipped with a CTC-PAL injector and a 5 µm, 4x100 mm ThermoQuest, Hypersil BDS-C18 column. An API-3000 (Sciex) MS detector was used. The flow rate was 1.2 mL/min and the mobile phase (gradient) consisted of 10-90% acetonitrile with 90-10% of 4 mM aq. ammonium acetate, both containing 0.2% formic acid.

¹H NMR spectra were recorded using tetramethylsilane as the internal standard. ¹³C NMR spectra were recorded using the listed deuterated solvents as the internal standard.

Example 1

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)



A
S
S

(i) 3-Chloro-5-methoxybenzaldehyde

3,5-Dichloroanisole (74.0 g, 419 mmol) in THF (200 mL) was added dropwise to magnesium metal (14.2 g, 585 mmol, pre-washed with 0.5 N HCl) in THF (100 mL) at 25°C. After the addition, 1,2-dibromoethane
5 (3.9 g, 20.8 mmol) was added dropwise. The resultant dark brown mixture was heated at reflux for 3 h. The mixture was cooled to 0°C, and *N,N*-dimethylformamide (60 mL) was added in one portion. The mixture was partitioned with diethyl ether (3 x 400 mL) and 6N HCl (500 mL). The combined organic extracts were washed with brine (300 mL), dried
10 (Na_2SO_4), filtered and concentrated *in vacuo* to give an oil. Flash chromatography (2x) on silica gel eluting with Hex:EtOAc (4:1) afforded the sub-title compound (38.9 g, 54%) as a yellow oil.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.90 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.15
15 (s, 1H), 3.87 (s, 3H).

(ii) 3-Chloro-5-hydroxybenzaldehyde

A solution of 3-chloro-5-methoxybenzaldehyde (22.8 g, 134 mmol; see step (i) above) in CH_2Cl_2 (250 mL) was cooled to 0°C. Boron tribromide (15.8
20 mL, 167 mmol) was added dropwise over 15 min. After stirring, the reaction mixture for 2 h, H_2O (50 mL) was added slowly. The solution was then extracted with Et_2O (2 x 100 mL). The organic layers were combined, dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated *in vacuo*. Flash chromatography
on silica gel eluting with Hex:EtOAc (4:1) afforded the sub-title compound
25 (5.2 g, 25%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.85 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.10
(s, 1H), 3.68 (s, 1H)

A2
SM
J(iii) 3-Chloro-5-difluoromethoxybenzaldehyde

A solution of 3-chloro-5-hydroxybenzaldehyde (7.5g, 48 mmol; see step (ii) above) in 2-propanol (250 mL) and 30% KOH (100 mL) was heated to reflux. While stirring, CHClF_2 was bubbled into the reaction mixture for 2 h. The reaction mixture was cooled, acidified with 1N HCl and extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The organics were washed with brine (100 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated *in vacuo*. Flash chromatography on silica gel eluting with Hex:EtOAc (4:1) afforded the sub-title compound (4.6 g, 46%).

10

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.95 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.60 (t, $J_{\text{H-F}} = 71.1$ Hz, 1H)

(iv) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R,S)CH(OTMS)CN}$

A solution of 3-chloro-5-difluoromethoxybenzaldehyde (4.6 g, 22.3 mmol; see step (iii) above) in CH_2Cl_2 (200 mL) was cooled to 0°C . ZnI_2 (1.8 g, 5.6 mmol) and trimethylsilyl cyanide (2.8 g, 27.9 mmol) were added and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 15 h. The mixture was partially concentrated *in vacuo* yielding the sub-title compound as a liquid, which was used directly in step (v) below without further purification or characterization.

20

(v) $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R,S)CH(OH)C(NH)OEt}$

$\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R,S)CH(OTMS)CN}$ (6.82 g, assume 22.3 mmol; see step (iv) above) was added dropwise to HCl/EtOH (500 mL). The reaction mixture was stirred 15 h, then partially concentrated *in vacuo* yielding the sub-title compound as a liquid, which was used in step (vi) without further purification or characterization.

30

43

(vi) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OEt

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(NH)OEt (6.24 g, assume 22.3 mmol; see step (v) above) was dissolved in THF (250 mL), 0.5M H₂SO₄ (400 mL) was added and the reaction was stirred at 40°C for 65 h, cooled and then partially concentrated *in vacuo* to remove most of the THF. The reaction mixture was then extracted with Et₂O (3 x 100 mL), dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated *in vacuo* to afford the sub-title compound as a solid, which was used in step (vii) without further purification or characterization.

10

(vii) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OH

A solution of Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OEt (6.25 g, assume 22.3 mmol; see step (vi) above) in 2-propanol (175 mL) and 20% KOH (350 mL) was stirred at room temperature 15 h. The reaction was then partially concentrated *in vacuo* to remove most of the 2-propanol. The remaining mixture was acidified with 1M H₂SO₄, extracted with Et₂O (3 x 100 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo* to give a solid. Flash chromatography on silica gel eluting with CHCl₃:MeOH:concentrated NH₄OH (6:3:1) afforded the ammonium salt of the sub-title compound. The ammonium salt was then dissolved in a mixture of EtOAc (75 mL) and H₂O (75 mL) and acidified with 2N HCl. The organic layer was separated and washed with brine (50 mL), dried (Na₂SO₄) and concentrated *in vacuo* to afford the sub-title compound (3.2 g, 57% from steps (iv) to (vii)).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.38 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.89 (t, *J*_{H-F} = 71.1 Hz, 1H), 5.16 (s, 1H)

47
D

(viii) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)OH (a) and Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(S)CH(OAc)C(O)OH (b)

A mixture of Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OH (3.2 g, 12.7 mmol; see step (vii) above) and Lipase PS "Amano" (~2.0 g) in vinyl acetate (125 mL) and MTBE (125 mL) was heated at reflux for 48 h. The reaction mixture was cooled, filtered through Celite® and the filter cake washed with EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo* and subjected to flash chromatography on silica gel eluting with CHCl₃:MeOH:concentrated NH₄OH (6:3:1) yielding the ammonium salts of the sub-title compounds (a) and (b). Compound (a) as a salt was dissolved in H₂O, acidified with 2N HCl and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated *in vacuo* to afford the sub-title compound (a) (1.2 g, 37%).

15 For sub-title compound (a)

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.38 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.89 (t, *J*_{H-F} = 71.1 Hz, 1H), 5.17 (s, 1H)

(ix) 2,6-Difluoro-4[(methylsulfinyl)(methylthio)methyl]benzonitrile

20 (Methylsulfinyl)(methylthio)methane (7.26g, 0.0584 mol) was dissolved in 100 mL of dry THF under argon and was cooled to -78°C. Butyllithium in hexane (16 mL 1.6M, 0.0256 mol) was added dropwise with stirring. The mixture was stirred for 15 min. Meanwhile, a solution of 3,4,5-trifluorobenzonitrile (4.0 g, 0.025 mmol) in 100 mL of dry THF was cooled to -78°C under argon and the former solution was added through a cannula to the latter solution over a period of 35 min. After 30 min, the cooling bath was removed and when the reaction had reached room temperature it was poured into 400 mL of water. The THF was evaporated and the remaining aqueous layer was extracted three times with diethyl ether. The combined

25

ether phase was washed with water, dried (Na_2SO_4) and evaporated. Yield: 2.0 g (30%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.4-7.25 (m, 2H), 5.01 (s, 1H, diastereomer), 4.91 (s, 1H, diastereomer), 2.88 (s, 3H, diastereomer), 2.52 (s, 3H, diastereomer), 2.49 (s, 3H, diastereomer), 2.34 (s, 3H, diastereomer), 1.72 (broad, 1H)

(x) 2,6-Difluoro-4-formylbenzonitrile

2,6-Difluoro-4[(methylsulfinyl)(methylthio)methyl]benzonitrile (2.17 g, 8.32 mmol; see step (ix) above) was dissolved in 90 mL of THF and 3.5 mL of concentrated sulfuric acid was added. The mixture was left at room temperature for 3 days and subsequently poured into 450 mL of water. Extraction three times with EtOAc followed and the combined ethereal phase was washed twice with aqueous sodium bicarbonate and with brine, dried (Na_2SO_4) and evaporated. Yield: 1.36 g (98%). The position of the formyl group was established by ^{13}C NMR. The signal from the fluorinated carbons at 162.7 ppm exhibited the expected coupling pattern with two coupling constants in the order of 260 Hz and 6.3 Hz respectively corresponding to an *ipso* and a *meta* coupling from the fluorine atoms.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.35 (s, 1H), 7.33 (m, 2H)

(xi) 2,6-Difluoro-4-hydroxymethylbenzonitrile

2,6-Difluoro-4-formylbenzonitrile (1.36 g, 8.13 mmol; see step (x) above) was dissolved in 25 mL of methanol and cooled on an ice bath. Sodium borohydride (0.307 g, 8.12 mmol) was added in portions with stirring and the reaction was left for 65 min. The solvent was evaporated and the residue was partitioned between diethyl ether and aqueous sodium bicarbonate. The ethereal layer was washed with more aqueous sodium

46
X
X

bicarbonate and brine, dried (Na_2SO_4) and evaporated. The crude product crystallised soon and could be used without further purification. Yield: 1.24 g (90%).

5 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.24 (m, 2H), 4.81 (s, 2H), 2.10 (broad, 1H)

(xii) 4-Cyano-2,6-difluorobenzyl methanesulfonate

To an ice cooled solution of 2,6-difluoro-4-hydroxymethylbenzonitrile (1.24 g, 7.32 mmol; see step (xi) above) and methanesulfonyl chloride (0.93 g, 8.1 mmol) in 60 mL of methylene chloride was added triethylamine (0.81 g, 8.1 mmol) with stirring. After 3 h at 0°C , the mixture was washed twice
10 with 1M HCl and once with water, dried (Na_2SO_4) and evaporated. The product could be used without further purification. Yield: 1.61 g (89%).

15 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.29 (m, 2H), 5.33 (s, 2H), 3.07 (s, 3H)

(xiii) 4-Azidomethyl-2,6-difluorobenzonitrile

A mixture of 4-cyano-2,6-difluorobenzyl methanesulfonate (1.61 g, 6.51 mmol; see step (xii) above) and sodium azide (0.72 g, 0.0111 mol) in 10 mL
20 of water and 20 mL of DMF was stirred at room temperature overnight. The resultant was subsequently poured into 200 mL of water and extracted three times with diethyl ether. The combined ethereal phase was washed five times with water, dried (Na_2SO_4) and evaporated. A small sample was evaporated for NMR purposes and the product crystallised. The rest was
25 evaporated cautiously but not until complete dryness. Yield (theoretically 1.26 g) was assumed to be almost quantitative based on NMR and analytical HPLC.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.29 (m, 2H), 4.46 (s, 2H)

(xiv) 4-Aminomethyl-2,6-difluorobenzonitrile

This reaction was carried out according to the procedure described in *J. Chem. Res. (M)* (1992) 3128. To a suspension of 520 mg of 10% Pd/C (50% moisture) in 20 mL of water was added a solution of sodium borohydride (0.834 g, 0.0221 mol) in 20 mL of water. Some gas evolution resulted. 4-Azidomethyl-2,6-difluorobenzonitrile (1.26 g, 6.49 mmol; see step (xiii) above) was dissolved in 50 mL of THF and added to the aqueous mixture on an ice bath over 15 min. The mixture was stirred for 4 h, whereafter 20 mL of 2M HCl was added and the mixture was filtered through Celite. The Celite was rinsed with more water and the combined aqueous phase was washed with EtOAc and subsequently made alkaline with 2M NaOH. Extraction three times with methylene chloride followed and the combined organic phase was washed with water, dried (Na₂SO₄) and evaporated. Yield: 0.87 g (80%).

15

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.20 (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 1.51 (broad, 2H)

(xv) 2,6-Difluoro-4-*tert*-butoxycarbonylaminomethylbenzonitrile

A solution of 4-aminomethyl-2,6-difluorobenzonitrile (0.876 g, 5.21 mmol; see step (xiv) above) was dissolved in 50 mL of THF and di-*tert*-butyl dicarbonate (1.14 g, 5.22 mmol) in 10 mL of THF was added. The mixture was stirred for 3.5 h. The THF was evaporated and the residue was partitioned between water and EtOAc. The organic layer was washed three times with 0.5 M HCl and water, dried (Na₂SO₄) and evaporated. The product could be used without further purification. Yield: 1.38 g (99%).

25

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (m, 2H), 4.95 (broad, 1H), 4.43 (broad, 2H), 1.52 (s, 9H)

30

4.9
4.9

(xvi) Boc-Pab(2,6-diF)(OH)

A mixture of 2,6-difluoro-4-*tert*-butoxycarbonylaminomethylbenzonitrile (1.38 g, 5.16 mmol; see step (xv) above), hydroxylamine hydrochloride (1.08 g, 0.0155 mol) and triethylamine (1.57 g, 0.0155 mol) in 20 mL of ethanol was stirred at room temperature for 36 h. The solvent was evaporated and the residue was partitioned between water and methylene chloride. The organic layer was washed with water, dried (Na₂SO₄) and evaporated. The product could be used without further purification. Yield: 1.43 g (92%).

10

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.14 (m, 2H), 4.97 (broad, 1H), 4.84 (broad, 2H), 4.40 (broad, 2H), 1.43 (s, 9H)

(xvii) Boc-Pab(2,6-diF) x HOAc

This reaction was carried out according to the procedure described by Judkins *et al*, *Synth. Comm.* (1998) 4351. Boc-Pab(2,6-diF)(OH) (1.32 g, 4.37 mmol; see step (xvi) above), acetic anhydride (0.477 g, 4.68 mmol) and 442 mg of 10% Pd/C (50% moisture) in 100 mL of acetic acid was hydrogenated at 5 atm pressure for 3.5 h. The mixture was filtered through Celite, rinsed with ethanol and evaporated. The residue was freeze-dried from acetonitrile and water and a few drops of ethanol. The sub-title product could be used without further purification. Yield: 0.1.49 g (99%).

20

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.45 (m, 2H), 4.34 (s, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.40 (s, 9H)

25

(xviii) Boc-Pab(2,6-diF)(Teoc)

To a solution of Boc-Pab(2,6-diF) x HOAc (1.56 g, 5.49 mmol; see step (xvii) above) in 100 mL of THF and 1 mL of water was added 2-(trimethylsilyl)ethyl p-nitrophenyl carbonate (1.67 g, 5.89 mmol). A

30

solution of potassium carbonate (1.57 g, 0.0114 mol) in 20 mL of water was added dropwise over 5 min. The mixture was stirred overnight. The THF was evaporated and the residue was partitioned between water and methylene chloride. The aqueous layer was extracted with methylene chloride and the combined organic phase was washed twice with aqueous sodium bicarbonate, dried (Na_2SO_4) and evaporated. Flash chromatography on silica gel with heptane/EtOAc = 2/1 gave 1.71 g (73%) of pure compound.

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.43 (m, 2H), 4.97 (broad, 1H), 4.41 (broad, 2H), 4.24 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.11 (m, 2H), 0.06 (s, 9H)

(xix) Boc-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc)

Boc-Pab(2,6-diF)(Teoc) (1.009 g, 2.35 mmol; see step (xviii) above) was dissolved in 50 mL of EtOAc saturated with HCl(g). The mixture was left for 10 min., evaporated and dissolved in 18 mL of DMF, and then cooled on an ice bath. Boc-(S)Aze-OH (0.450 g, 2.24 mmol), PyBOP (1.24 g, 2.35 mmol) and lastly diisopropylethyl amine (1.158 g, 8.96 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 2 h and then poured into 350 mL of water and extracted three times with EtOAc. The combined organic phase was washed with brine, dried (Na_2SO_4) and evaporated. Flash chromatography on silica gel with heptane:EtOAc (1:3) gave 1.097 g (96%) of the desired compound.

¹H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (m, 2H), 4.65-4.5 (m, 3H), 4.23 (m, 2H), 3.87 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 2.45-2.3 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.10 (m, 2H), 0.05 (s, 9H)

50
X
7

(xx) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc)
Boc-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc) (0.256 g, 0.500 mmol; see step (xix) above)
was dissolved in 20 mL of EtOAc saturated with HCl(g). The mixture was
left for 10 min. and evaporated and dissolved in 5 mL of DMF. Ph(3-Cl)(5-
s OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)OH (0.120 g, 0.475 mmol; see step (viii) above),
PyBOP (0.263 g, 0.498 mmol) and lastly diisopropylethyl amine (0.245 g,
1.89 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 2 h and then
poured into 350 mL of water and extracted three times with EtOAc. The
combined organic phase was washed with brine, dried (Na₂SO₄) and
10 evaporated. Flash chromatography on silica gel with EtOAc gave 0.184 g
(60%) of the desired sub-title compound.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD, mixture of rotamers) δ 7.55-7.45 (m, 2H),
7.32 (m, 1H, major rotamer), 7.27 (m, 1H, minor rotamer), 7.2-7.1 (m, 2H),
15 6.90 (t, 1H, major rotamer), 6.86 (t, 1H, minor rotamer), 5.15 (s, 1H, major
rotamer), 5.12 (m, 1H, minor rotamer), 5.06 (s, 1H, minor rotamer), 4.72
(m, 1H, major rotamer), 4.6-4.45 (m, 2H), 4.30 (m, 1H, major rotamer),
4.24 (m, 2H), 4.13 (m, 1H, major rotamer), 4.04 (m, 1H, minor rotamer),
3.95 (m, 1H, minor rotamer), 2.62 (m, 1H, minor rotamer), 2.48 (m, 1H,
20 major rotamer), 2.22 (m, 1H, major rotamer), 2.10 (m, 1H, minor rotamer),
1.07 (m, 2H), 0.07 (m, 9H)

(xxi) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)
Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc) (81 mg,
25 0.127 mmol; see step (xx) above) was dissolved in 0.5 mL of methylene
chloride and cooled on an ice bath. TFA (3 mL) was added and the reaction
was left for 75 min. The TFA was evaporated and the residue was freeze
dried from water and acetonitrile. The crude product was purified by

preparative RPLC with CH₃CN:0.1M NH₄OAc (35:65) to produce 39 mg (55%) of the title compound as its HOAc salt, purity: 99%.

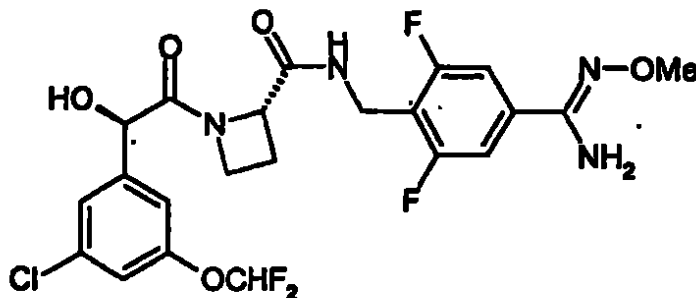
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD mixture of rotamers) δ 7.5-7.4 (m, 2H), 7.32 (m, 1H, major rotamer), 7.28 (m, 1H, minor rotamer), 7.2-7.1 (m, 3H) 6.90 (t, 1H, major rotamer), 6.86 (t, minor rotamer), 5.15 (s, 1H, major rotamer), 5.14 (m, 1H, minor rotamer), 5.07 (s, 1H, minor rotamer), 4.72 (m, 1H, major rotamer), 4.65-4.45 (m, 2H), 4.30 (m, 1H, major rotamer), 4.16 (m, 1H, major rotamer), 4.03 (m, 1H, minor rotamer), 3.95 (m, 1H, minor rotamer), 2.63 (m, 1H, minor rotamer), 2.48 (m, 1H, major rotamer), 2.21 (m, 1H, major rotamer), 2.07 (m, 1H, minor rotamer), 1.89 (s, 3H)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): (carbonyl and/or amidine carbons, mixture of rotamers) δ 171.9, 171.2, 165.0, 162.8, 160.4

APCI-MS: (M + 1) = 503/505 m/z.

Example 2

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe)



(i) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe,Teoc)

A mixture of Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc) (64 mg, 0.099 mmol; see Example 1(xx) above) and O-methyl hydroxylamine hydrochloride (50 mg, 0.60 mmol) in 4 mL of acetonitrile was heated at 70°C for 3 h. The solvent was evaporated and the residue

was partitioned between water and EtOAc. The aqueous layer was extracted twice with EtOAc and the combined organic phase was washed with water, dried (Na₂SO₄) and evaporated. The product could be used without further purification. Yield: 58 mg (87%).

5

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (bt, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.25-6.95 (m, 5H), 6.51, t, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.83 (m, 1H), 4.6-4.5 (m, 2H), 4.4-3.9 (m, 4H), 3.95 (s, 3H), 3.63 (m, 1H), 2.67 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 1.87 (broad, 1H), 0.98 (m, 2H), 0.01, s, 9H)

10

(ii) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe)

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe, Teoc) (58 mg, 0.086 mmol; see step (i) above) was dissolved in 3 mL of TFA, cooled on an ice bath and allowed to react for 2 h. The TFA was evaporated and the residue dissolved in EtOAc. The organic layer was washed twice with aqueous sodium carbonate and water, dried (Na₂SO₄) and evaporated. The residue was freeze-dried from water and acetonitrile to give 42 mg (92%) of the title compound. Purity: 94%.

15

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (bt, 1H), 7.2-7.1 (m, 4H), 6.99 (m, 1H), 6.52 (t, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.85-4.75 (m, 3H), 4.6-4.45 (m, 2H), 4.29 (broad, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.69 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 1.85 (broad, 1H)

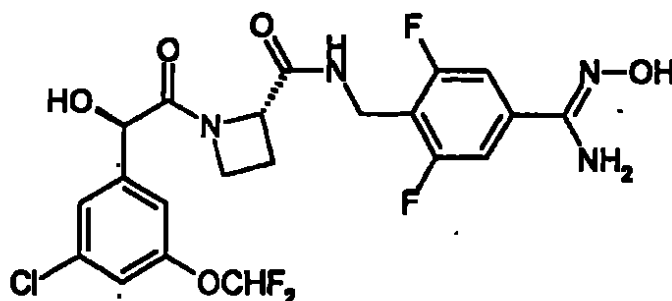
20

¹³C-NMR (100 MHz; CDCl₃): (carbonyl and/or amidine carbons) δ 172.1, 169.8, 151.9

25

APCI-MS: (M + 1) = 533/535 m/z

30

Example 3**Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH)**

5

(i) Boc-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN)

Boc-(S)Aze-OH (1.14 g, 5.6 mmol) was dissolved in 45 mL of DMF. 4-Aminomethyl-2,6-difluorobenzonitrile (1.00 g, 5.95 mol, see Example 1(xiv) above), PyBOP (3.10 g, 5.95 mmol) and DIPEA (3.95 mL, 22.7 mmol) were added and the solution was stirred at room temperature for 2 h. The solvent was evaporated and the residue was partitioned between H₂O and EtOAc (75 mL each). The aqueous phase was extracted with 2 x 50 mL EtOAc and the combined organic phase was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Flash chromatography (SiO₂, EtOAc/heptane (3/1)) yielded the sub-title compound (1.52 g, 77%) as an oil which crystallized in the refrigerator.

¹H-NMR (400 MHz; CD₃OD): δ 7.19 (m, 2H), 4.65-4.5 (m, 3H), 3.86 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 2.45-2.3 (m, 2H), 1.39 (s, 9H)

20

(ii) H-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN) x HCl

Boc-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN) (0.707 g, 2.01 mmol, see step (i) above) was dissolved in 60 mL of EtOAc saturated with HCl(g). After stirring at room temperature for 15 minutes, the solvent was evaporated. The residue was dissolved in CH₃CN/H₂O (1/1) and was freeze-dried to

25

give the sub-title compound (0.567 g, 98%) as an off-white amorphous powder.

