



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2017.08.31

(21) Номер заявки  
201490823

(22) Дата подачи заявки  
2012.11.29

(51) Int. Cl. C07D 241/04 (2006.01)  
C07D 295/13 (2006.01)  
A61K 31/495 (2006.01)  
A61P 7/00 (2006.01)

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ ПИПЕРАЗИНА, РЕВЕРСИРУЮЩИЕ ДЕЙСТВИЕ  
АНТИКОАГУЛЯНТОВ

(31) 61/564,559; 61/614,292; 61/641,698;  
61/666,291

(32) 2011.11.29; 2012.03.22; 2012.05.02;  
2012.06.29

(33) US

(43) 2015.01.30

(86) PCT/US2012/066938

(87) WO 2013/082210 2013.06.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ПЕРОСФЕРЕ ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Стейнер Соломон С., Лаулихт Брайан  
Е., Бахру Саша Х., Матиовиц Эдит  
(US)

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(56) "Sigma-Aldrich Catalogue", 1 January 1996  
(1996-01-01), Sigma-Aldrich GmbH, XP002692061,  
page 497, 502, 1305

F. BISCHOFF: "Preparation of some  
substituted guanidines", J. BIOL. CHEM., vol.  
80, 1 January 1928 (1928-01-01), pages 345-355,  
XP055053032, page 347

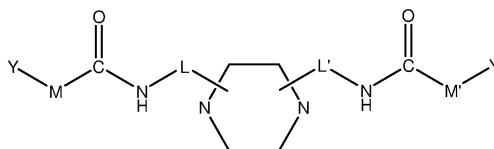
MULL R.P. ET AL.: "GUANIDINES WITH  
ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITY. II", JOURNAL  
OF MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL  
CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY,  
EASTON, US, vol. 5, 1 September 1962 (1962-09-01),  
pages 944-949, XP009084771, table III

A. SABET HAMMAM: "Heterocyclic  
Quinones VIII. Synthesis and spectra of new  
carbazoloquinone derivatives of naturally occurring  
amino acids", J. APPL. CHEM. BIOTECHNOL., vol.  
26, 1 January 1976 (1976-01-01), pages 667-682,  
XP055053034, page 670; compound (IX)

SHUJI KITAMURA ET AL.: "Potent Dibasic  
GPIIb/IIIa Antagonists with Reduced Prolongation  
of Bleeding Time: Synthesis and Pharmacological  
Evaluation of 2-Oxopiperazine Derivatives",  
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 44,  
no. 15, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 2438-2450,  
XP055053054, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/  
jm0004345, compounds 12a-c

M.A. CROWTHER ET AL.: "Bleeding risk  
and the management of bleeding complications