¹H-NMR (400 MHz; CD₃OD): δ 7.49 (m, 2H), 4.99 (m, 1H), 4.58 (m, 2H),

5 4.12 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.47 (m, 1H)

MS (m/z) 252.0 (M + 1)⁺

(iii) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN)

10 Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)OH (0.40 g, 1.42 mmol, see Example 1(viii) above) was dissolved in 10 mL of DMF and H-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN) x HCl (0.43 g, 1.50 mmol, see step (ii) above) and PyBOP (0.779 g, 1.50 mmol) were added, followed by DIPEA (1.0 mL, 5.7 mmol). After stirring at room temperature for 2 h, the solvent was
15 evaporated. The residue was partitioned between H₂O (200 mL) and EtOAc (75 mL). The aqueous phase was extracted with 2 x 75 mL EtOAc and the combined organic phase was washed with brine and dried over Na₂SO₄. Flash chromatography (SiO₂, EtOAc/heptane (4/1)) yielded the sub-title compound (0.56 g, 81%) as an oil.

20

¹H-NMR (400 MHz; CD₃OD) rotamers: δ 7.43 (m, 2H), 7.31 (m, 1H, major rotamer), 7.26 (m, 1H, minor rotamer), 7.2-7.1 (m, 2H), 6.90 (t, 1H, major rotamer), 6.86 (t, 1H, minor rotamer), 5.14 (s, 1H, major rotamer), 5.11 (m, 1H, minor rotamer), 5.04 (s, 1H, minor rotamer), 4.71 (m, 1H, major
25 rotamer), 4.6-4.45 (m, 2H), 4.30 (m, 1H, major rotamer), 4.2-3.9 (m, 1H; and 1H, minor rotamer), 2.62 (m, 1H, minor rotamer), 2.48 (m, 1H, major rotamer), 2.21 (m, 1H, major rotamer), 2.09 (m, 1H, minor rotamer)

¹³C-NMR (100 MHz; CD₃OD): (carbonyl carbons) δ 171.9, 171.8

MS (m/z) 484.0, 485.9 (M - 1)⁻, 486.0, 487.9 (M + 1)⁺

55
20

(iv) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH)
Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN)
(0.555 g, 1.14 mmol, from step (iii) above) was dissolved in 10 mL of EtOH.
5 (95%). To this solution was added hydroxylamine hydrochloride (0.238 g,
3.42 mmol) and Et₃N (0.48 mL, 3.44 mmol). After stirring at room
temperature for 14 h, the solvent was removed and the residue was
dissolved in EtOAc. The organic phase was washed with brine and H₂O
and was dried over Na₂SO₄. The crude product was purified by preparative
10 RPLC with CH₃CN:0.1 M NH₄OAc as eluent, yielding the title compound
as an amorphous powder (0.429 g, 72%) after freeze-drying.

¹H-NMR (400 MHz; CD₃OD) rotamers: δ 7.35-7.1 (m, 5H), 6.90 (t, 1H,
major rotamer), 6.85 (t, 1H, minor rotamer), 5.15 (s, 1H, major rotamer),
15 5.12 (m, 1H, minor rotamer), 5.08 (s, 1H, minor rotamer), 4.72 (m, 1H,
major rotamer), 4.6-4.4 (m, 2H), 4.30 (m, 1H, major rotamer), 4.12 (m, 1H,
major rotamer), 4.04 (m, 1H, minor rotamer), 3.94 (m, 1H, minor rotamer),
2.62 (m, 1H, minor rotamer), 2.48 (m, 1H, major rotamer), 2.22 (m, 1H,
major rotamer), 2.10 (m, 1H, minor rotamer)

20 ¹³C-NMR (100 MHz; CD₃OD): (carbonyl and amidine carbons, rotamers) δ
172.4, 171.9, 171.0, 152.3, 151.5

MS (m/z) 517.1, 519.0 (M - 1)⁺, 519.1, 521.0 (M + 1)⁺

Example 4

25 The title compound of Example 1 was tested in Test A above and was found
to exhibit an IC₅₀TT value of less than 0.02 μM.

17.56

Example 5

The title compound of Example 1 was tested in Test D above and was found to exhibit an IC_{50} APTT value of less than 1 μ M.

5 Example 6

The title compound of Example 2 was tested in Test E above and was found to exhibit oral and/or parenteral bioavailability in the rat as the corresponding active inhibitor (free amidine).

10 Example 7

The title compound of Example 2 was tested in Test G above and was found to be converted to the corresponding active inhibitor (free amidine) in liver microsomes from humans and from rats.

15 Abbreviations

	Ac	=	acetyl
	APCI	=	atmospheric pressure chemical ionisation (in relation to MS)
20	API	=	atmospheric pressure ionisation (in relation to MS)
	aq.	=	aqueous
	AUC	=	area under the curve
	Aze	=	azetidine-2-carboxylate
	AzeOH	=	azetidine-2-carboxylic acid
25	Boc	=	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
	BSA	=	bovine serum albumin
	CI	=	chemical ionisation (in relation to MS)
	d	=	day(s)
	DCC	=	dicyclohexyl carbodiimide
30	DIBAL-H	=	di-isobutylaluminium hydride

	DIPEA	=	diisopropylethylamine
	DMAP	=	4-(<i>N,N</i> -dimethyl amino) pyridine
	DMF	=	dimethylformamide
	DMSO	=	dimethylsulfoxide
5	DVT	=	deep vein thrombosis
	EDC	=	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride
	Et	=	ethyl
	ether	=	diethyl ether
10	EtOAc	=	ethyl acetate
	EtOH	=	ethanol
	Et ₂ O	=	diethyl ether
	h	=	hour(s)
	HATU	=	<i>O</i> -(azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium 15 hexafluorophosphate
	HBTU	=	[<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate]
	HCl	=	hydrochloric acid, hydrogen chloride gas or hydrochloride salt (depending on context)
20	Hex	=	hexanes
	HOAc	=	acetic acid or acetic acid salt
	HPLC	=	high performance liquid chromatography
	LC	=	liquid chromatography
	Me	=	methyl
25	MeOH	=	methanol
	min	=	minute(s)
	MS	=	mass spectroscopy
	MTBE	=	methyl <i>tert</i> -butyl ether
	NADH	=	nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form

58
2/9
5

	NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
	NIH	=	National Institute of Health (US)
	NIHU	=	National Institute of Health units
5	NMR	=	nuclear magnetic resonance
	OAc	=	acetate
	Pab	=	<i>para</i> -amidinobenzylamino
	H-Pab	=	<i>para</i> -amidinobenzylamine
	Ph	=	phenyl
10	PyBOP	=	(benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
	QF	=	tetrabutylammonium fluoride
	RPLC	=	reverse phase high performance liquid chromatography
	rt/RT	=	room temperature
15	SOPs	=	standard operating procedures
	TBTU	=	[<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate]
	TEA	=	triethylamine
	Teoc	=	2-(trimethylsilyl)ethoxycarbonyl
20	TEMPO	=	2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy free radical
	TFA	=	trifluoroacetic acid
	THF	=	tetrahydrofuran
	TLC	=	thin layer chromatography
	UV	=	ultraviolet

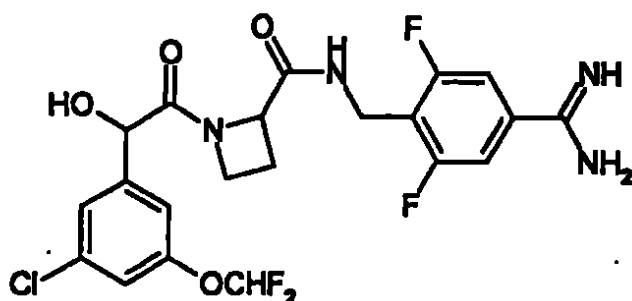
25

Prefixes *n*, *s*, *i* and *t* have their usual meanings: normal, secondary, iso and tertiary. The prefix *c* means cyclo.

6059

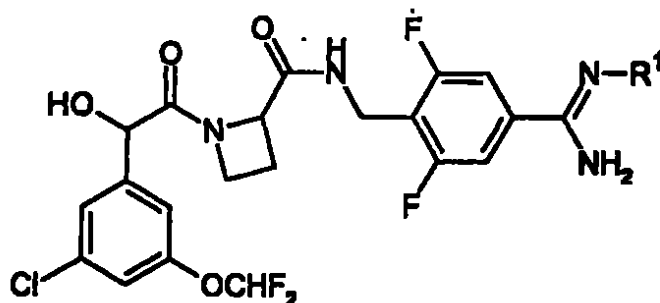
Claims

1. A compound of formula I,



or a pharmaceutically-acceptable derivative thereof.

2. A pharmaceutically acceptable derivative of a compound of formula I as defined in Claim 1, which derivative compound is a compound of formula Ia,



- wherein R¹ represents OR² or C(O)OR³;

R² represents H, C₁₋₁₀ alkyl, C₁₋₃ alkylaryl or C₁₋₃ alkyloxyaryl (the alkyl parts of which latter two groups are optionally interrupted by one or more oxygen atoms, and the aryl parts of which latter two groups are optionally substituted by one or more substituents selected from halo, phenyl, methyl

6160

or methoxy, which latter three groups are also optionally substituted by one or more halo substituents); and

- R^3 represents C_{1-10} alkyl (which latter group is optionally interrupted by one or more oxygen atoms), or C_{1-3} alkylaryl or C_{1-3} alkyloxyaryl (the alkyl parts of which latter two groups are optionally interrupted by one or more oxygen atoms, and the aryl parts of which latter two groups are optionally substituted by one or more substituents selected from halo, phenyl, methyl or methoxy, which latter three groups are also optionally substituted by one or more halo substituents),
- 10 or a pharmaceutically-acceptable derivative thereof.

3. A compound as claimed in Claim 2 wherein R^1 represents OR^2 .

4. A compound as claimed in Claim 3 wherein R^2 represents H or

15 unsubstituted, linear, branched or cyclic C_{1-3} alkyl.

5. A compound as claimed in Claim 4 wherein R^2 represents H or C_{1-4} alkyl.

20 6. A compound as claimed in Claim 4 wherein R^2 represents linear C_{1-3} alkyl, branched C_{3-4} alkyl or cyclic C_{4-7} alkyl.

7. A compound as claimed in Claim 5 or Claim 6 wherein R^2 represents methyl, ethyl, *n*-propyl, *i*-propyl or cyclobutyl.

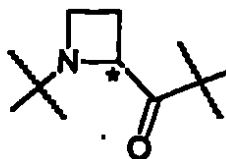
25

8. A compound as claimed in Claim 7 wherein R^2 represents methyl.

9. A compound as claimed in any one of Claims 1 to 8 wherein the fragment

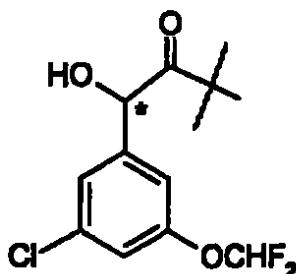
30

57



is in the *S*-configuration.

- 5 10. A compound as claimed in any one of Claims 1 to 9, wherein the fragment



is in the *R*-configuration.

10

11. A compound as claimed in Claim 1 which is Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF).

12. A compound as claimed in Claim 2 which is:

- 15 Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe); or
Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH).

13. A pharmaceutical formulation including a compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof,
20 in admixture with a pharmaceutically acceptable adjuvant, diluent or carrier.

14. A compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, for use as a pharmaceutical.

62
37
6

15. A compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, for use in the treatment of a condition where inhibition of thrombin is required.

5

16. A compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, for use in the treatment of a condition where anticoagulant therapy is indicated.

10 17. A compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, for use in the treatment of thrombosis.

15 18. A compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, for use as an anticoagulant.

19. The use of a compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, as an active ingredient for the manufacture of a medicament for the treatment of a condition where
20 inhibition of thrombin is required.

20. The use of a compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, as an active ingredient for the manufacture of a medicament for the treatment of a condition where
25 anticoagulant therapy is indicated.

21. The use as claimed in Claim 19 or Claim 20, wherein the condition is thrombosis.

63
127

22. The use as claimed in Claim 19 or Claim 20, wherein the condition is hypercoagulability in blood and/or tissues.

23. The use of a compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a
5 pharmaceutically acceptable derivative thereof, as an active ingredient for the manufacture of an anticoagulant.

24. A method of treatment of a condition where inhibition of thrombin is required which method comprises administration of a therapeutically
10 effective amount of a compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, to a person suffering from, or susceptible to, such a condition.

25. A method of treatment of a condition where anticoagulant therapy is
15 indicated which method comprises administration of a therapeutically effective amount of a compound as defined in any one of Claims 1 to 12, or a pharmaceutically acceptable derivative thereof, to a person suffering from, or susceptible to, such a condition.

20 26. A method as claimed in Claim 24 or Claim 25, wherein the condition is thrombosis.

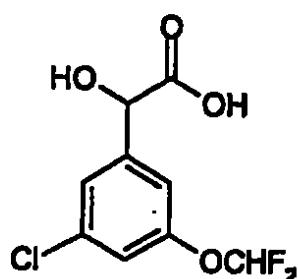
27. A method as claimed in Claim 24 or Claim 25, wherein the condition is hypercoagulability in blood and/or tissues.

25

28. A process for the preparation of a compound of formula I as defined in Claim 1, which comprises:

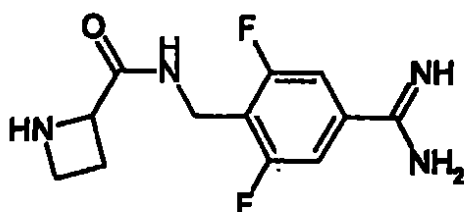
(i) the coupling of a compound of formula II,

60



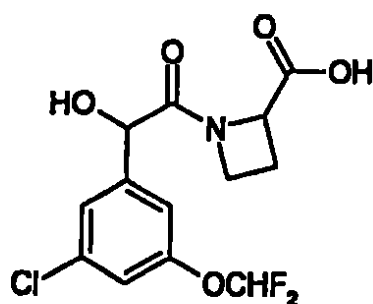
II

with a compound of formula III,



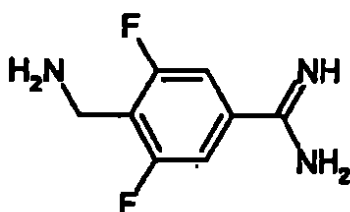
III

(ii) the coupling of a compound of formula IV,



IV

with the compound of formula V,

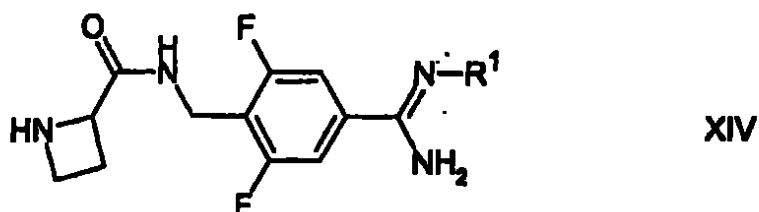


V

- (iii) reaction of a corresponding compound of formula XVI, as defined in Claim 29, with a suitable source of ammonia; or
- (iv) deprotection of a protected derivative of a compound as claimed in Claim 1.

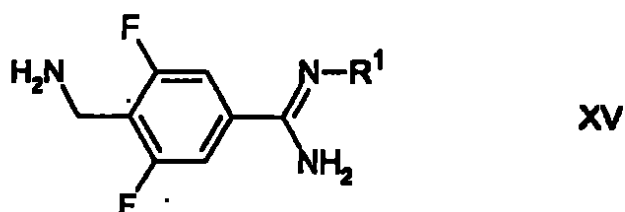
29. A process for the preparation of a compound of formula Ia as defined in Claim 2, which comprises:

(a) reaction of a corresponding compound of formula II as defined in Claim 28 with a compound of formula XIV,



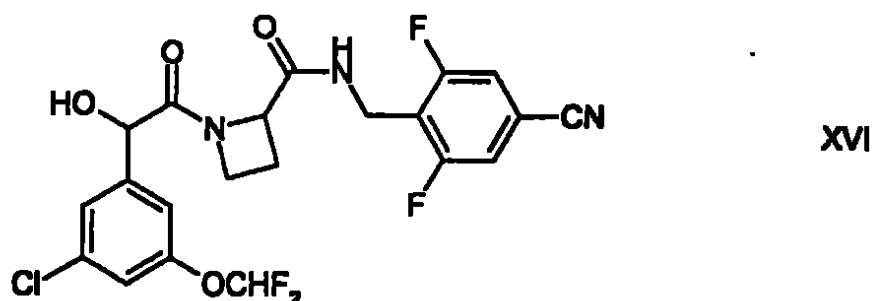
wherein R¹ is as defined in Claim 2;

5 (b) reaction of a corresponding compound of formula IV as defined in Claim 28 with a compound of formula XV,



wherein R¹ is as defined in Claim 2;

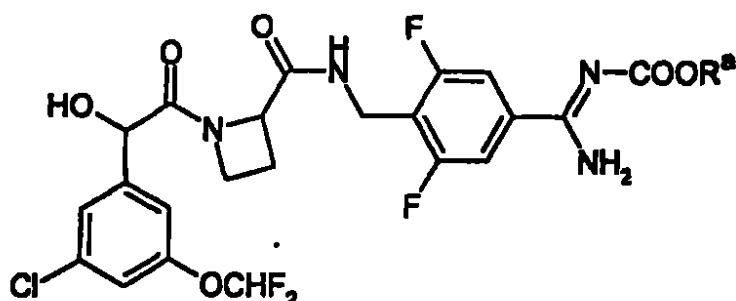
(c) for compounds of formula Ia in which R¹ represents OH, reaction of a
10 corresponding compound of formula XVI,



with hydroxylamine;

(d) for compounds of formula Ia in which R¹ represents OR², reaction of
compound of formula XVII,

66



XVII

wherein R^a represents $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$, or benzyl, or a tautomer thereof, with a compound of formula XVIII,



XVIII

- 5 wherein R^2 is as defined in Claim 2, or an acid addition salt thereof, followed by removal of the $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ group;
- (e) for compounds of formula Ia in which R^1 represents OH, reaction of a compound of formula XVII, as defined above, in which R^a represents benzyl with hydroxylamine, or an acid addition salt thereof;
- 10 (f) for compounds of formula Ia in which R^1 represents COOR^3 , reaction of a corresponding compound of formula I as defined in Claim 1 with a compound of formula XIX,



XIX

- wherein L^1 represents a suitable leaving group and R^3 is as defined in Claim
- 15 2; or
- (g) for compounds of formula Ia in which R^1 represents OCH_3 , or OCH_2CH_3 , reaction of a corresponding compound of formula Ia in which R^1 represents OH with dimethylsulfate or diethylsulfate, respectively.

(18) Organización Mundial de Propiedad Intelectual

Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional

6 de Marzo de 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 03/018551 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: C07D 205/04, A61K 31/397, A61P 7/02

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/SE02/01577

(22) Fecha de Entrega Internacional: 30 de Agosto de 2002 (30.08.2002)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Fecha de Prioridad:
0102821-4 30 de Agosto 2001 (03.08.2001) SE
PCT/SE01/02857

30 de Noviembre 2001 (30.11.2001) SE

(71) Solicitante por (para todos los estados designados excepto US): ASTRAZENECA AB [SE/SE]; S-151 85 Södertälje (SE)

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (Solo para US): INGARDT, Tord [SE/SE]; AstraZeneca R & D Mölndal, S-431 83 Mölndal (SE). JOHANSSON, Anders [SE/SE]; AstraZeneca R & D Mölndal, S-431 83 Mölndal (SE). SVENSSON, -ARNE [SE/SE]; AstraZeneca R & D Mölndal, S-431 83 Mölndal (SE).

(74) Apoderado: GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY; AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje (SE).

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FIM, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HY, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UAM, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

Con el informe de búsqueda internacional.

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, referirse a las "Notas de Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta del PCT.

(54) Título: NUEVOS DERIVADOS DEL ÁCIDO MANDELICO Y SU USO COMO INHIBIDORES DE LA TROMBINA

(57) Resumen: Se proporciona un compuesto de fórmula (I) y derivados farmacéuticamente aceptables (incluyendo prodrogas) del mismo, tal compuesto y sus derivados son útiles como, o son útiles como prodrogas de, inhibidores competitivos de proteasas tipo tripsina, tal como la trombina, y por lo tanto, en particular, en el tratamiento de condiciones donde se requiere la inhibición de la trombina (como la trombosis) o como anticoagulantes.

NUEVOS DERIVADOS DEL ÁCIDO MANDELICO Y SU USO COMO INHIBIDORES DE LA TROMBINA.

63
7

Campo de la invención

Esta invención se relaciona con compuestos novedosos farmacéuticamente útiles, en particular compuestos que son, y/o compuestos que son metabolizados a compuestos que son, inhibidores competitivos de proteasas de serina de tipo tripsina, especialmente la trombina, su uso como medicamentos, composiciones farmacéuticas que los contienen y rutas sintéticas para su producción.

Antecedentes

La coagulación de la sangre es el proceso clave involucrado tanto en la hemostasis (en otras palabras la prevención de la pérdida de sangre desde un vaso dañado) como en la trombosis (o sea la formación de coágulos de sangre en un vaso sanguíneo, lo que a veces conlleva a una obstrucción del vaso).

La coagulación es el resultado de una serie de complejas reacciones enzimáticas. Uno de los pasos finales en ésta serie de reacciones es la conversión de la proenzima protrombina a la enzima trombina activa.

Se sabe que la trombina juega un papel central en la coagulación. Activa las plaquetas, lo que lleva a la agregación de plaquetas, convierte el fibrinógeno en monómeros de fibrina, los cuales se polimerizan espontáneamente en polímeros de fibrina, y activa el factor XIII, el cual a su vez entrecruza los polímeros para formar la fibrina insoluble. Más aun, la trombina activa el factor V y el factor VIII lo

que lleva a una generación de trombina desde la protrombina por "retroalimentación positiva".

Al inhibir la agregación de las plaquetas y la formación de entrecruzamientos en la fibrina, se esperaría que los inhibidores efectivos de la trombina exhibieran actividad antitrombótica. Adicionalmente, se esperaría que la actividad antitrombótica fuera aumentada por la inhibición efectiva del mecanismo de retroalimentación positiva.

El arte previo

El desarrollo temprano de inhibidores de la trombina de bajo peso molecular ha sido descrito por Claesson en Blood Coagul. Fibrinol. (1994) 5, 411.

Blombäck y colaboradores (en J. Clin. Lab. Invest. 24 suplemento 107, 59, (1996)) reportó inhibidores de trombina basados en la secuencia de aminoácidos situados alrededor del sitio de hendidura para la cadena de fibrinógeno A α . De las secuencias de aminoácidos discutidas, estos autores sugirieron que la secuencia de tres péptidos Phe-Val-Arg (P9-P2-P1, de aquí en adelante denominada secuencia P3-P2-P1) sería el inhibidor más efectivo.

Los inhibidores de la trombina basados en derivados del dipeptilo con un α,ω -aminoalquilo de guanidina en la posición P1 se conocen de la patente US N° 4.346.078 y la solicitud internacional de patente WO 93/11152. También se han reportado derivados de dipeptilo similares, relacionados estructuralmente. Por ejemplo la solicitud internacional de patente WO 94/29336 divulga compuestos con, por ejemplo, benzamidinas de aminometilo, amidinas de aminoalquilo cíclico y guanadinas de aminoalquilo cíclico en la posición P1 (la solicitud internacional de

patente WO 97/23499 divulga prodrogas de ciertos de estos compuestos); la solicitud de patente europea 0 648 780 divulga compuestos con, por ejemplo, guanadinas de aminoalquilo cíclico en la posición P1.

Los inhibidores de la trombina basados en los derivados del peptidilo, que también tienen guanadinas de aminoalquilo cíclico (por ejemplo 3- o 4-aminometil-1-amidinopiperidina) en la posición P1 son conocidos de las solicitudes de patente europea 0 468 231, 0 559 046 y 0 641 779

Los inhibidores de la trombina basados en derivados del tripeptidilo con aldehído de arginina en la posición P1 fueron divulgados primero en la solicitud de patente europea 0 185 390.

Más recientemente, se han reportado derivados del peptidilo basados en aldehído de arginina, modificados en la posición P3. Por ejemplo, la solicitud internacional de patente WO 93/18060 divulga hidroxiácidos, la solicitud de patente europea 0 526 877 des-aminoácidos, y la solicitud de patente europea 0 542 525 ácidos O-metilmandélicos en la posición P3.

También se conocen los inhibidores de proteasas de serina (como la trombina) basados en cetonas electrofílicas en la posición P1. Por ejemplo, la solicitud de patente europea 0 192 212 divulga α -ceto ésteres y amidas de peptidilo, la solicitud de patente europea 0 362 002 cetonas de fluoroalquilamida, la solicitud de patente europea 0 364 344 compuestos de α,β,δ -tricetonas, y la solicitud europea de patente 0 530 167 derivados α -alcoxicetona de la arginina en la posición P1.

4

Otros inhibidores, estructuralmente diferentes, de las proteasas de serina tipo tripsina basadas en derivados de arginina con ácido borónico en el C terminal y análogos del isotiuronio de los mismos se conocen de la solicitud de patente europea 0 293 881.

Más recientemente, se han divulgado inhibidores de trombina basados en derivados del peptidilo divulgados en la solicitud de patente europea 0 669 317 y las solicitudes de patente internacional WO 95/35309, WO 95/23609, WO 96/25426, WO 97/02284, WO 97/46577, WO 96/32110, WO 96/31504, WO 96/03374, WO 98/06740, WO 97/49404, WO 98/57932, WO 99/29664, WO 00/35869 y WO 00/42059.

En particular, WO 97/02284 y WO 00/42059 divulgan inhibidores de trombina con ácidos mandélicos sustituidos en la posición P3.

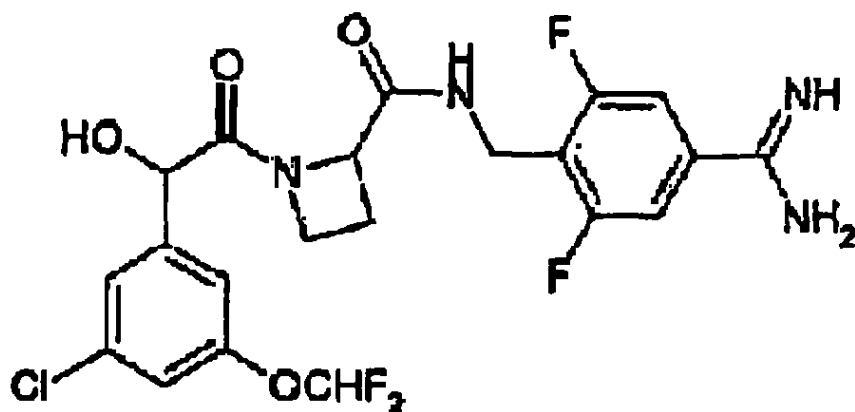
Sin embargo, permanece una necesidad de inhibidores efectivos de proteasas de serina tipo tripsina, tal como la trombina. También hay una necesidad de compuestos que tengan un perfil farmacocinético favorable y que inhiban selectivamente a la trombina por sobre otras proteasas de serina, en particular aquellas involucradas en la hemostasis. Se espera que los compuestos que exhiben actividad inhibidora competitiva hacia la trombina sean especialmente útiles como anticoagulantes y por lo tanto en el tratamiento de la trombosis y los desordenes relacionados.

Divulgación de la invención

De acuerdo con la invención se proporciona un compuesto de la fórmula I

5 72





I

(en otras palabras Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-CH(OH)C(O)-Aze-Pab(2,6-diF)) o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

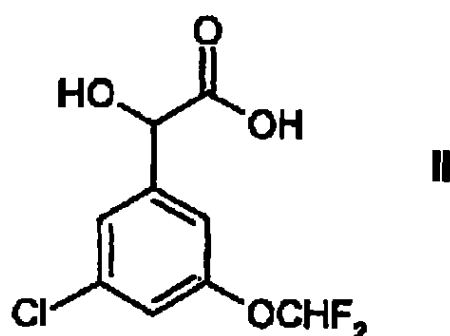
El término "derivado farmacéuticamente aceptable" incluye sales farmacéuticamente aceptables (como sales de adición ácida).

Las abreviaturas se listan al final de esta especificación.

El compuesto de la fórmula I puede ser hecho de acuerdo con técnicas bien conocidas a aquellos con habilidad en el arte, por ejemplo como se describe de aquí en adelante.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un proceso para la preparación de un compuesto de la fórmula I, el cual comprende:

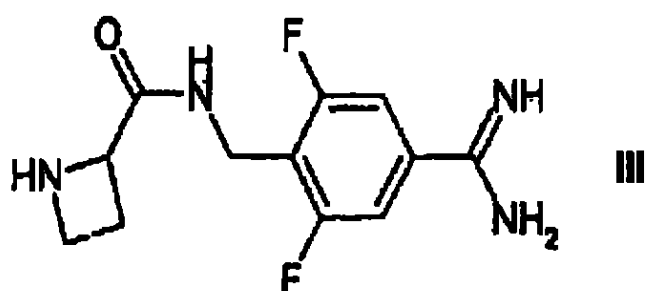
(i) la combinación de un compuesto de fórmula II



II

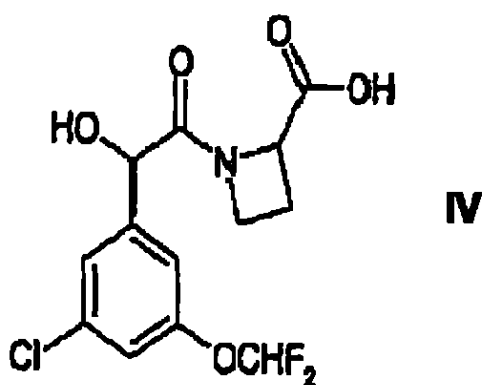
6 73
A

con un compuesto de la fórmula III

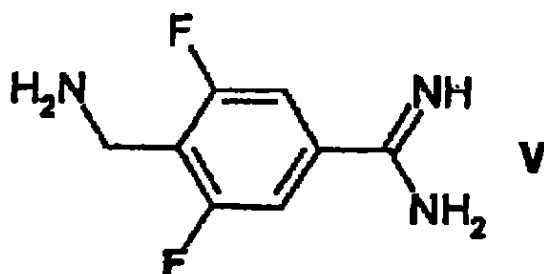


por ejemplo en la presencia de un agente combinante (como cloruro de oxalilo en DMF, EDC, HBTU, HATU, PyBOP o TBTU), una base apropiada (como piridina, DMAP, TEA, 2,4,6-collidina o DIPEA) y un solvente orgánico apropiado (como diclorometano, acetonitrilo, EtOAc o DMF);

(ii) la combinación de un compuesto de la fórmula IV,



con el compuesto de la fórmula V,



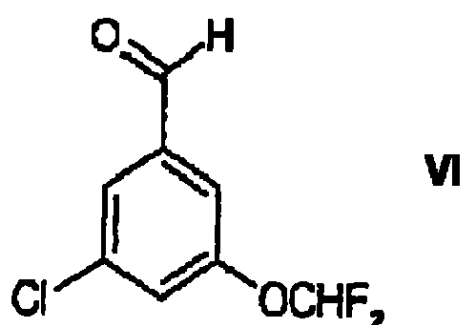
por ejemplo bajo condiciones como se describen en el proceso (i) arriba; y

(iii) la reacción del compuesto correspondiente de fórmula XVI, como se define a continuación, con una fuente apropiada de amonio (como el acetato de amonio o gas de amonio) bajo condiciones conocidas a aquellos con habilidad en el arte, tal

como por reacción de un etilimidoato intermedio (formado por reacción de un compuesto de fórmula XVI con HCl (g) en etanol) con gas de amonio en etanol, o bajo las condiciones descritas en *Tetrahedron Lett.* 40, 7067 (1999), las divulgaciones en tal documento son incorporadas aquí como referencia.

Los compuestos de la fórmula II están disponibles usando técnicas conocidas y/o estándar.

Por ejemplo, los compuestos de la fórmula II pueden ser preparados por reacción del aldehído de fórmula VI,



con:

(a) Un compuesto de la fórmula VII,



VII

en dónde R^* representa H o $(CH_3)_3Si$, por ejemplo a temperatura ambiente, o elevada, (por ejemplo, menos de $100^\circ C$) en presencia de un solvente orgánico apropiado (como cloroformo o cloruro de metileno) y, de ser necesario, en presencia de una base apropiada (como TEA) y/o un sistema catalizador apropiado (como cloruro de bencilamonio o yoduro de zinc, o usando un catalizador quiral, por ejemplo como se describe en *Chem. Rev.*, (1999) 99, 3694),

seguida de una hidrólisis bajo condiciones que son bien conocidas por aquellos con habilidad en el arte (como las que se describen a continuación);

(b) NaCN o KCN, por ejemplo en presencia de NaHSO₃ y agua, seguida de hidrólisis.

(c) cloroformo, por ejemplo a temperatura elevada (como por encima de la temperatura ambiente pero por debajo de 100°C) en presencia de un solvente orgánico apropiado (como cloroformo) y, de ser necesario, en presencia de un sistema catalizador apropiado (como cloruro de bencilamonio), seguida de hidrólisis.

(d) un compuesto de la fórmula VIII

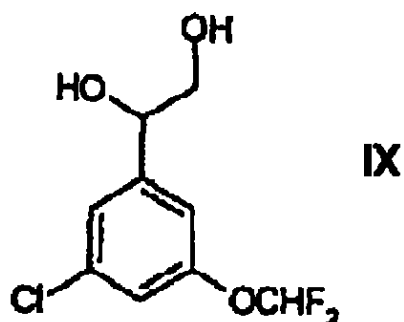


en dónde M representa Mg o Li, seguida de una escisión oxidativa (como por ozonólisis o catalizada por osmio o rutenio) bajo condiciones que son bien conocidas a aquellos con habilidad en el arte; o

(e) tris(metilíto)metano bajo condiciones que son bien conocidas para aquellos con habilidad en el arte, seguida de una hidrólisis en presencia de por ejemplo HgO y HBF₄.

Los compuestos de la fórmula II pueden alternativamente ser preparados por oxidación de un compuesto de fórmula IX,

9/76



o un derivado del mismo que está opcionalmente protegido en el grupo hidroxilo secundario, en presencia de un agente oxidante apropiado (como una combinación de un oxidante de radical libre apropiado (tal como TEMPO) y una sal de hipoclorito apropiada (tal como el hipoclorito de sodio) bajo condiciones conocidas a aquellos con habilidad en el arte, a por ejemplo entre -10°C y temperatura ambiente, en presencia de una solvente apropiado (como agua, acetona o una mezcla de los mismos), una sal apropiada (como un haluro de metal alcalino tal como bromuro de potasio) y una base apropiada (como un carbonato de metal alcalino o un bicarbonato como bicarbonato de sodio).

Las formas enantioméricamente puras de los compuestos de fórmula II (como aquellos compuestos que tienen distintas configuraciones de sustituyentes alrededor de átomo C α - del grupo CO₂H) pueden ser separadas por un paso de derivación específico para los enantiómeros. Esto puede lograrse, por ejemplo por un proceso enzimático. Tal proceso enzimático incluye, por ejemplo, la transesterificación del grupo α -OH a temperatura entre ambiente y de reflujo (como entre 45 y 65°C aproximadamente) en presencia de una enzima apropiada (como Amano PS Lipasa), un éster apropiado (como acetato de vinilo) un solvente apropiado (como *tert*-butil éter de metilo). El isómero derivado puede entonces ser separado del isómero sin reaccionar por técnicas de separación convencionales (como cromatografía).

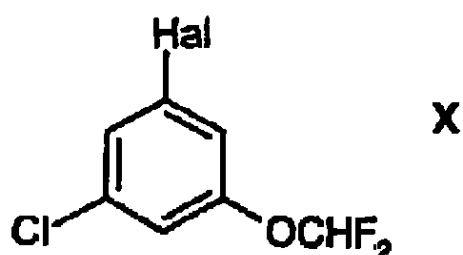
Los grupos adicionados a los compuestos de fórmula II en tal etapa de derivación pueden ser removidos ya sea antes de cualquier reacción adicional o en cualquier etapa posterior en la síntesis de compuestos de fórmula I. Los grupos adicionales pueden ser removidos usando técnicas convencionales (por ejemplo para los ésteres del grupo α -OH, hidrólisis bajo condiciones conocidas a aquellos con habilidad en el arte (como a entre temperatura ambiente y temperatura de reflujo en presencia de una base apropiada (como NaOH) y un solvente apropiado (como MeOH, agua o una mezcla de los mismos))).

Los compuestos de la fórmula III pueden ser preparados por combinación de ácido azetidin-2-carboxílico con un compuesto de fórmula V, como se definió anteriormente, por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas aquí para la preparación de los compuestos de fórmula I.

Los compuestos de fórmula IV pueden ser preparados por combinación de un compuesto de fórmula II como se definió anteriormente con ácido azetidin-2-carboxílico, por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas aquí para la preparación de compuestos de fórmula I.

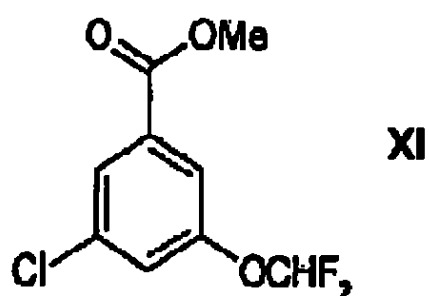
El compuesto de fórmula VI está disponible usando técnicas conocidas y/o estándar. Por ejemplo, se puede preparar por:

(i) metalización (en dónde el metal puede ser, por ejemplo, un metal alcalino tal como litio o, preferiblemente, un metal divalente tal como Mg) de un compuesto de fórmula X,



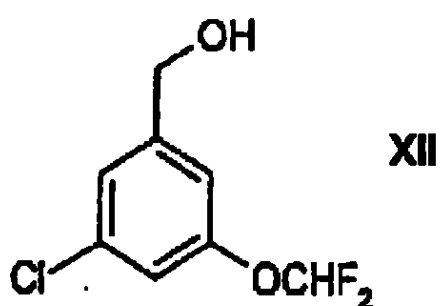
en dónde Hal representa un átomo halógeno seleccionado de Cl, Br e I, seguido de una reacción con una fuente apropiada del grupo formilo (tal como *N,N*-dimetilformamida), por ejemplo bajo condiciones descritas a continuación;

(ii) reducción de un compuesto de fórmula XI,



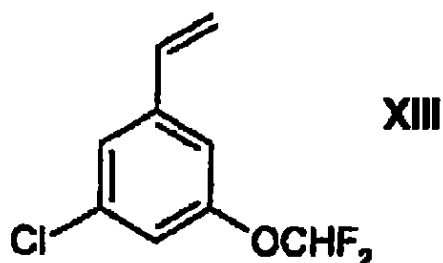
en presencia de un agente reductor apropiado (como DIBAL-H); o

(iii) oxidación de un compuesto de fórmula XII,



en presencia de un agente oxidante apropiado (como MnO₂, clorcromato de piridinio, una combinación de DMSO y cloruro de oxalilo, o un complejo de SO₃ y piridina en DMSO).

Compuestos de la fórmula IX pueden ser preparados por dihidroxilación de un compuesto correspondiente de fórmula XIII



en presencia de un agente dihidroxilante (como un reactivo o una mezcla reactiva que proporcione OsO_4 , tal como AD-mix- α o, particularmente, AD-mix- β), por ejemplo bajo condiciones conocidas a aquellos con habilidad en el arte, tal como a entre -10°C y temperatura ambiente en presencia de un solvente apropiado (como agua, *tert*-butanol o una mezcla de estos). Cuando se emplean oxidantes asimétricos tal como AD-mix- α o AD-mix- β , éste método puede ser usado para preparar compuestos de fórmula IX que tienen una configuración de grupos específica (como *R* o *S*) alrededor de los dos átomos de carbono a los cuales están unidos los grupos hidroxilo primario y secundario.

El compuesto de la fórmula XIII puede ser preparado por reacción de un compuesto correspondiente de fórmula X, como se definió antes, con una fuente apropiada del ión vinilo (como tributil(vinil)estaño) bajo condiciones conocidas a aquellos con habilidad en el arte, por ejemplo a entre temperatura ambiente y de reflujo (como 50°C) en presencia de un solvente apropiado (como tolueno), una agente combinante apropiado (como un complejo de coordinación de paladio (0) tal como tretrakis(trifenilfosfin)paladio(0)) y opcionalmente en presencia de un catalizador apropiado (como 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol).

Los compuestos de la fórmula V, VII, VIII, X, XI, XII y el ácido azetadin-2-carboxílico o están comercialmente disponibles, o se conocen en la literatura, o pueden ser obtenidos ya sea por analogía con el proceso aquí descrito, o por procedimientos sintéticos convencionales, de acuerdo con técnicas estándar, desde materiales iniciales fácilmente disponibles usando reactivos y condiciones

de reacción apropiados. Los compuestos de la fórmula XVI pueden ser obtenidos por procesos descritos de aquí en adelante.

Los sustituyentes en los anillos de fenilo en los compuestos de las fórmulas I, II, III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII y XIII pueden ser introducidos usando técnicas bien conocidas para aquellos con habilidad en el arte por medio de interconversiones de los grupos funcionales estándar, de acuerdo con técnicas estándar, desde materiales iniciales fácilmente disponibles usando reactivos y condiciones de reacción apropiados.

Por ejemplo, los compuestos de las fórmulas I, II, IV, VI, X, XI, y XII pueden ser preparados de compuestos correspondientes a aquellos compuestos, en donde, en lugar de el grupo -OCHF_2 , hay presente un grupo -OH (que de aquí en adelante serán referenciados como "los compuestos relevantes precursores del fenol"), por ejemplo por reacción de uno de tal compuesto relevante precursor del fenol con un haloalcano fluorinado apropiado (tal como ClCHF_2), por ejemplo a temperatura ambiente o superior (como la de reflujo) en presencia de una base apropiada (como *tert*-butoxido de potasio, KOH o NaOH, por ejemplo en solución acuosa) y un solvente orgánico apropiado (como THF, cloroformo o *i*-propanol), por ejemplo como se describirá de aquí en adelante.

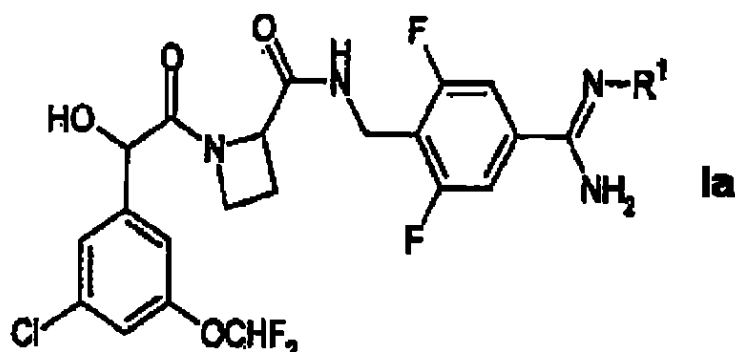
La persona con habilidad apreciará que tales transformaciones del grupo funcional también pueden llevarse a cabo en una etapa más temprana en la síntesis total de los compuestos de las fórmulas II, IV, VI, X, XI, y XII (como en precursores apropiados de los compuestos precursores relevantes del fenol). Los compuestos relevantes precursores del fenol o están disponibles comercialmente, o son conocidos en la literatura, o pueden ser obtenidos ya sea por analogía con los procesos aquí descritos, o por procedimientos sintéticos convencionales, de

acuerdo con las técnicas estándar, de materiales iniciales fácilmente disponibles usando reactivos y condiciones de reacción apropiados. Por ejemplo, los compuestos relevantes precursores del fenol pueden ser obtenidos por desprotección de los fenoles protegidos correspondientes (donde el grupo protector puede ser, por ejemplo, metilo, alilo, bencilo o *tert*-butilo) bajo condiciones estándar.

Los compuestos de fórmula I pueden ser aislados de sus mezclas de reacción usando técnicas convencionales.

De acuerdo con la presente invención, los derivados farmacéuticamente aceptables de compuestos de fórmula I también incluyen derivados "protegidos", y/o compuestos que actúan como prodrogas, de compuestos de la fórmula I.

Los compuestos que pueden actuar como prodrogas de los compuestos de fórmula I que pueden ser mencionados incluyen compuestos de la fórmula Ia,



en donde R^1 representa OR^2 o $C(O)OR^3$;

R^2 representa H, C_{1-10} -alquilo, C_{1-3} -alquilarilo o C_{1-3} -alquiloarilo (donde las partes alquilo de estos últimos dos grupos son opcionalmente interrumpidas por uno o más átomos de oxígeno, y las partes arilo de estos dos últimos grupos son opcionalmente sustituidas por uno o más sustituyentes seleccionados de halo,

02
M

fenilo, metilo o metoxi, donde estos tres últimos grupos también pueden ser opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes halo); y

R^3 representa C_{1-10} -alquilo (donde éste último grupo es opcionalmente interrumpido por uno o más átomos de oxígeno), o C_{1-3} -alquilarilo o C_{1-3} -alquiloarilo (donde las partes alquilo de estos últimos dos grupos son opcionalmente interrumpidas por uno o más átomos de oxígeno, y las partes arilo de estos dos últimos grupos son opcionalmente sustituidas por uno o más sustituyentes seleccionados de halo, fenilo, metilo o metoxi, donde estos tres últimos grupos también pueden ser opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes halo),

y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término "derivados farmacéuticamente aceptables" de compuestos de la fórmula la incluyen sales farmacéuticamente aceptables (como sales de adición ácida).

Los grupos alquiloarilo que R^2 y R^3 pueden representar comprenden un grupo alquilo y un arilo unidos por medio de un átomo de oxígeno. Los grupos alquilarilo y alquiloarilo están unidos al resto de la molécula por la parte alquilo de estos grupos, donde las partes alquilo pueden ser (si hay un número suficiente (por ejemplo, tres) de átomos de carbono) de cadenas ramificadas. Las partes arilo de los grupos alquilarilo y alquiloarilo que R^2 y R^3 pueden representar, o ser sustituidas por, incluyen grupos aromáticos carbocíclicos y heterocíclicos, tales como fenilo, naftilo, piridinilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, indolilo y benzofuranilo y otros semejantes.

Los grupos alquilo que R^2 y R^3 pueden representar pueden ser de cadena lineal o, cuando hay un número suficiente (como mínimo 3) de átomos de carbono, pueden

16 83

ser de cadena ramificada y/o cíclica. Más aun, cuando hay un número suficiente (como mínimo cuatro) de átomos de carbono, tales grupos alquilo también pueden ser en parte cíclicos/acíclicos. Tales grupos alquilo también pueden ser saturados o, cuando hay un número suficiente (como mínimo dos) de átomos de carbono, ser insaturados.

Los grupos halo con que R^2 y R^3 pueden ser sustituidos incluyen fluoro, cloro, bromo e yodo.

Cuando R^1 representa $C(O)OR^3$, los grupos R^3 preferidos incluyen:

- (a) C_{3-8} alquilo lineal, ramificado o cíclico, por ejemplo C_{4-8} cicloalquilo;
- (b) grupos C_{1-2} alquilarilo, tal como bencilo, opcionalmente sustituidos como se indicó anteriormente.

Los compuestos preferidos de la fórmula la incluyen aquellos en donde R^1 representa OR^2 .

Cuando R^1 representa OR^2 , los grupos R^2 preferidos incluyen:

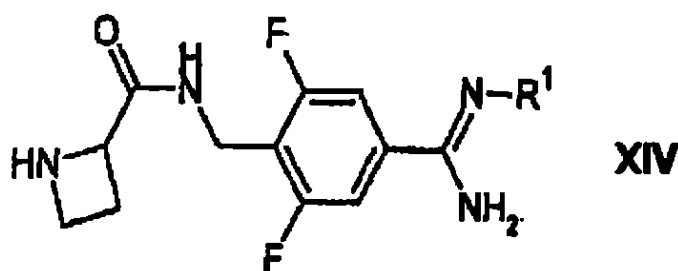
- (a) H;
- (b) C_{1-8} (como C_{1-8})alquilo sin sustituir, ramificado o cíclico, tal como C_{1-3} alquilo lineal (por ejemplo etilo o, particularmente, metilo), C_{3-8} -alquilo ramificado (por ejemplo *i*-propilo, *i*-butilo o 4-heptilo) o C_{4-7} -alquilo cíclico (por ejemplo C_{4-7} coclialquilo, como ciclobutilo o ciclohexilo);
- (c) C_{1-3} alquinoxifenilo (como C_2 alquinoxifenilo), donde el grupo fenilo es opcionalmente sustituido por un o más sustituyentes como se indicó anteriormente (por ejemplo trifluorometilo);
- (d) C_{1-2} alquilarilo (como metilarilo) en dónde el grupo arilo es fenilo, piridinilo, oxazolilo o isoxazolilo, donde los últimos tres grupos son opcionalmente

sustituidos por uno o más sustituyentes como se indicó anteriormente (como metoxi, metilo, bromo y/o cloro).

Los compuestos preferidos de la fórmula Ia incluyen aquellos en donde R¹ representa OR² y R² representa un C₁₋₆ (por ejemplo C₁₋₄) alquilo lineal, ramificado (según sea apropiado), o cíclico (según sea apropiado), tal como metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo o ciclobutilo.

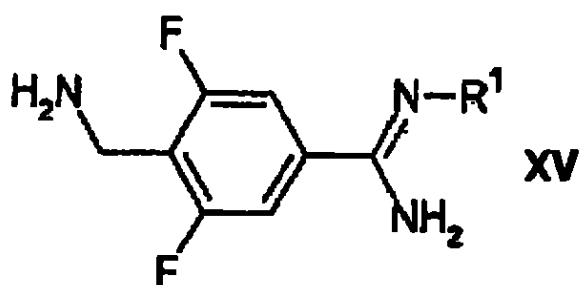
Los compuestos de la fórmula Ia pueden ser preparados por uno o más de los siguientes métodos:

(a) reacción de un compuesto correspondiente a la fórmula II como se definió anteriormente con un compuesto de la fórmula XIV,



en donde R¹ es como se definió anteriormente, por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas anteriormente para la síntesis de compuesto de fórmula I;

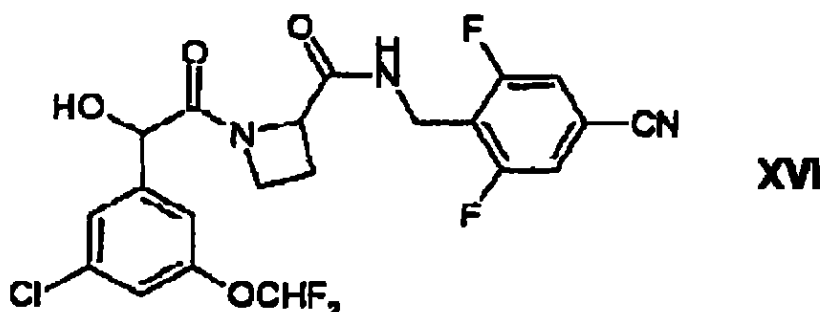
(b) La reacción del compuesto correspondiente a la fórmula IV como se definió anteriormente con un compuesto de la fórmula XV,



18

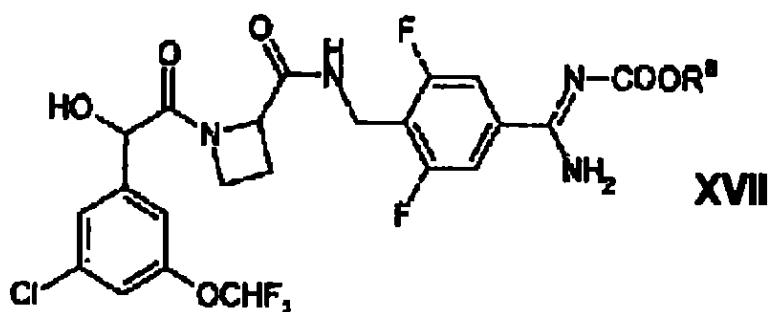
en donde R^1 es como se definió anteriormente, por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas anteriormente para la síntesis de compuestos de la fórmula I,

(c) para compuestos de la fórmula Ia en donde R^1 representa OH, la reacción de un compuesto correspondiente a la fórmula XVI,



con hidroxilamina, por ejemplo bajo condiciones conocidas a aquellos con habilidad en el arte;

(d) Para compuestos de la fórmula Ia en donde R^1 representa OR^2 , la reacción de un derivado protegido de un compuesto correspondiente de la fórmula I el cual es, por ejemplo, un compuesto de fórmula XVII,



en donde R^2 representa, por ejemplo $-CH_2CH_2-Si(CH_3)_3$ o bencilo, o un tautómero de los mismos, con un compuesto de la fórmula XVIII,



en donde R^2 es como se definió con anterioridad, o una sal de adición ácida del mismo, por ejemplo a entre temperatura ambiente y de reflujo en presencia de un

83

solvente orgánico apropiado (como THF, CH₃CN, DMF o DMSO), seguida de una remoción del grupo -C(O)OR^a bajo condiciones conocidas a aquellos con habilidad en el arte (como por reacción con QF o TFA (por ejemplo como se describió anteriormente));

(e) para compuestos de la fórmula Ia en donde R¹ representa OH, la reacción de un compuesto de la fórmula XVII, como se definió con anterioridad, en donde R^a representa bencilo con hidroxilamina, o una sal de adición ácida del mismo, por ejemplo bajo condiciones que son bien conocidas a aquellos con habilidad en el arte;

(f) para compuestos de la fórmula Ia en donde R¹ representa COOR³, la reacción de un compuesto correspondiente de la fórmula I como se definió anteriormente con un compuesto de la fórmula XIX,



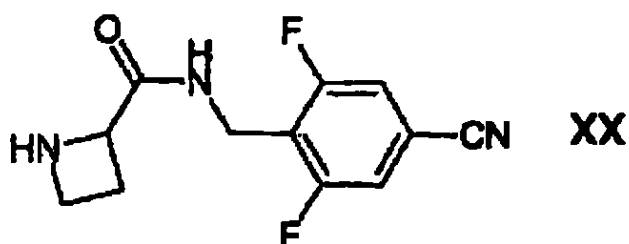
XIX

en donde L¹ representa un grupo saliente apropiado, tal como halógeno o nitrofenilo (como 4-nitrofenilo), y R³ es como se definió con anterioridad, por ejemplo en o alrededor de la temperatura ambiente en presencia de una base apropiada (como NaOH, por ejemplo en solución acuosa) y un solvente orgánico apropiado (como cloruro de metileno); o

(g) para compuestos de la fórmula Ia en donde R¹ representa OCH₃ u OCH₂CH₃, la reacción de un compuesto correspondiente de la fórmula Ia en donde R² representa OH con dimetilsulfato o dietilsulfato, respectivamente, por ejemplo en presencia de una base apropiada (como un hidróxido de metal alcalino como el KOH (por ejemplo en solución acuosa a por ejemplo el 50% en peso)) y un

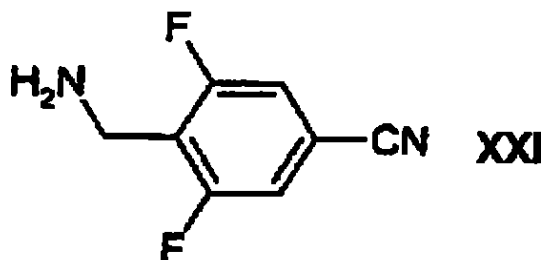
catalizador apropiado (como un haluro cuaternario de amonio tal como cloruro de benciltrimetilamonio (por ejemplo en CH_2Cl_2 o en una solución de THF por ejemplo al 10% en peso)).

Los compuestos de la fórmula XVI pueden ser preparados por reacción de un compuesto correspondiente de fórmula II, como se definió anteriormente, con un compuesto de fórmula XX,



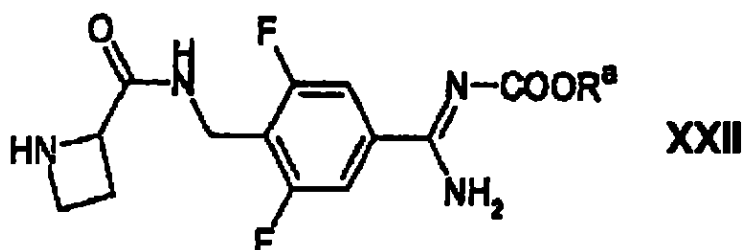
por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas anteriormente para la síntesis de compuestos de fórmula I.

Los compuestos de fórmula XVI pueden alternativamente ser preparados por una reacción de un compuesto correspondiente de fórmula IV, como se definió anteriormente, con un compuesto de fórmula XXI,



por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas anteriormente para la síntesis de compuestos de fórmula I.

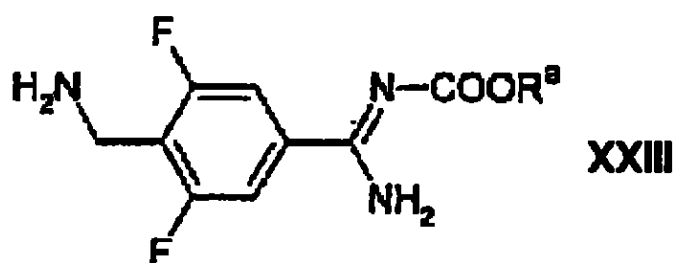
Los compuestos de fórmula XVII pueden ser preparados por reacción de un compuesto correspondiente de fórmula II, como se definió anteriormente, con un compuesto de fórmula XXII,



en donde R^a es como se definió anteriormente, por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas anteriormente para la síntesis de compuestos de la fórmula I.

Alternativamente, se pueden preparar compuestos de la fórmula XVII por reacción de un compuesto correspondiente de fórmula I con un compuesto correspondiente a un compuestos correspondiente de fórmula XIX en donde, en lugar de R^3 , está presente el grupo R^a , en donde R^a es como se definió anteriormente, por ejemplo bajo condiciones descritas arriba respecto a la preparación de compuestos de la fórmula Ia.

Los compuestos de la fórmula XIV y XXII pueden ser preparados por reacción de ácido azetidin-2-carboxílico con, respectivamente, un compuesto de fórmula XV como se definió anteriormente, o un compuesto de fórmula XXIII,



en donde R^a es como se definió anteriormente, por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas anteriormente para la síntesis de compuestos de fórmula I.

Los compuestos de fórmula XV, XVIII, XIX, XX, XXI y XXIII o están disponibles comercialmente, o se conocen en la literatura, o pueden ser obtenidos ya sea por

analogía con los procesos aquí descritos, o por procedimientos de síntesis convencionales, de acuerdo con las técnicas estándar, de materiales iniciales fácilmente disponibles usando reactivos y condiciones de reacción apropiadas. Por ejemplo, los compuestos de la fórmula XX pueden ser preparados por reacción de un compuesto correspondiente de fórmula XXI con ácido azetidin-2-carboxílico, por ejemplo bajo condiciones similares a aquellas descritas con anterioridad.

Los compuestos de fórmula I e Ia, como se definieron anteriormente, y los derivados de cualquiera de los dos, se conocerán de aquí en adelante como "los compuestos de la invención".

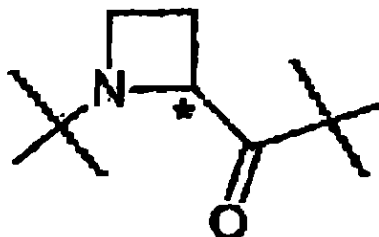
Los compuestos de la invención pueden exhibir tautomerismo. Todas las formas tautoméricas y las mezclas de los mismos se encuentran incluidas dentro del alcance de la invención. Las formas tautoméricas particulares que pueden ser mencionadas incluyen aquellas conectadas con la posición del doble enlace en la funcionalidad amidina en un compuesto de fórmula Ia, y la posición de sustituyente R¹.

Los compuestos de la invención también pueden contener dos o más átomos asimétricos de carbono y por lo tanto exhibir isomerismo óptico y/o diastereoisomerismo. Los diastereoisómeros pueden ser separados usando técnicas convencionales, como cromatografía. Los distintos estereoisómeros pueden ser aislados por separación de una mezcla de los compuestos, racémica o de otro tipo, usando técnicas convencionales, como técnicas de HPLC. Alternativamente, los isómeros ópticos deseados pueden ser hechos por reacción con los materiales iniciales ópticamente activos apropiados bajo condiciones que no causarán racemización o epimerización, o por derivación, por ejemplo con un



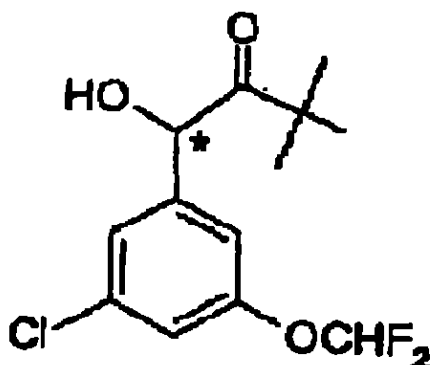
ácido homoquiral seguida de una separación de los derivados diastereoméricos por medios convencionales (como cromatografía HPLC sobre sílice). Todos los estereoisómeros están incluidos dentro del alcance de la invención.

Los compuestos de la invención en donde el fragmento



está en configuración S son preferidos.

Los compuestos preferidos de la invención también incluyen aquellos en donde el fragmento estructural



está en la configuración R.

Las líneas onduladas sobre los enlaces en los dos fragmentos anteriores significan las posiciones de enlace de los fragmentos.

Por lo tanto, compuesto preferidos de la invención incluyen:

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF);

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe); y

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH).

Aquellos con habilidad en el arte apreciarán que en los procesos descritos anteriormente y de aquí en adelante los grupos funcionales de los compuestos intermedios pueden necesitar ser protegidos por grupos protectores.

Los grupos funcionales que se desea proteger incluyen hidroxí, amino y ácido carboxílico. Grupos apropiados para la protección del grupo hidroxí opcionalmente incluyen grupos alquilo sustituidos y/o insaturados (como metilo, alilo, bencilo o *tert*-butilo), grupos trialkilsililo o diarilalkilsililo (como *t*-butildimetilsililo, *t*-butildifenilsililo o trimetilsililo) y tetrahidropiraniilo. Grupos protectores apropiados para el ácido carboxílico incluyen ésteres de C₁₋₆-alquilo o bencilo.

Grupos protectores apropiados para amino y amidino incluyen *t*-butiloxicarbonilo, benciloxicarbonilo o 2-trimetilsililetoxicarbonilo (Teoc). Los nitrógenos del amidino también pueden ser protegidos por grupos hidroxí o alcoxi, y pueden ser mono o diprotegidos.

La protección y desprotección de los grupos funcionales puede llevarse a cabo antes o después del enlace, o antes o después de cualquier otra reacción en los esquemas anteriormente mencionados.

Los grupos protectores pueden ser removidos de acuerdo con técnicas que son bien conocidas para aquellos con habilidad en el arte y como se describen de aquí en adelante.

Las personas con habilidad en el arte apreciarán que, con el fin de obtener los compuestos de la invención en una forma alternativa y, en algunas ocasiones, más conveniente, los pasos individuales del proceso mencionados anteriormente pueden ser llevados a cabo en diferente orden, y/o las reacciones individuales

25 22

pueden ser llevadas a cabo en una etapa diferente en la ruta total (por ejemplo los sustituyentes pueden ser adicionados y/o las transformaciones químicas pueden ser realizadas sobre distintos intermedios a los mencionados anteriormente en conjunto con una reacción particular). Esto puede negar, o hacer innecesaria, la necesidad de grupos protectores.

El tipo de química involucrada dictará la necesidad, y el tipo, de grupos protectores así como también la secuencia para lograr la síntesis.

El uso de grupos protectores está completamente descrito en "Grupos Protectores en la Química Orgánica", editado por J W F McOmie, Plenum Press (1973), y "Grupos Protectores en la Síntesis Orgánica", 3ª edición, T. W. Green & P. G. M. Wutz, Wiley-Interscience (1999).

Los derivados protegidos de los compuestos de la invención pueden ser convertidos químicamente en los compuestos de la invención usando técnicas estándar de desprotección (como hidrogenación). La persona con habilidad en el arte también apreciará que ciertos compuestos de fórmula I también pueden ser referidos como que son "derivados protegidos" de los compuestos de fórmula I.

Uso médico y farmacéutico

Los compuestos de la invención pueden poseer actividad farmacológica como tal. Los compuestos de la invención que pueden poseer tal actividad incluyen, pero no se limitan a, los compuestos de la fórmula I.

Sin embargo, otros compuestos de la invención (incluyendo compuestos de la fórmula Ia) pueden no poseer tal actividad, pero pueden ser administrados

26 913
K

parenteralmente u oralmente, y pueden posteriormente ser metabolizados en el cuerpo para formar compuestos que son farmacológicamente activos (incluyendo, pero no limitándose a, compuestos correspondientes de fórmula I). Tales compuestos (los cuales también incluyen compuestos que pueden poseer alguna actividad farmacéutica, pero esa actividad es apreciablemente menor que la de los compuestos "activos" en los que son metabolizados), pueden por lo tanto ser descritos como "prodrogas" de los compuestos activos.

Por lo tanto, los compuestos de la invención son útiles porque poseen actividad farmacológica, y/o son metabolizados por el cuerpo tras la administración oral o parenteral para formar compuestos que poseen actividad farmacológica. Los compuestos de la invención son por lo tanto indicados como farmacéuticos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporcionan los compuestos de la invención para su uso como farmacéuticos.

En particular, los compuestos de la invención son inhibidores potentes de la trombina ya sea como tales y/o (como en el caso de las prodrogas), son metabolizados después de la administración para formar inhibidores potentes de la trombina, por ejemplo como se puede demostrar en las pruebas descritas a continuación.

Por "prodroga de un inhibidor de la trombina", incluimos compuestos que forman un inhibidor de la trombina, en una cantidad experimentalmente detectable, y dentro de un tiempo predeterminado (como alrededor de una hora), después de la administración oral o parenteral (ver, por ejemplo, la prueba E a continuación) o, alternativamente, después de la incubación en presencia de microsomas del hígado (ver por ejemplo, la Prueba G a continuación).

27 94

Por lo tanto se espera que los compuestos de la invención sean útiles en aquellas condiciones donde se requiere la inhibición de la trombina, y/o las condiciones donde se indica la terapia anticoagulante, incluyendo las siguientes:

El tratamiento y/o profilaxis de la trombosis y la hipercoagulabilidad en la sangre y/o los tejidos de los animales incluyendo al hombre. Se sabe que la hipercoagulabilidad puede llevar a enfermedades trombo-embólicas. Condiciones asociadas con la hipercoagulabilidad y las enfermedades trombo-embólicas que pueden ser mencionadas incluyen la resistencia hereditaria o adquirida a la vitamina C activada, tal como la mutación del factor V (factor V Leiden), y deficiencias hereditarias o adquiridas en antitrombina III, proteína C, proteína S, cofactor II de la heparina. Otras condiciones que se sabe están asociadas con la hipercoagulabilidad y con enfermedades trombo-embólicas incluyen anticuerpos antifosfolípidos circulantes (Lupus anticoagulante), homocisteinemia, trombocitopenia inducida por la heparina y defectos en la fibrinólisis, así como síndromes de coagulación (como coagulación intravascular diseminada (DIC)) y lesiones vasculares en general (como las debidas a la cirugía).

El tratamiento de condiciones en donde hay un exceso indeseable de trombina sin señales de hipercoagulabilidad, por ejemplo en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

Los estados particulares de las enfermedades que pueden ser mencionados incluyen el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la trombosis venosa (como DVT) y embolismo pulmonar, trombosis arterial (como en la infección del miocardio, angina inestable, ataque basado en la trombosis y trombosis periférica arterial), y embolismo sistémico usualmente desde la aurícula durante fibrilación

25

auricular (como la fibrilación auricular no valvular) o desde el ventrículo izquierdo después de un infarto en la pared del miocardio, o causada por una falla congestiva del corazón; la profilaxis de la oclusión repetida (en otras palabras trombosis) después de una trombólisis, operaciones de angioplastia percutanea transluminal (PTA) y de derivación coronaria; la prevención de la repetición de la trombosis después de una microcirugía y de una cirugía vascular en general.

Indicaciones adicionales incluyen el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la coagulación intravascular diseminada ocasionada por bacterias, trauma múltiple, intoxicación o cualquier otro mecanismo; tratamiento anticoagulante cuando la sangre está en contacto con superficies extrañas dentro del cuerpo tal como injertos vasculares, stents vasculares, catéteres vasculares, válvulas prostéticas mecánicas y biológicas o cualquier otro dispositivo médico; y tratamiento anticoagulante cuando la sangre está en contacto con dispositivos médicos fuera del cuerpo tal como durante una cirugía cardiovascular usando una máquina corazón-pulmón o en una hemodiálisis; el tratamiento terapéutico y/o profiláctico del síndrome de angustia respiratoria adulta y de causa desconocida, fibrosis pulmonar después del tratamiento con radiación o quimioterapia, choque séptico, septicemia, respuestas inflamatorias las cuales incluyen, pero no se limitan a, edema, arterosclerosis aguda o crónica tal como enfermedad arterial coronaria y la formación de placas arterioscleróticas, enfermedad arterial cerebral, infección cerebral, trombosis cerebral, embolia cerebral, enfermedad arterial periférica, isquemia, angina (incluyendo angina inestable), daño por reperfusión, restenosis tras una angioplastia transluminal percutánea y una cirugía de derivación de la arteria coronaria.

Los compuestos de la invención que inhiben la tripsina y/o la trombina también pueden ser útiles en el tratamiento de la pancreatitis.

29/96
[Signature]

Los compuestos de la invención son por lo tanto indicados tanto en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de estas condiciones.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento de una condición donde se requiere la inhibición de la trombina el cual comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de la invención a una persona que sufre de, o es susceptible a, tal condición.

Los compuestos de la invención serán normalmente administrados de forma oral, intravenosa, subcutánea, bucal, rectal, dérmica, nasal, traqueal, bronquial, por cualquier otra ruta parenteral o por inhalación, en la forma de preparaciones farmacéuticas que comprenden compuestos de la invención en forma de una dosis farmacéuticamente aceptable.

Dependiendo del desorden del paciente a ser tratado y de la ruta de administración, las composiciones pueden ser administradas a dosis variables.

Los compuestos de la invención también pueden ser combinados y/o administrados junto con cualquier agente(s) antitrombótico(s) con un mecanismo de acción diferente, tal como uno o más de los siguientes: los agentes antiplaquetas como ácido acetilsalicílico, ticlopidina y clopidrogel; receptores de tromboxano y/o inhibidores de sintetasa; antagonistas del receptor de fibrinógeno, miméticos de prostaciclina; inhibidores de fosfodiesterasa; antagonistas del receptor de ADP (P_2T); e inhibidores de la carboxipeptidasa U (CPU).

Los compuestos de la invención pueden adicionalmente ser combinados y/o administrados junto con trombolíticos tal como uno o más de activador de plasminógeno del tejido (natural, recombinante o modificado), estreptoquinasa, uroquinasa, prouroquinasa, complejo anisolado activador de la plasminogeno-estreptoquinasa (APSAC), activadores del plasminógeno de la glándula salivar animal, y otros semejantes, en el tratamiento de enfermedades trombóticas, en particular el infarto del miocardio.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención, en una mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

Dosis diarias apropiadas de los compuestos de la invención en tratamiento terapéutico de humanos son de alrededor de 0.001 – 100 mg/kg de peso corporal en administración peroral y alrededor de 0.001 – 50 mg/kg de peso corporal en administración parenteral, excluyendo el peso de cualquier ión contrario ácido.

Para evitar la duda, como se emplea aquí, el término "tratamiento" incluye tratamiento terapéutico y/o profiláctico.

Los compuestos de la invención tienen la ventaja de que pueden ser más eficaces, menos tóxicos, de acción más prolongada, tener un rango de actividad más amplio, ser más potentes, producir menos efectos secundarios, ser absorbidos más fácilmente, y/o tener un mejor perfil farmacocinético (mayor biodisponibilidad oral y/o menor despeje), que, y/o tener otras propiedades farmacológicas, físicas, o químicas útiles sobre, compuestos conocidos en el arte previo.

Los compuestos de la invención pueden tener la ventaja adicional de que pueden ser administrados menos frecuentemente que los compuestos conocidos en el arte previo.

Pruebas biológicas

Prueba A

Determinación del tiempo de coagulación de la trombina (TT)

La solución de inhibidor (25 µL) es incubada con plasma (25 µL) por tres minutos. Luego se adiciona trombina humana (T 6769; Sigma Chem. Co o Hematologic Technologies) en solución amortiguadora, pH 7.4 (25 µL, 4.0 NIH unidades/mL), y se mide el tiempo de coagulación en un dispositivo automático (KC 10; Amelung).

El tiempo de coagulación de la trombina (TT) se expresa en valores absolutos (segundos) así como también la proporción de TT sin inhibidor (TT₀) a TT con inhibidor (TT₁). Las proporciones anteriores (rango 1 – 0) son graficadas contra la concentración de inhibidor (transformada a logaritmo) y ajustada a curvas en forma de S de respuesta a la dosis de acuerdo con la ecuación

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s}$$

donde a = rango máximo, en otras palabras 1; s = pendiente de la curva de respuesta a la dosis; e IC₅₀ = la concentración de inhibidor que dobla el tiempo de coagulación. Los cálculos se procesan en un PC usando el programa de software GraFit versión 3, ajustando la ecuación igual a: Inicio en 0, definir fin = 1 (Erathicus Software, Robin Leatherbarrow, Colegio Imperial de Londres, Londres, UK).

100.29

Prueba B

Determinación de la inhibición de trombina con un cromogénico, análisis robótico

La potencia del inhibidor de trombina se mide con un método de sustrato cromogénico, en un procesador robótico de microlámina Plato 3000 (Rosys AG, CH-8634 Hombrechtikon, Suiza), usando láminas de microtitulación de 96 cubetas de mitad de volumen (Costar, Cambridge, MA, USA; Cat No 3690). Se diluyen en serie soluciones patrón de la sustancia de prueba en DMSO (72 μ L), 0.1 – 1 mmol/L, en proporción 1:3 (24 + 48 μ L) con DMSO para obtener diez concentraciones diferentes, las cuales son analizadas como muestras en el análisis. Muestras de prueba de 2 μ L son diluidas con 124 μ L de la solución amortiguadora del análisis, se adicionan 12 μ L de solución de sustrato cromogénico (S-2366, Cromogenix, Mölndal, Suecia) en solución amortiguadora de análisis y finalmente 12 μ L de solución de α -trombina (α -trombina humana, Sigma Chemical Co., o Hematologic Technologies) en solución amortiguadora de análisis, y se mezclan las muestras. Las concentraciones finales del análisis son: sustancia de prueba 0.00068 – 13.3 μ mol/L, α -trombina 0.020 NIHU/mL. Se usa el incremento de la absorbancia lineal durante los 40 minutos de la incubación a 37°C para calcular el porcentaje de inhibición para las muestras de prueba, al compararlas con blancos sin inhibidor. El valor IC₅₀ robótico, correspondiente a la concentración de inhibidor que causa un 50% de inhibición de la actividad de la trombina, de una curva del logaritmo de la concentración contra el % de inhibición.

Prueba C

Determinación de la constante de inhibición K_i para la trombina humana

Las determinaciones de K_i se hacen usando un método de sustrato cromogénico, realizado a 37°C en un analizador centrífugo Cobas Bio (Roche, Basel, Suiza). Se determina la actividad enzimática residual después de la incubación de α -trombina humana con varias concentraciones del compuesto de prueba a tres

concentraciones de sustrato diferentes, y se mide como el cambio en la absorbancia óptica a 405 nm.

Las soluciones de los compuestos de prueba (100 μ L; normalmente en una solución amortiguadora o salina que contiene 10 g/L de BSA) se mezclan con 200 μ L de α -trombina humana (Sigma Chemical Co) en solución amortiguadora de análisis (0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.4, fuerza iónica 0.15 ajustada con NaCl) que contiene BSA (10 g/L), y se analizan como muestras en el Cobas Bio. Se adiciona una muestra de 60 μ L, junto con 20 μ L de agua, a 320 μ L de sustrato S-2238 (Chromogenix AB, Mölndal, Suecia) en una solución amortiguadora de análisis, y se monitorea el cambio de absorbancia ($\Delta A/\text{min}$). Las concentraciones finales de S-2238 son 16, 24 y 50 $\mu\text{mol/L}$ y de trombina 0.125 NIH U/mL.

Se usa la tasa de reacción en estado estacionario para construir graficas Dixon, en otras palabras diagramas de concentración de inhibidor vs $1/(\Delta A/\text{min})$. Para inhibidores reversibles, competitivos, los puntos de los datos para las diferentes concentraciones de sustrato típicamente forman líneas rectas las cuales se interceptan en $x = -K_i$.

Prueba D

Determinación del tiempo activado de tromboplastina parcial (APTT)

El APTT se determina en plasma citrado humano normal combinado con el reactivo PTT Automated 5 manufacturado por Stago. Los inhibidores son agregados al plasma (10 μ L de solución de inhibidor a 90 μ L de plasma) e incubados con el reactivo APTT por 3 minutos seguidos de la adición de 100 μ L de solución de cloruro de calcio (0.025 M) y se determina el APTT por el uso del analizador de coagulación KC10 (Amelung) de acuerdo con las instrucciones del productor del reactivo.

24 10/1

El tiempo de coagulación se expresa como valores absolutos (segundos) así como también como la proporción entre APTT sin inhibidor (APTT₀) y APTT con inhibidor (APTT_i). Las anteriores proporciones (rango 1 – 0) son graficadas contra la concentración de inhibidor (transformada a logarítmica) y ajustada a curvas en forma de S de respuesta a la dosis de acuerdo con la ecuación

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s}$$

donde a = rango máximo, en otras palabras 1; s = la pendiente de la curva de respuesta a la dosis; e IC₅₀ = la concentración de inhibidor que dobla el tiempo de coagulación. Los cálculos son procesados en un PC usando el programa de software GraFit versión 3, haciendo la ecuación igual a: Inicio en 0, definir final = 1 (Erithacus Software, Robin Leatherbarrow, Colegio Imperial de Londres, Londres, UK). El IC₅₀APTT se define como la concentración de inhibidor en el plasma humano que dobla el tiempo de activado de tromboplastina parcial.

Prueba E

Determinación del tiempo de trombina *ex vivo*

Se examina la inhibición de la trombina después de la administración parenteral u oral de los compuestos de la invención, disueltos en etanol:SolutolK:agua (5:5:90), en ratas concientes las cuales, uno o dos días antes del experimento, son equipadas con un catéter para tomar muestras de sangre de la arteria carótida. En el día de el experimento se extraen muestras de sangre a tiempos fijos después de la administración del compuesto en tubos plásticos que contienen 1 parte de solución de citrato de sodio (0.13 mol por L) y 9 partes de sangre. Los tubos se centrifugan para obtener plasma pobre en plaquetas.

102

Se precipitan 50 µL de las muestras de plasma con 100 µL de acetonitrilo frío. Las muestras se centrifugan por 10 minutos a 4000 rpm. Se diluyen 75 µL del sobrenadante con 75 µL de ácido fórmico al 0.2%. Se analizan volúmenes de 10 µL de las soluciones resultantes por LC-MS/MS y se determinan las concentraciones de inhibidor de trombina usando curvas estándar.

Prueba F

Determinación de la depuración del plasma en una rata

La depuración del plasma es estimada en machos de ratas Sprague Dawley. El compuesto es disuelto en agua y administrado como una inyección de bolo subcutáneo a una dosis de 4 µmol/kg. Las muestras de sangre se recolectan a intervalos frecuentes hasta 5 h después de la administración de la droga. Las muestras de sangre se centrifugan y el plasma es separado de las células de sangre y transferido a viales que contienen citrato (10% de concentración final). 50 µL de las muestras de plasma fueron precipitados con 100 µL de acetonitrilo frío. Las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm. 75 µL del sobrenadante son diluidos con 75 µL de ácido fórmico al 0.2%. Se analizan volúmenes de 10 µL de la solución resultante por LC-MS/MS y las concentraciones de inhibidor de trombina son determinadas usando curvas estándar. El área bajo el perfil de la concentración en plasma – tiempo se estima usando la regla del trapecoide logarítmico/lineal y se extrapola a tiempo infinito. La depuración del plasma (CL) del compuesto se determina como

$$CL = \frac{Dosis}{AUC}$$

Los valores se reportan en mL/min/kg.

26
103

Prueba G

Determinación de la estabilidad *in vitro*

Los microsomas del hígado se preparan de muestras de hígados de ratas Sprague-Dawley y de humanos de acuerdo a los SOP internos. Los compuestos son incubados a 37°C a una concentración total de proteína de microsoma de 3 mg/mL en 0.05 mol/L de amortiguador TRIS a un pH de 7.4, en presencia de los cofactores NADH (2.5 mmol/L) y NADPH (0.8 mmol/L). La concentración inicial del compuesto es de 5 o 10 µmol/L. Las muestras se toman para análisis hasta 60 minutos después del inicio de la incubación. La actividad enzimática en la muestra recolectada es detenida inmediatamente por adición de ácido mirístico al 20% a un volumen correspondiente al 3.3% del volumen total de la muestra. La concentración del compuesto restante (CONCENTRACION FINAL) en la muestra del minuto 60 se determina por medio de LCMS usando una muestra recolectada en tiempo cero como referencia (CONCENTRACION INICIAL). El % de inhibidor de trombina degradado se calcula como:

$$100\% \times \frac{[CONCENTRACION INICIAL] - [CONCENTRACION FINAL]}{[CONCENTRACION INICIAL]}$$

Prueba H

Modelo de trombosis arterial

El daño en los vasos es inducido aplicando cloruro férrico (FeCl₃) de forma tópica a la arteria carótida. Las ratas son anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (80 mg/kg; Apoteksbolaget; Umeå, Suecia), seguida de una infusión continua (12 mg/kg/h) a lo largo del experimento. La temperatura corporal de la rata se mantiene a 38 °C a lo largo del experimento por calentamiento externo. El experimento comienza con un periodo de control de 5 minutos. Cinco minutos después, se administra ¹²⁵I-fibrinógeno humano de forma intravenosa (80 kBq; IM53; Amersham International, Buckinghamshire, Reino

27/10/14

Unido) y se emplea como marcador para la subsiguiente incorporación de fibrin(ogeno) en el trombo. El extremo más cercano del segmento de arteria carótida es colocado en un tubo de plástico (6 mm; Silastic[®]; Dow Corning, MI, Estados Unidos de América) abierto longitudinalmente, que contiene papel de filtro (3 mm de diámetro; 1F; Munktell, Grycksbo, Suecia) empapado en FeCl₃ (2 µL; 55% w/w; Merck, Darmstadt, Alemania). La arteria carótida izquierda es expuesta a FeCl₃ por 10 minutos y luego es removida del tubo plástico y empapada en una solución salina. Cincuenta minutos después, la arteria carótida es removida y enjuagada en solución salina. También se toman muestras de sangre de referencia para determinar la actividad del ¹²⁵I, 10 minutos después de la inyección del ¹²⁵I-fibrinógeno, y al final del experimento. La actividad del ¹²⁵I en las muestras de sangre de referencia y en el segmento de vaso son medidos en un contador gamma (1282 Compugamma; LKB Wallac Oy, Turku, Finlandia) en el mismo día que el experimento es llevado a cabo. El tamaño del trombo se determina como la cantidad de actividad de ¹²⁵I incorporada en el segmento de vaso en relación con la actividad de ¹²⁵I en la sangre (cpm/mg).

Detalles experimentales generales

EL TLC se llevó a cabo en gel de sílice. El análisis quiral en HPLC se llevó a cabo usando una columna Chiracel OD de 46 mm x 250 mm con una columna de protección de 5 cm. La temperatura de la columna se mantuvo a 35°C. Se empleó una tasa de flujo de 1.0 mL/min. Se empleó un detector UV Gilson 115 a 228 nm. La fase móvil consistió en hexanos, etanol y ácido trifluoroacético y las proporciones apropiadas están enumeradas para cada compuesto. Típicamente, el producto fue disuelto en una cantidad mínima de etanol y esto fue diluido con la fase móvil.

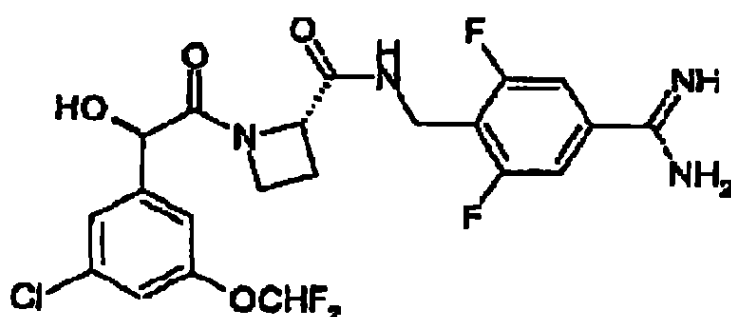
105

El LC-MS/MS se llevó a cabo usando un instrumento HP-1100 equipado con un inyector CTC-PAL y una columna de 5 μ m, 4 x 100 mm ThermoQuest, Hypersil BDS-C18. Se empleó un detector MS API-3000 (Sciex). La tasa de flujo fue de 1.2 mL/min y la fase móvil (gradiente) consistió de 10 – 90% de acetonitrilo con 90 – 10% de acetato de amonio acuoso 4mM, ambos con 0.2% de ácido fórmico.

Se registró el espectro ^1H NMR usando tetrametilsilano como estándar interno. Se registró el espectro ^{13}C NMR usando solventes deuterados enumerados como el estándar interno.

Ejemplo 1

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)



(i) 3-cloro-5-metoxibenzaldehido

Se adicionó 3,5-dicloroanisol (74.0 g, 419 mmol) en THF (200 mL) gota a gota a metal de magnesio (14.2 g, 585 mmol, lavado previamente con HCl 0.5 N) en THF (100 mL) a 25°C. Tras la adición, se adicionó 1,2-dibromoetano (3.9 g, 20.8 mmol) gota a gota. La mezcla café oscuro resultante se calentó a temperatura de reflujo por 3 h. La mezcla se enfrió a 0°C y se adicionó *N,N*-dimetilformamida (60 mL) en una porción. La mezcla fue partida con dietiléter (3 x 400 mL) y HCl 6N (500 mL). Los extractos orgánicos combinados fueron lavados con salmuera (300 mL), secados (Na₂SO₄), filtrados y concentrados *en vacuo* para dar un aceite. La cromatografía flash (2x) en gel de sílice eluyendo con Hex:EtOAc (4:1) proporcionó el compuesto del subtítulo (38.9 g, 54%) como un aceite amarillo.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.90 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 3.87 (s, 3H)

(ii) 3-cloro-5-hidroxibenzaldehido

Se enfrió una solución de 3-cloro-5-metoxibenzaldehido (22.8 g, 134 mmol; ver paso (i) arriba) en CH₂Cl₂ (250 mL) a 0°C. Se adicionó tribromuro de boro (15.8 mL, 167 mmol) gota a gota por 15 minutos. Después de agitar la mezcla de reacción por 2 h, se adicionó H₂O (50 mL) lentamente. La solución fue luego extraída con Et₂O (2 x 100 mL). Las capas orgánicas fueron combinadas, secadas (Na₂SO₄), filtradas y concentradas *in vacuo*. La cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con Hex:EtOAc (4:1) proporcionó el compuesto del subtítulo (5.2 g, 25%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.85 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 3.68 (s, 1H)

(iii) 3-cloro-5-difluorometoxibenzaldehido

Se calentó a temperatura de reflujo una solución de 3-cloro-5-hidroxibenzaldehido (7.5 g, 48 mmol; ver paso (ii) arriba) en 2-propanol (250 mL) y KOH al 30% (100 mL). Mientras se agita, se soplan burbujas de CHClF₂ en la mezcla de la reacción por 2 h. La mezcla de la reacción fue enfriada, acidificada con HCl 1N y extraída con EtOAc (2 x 100 mL). Los orgánicos fueron lavados con salmuera (100 mL), secados (Na₂SO₄), filtrados y concentrados *in vacuo*. La cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con Hex:EtOAc (4:1) proporcionó el compuesto del subtítulo (4.6 g, 46%).

40
52
A8

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.95 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.60 (t, $J_{\text{HF}} = 71.1$ Hz, 1H)

(iv) $\text{Ph(3-Cl)(5-OCHF}_2\text{)-(R,S)(OTMS)CN}$

Se enfrió una solución de 3-cloro-5-difluorometoxibenzaldehído (4.6 g, 22.3 mmol; ver paso (iii) arriba) en CH_2Cl_2 (200 mL) a 0°C . Se adicionó ZnI_2 (1.8 g, 5.6 mmol) y cianuro de trimetilsilio (2.8 g, 27.9 mmol) y se dejó que la mezcla de la reacción se calentara a temperatura ambiente y se agitó por 15 h. La mezcla fue parcialmente concentrada *in vacuo* proporcionando el compuesto del subtítulo como un líquido, el cual fue empleado directamente en el paso (v) a continuación sin una purificación o caracterización adicional.

(v) $\text{Ph(3-Cl)(5-OCHF}_2\text{)-(R,S)CH(OH)C(NH)OEt}$

Se adicionó $\text{Ph(3-Cl)(5-OCHF}_2\text{)-(R,S)(OTMS)CN}$ (6.82 g, se asumen 22.3 mmol; ver paso (iv) arriba) gota a gota a HCl/EtOH (500 mL). La mezcla de la reacción fue agitada por 15 h, luego parcialmente concentrada *in vacuo* proporcionando el compuesto del subtítulo, el cual fue empleado en el paso (vi) sin purificación o caracterización adicional.

(vi) $\text{Ph(3-Cl)(5-OCHF}_2\text{)-(R,S)CH(OH)C(O)OEt}$

Se disolvió $\text{Ph(3-Cl)(5-OCHF}_2\text{)-(R,S)CH(OH)C(NH)OEt}$ (6.24 g, se asumen 22.3 mmol; ver paso (v) arriba) en THF (250 mL), se adicionó H_2SO_4 0.5 M (400 mL) y la reacción fue agitada a 40°C por 65 h, enfriada y luego parcialmente concentrada *in vacuo* para remover la mayor parte del THF. La mezcla de la reacción fue extraída con Et_2O (3 x 100 mL), secada (Na_2SO_4), filtrada y concentrada *in vacuo* para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido, el cual fue usado en el paso (vii) sin purificación o caracterización adicional.

41

103/103

(vii) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OH

Una solución de Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OEt (2.25 g, se asumen 22.3 mmol; ver paso (vi) arriba) en 2-propanol (175 mL) y KOH al 20% (350 mL) fue agitada a temperatura ambiente por 15 h. La reacción fue entonces concentrada parcialmente *in vacuo* para remover la mayor parte del 2-propanol. La mezcla remanente fue acidificada con H₂SO₄ 1M, extraída con Et₂O (3 x 100 mL), secada (Na₂SO₄) y concentrada *in vacuo* para dar un sólido. La cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con CHCl₃:MeOH:NH₄OH concentrado (6:3:1) proporcionó la sal de amonio del compuesto del subtítulo. La sal de amonio fue luego disuelta en una mezcla de EtOAc (75 mL) y H₂O (75 mL) y acidificada con HCl 2N. La capa orgánica fue separada y lavada con salmuera (50 mL), secada (Na₂SO₄) y concentrada *in vacuo* para proporcionar el compuesto del subtítulo (3.2 g, 57 % desde los pasos (iv) a (vii)).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.38 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.89 (t, J_{H-F} = 71.1 Hz, 1H), 5.16 (s, 1H)

(viii) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)OH (a) y Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(S)CH(OAc)C(O)OH (b)

Se calentó una mezcla de Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R,S)CH(OH)C(O)OH (3.2 g, 12.7 mmol; ver paso (vii) arriba) y Lipasa PS "Amano" (~2.0 g) en acetato de vinilo (125 mL) y MTBE (125 mL) a temperatura de reflujo por 48 h. La mezcla de la reacción fue enfriada, filtrada por Celite ® y la torta del filtro lavada con EtOAc. El filtrado fue concentrado *in vacuo* y sometido a cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con CHCl₃:MeOH:NH₄OH concentrado (6:3:1) proporcionando las sales de amonio de los compuestos (a) y (b) del subtítulo. La sal del compuesto (a) fue disuelta en H₂O, acidificada con HCl 2N y extraída con EtOAc. La capa orgánica

170132

fue lavada con salmuera, secada (Na_2SO_4), filtrada y concentrada *in vacuo* para proporcionar el compuesto (a) del subtítulo (1.2 g, 37%)

Para el compuesto (a) de subtítulo

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.38 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.89 (t, $J_{\text{H-F}} = 71.1$ Hz, 1H), 5.17 (s, 1H)

(ix) 2,6-difluoro-4[(metilsulfinil)(metiltio)metil]benzonitrilo

Se disolvió (metilsulfinil)(metiltio)metano (7.26 g, 0.0584 mol) en 100 mL de THF seco bajo argón y se enfrió a -78°C . Se adicionó Bitulio en hexano (16 mL, 0.0256 mol) gota a gota. La mezcla fue agitada por 15 minutos. Mientras tanto, se enfrió una solución de 3,4,5-trifluorobenzonitrilo (4.0 g, 0.025 mmol) en 100 mL de THF seco a -78°C bajo argón y se adiciono la solución anterior por medio de una cánula a ésta solución por un periodo de 35 min. Después de 30 minutos se removió el baño de refrigeración y cuando la reacción alcanzó la temperatura ambiente se vertió en 400 mL de agua. Se evaporó el THF y la capa acuosa restante fue extraída tres veces con dietiléter. La fase de éter combinada fue lavada con agua, secada (Na_2SO_4) y evaporada. Rendimiento: 2.0 g (30%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.4 – 7.25 (m, 2H), 5.01 (s, 1H, diasterómero), 4.91 (s, 1H, diasterómero), 2.88 (s, 3H, diasterómero), 2.52 (s, 3H, diasterómero), 2.49 (s, 3H, diasterómero), 1.72 (ancha, 1H)

(x) 2,6-difluoro-4-formilbenzonitrilo

Se disolvió 2,6-difluoro-4[(metilsulfinil)(metiltio)metil]benzonitrilo (2.17 g, 8.32 mmol; ver paso (ix) arriba) en 90 mL de THF y se adicionaron 3.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla fue dejada a temperatura ambiente por 3 días y subsiguientemente fue vertida en 450 mL de agua. A esto siguió una extracción 3

O:
H:
H:

veces con EtOAc y la fase etérea combinada fue lavada dos veces con bicarbonato de sodio acuoso y salmuera, secada (Na_2SO_4) y evaporada. Rendimiento: 1.36 g (98%). La posición del grupo formilo se estableció por ^{13}C NMR. La señal de los carbonos fluorinados a 162.7 ppm exhibió el patrón esperado de unión con dos constantes de unión en el orden de 260 Hz y 6.3 Hz que corresponden respectivamente a un enlace *ipso* y un enlace *meta* de los átomos de fluor.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.35 (s, 1H), 7.33 (m, 2H)

(xi) 2,6-difluoro-4-hidroximetilbenzonitrilo

Se disuelve 2,6-difluoro-4-hidroximetilbenzonitrilo (1.36 g, 8.13 mmol; ver paso (x) arriba) en 25 mL de metanol y se enfría en un baño de hielo. Se adicionó borohidruro de sodio (0.307 g, 8.12 mmol) en porciones con agitación y la reacción se dejó por 65 min. El solvente fue evaporado y el residuo fue dividido en partes entre dietiléter y bicarbonato de sodio acuoso. La capa etérea fue lavada con más bicarbonato de sodio acuoso y salmuera, secada (Na_2SO_4) y evaporada. El producto crudo cristalizó rápidamente y pudo ser usado sin purificación adicional. Rendimiento: 1.24 g (90%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.24 (m, 2H), 4.81 (s, 2H), 2.10 (ancha, 1H)

(xii) metansulfonato de 4-ciano-2,6-difluorobencilo

A una solución enfriada con hielo de 2,6-difluoro-4-hidroximetilbenzonitrilo (1.24 g, 7.32 mmol; ver paso (xi) arriba) y cloruro de metansulfonilo (0.93 g, 8.1 mmol) en 60 mL de cloruro de metileno se le adicionó trietilamina (0.81 g, 8.1 mmol) con agitación. Después de 3 h a 0°C , la mezcla fue lavada dos veces con HCl 1M y

una vez con agua, secada (Na_2SO_4) y evaporada. El producto puede ser usado sin purificación posterior. Rendimiento: 1.61 g (89%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.29 (m, 2H), 5.33 (s, 2H), 3.07 (s, 3H)

(xiii) 4-azidametil-2,6-difluorobenzonitrilo

Se agitó una mezcla de metansulfonato de 4-ciano-2,6-difluorobencilo (1.61 g, 6.51 mmol; ver paso (xii) arriba) y ázida de sodio (0.72 g, 0.0111 mol) en 10 mL de agua y 20 mL de DMF a temperatura ambiente durante la noche. El resultante fue subsiguientemente vertido en 200 mL de agua y extraído 3 veces con dietiléter. La fase etérea combinada fue lavada cinco veces con agua, secada (Na_2SO_4) y evaporada. Se evaporó una pequeña muestra para propósitos de NMR y el producto fue cristalizado. El resto fue evaporado cuidadosamente pero no hasta que estuviera completamente seco. Se asumió que el rendimiento (teórico 1.26 g) fue casi cuantitativo basado en la NMR y la HPLC analítica.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.29 (m, 2H), 4.46 (s, 2H)

(xiv) 4-aminometil-2,6-difluorobenzonitrilo

Esta reacción se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en *J. Chem. Res. (M)* (1992) 3128. A una suspensión de 520 mg de Pd/C al 10% (50% de humedad) en 20 mL de agua se adicionó una solución de borohidruro de sodio (0.834 g, 0.0221 mol) en 20 mL de agua. Lo que resultó en alguna evolución de gas. Se disolvió 4-azidametil-2,6-difluorobenzonitrilo (1.26 g, 6.49 mmol; ver paso (xiii) arriba) en 50 mL de THF y se adicionó a la mezcla acuosa en un baño de hielo por 15 minutos. La mezcla fue agitada por 4 h, donde después de 20 minutos se adicionaron 20 mL de HCl 2M y la mezcla se filtró por Celite. El Celite fue enjuagado con más agua y la fase acuosa combinada fue lavada con EtOAc y

subsiguientemente hecha alcalina con NaOH 2M. Después se hizo una extracción tres veces con cloruro de metileno y la fase orgánica combinada fue lavada con agua, secada (Na_2SO_4) y evaporada. Rendimiento: 0.87 g (80%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.20 (m, 2H), 3.96 (s, 2H), 1.51 (ancha, 2H)

(xv) 2,6-difluoro-4-*tert*-butoxicarbonilaminometilbenzonitrilo

Se disolvió una solución de 4-aminometil-2,6-difluorobenzonitrilo (0.876 g, 5.21 mmol; ver paso (xiv) arriba) en 50 mL de THF y se adicionó bicarbonato de di-*tert*-butilo (1.14g, 5.22 mmol) en 10 mL de THF. La mezcla fue agitada por 3.5 h. El THF fue evaporado y el residuo fue repartido entre agua y EtOAc. La fase orgánica fue lavada tres veces con HCl 0.5M y agua, secada (Na_2SO_4) y evaporada. El producto pudo ser usado sin purificación adicional. Rendimiento: 1.38 g (99%)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.21 (m, 2H), 4.95 (ancha, 1H), 4.43 (ancha, 2H), 1.52 (s, 9H)

(xvi) Boc-Pab(2,6-diF)(OH)

Una mezcla de 2,6-difluoro-4-*tert*-butoxicarbonilaminometilbenzonitrilo (1.38 g, 5.16 mmol; ver paso (xv) arriba), hidrocloruro de hidroxilamina (1.08 g, 0.0155 mol) y trietilamina (1.57 g, 0.0155 mol) en 20 mL de etanol fue agitada a temperatura ambiente por 36 h. El solvente fue evaporado y el residuo fue repartido entre agua y cloruro de metileno. La capa orgánica fue lavada con agua, secada (Na_2SO_4) y evaporada. El producto puede ser usado sin purificación adicional. Rendimiento: 1.43 g (92%).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.14 (m, 2H), 4.97 (ancha, 1H), 4.84 (ancha, 2H), 4.40 (ancha, 2H), 1.43 (s, 9H)

(xvii) Boc-Pab(2,6-diF) x HOAc

Esta reacción fue llevada a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Judkins y colaboradores, en *Synth. Comm.* (1998) 4351. Se hidrogenan Boc-Pab(2,6-diF)(OH) (1.32 g, 4.37 mmol; ver paso (xvi) arriba), anhídrido acético (0.477 g, 4.68 mmol) y 442 mg de Pd/C al 10% (50% de humedad) en 100 mL de ácido acético a 5 atm de presión por 3.5 h. La mezcla fue filtrada por Celite, enjuagada con etanol y evaporada. El residuo fue secado por congelación a partir de acetonitrilo y agua y unas cuantas gotas de etanol. El producto del subtítulo pudo ser usado sin purificación adicional. Rendimiento: 1.49 g (99%).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.45 (m, 2H), 4.34 (s, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.40 (s, 9H)

(xviii) Boc-Pab(2,6-diF)(Teoc)

A una solución de Boc-Pab(2,6-diF) x HOAc (1.56 g, 5.48 mmol; ver paso (xvii) arriba) en 100 mL de THF y 1 mL de agua se le adicionó carbonato de 2-(trimetilsilil)etil p-nitrofenilo (1.67 g, 5.89 mmol). Se agregó una solución de carbonato de potasio (1.57 g, 0.0114 mol) en 20 mL de agua gota a gota durante 5 minutos. La mezcla fue agitada durante la noche. Se evaporó el THF y el residuo fue repartido entre agua y cloruro de metileno. La capa acuosa fue extraída con cloruro de metileno y la fase orgánica combinada fue lavada dos veces con bicarbonato de sodio acuoso, secada (Na₂SO₄) y evaporada. La cromatografía flash en gel de sílice con heptano/EtOAc = 2/1 dio 1.71 g (73%) de compuesto puro.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (m, 2H), 4.97 (ancha, 1H), 4.41 (ancha, 2H), 2.24 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.11 (m, 2H), 0.06 (s, 9H)

(xix) Boc-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc)

Se disolvió Boc-Pab(2,6-diF)(Teoc) (1.009 g, 2.53 mmol; ver paso (xviii) arriba) en 50 mL de EtOAc saturado con HCl (g). La mezcla fue dejada por 10 minutos, evaporada y disuelta en 18 mL de DMF, y luego fue enfriada en un baño de hielo. Se adicionaron Boc-(S)Aze-OH (0.450 g, 2.24 mmol), PyBOP (1.24 g, 2.35 mmol) y finalmente diisopropiletilamina (1.158 g, 8.96 mmol). La mezcla de la reacción fue agitada por 2 h y luego vertida en 350 mL de agua y extraída tres veces con EtOAc. La fase orgánica combinada fue lavada con salmuera, secada (Na₂SO₄) y evaporada. La cromatografía flash en gel de sílice con heptano:EtOAc (1:3) dio 1.097 g (96%) del compuesto deseado.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.46 (m, 2H), 4.65 – 4.5 (m, 3H), 4.23 (m, 2H), 3.87 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 2.45 – 2.3 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.10 (m, 2H), 0.05 (s, 9H)

(xx) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc)

Se disolvió Boc-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc) (0.2556 g, 0.500 mmol; ver paso (xix) arriba) en 20 mL de EtOAc saturado con HCl (g). La mezcla fue dejada por 10 minutos y evaporada y disuelta en 5 mL de DMF. Se agregaron Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)OH (0.120 g, 0.475 mmol; ver paso (viii) arriba), PyBOP (0.263 g, 0.489 mmol) y finalmente diisopropiletilamina (0.245 g, 1.89 mmol). La mezcla de la reacción fue agitada por 2 h y luego vertida en 350 mL de agua y extraída 3 veces con EtOAc. La fase orgánica combinada fue lavada con salmuera, secada (Na₂SO₄) y evaporada. La cromatografía flash en gel de sílice con EtOAc dio 0.184 g (60%) del compuesto del subtítulo deseado.

48
115

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , mezcla de rotámeros) δ 7.55 – 7.45 (m, 2H), 7.32 (m, 1H, rotámero mayor), 7.27 (m, 1H, rotámero menor), 7.2 – 7.1 (m, 2H), 6.90 (t, 1H, rotámero mayor), 6.86 (t, 1H, rotámero menor), 5.15 (s, 1H, rotámero mayor), 5.12 (m, 1H, rotámero menor), 5.06 (s, 1H, rotámero menor), 4.72 (m, 1H, rotámero menor), 4.6 – 4.45 (m, 2H), 4.30 (m, 1H, rotámero mayor), 4.24 (m, 2H), 4.13 (m, 1H, rotámero menor), 4.04 (m, 1H, rotámero menor), 3.95 (m, 1H, rotámero menor), 2.62 (m, 1H, rotámero menor), 2.48 (m, 1H, rotámero menor), 2.22 (m, 1H, rotámero menor), 2.10 (m, 1H, rotámero menor), 1.07 (m, 2H), 0.07 (m, 9H)

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

Se disolvió $\text{Ph}(3\text{-Cl})(5\text{-OCHF}_2)\text{-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc)}$ (81 mg, 0.127 mmol; ver paso (xx) arriba) en 0.5 mL de cloruro de metileno y se enfrió en un baño de hielo. Se agregó TFA (3 mL) y se dejó la reacción por 75 min. El TFA se evaporó y el residuo se seco por congelación a partir agua y acetonitrilo. El producto crudo fue purificado por RPLC preparativa con $\text{CH}_3\text{CN}:\text{NH}_4\text{OAc}$ 0.1M (35:65) para producir 39 mg (55%) del compuesto del título como su sal de HOAc, pureza: 99%.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD , mezcla de rotámeros) δ 7.5 – 7.4 (m, 2H), 7.32 (m, 1H, rotámero mayor), 7.28 (m, 1H, rotámero menor), 7.28 (m, 1H, rotámero menor), 7.2 – 7.1 (m, 3H), 6.90 (t, 1H, rotámero mayor), 6.86 (t, rotámero menor), 5.15 (s, 1H, rotámero menor), 5.14 (m, 1H, rotámero menor), 5.07 (s, 1H, rotámero menor), 4.72 (m, 1H, rotámero mayor), 4.16 (m, 1H, rotámero mayor), 4.03 (m, 1H, rotámero menor), 3.95 (m, 1H, rotámero menor), 2.63 (m, 1H, rotámero menor), 2.48 (m, 1H, rotámero mayor), 2.21 (m, 1H, rotámero mayor), 2.07 (m, 1H, rotámero menor), 1.89 (s, 3H)

^{13}C -NMR (75 MHz; CD_3OD): (carbonos de carbonilo y/o amidina, mezcla de rotámeros) δ 171.9, 171.2, 165.0, 162.8, 160.4

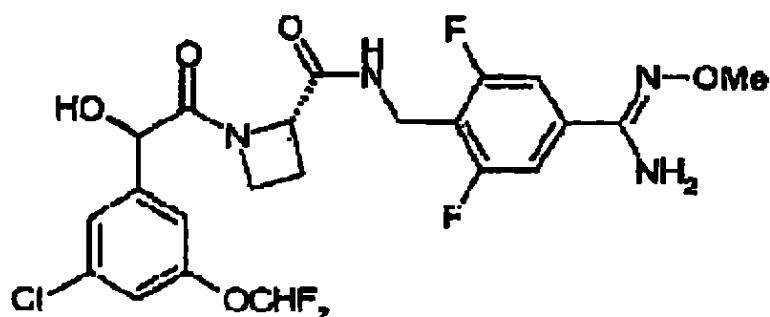
APCI-MS: (M+1) = 503/505 m/z.

49

116
116

Ejemplo 2

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe)



(i) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe Teoc)

Se calentó una mezcla de Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(Teoc) (64 mg, 0.099 mmol; ver Ejemplo 1(xx) arriba) e hidroccloruro de O-metilhidroxilamina (50 mg, 0,60 mmol) en 4 mL de acetonitrilo a 70 °C por 3 h. El solvente se evaporó y el residuo fue repartido entre agua y EtOAc. La capa acuosa fue extraída dos veces con EtOAc y la fase orgánica combinada fue lavada con agua, secada (Na₂SO₄) y evaporada. El producto pudo ser utilizado sin purificación adicional. Rendimiento: 58 mg (87%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (bt, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.25 – 6.95 (m, 5H), 6.51 (t, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.83 (m, 1H), 4.6 – 4.5 (m, 2H), 4.4 – 3.9 (m, 4H), 3.95 (s, 3H), 3.63 (m, 1H), 2.67 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 1.87 (ancha, 1H), 0.98 (m, 2H), 0.01 (s, 9H)

(ii) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe)

Se disolvió Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe, Teoc) (58 mg, 0.086 mmol; ver paso (i) arriba) en 3 mL de TFA, se enfrió en un baño de hielo y se dejó reaccionar por 2 h. Se evaporó el TFA y el residuo se disolvió en EtOAc. La capa orgánica se lavó dos veces con carbonato de sodio acuoso y

agua, se secó (Na_2SO_4) y se evaporó. El residuo se seco por congelación a partir de agua y acetonitrilo para dar 42 mg (92%) del compuesto del título. Pureza: 94%.

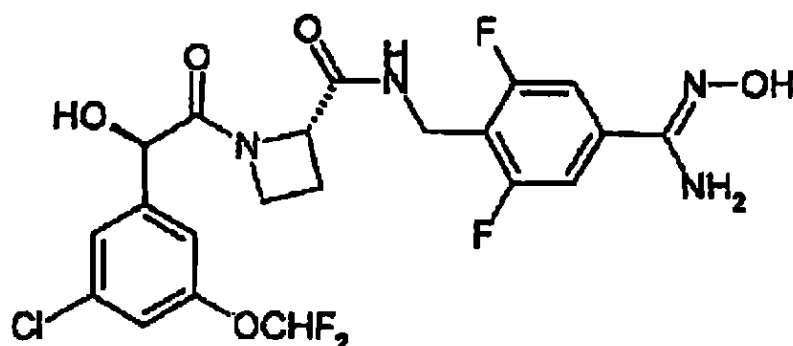
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.95 (bt, 1H), 7.2 – 7.1 (m, 4H), 6.99 (m, 1H), 6.52 (t, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.85 – 4.75 (m, 3H), 4.6 – 4.45 (m, 2H), 4.29 (ancha, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.69 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 1.85 (ancha, 1H)

^{13}C -NMR (100 MHz; CDCl_3): (carbonos de carbonilo y/o amidina) δ 172.1, 169.8, 151.9

APCI-MS: ($\text{M}+1$) = 533/535 m/z

Ejemplo 3

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



(i) $\text{Boc}\text{-(S)Aze-NHCH}_2\text{-Ph}(2,6\text{-diF}, 4\text{-CN})$

Se disuelve Boc-(S)Aze-OH (1.14 g, 5.6 mmol) en 45 mL de DMF. Se adicionaron 4-aminometil-2,6-difluorobenzonitrilo (1.00 g, 5.95 mmol, ver Ejemplo 1 (xiv) arriba), PyBOP (3.10 g, 5.95 mmol) y DIPEA (3.95 mL, 22.7 mmol) y se agitó la solución a temperatura ambiente por 2 h. El solvente fue evaporado y el residuo repartido entre H_2O y EtOAc (75 mL de cada uno). La fase acuosa fue extraída con 2 x 50 mL de EtOAc y la fase orgánica combinada fue lavada con salmuera y secada sobre Na_2SO_4 . La cromatografía flash (SiO_2 , EtOAc/heptano (3/1)) produjo el compuesto del subtítulo (1.52 g, 77%) como un aceite el cual fue cristalizado en el refrigerador.

119/18

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7.19 (m, 2H), 4.65 – 4.5 (m, 3H), 3.86 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 2.45 – 2.3 (m, 2H), 1.39 (s, 9H)

(ii) H-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN) x HCl

Se disolvió Boc-(S)Aze-NHCH₂.Ph(2,6-diF, 4-CN) (0.707 g, 2.01 mmol, ver paso (i) arriba) en 60 mL de EtOAc saturado con HCl (g). Después de la agitación a temperatura ambiente durante 15 minutos, se evaporó el solvente. El residuo fue disuelto en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1) y fue secado por congelación para dar el compuesto del subtítulo (0.567 g, 98%) como un polvo blancuzco amorfo.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CD_3OD): δ 7.49 (m, 2H), 4.99 (m, 1H), 4.58 (m, 2H), 4.12 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 2.80 (m, 1H), 2.47 (m, 1H)

MS (m/z) 252.0 (M + 1)⁺

(iii) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN)

Se disolvió Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)OH (0.40 g, 1.42 mmol, ver Ejemplo 1 (viii) arriba) en 10 mL de DMF y se adicionaron H-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN) x HCl (0.43 g, 1.50 mmol, ver paso (ii) arriba) y PyBOP (0.799 g, 1.50 mmol), seguidos de DIPEA (1.0 mL, 5.7 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente por 2 h, se evaporó el solvente. El residuo fue repartido entre H_2O (200 mL) y EtOAc (75 mL). La fase acuosa fue extraída con 2 x 75 mL de EtOAc y la fase orgánica combinada fue lavada con salmuera y secada sobre Na_2SO_4 . La cromatografía flash (SiO_2 , EtOAc/heptano (4/1)) proporcionó el compuesto del subtítulo (0.56 g, 81%) como un aceite.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CD_3OD) rotámeros: δ 7.43 (m, 2H), 7.31 (m, 1H, rotámero mayor), 7.26 (m, 1H, rotámero menor), 7.2 – 7.1 (m, 2H), 6.90 (t, 1H, rotámero

mayor), 6.86 (y, 1H, rotámero menor), 5.14 (s, 1H, rotámero mayor), 5.11 (m, 1H, rotámero menor), 5.04 (s, 1H, rotámero menor), 4.71 (m, 1H, rotámero mayor), 4.6 – 4.45 (m, 2H), 4.30 (m, 1H, rotámero mayor), 4.2 – 3.9 (m, 1H; y 1H, rotámero menor), 2.62 (m, 1H, rotámero menor), 2.48 (m, 1H, rotámero mayor), 2.21 (m, 1H, rotámero mayor), 2.09 (m, 1H, rotámero menor)

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): (carbonos de carbonilo) δ 171.9, 171.8

MS (m/z) 484.0, 485.9 (M-1)⁺

(iv) Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH)

Se disuelve Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-NHCH₂-Ph(2,6-diF, 4-CN) (0.555 g, 1.14 mmol, del paso (iii) arriba) en 10 mL de EtOH (95%). A esta solución se le adicionó hidrocloruro de hidroxilamina (0.238 g, 3.42 mmol) y Et₃N (0.48 mL, 3.44 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente por 14 h, se removi6 el solvente y el residuo fue disuelto en EtOAc. La fase orgánica fue lavada con salmuera y H₂O y se secó sobre Na₂SO₄. El producto crudo fue purificado por RPLC preparativa con CH₃CN:NH₄OAc 0.1M como eluente, proporcionando el compuesto del título como un polvo amorfo (0.429 g, 72%) después de secar por congelación.

^1H -NMR (400 MHz; CD_3OD) rotámeros: δ 7.35 – 7.1 (m, 5H), 6.90 (t, 1H), rotámero mayor), 6.85 (t, 1H, rotámero menor), 5.15 (s, 1H, rotámero mayor), 5.12 (m, 1H, rotámero menor), 5.08 (s, 1H, rotámero menor), 4.72 (m, 1H, rotámero mayor), 4.6 – 4.4 (m, 2H), 4.30 (m, 1H, rotámero mayor), 4.12 (m, 1H, rotámero mayor), 4.04 (m, 1H, rotámero menor), 3.94 (m, 1H, rotámero menor), 2.62 (m, 1H, rotámero menor), 2.48 (m, 1H, rotámero menor), 2.22 (m, 1H, rotámero mayor), 2.10 (m, 1H, rotámero menor)

^{13}C -NMR (100 MHz; CD_3OD): (carbonos de carbonilo y amidina, rotámeros) δ 172.4, 171.9, 171.0, 152.3, 151.1

53-
127/20

MS (m/z) 517.1, 519.0 (M-1)⁻, 519.1, 521.0 (M+1)⁺

Ejemplo 4

El compuesto del título del Ejemplo 1 fue probado en la Prueba A arriba y se encontró que exhibe un valor de IC₅₀TT menor a 0.02 µM.

Ejemplo 5

El compuesto del título del Ejemplo 1 fue probado en la Prueba D arriba y se encontró que exhibe un valor de IC₅₀ APTT menor a 1 µM.

Ejemplo 6

El compuesto del título del Ejemplo 2 fue probado en la Prueba E arriba y se encontró que exhibe una biodisponibilidad oral y/o parenteral en la rata en forma del inhibidor activo correspondiente (amidina libre).

Ejemplo 7

El compuesto del título del Ejemplo 2 fue probado en la Prueba G arriba y se encontró que se convierte al inhibidor activo correspondiente (amidina libre) en los microsomas del hígado de humanos y ratas.

Abreviaturas

Ac	=	acetilo
APCI	=	ionización química a presión atmosférica (relacionada con MS)
API	=	ionización a presión atmosférica (relacionada con MS)
aq.	=	acuoso
AUC	=	área bajo la curva

192-13

Aze	=	azetidin-2-carboxilato
AzeOH	=	ácido azetidin-2-carboxílico
Boc	=	<i>tert-but</i> oxycarbonilo
BSA	=	albúmina de suero bovino
CI	=	ionización química (relacionada con MS)
d	=	día(s)
DCC	=	diciclohexilcarbodiimida
DIBAL-H	=	hidruro de di-isobutilaluminio
DIPEA	=	diisopropiletilamina
DMAP	=	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
DMF	=	dimetilformamida
DMSO	=	dimetilsulfóxido
DVT	=	trombosis profunda de vena
EDC	=	hidrocloruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
Et	=	etilo
éter	=	dietyléter
EtOAc	=	acetato de etilo
EtOH	=	etanol
Et ₂ O	=	dietyléter
h	=	hora(s)
HATU	=	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
HBTU	=	[hexafluorofosfato de <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(benzotriazol-1-il) uronio]
HCl	=	ácido hidroclicóric, gas de cloruro de hidrógeno o sal de hidrocloruro (dependiendo el contexto)
Hex	=	hexanos

123122

HOAC	=	ácido acético o sal de ácido acético
HPLC	=	cromatografía líquida de alto desempeño
LC	=	cromatografía líquida
Me	=	metilo
MeOH	=	metanol
min	=	minuto(s)
MS	=	espectroscopia de masa
MTBE	=	<i>tert</i> -butiléter de metilo
NADH	=	dinucleótido de nicotinamida adenina, forma reducida
NADPH	=	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina, forma reducida
NIH	=	Instituto Nacional de Salud (Estados Unidos)
NIHU	=	unidades del Instituto Nacional de Salud
NMR	=	resonancia magnética nuclear
OAc	=	acetato
Pab	=	<i>para</i> -amidinobencilamino
H-Pab	=	<i>para</i> -amidinobencilamina
Ph	=	fenilo
PyBOP	=	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinfosfonio
QF	=	fluoruro de tetrabutilamonio
RPLC	=	cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa
rt/RT	=	temperatura ambiente
SOPs	=	procedimientos operativos estándar
TBTU	=	[tetrafluoroborato de <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)uronio]
TEA	=	triethylamina

Teoc	=	2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo
TEMPO	=	radical libre de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxilo
TFA	=	ácido trifluoroacético
THF	=	tetrahidrofurano
TLC	=	cromatografía de capa delgada
UV	=	ultravioleta

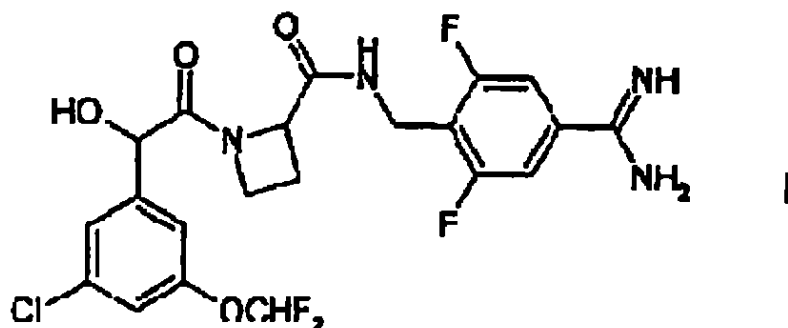
Los prefijos *n*, *s*, *i*, y *t* tienen sus significados usuales: normal, secundario, iso y terciario. El prefijo *c* significa ciclo.

56
125
128

125/12A

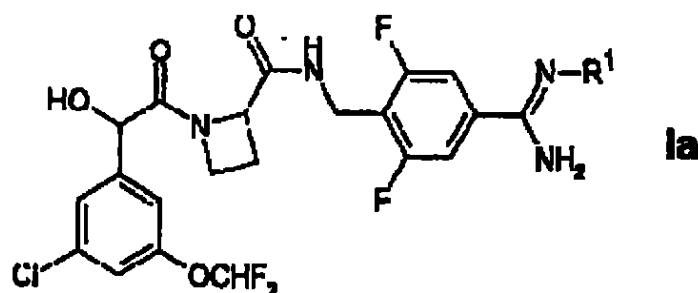
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I,



o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un derivado farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula I como se define en la reivindicación 1, donde tal compuesto derivado es un compuesto de fórmula Ia,



en dónde R^1 representa OR^2 o $C(O)OR^3$:

R^2 representa H, C_{1-10} alquilo, C_{1-3} alquilarilo o C_{1-3} alquiloarilo (las partes alquilo de estos últimos grupos son opcionalmente interrumpidas por uno o más átomos de oxígeno, y las partes arilo de estos dos últimos grupos son opcionalmente sustituidas por uno o más sustituyentes seleccionados de halo, fenilo, metilo o metoxi, donde estos últimos tres grupos también son opcionalmente sustituidos por uno o más sustitutos halo); y

R^3 representa C_{1-10} alquilo (donde éste último grupo es interrumpido opcionalmente por uno o más átomos de oxígeno), o C_{1-3} alquilarilo o C_{1-3}

58 125
9/2/1

alquiloarilo (las partes alquilo de estos dos últimos grupos pueden ser interrumpidas opcionalmente por uno o más átomos de oxígeno, y las partes arilo de estos dos últimos grupos son opcionalmente sustituidas por uno o más sustituyentes seleccionados de halo, fenilo, metilo o metoxi, donde los últimos tres grupos también son opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes halo), o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos.

3. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 2 en donde R^1 representa OR^2 .

4. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 3 en donde R^2 representa H o un C_{1-8} alquilo sin sustituir, lineal, ramificado o cíclico.

5. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 4 en donde R^2 representa H o C_{1-8} alquilo.

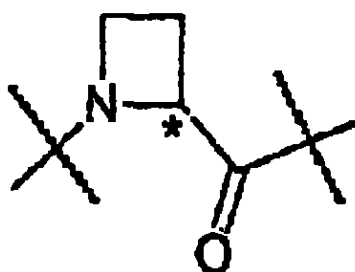
6. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 4 en donde R^2 representa C_{1-3} alquilo lineal, C_{3-8} alquilo ramificado o C_{4-7} alquilo cíclico.

7. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 5 o en la reivindicación 6 en donde R^2 representa metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo o ciclobutilo.

8. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 7 en donde R^2 representa metilo.

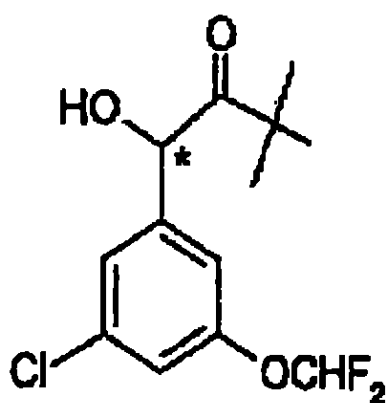
9. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el fragmento

59
/ 27/176



está en la configuración *S*.

10. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en dónde el fragmento



está en la configuración *R*.

11. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1 el cual es Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF).

12. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 2 el cual es:

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OMe); o

Ph(3-Cl)(5-OCHF₂)-(R)CH(OH)C(O)-(S)Aze-Pab(2,6-diF)(OH)

13. Una formulación farmacéutica que incluye un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

60
22/12/13

14. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como farmacéutico.

15. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de una condición donde se requiere la inhibición de la trombina.

16. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en el tratamiento de una condición donde se indica terapia anticoagulante.

17. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la trombosis.

18. Un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un anticoagulante.

19. El uso de un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, como un ingrediente activo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una condición donde se requiere la inhibición de la trombina.

20. El uso de un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo,

...
como un ingrediente activo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de una condición donde la terapia anticoagulante es indicada.

21. El uso como se reivindica en la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en donde la condición es la trombosis.

22. El uso como se reivindica en la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en donde la condición es hipercoagulabilidad en la sangre y/o los tejidos.

23. El uso de un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, como un ingrediente activo para la manufactura de un anticoagulante.

24. Un método para el tratamiento de una condición donde se requiere la inhibición de la trombina el cual comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, a una persona que sufre de, o es susceptible a, tal condición.

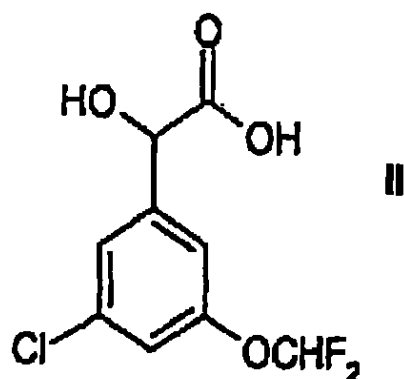
25. Un método de tratamiento de una condición donde la terapia anticoagulante es indicada el cual comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto como se define en una de las reivindicaciones 1 a 12, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, a una persona que sufre de, o es susceptible a, tal condición.

26. Un método como se reivindica en la reivindicación 24 o la reivindicación 25 en donde la condición es trombosis.

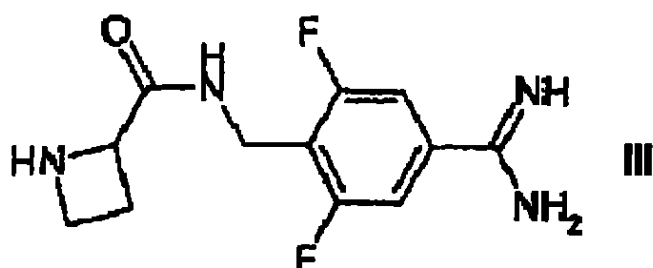
27. Un método como se reivindica en la reivindicación 24 o la reivindicación 25, en dónde la condición es hipercoagulabilidad en la sangre y/o los tejidos.

28. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula I como se define en la Reivindicación 1, el cual comprende:

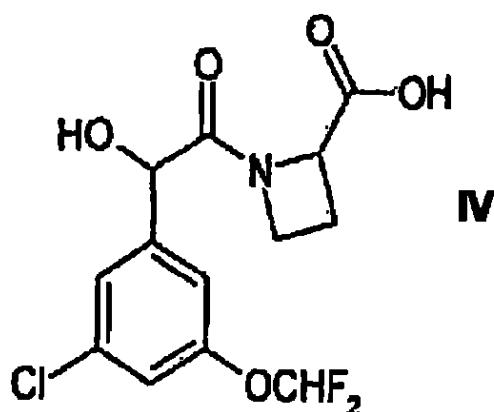
(i) la combinación de un compuesto de fórmula II,



con un compuesto de fórmula III,

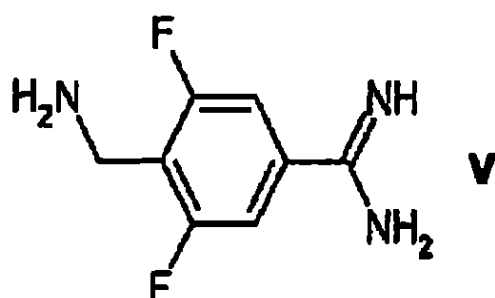


(ii) la combinación de un compuesto de fórmula IV,



con un compuesto de fórmula V,

63
13730

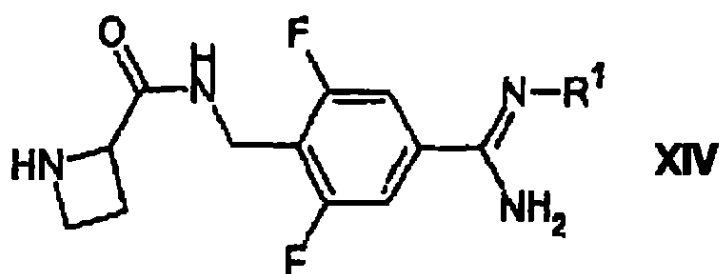


(iii) la reacción de compuesto correspondiente de fórmula XVI, como se define en la reivindicación 29, con una fuente apropiada de amoníaco; o

(iv) la desprotección de un derivado protegido de un compuesto como se reivindica en la reivindicación 1.

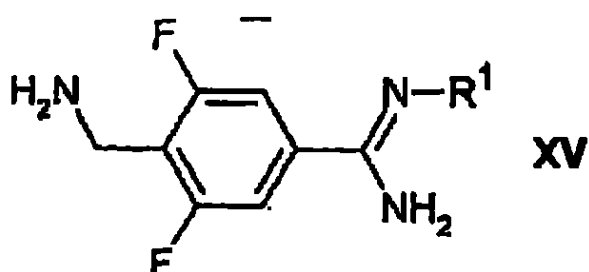
29. Un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula Ia como se define en la reivindicación 2, el cual comprende:

(a) la reacción de un compuesto correspondiente de fórmula II como se define en la reivindicación 28 con un compuesto de fórmula XIV,



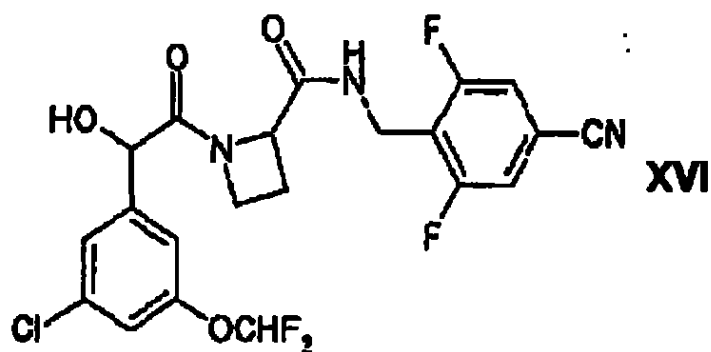
en donde R¹ es como se define en la reivindicación 2;

(b) la reacción de un compuesto correspondiente de fórmula IV como se define en la reivindicación 28 con un compuesto de fórmula XV,



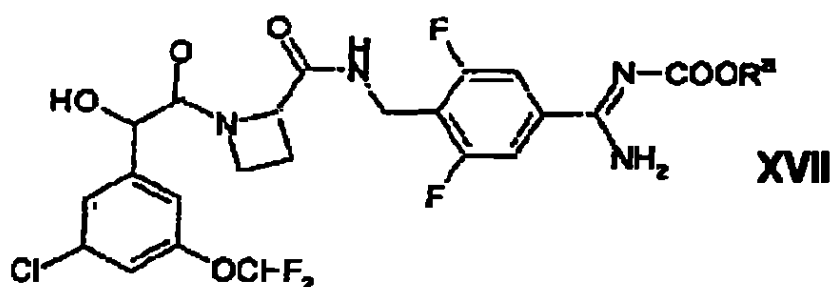
en donde R¹ es como se define en la reivindicación 2;

(c) para compuestos de fórmula Ia en donde R¹ representa OH, la reacción de un compuesto correspondiente de fórmula XVI,



con hidroxilamina;

(d) para compuestos de fórmula Ia en donde R^1 representa OR^2 , la reacción de un compuesto de fórmula XVII,



en donde R^a representa $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ o bencilo, o un tautómero de los mismos, con un compuesto de fórmula XVIII,



en donde R^2 es como se define en la reivindicación 2, o una sal de adición ácida del mismo, seguido por una remoción del grupo $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$;

(e) para compuestos de la fórmula Ia en donde R^1 representa OH, la reacción de un compuesto de fórmula XVII, como se define arriba, en donde R^a representa bencilo con hidroxilamina, o una sal de adición ácida del mismo;

(f) para compuestos de fórmula Ia en donde R^1 representa COOR^3 , la reacción de un compuesto correspondiente de fórmula I como se define en la reivindicación 1 con un compuesto de fórmula XIX,



en donde L^1 representa un grupo saliente apropiado y R^3 es como se define en la reivindicación 2; o

(g) para compuestos de fórmula Ia en donde R^1 representa OCH_3 u OCH_2CH_3 , la reacción de un compuesto correspondiente de fórmula Ia en donde R^1 representa OH con dimetilsulfato o dietilsulfato, respectivamente.

68

132

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 100735-1 WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/SE02/01557	International filing date (day/month/year) 30.08.2002	Priority date (day/month/year) 30.08.2001
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07D 205/04, A61K 31/397, A61P 7/02		
Applicant Astrazeneca AB et al		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the These annexes consist of a total of _____ sheets.			<table border="1"> <thead> <tr> <th>PCODE</th> <th>DATE</th> <th>NTD</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	PCODE	DATE	NTD			
PCODE	DATE	NTD							
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the report II ☐ Priority III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application			<table border="1"> <tr> <td>ANKOM 27 NOV 2003 GPS</td> </tr> <tr> <td>DATA ENTERED</td> </tr> <tr> <td>FINAL CHECK</td> </tr> </table>	ANKOM 27 NOV 2003 GPS	DATA ENTERED	FINAL CHECK			
ANKOM 27 NOV 2003 GPS									
DATA ENTERED									
FINAL CHECK									

Date of submission of the demand 07.03.2003	Date of completion of this report 19.11.2003
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. 08-667 72 88 Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (January 1998)	Authorized officer Nebil Gecer/Els Telephone No. 08-782 25 00

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE02/01557

1. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:**

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement) under article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheet/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2 (e)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE02/01557

13-6-35

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 24-27

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 24-27

relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

See PCT Rule 67.1.(iv): Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.

☐ the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE02/01557

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>1-23, 28-29</u>	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	<u>1-23, 28-29</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-23, 28-29</u>	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

The following documents are cited in the search report:

D1) WO 0042059 A1

D2) WO 9702284 A1

D1 relates to thrombin inhibitors based on peptidyl derivatives. The claimed compounds differ from those of D1 by the presence of the substituent OCHF₂ on one of the phenyl rings. Therefore, the invention claimed in claims 1-23 and 28-29 is novel.

An inventive step could not be acknowledged for the invention claimed in claims 1-23 and 28-29, since the applicant has not shown that the structural difference render the claimed compounds unexpected effects in comparison with the closely related compounds of D1.

Also D2 is relevant for the issue of inventive step, since this document also relates to closely related thrombin inhibitors.

Thus, the invention claimed in claims 1-23 and 28-29 is novel and industrially applicable but is not considered to involve an inventive step.

**TRATADO SOBRE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES**

PCT

**INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(Artículo 36 y Regla 70 PCT)**

1328135

No. de Expediente del Solicitante o Apoderado 100735-1 WO	PROCEDIMIENTO POSTERIOR Véase comunicación sobre el envío del informe de examen preliminar internacional (Formulario PCT/IPEA/416)		
No. Solicitud Internacional PCT/SE02/01557	<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">Fecha Internacional de Presentación (día/mes/año) 30.08.2002</td> <td style="width: 50%;">Fecha de Prioridad (día/mes/año) 30.08.2001</td> </tr> </table>	Fecha Internacional de Presentación (día/mes/año) 30.08.2002	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 30.08.2001
Fecha Internacional de Presentación (día/mes/año) 30.08.2002	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 30.08.2001		
Clasificación Internacional de Patente (IPC) o Clasificación Nacional e IPC C07D, A61K 31/397, A61P 7/02			
Solicitante AstraZebeca AB y colaboradores			

1.	Este informe de examen preliminar internacional fue elaborado por la Oficina Encargada del Examen Preliminar Internacional y se envía al solicitante según Artículo 36.																								
2.	Este INFORME comprende un total de 4 hojas, inclusive esta portada. ☐ Además se adjuntan ANEXOS al informe; en este caso se trata de hojas con descripciones, reivindicaciones y/o dibujos, que se modificaron y que sirven de base a este informe, y/o hojas con correcciones efectuadas por esta oficina (véase Regla 70.16 y Sección 807 de las Instrucciones administrativas al PCT). Estos anexos comprenden en total de hojas.																								
3.	Este informe contiene datos con respecto a los siguientes puntos: <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 5%;">I</td> <td style="width: 5%;">☒</td> <td style="width: 90%;">Base del Informe</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td>☐</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td>☒</td> <td>Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, actividad inventiva y posibilidad de aplicación industrial</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td>☐</td> <td>Uniformidad deficiente de la invención</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td>☒</td> <td>Declaración justificada según Artículo 35(2) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la posibilidad de aplicación industrial; documentos y explicaciones que sustentan esta declaración</td> </tr> <tr> <td>VI</td> <td>☐</td> <td>Ciertos documentos enumerados</td> </tr> <tr> <td>VII</td> <td>☐</td> <td>Ciertas deficiencias del registro internacional</td> </tr> <tr> <td>VIII</td> <td>☐</td> <td>Ciertas observaciones relacionadas con la solicitud internacional</td> </tr> </table>	I	☒	Base del Informe	II	☐	Prioridad	III	☒	Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, actividad inventiva y posibilidad de aplicación industrial	IV	☐	Uniformidad deficiente de la invención	V	☒	Declaración justificada según Artículo 35(2) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la posibilidad de aplicación industrial; documentos y explicaciones que sustentan esta declaración	VI	☐	Ciertos documentos enumerados	VII	☐	Ciertas deficiencias del registro internacional	VIII	☐	Ciertas observaciones relacionadas con la solicitud internacional
I	☒	Base del Informe																							
II	☐	Prioridad																							
III	☒	Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, actividad inventiva y posibilidad de aplicación industrial																							
IV	☐	Uniformidad deficiente de la invención																							
V	☒	Declaración justificada según Artículo 35(2) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la posibilidad de aplicación industrial; documentos y explicaciones que sustentan esta declaración																							
VI	☐	Ciertos documentos enumerados																							
VII	☐	Ciertas deficiencias del registro internacional																							
VIII	☐	Ciertas observaciones relacionadas con la solicitud internacional																							

Fecha de presentación de la petición 07.03.2003	Fecha de la preparación de este informe 19.11.2003
Nombre y dirección postal de la IPEA/SE Patent – och registreringsverket Telex Apartado 5055 17978 S-102 42 ESTOCOLOMO PATOREG-S Facsimil No. 08-667 72 88	Empleado Autorizado Nebil Gecer/Els Telefono No. 08-782 25 00

Formulario PCT/IPEA/409 (hoja de portada)(Enero de 1998)

INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/SE02/01557

138
134

I. Bases para este reporte.

1. Respecto a los elementos de la solicitud Internacional:*

- ☒ la solicitud internacional como se entregó originalmente
- ☐ la descripción:
 páginas _____ como se entregaron originalmente
 páginas _____ como se entregaron con la demanda
 páginas _____ como se entregaron con la carta de _____
- ☐ las reivindicaciones:
 páginas _____ como se entregaron originalmente
 páginas _____ como se corrigieron (junto con cualquier declaración) bajo el Artículo 19
 páginas _____ como se entregaron con la demanda
 páginas _____ como se entregaron con la carta de _____
- ☐ los dibujos
 páginas _____ como se entregaron originalmente
 páginas _____ como se entregaron con la demanda
 páginas _____ como se entregaron con la carta de _____
- ☐ la lista de la descripción
 páginas _____ como se entregaron originalmente
 páginas _____ como se entregaron con la demanda
 páginas _____ como se entregaron con la carta de _____

2. Respecto al idioma, todos los elementos anteriormente marcados estaban disponibles o fueron suministrados a esta oficina en el idioma en el que se entregó la solicitud Internacional, a menos que se diga lo contrario en este punto. Estos elementos estaban disponibles o fueron entregados a esta oficina en el siguiente idioma _____ los cuales son

- ☐ El idioma de la traducción entregada para propósitos de la búsqueda Internacional (Regla 23.1 (b)).
- ☐ El idioma de publicación de la solicitud Internacional (bajo la Regla 48.3 (b)).
- ☐ El idioma de la traducción entregada para propósitos del examen preliminar internacional (bajo las Reglas 55.2 y/o 55.3)

3. respecto a cualquier secuencia de nucleótido y/o aminoácidos divulgados en esta solicitud internacional, el examen preliminar internacional se realizó sobre la base de la secuencia:

- ☐ contenida en la solicitud en forma impresa
- ☐ entregada junto con la solicitud internacional en una forma legible en un computador
- ☐ suministrada subsecuentemente a esta oficina de forma escrita
- ☐ suministrada subsecuentemente a esta oficina en forma legible en un computador
- ☐ la declaración que la secuencia escrita suministrada no va más allá de lo divulgado en la solicitud internacional como se entregó ha sido suministrada
- ☐ La declaración que la información registrada en la forma legible a computador es idéntica a la secuencia escrita ha sido suministrada.

4. ☐ Las correcciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas NINGUNA
- ☐ las reivindicaciones, Nos. NINGUNA
- ☐ los dibujos, hojas/figuras NINGUNA

5. ☐ Este informe ha sido admitido como si (algunas de) las enmendaduras no hubieran sido hechas, ya que se considera que estas van más allá de la divulgación preliminar, como se indica el Apartado Suplementario (Regla 70.2 (c)). **

* Las hojas de reemplazo que han sido suministradas a la Oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 se mencionan en este informe como "entregadas originalmente" y no se anexan a este informe ya que no contienen enmendaduras (Reglas 70.16 y 70.17)

** Cualquier hoja de reemplazo que contiene tales enmiendas debe mencionarse bajo el asunto 1 de este informe.

INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONALNo. de Solicitud Internacional
PCT/SE02/01557139
1407/**III. Sin establecimiento de una opinión con respecto a la novedad, el nivel inventivo o la aplicabilidad industrial.**

1. La pregunta de si la invención reivindicada parece ser nueva, involucra un nivel inventivo o es industrialmente aplicable no ha sido y no será examinada con respecto a:

☐ La totalidad de la solicitud internacional

☒ La(s) reivindicación(es) No. 24 - 27

Porque:

☒ Dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones No. 24 - 27 se relacionan a la siguiente materia la cual no requiere del examen preliminar (*especifique*)

Ver Regla del PCT 87.1.(iv): Métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia, así como métodos de diagnóstico.

☐ La descripción, las reivindicaciones o los dibujos (*Indique a continuación los elementos particulares*) o dichas reivindicaciones No. _____ son tan poco claras que no se puede formar una opinión significativa (*especifique*):

☐ Las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones No. _____ están tan inadecuadamente sustentadas por la descripción que no puede formar una opinión significativa

☐ No se ha establecido un informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones No. _____

2. No se puede llevar a cabo un examen preliminar internacional debido a la falla de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos de cumplir con el estándar proporcionado en el anexo C de las Instrucciones Administrativas:

☐ No se ha entregado la forma escrita o no cumple con el estándar.

☐ No se ha entregado en forma legible a computador o no cumple con el estándar.

INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

No de Solicitud Internacional
PCT/SE02/01557

V. Declaración concluyente de acuerdo a la Regla 66.2 (a)(ii) con relación a la novedad, el nivel inventivo o la aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan tal declaración

1. DECLARACIÓN

Novedad (N)	Reivindicaciones 1 - 23, 28 - 29	Si
	Reivindicaciones	No
Nivel Inventivo (IS)	Reivindicaciones	Si
	Reivindicaciones 1 - 23, 28 - 29	No
Aplicabilidad Industrial (IA)	Reivindicaciones 1 - 23, 28 - 29	Si
	Reivindicaciones	No

2. CITAS Y EXPLICACIONES

Los siguientes documentos fueron citados en el informe de búsqueda:

D1) WO 0042059 A1

D2) WO 9712284 A1

D1 se relaciona con los inhibidores de la trombina basados en derivados del peptidilo. Los compuestos reivindicados difieren de aquellos en D1 por la presencia de es sustituyente OCHF2 en uno de los anillo fenilo. Por lo tanto, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1 - 23 y 28 - 29 es novedosa.

No se puede reconocer un nivel inventivo para la invención reivindicada en las reivindicaciones 1 - 23 y 28 - 29, ya que el solicitante no ha mostrado que la diferencia estructural le da a los compuestos reivindicados efectos inesperados en comparación con los compuestos cercanamente relacionados de D1.

D2 también es relevante para el asunto del nivel inventivo, ya que éste documento también se relaciona con inhibidores de la trombina cercanamente relacionados.

Por lo tanto, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1 - 23 y 28 - 29 es novedosa y aplicable industrialmente pero no se considera que involucre algún nivel inventivo.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE 02/01557

167241

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C07D 205/04, A61K 31/397, A61P 7/02
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C07D, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CHEM. ABS DATA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0042059 A1 (ASTRAZENECA AB), 20 July 2000 (20.07.00) --	1-29
X	WO 9702284 A1 (ASTRA AKTIEBOLAG), 23 January 1997 (23.01.97) -- -----	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2002

Date of mailing of the international search report

05-12-2002

Name and mailing address of the ISA/
Swedish Patent Office
Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. +46 8 666 02 86Authorized officer
Nabil Gecar/EO
Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE02/01557

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 24-27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see next sheet
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

142
3
142

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE02/01557

Claims 24-27 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy/ diagnostic methods practised on the human or animal body/Rule 39.1.(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds/compositions.

PCT REQUEST

100735-1 WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 29.08.2002 01:41:04 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Swedish Patent Office (RO/SE)
0-7	Applicant's or agent's file reference	100735-1 WO
I	Title of invention	NEW MANDELIC ACID DERIVATIVES AND THEIR USE AS THROMBIN INHIBITORS
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	ASTRAZENECA AB
II-5	Address:	S-151 85 Södertälje Sweden
II-6	State of nationality	SE
II-7	State of residence	SE
II-8	Telephone No.	+46 8 553 260 00
II-9	Facsimile No.	+46 8 553 288 20
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	INGHARDT, Tord
III-1-5	Address:	AstraZeneca R&D Mölndal S-431 83 Mölndal Sweden
III-1-6	State of nationality	SE
III-1-7	State of residence	SE

PCT REQUEST

100735-1 WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 28.08.2002 01:41:04 PM

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	JOHANSSON, Anders
III-2-5	Address:	AstraZeneca R&D Mölndal S-431 83 Mölndal Sweden
III-2-6	State of nationality	SE
III-2-7	State of residence	SE
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	SVENSSON, Arne
III-3-5	Address:	AstraZeneca R&D Mölndal S-431 83 Mölndal Sweden
III-3-6	State of nationality	SE
III-3-7	State of residence	SE
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	
IV-1-1	Name	agent GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY
IV-1-2	Address:	AstraZeneca AB S-151 85 Södertälje Sweden
IV-1-3	Telephone No.	+46 8 553 260 00
IV-1-4	Facsimile No.	+46 8 553 288 20
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GE GM KE LS MW MX SD SL SZ TZ UG ZM ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE BG CH LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT

PCT REQUEST

3/6

100735-1 WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 29.08.2002 01:41:04 PM

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH & LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	30 August 2001 (30.08.2001)
VI-1-2	Number	0102921-4
VI-1-3	Country	SE
VI-2	Priority claim of earlier international application	
VI-2-1	Filing date	30 November 2001 (30.11.2001)
VI-2-2	Number	PCT/SE01/02657
VI-2-3	PCT receiving Office	SE
VII-1	International Searching Authority Chosen	Swedish Patent Office (ISA/SE)
VII-2	Request to use results of earlier search; reference to that search	
VII-2-1	Date	30 November 2001 (30.11.2001)
VII-2-2	Number	PCT/SE01/02657
VII-2-3	Country (or regional Office)	SE

PCT REQUEST

100735-1 WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 29.06.2002 01:41:04 PM

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	1	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

129
⑤

PCT REQUEST

100735-1 WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 29.08.2002 01:41:04 PM

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name:	in relation to this international application ASTRAZENECA AB is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1 (i)		ASTRAZENECA AB is entitled as employer of the inventor, INGARDT, Tord
VIII-2-1 (ii)		ASTRAZENECA AB is entitled as employer of the inventor, JOHANSSON, Anders
VIII-2-1 (ii)		ASTRAZENECA AB is entitled as employer of the inventor, SVENSSON, Arne
VIII-2-1 (ix)	This declaration is made for the purposes of:	all designations except the designation of the United States of America

PCT REQUEST

100735-1 WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 29.08.2002 01:41:04 PM

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	6	-
IX-2	Description	54	-
IX-3	Claims	8	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	0	-
IX-7	TOTAL	69	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-9	Original separate power of attorney	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. GF 643/2002	-
IX-13	Priority document(s)	Item(s) VI-1, VI-2	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-18	Other (specified):	International Search Report PCT/SE01/02657	-
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name	GLOBAL INTELLECTUAL PROPERTY	
X-1-2	Name of signatory	Christer Wahlström	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/SE
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

Original (for SUBMISSION) - printed on 29.08.2002 01:41:04 PM

PCT-EASY INFORMATION SHEET

(For applicant use only, DO NOT submit this sheet with the International application)

VALIDATION LOG

Yellow	Names Applicant 1.:Street address missing
Yellow	Applicant 2.:Street address missing
Yellow	Applicant 3.:Street address missing
Yellow	Applicant 4.:Street address missing
Yellow	Agent 1.:Street address missing
Green?	Contents The International application contains no drawings. Please verify.
Green?	Payment Please ensure that you have a valid deposit account with the receiving Office selected.
Green?	Annotate The name of the person signing the request or/and the capacity in which the person signs has/have not been indicated. Please be informed that some receiving Offices require that this information be present along with the signature.

Before submitting the International Application, please carefully verify that:

- the information contained on printed Request form is correct;
- Box X of the Request form and Item 12-23 of the Annex to the Request form have been signed;
- all elements of the International application as indicated in Boxes VIII and IX of the Request form have been attached; and,
- the diskette containing the PCT-EASY zip file of the International Application has been enclosed and has been clearly labeled "PCT-EASY", with the applicant's or agent's file reference, and the first applicant's name.

ATTENTION

DO NOT modify any indications on the Request form printout. The electronic version of the PCT-EASY application has been locked. If an error or an omission is discovered at this time, you must reopen the stored form for submission, perform necessary amendments and immediately resubmit the form. Finally, a NEW submission diskette must be created manually by resending the corrected stored form to the diskette. The previously created printout and submission diskette must be destroyed in order to prevent the possibility of erroneously sending it to the RO.

• There is provided a compound of formula I

• [Chemical formula should be inserted here. Please see paper copy]

and pharmaceutically-acceptable derivatives (including prodrugs) thereof, which compound and derivatives are useful as, or are useful as prodrugs of, competitive inhibitors of trypsin-like proteases, such as thrombin, and thus in particular, in the treatment of conditions where inhibition of thrombin is required (e.g. thrombosis) or as anticoagulants.

152
M

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ SE

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:

The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only

Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND	
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference 100735-1 WO	
International application No. PCT/SE02/01557	International filing date (day/month/year) 30 August 2002 (30.08.2002)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 30 August 2001 (30.08.2001)	
Title of invention NEW MANDELIC ACID DERIVATIVES AND THEIR USE AS THROMBIN INHIBITORS			
Box No. II APPLICANT(S)			
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) AstraZeneca AB S-151 85 Södertälje Sweden		Telephone No. +46 8 553 260 00	
		Facsimile No. +46 8 553 288 20	
		Teleprinter No.	
		Applicant's registration No. with the Office	
State (that is, country) of nationality: SE		State (that is, country) of residence: SE	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) INGHARDT, Tord AstraZeneca R&D Mölndal S-431 83 Mölndal Sweden			
State (that is, country) of nationality: SE		State (that is, country) of residence: SE	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) JOHANSSON, Anders AstraZeneca R&D Mölndal S-431 83 Mölndal Sweden			
State (that is, country) of nationality: SE		State (that is, country) of residence: SE	
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.			

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

SVENSSON, Arne
AstraZeneca R&D Mölndal
S-431 83 Mölndal
Sweden

State (that is, country) of nationality:
SE

State (that is, country) of residence:
SE

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

☐

Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*Global Intellectual Property
AstraZeneca AB
S-151 85 Södertälje
Sweden

Telephone No.

+46 8 553 260 00

Facsimile No.

+46 8 553 288 20

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☐ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☐ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☐ as amended under Article 34the drawings ☐ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). *(This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)*

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English

☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The applicant hereby elects all eligible States *(that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)*

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|--|---|--------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | sheets |
| 6. other (specify) | : | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

- | received | not received |
|--------------------------|--------------------------|
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|---|---|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listings in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings |
| 4. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any: GF 345/2003 | 8. ☐ other (specify): |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).

Södertälje, 7 March 2003

Christer Wahleström

Christer Wahleström
Global Intellectual Property, AstraZeneca AB

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.

☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

APOSTILLA**(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)****1. Pais: Suecia****El presente documento oficial****2. ha sido firmado por Sr. Björn Sandin****3. en su calidad de Notario Público****4. y lleva el timbre/sello de Notario Público en Estocolmo****Atestado****5. en Estocolmo****6. el 5 de febrero de 2004****7. de Ministerio de Asuntos Exteriores****8. N° 750****9. Timbre/Sello****10. Firma****Madelaine Beronius**

ASSIGNMENT

TRASPASO

The undersigned,

abajo firmado

Tord INGARD; Anders JOHANSSON and Arne SVENSSON

All domiciled in
AstraZeneca R&D Mölndal
SE-431 83 Mölndal
Sweden

domiciliado en

hereby state under oath to be the sole and true inventor
of

decla bajo juramento ser único y verda-
dero inventor de.

NEW MANDELIC ACID DERIVATIVES AND THEIR USE AS THROMBIN INHIBITORS

We state as well that we assign, without reservations or
limitation, in favor of

Declar asimismo que ced y
transf sin reserva ni limitación, a favor de la
sociedad

AstraZeneca AB

a corporation organized and existing under the laws of
Sweden

organizada y existente de conformidad con la leyes de

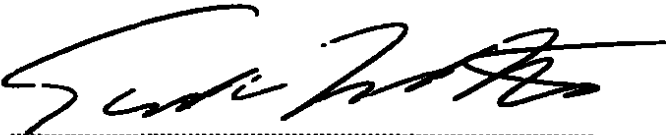
domiciled in

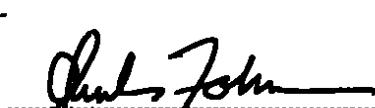
domiciliada en

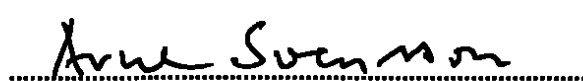
SE-151 85 Södertälje, Sweden

all rights inherent to said invention, and that the above
mentioned corporation hereby is enabled to apply, in its
name, for the corresponding patent in the Republic of
Colombia.

Todos los derechos inherentes a dicha invención y que la
citada sociedad queda facultada para solicitar en su
nombre la patente correspondiente en la República de
Colombia.


Tord INGARDT


Anders JOHANSSON


Arne SVENSSON

BJURN SANDIN
La Infrascrita ~~Arne Maria Boman~~, Notario Público
do Estocolmo, Suecia, certifica que

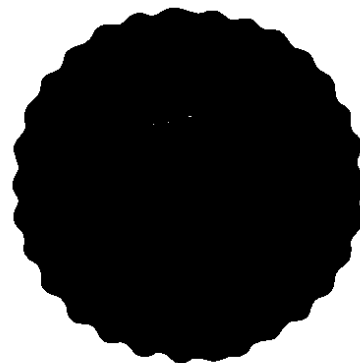
TORD I N G H A R D T,
ANDERS J O H A N S S O N y
ARNE S V E N S S O N

han otorgado y firmado el documento que antecede.

Derechos 280:- Estocolmo, 2004-02-04

Coronas

De oficio:

ထိုအခါ အိမ်ထောင်၊ ပစ္စည်း ငွေကြေး-တရား စာချုပ်ချုပ်ဆိုမှု
ဥပဒေ အကျိုးသက်ရောက်မှု၊ အကျိုးသက်ရောက်မှု

အကျိုးသက်ရောက်မှု ဥပဒေ အကျိုးသက်ရောက်မှု
အကျိုးသက်ရောက်မှု
အကျိုးသက်ရောက်မှု

အကျိုးသက်ရောက်မှု

159
/60/

**TRADUCCION DEL SELLO QUE SE ENCUENTRA EN EL DOCUMENTO
DE CESIÓN DE DERECHOS SOBRE LA INVENCIÓN, OTORGADO POR
LOS INVENTORES: TORD INGHARDT, ANDERS JOHANSSON Y ARNE
SVENSSON, A LA SOCIEDAD **ASTRAZENECA AB**, DOMICILIADA EN S-151
85 SÖDERTÄLJE, SUECIA, DEL SUECO AL CASTELLANO.**

**BJÖRN SANDIN
NOTARIO PÚBLICO DE ESTOCOLMO**



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

3RD FLOOR, 15-19 GREAT TITCHFIELD STREET, LONDON W1P 7FB
TELEPHONE 020-7637 9883 • TELEFAX 020-7637 6804
E-MAIL consulco@consulco.demon.co.uk

3671

El suscrito Cónsul General de Colombia en Londres, vistos los documentos presentados ante este Despacho,

CERTIFICA

Que, **J.B. HODGSON**, Notario Público de Macclesfield, Cheshire, Inglaterra, legalizó la firma del documento precedente y su firma se encuentra certificada por **J. GARBRAH**, Oficial de del Ministerio de Relaciones Exteriores-Británico, firma que se encuentra registrada en este Consulado General.

Que, **AstraZeneca AB**, es una Sociedad constituida, organizada y existente en Sodertalje, Suecia, y que cumple con su objeto social de acuerdo con las leyes de ese país.

Que, **DAVID ERIC GILES**, en su calidad de Representante Legal de la mencionada Sociedad, debidamente autorizado otorga el documento precedente y su firma se encuentra legalizada por **J.B. HODGSON**, Notario Público de Macclesfield, Cheshire, Inglaterra, Gran Bretaña.

El Cónsul General no asume responsabilidad por el contenido del mencionado documento.

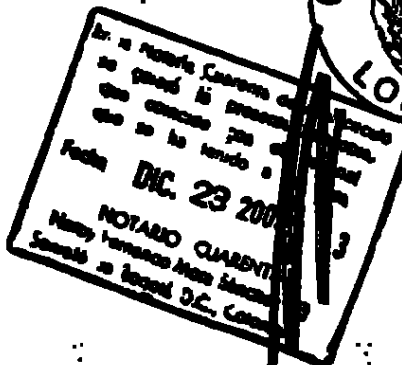
Dado en Londres, Inglaterra, Gran Bretaña, a los quince (15) días del mes de Noviembre de dos mil (2000).

Certificación No.11 /1722

Derechos: US\$ 106,00 CANCELADOS

JAIR H. BERRIO VILLARREAL
Cónsul General

HUGO NAVARRO ALVARADO
INTERPRETE OFICIAL
Reg. 1876 Ministerio 1983



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
Bogotá
481834

SE SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 NOV 29 A 10:32
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

BRIGARD & CASTRO

SANTAFE DE BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros) ASTRAZENECA AB

Domiciliado(s) en: S-151 85, Sodertalje,
SUECIA

Nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, de Santafé de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las demás facultades legales necesarias.

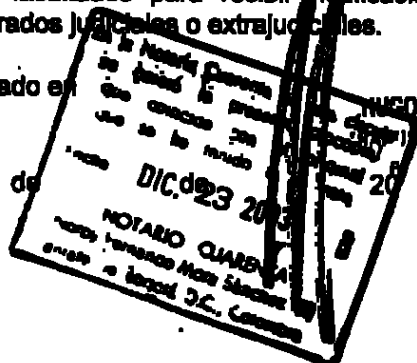
Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: RAMIRO CASTRO DUQUE y/o HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-58 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy

Firma

Nombre
Cargo



POWER OF ATTORNEY

I (We) ASTRAZENECA AB

Domiciled in: S-151 85, Sodertalje
SWEDEN

Hereby appoint RAMIRO CASTRO DUQUE and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, of Santafé de Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetable varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; penal demands, actions of indemnities for damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures; and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint RAMIRO CASTRO DUQUE and/or HECTOR GOMEZ MEJIA, domiciled in Carrera 7 No. 16-58, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in

This 10 NOV 2000 day

Signature

Name
Title

MACCLESFIELD, CHESHIRE
ENGLAND

David Eric Giles

DAVID ERIC GILES
DIRECTOR IP SERVICES

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
Personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él es

De ASTRAZENECA AB

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder, que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

**CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL**

Hoy de de
compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

**LEGALIZACION ANTE' CONSUL COLOMBIANO
ES REQUERIDA**

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 10 day of November of 2000
Personally appeared before me

DAVID ERIC GILES
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the

DIRECTOR IP SERVICES

of ASTRAZENECA AB

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of SWEDEN
under date of 3RD JANUARY 2000

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

Notary Public (Seal)

**NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON**

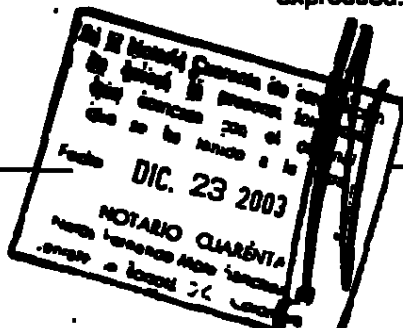
On this day of of
personally appeared before me

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

**LEGALIZATION BEFORE COLOMBIAN CONSUL
IS REQUIRED**

162
M
4
RUBEN NAVARRO ALVAREZ
INSTRUCTOR E. INTERPRETE
1993



164893

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

No. **D644894**

Date **14 November, 2000**

This document bears
the signature / seal of **J B Hodgson**

NOTARY PUBLIC
IRADIA
INTERPRETS OFFICIAL
Esp. 14/11/2000

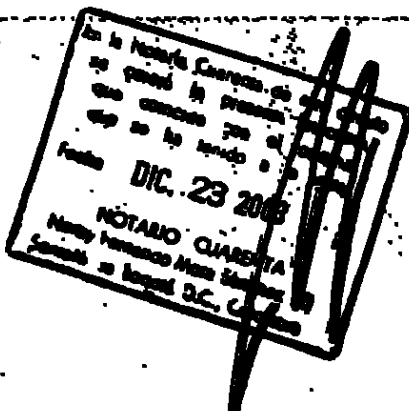
Acting in the capacity of **Notary Public**

Signed by: **J. Garbrah**



A handwritten signature in dark ink, appearing to be "J. Garbrah".

*For Her Majesty's Principal Secretary of State
For Foreign and Commonwealth Affairs*



SELLO EN RELIEVE.

+++++

EN ESPAÑOL: La Certificación del Consulado General de Colombia en Londres, Inglaterra bajo el Número de Certificación 11/1722 de fecha '16 de Noviembre del año 2000; Autenticación Hasta por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el Número 481834 de fecha 29 de Noviembre del año 2000.

+++++

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE LOS DOCUMENTOS

ADJUNTOS.

NOTA
MAGNITA
3

Resolución Número 1876 del Ministerio de Justicia
Fecha: 4 de Diciembre del año 2000.

167

166

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

USUARIO RADICADOR

- | | | |
|---|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. | () | () |
| - Descripción de la invención. | () | () |
| - Dibujos de ser estos pertinentes. | () | () |
| - Comprobante de Pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |

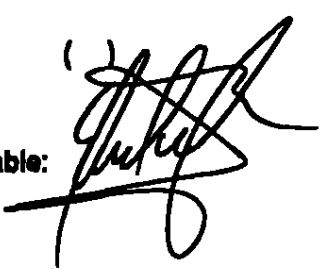
COMPLETA () INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica del esquema de trazado | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

Firma Responsable:



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Fecha: Radicación : 04016754 00000000 Folios: 166
Fecha (AIB): 2004-02-25 17:20:06
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



Folio 168

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
RAMIRO CASTRO DUQUE
Apoderado(a)
ASTRAZENECA AB.

REFERENCIA:	Radicación No.	04-16754
	Solicitud Internacional	PCT/SE02/01557
	Fecha inicio fase nacional	30/03/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	483
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, 30 MAR. 2004


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202060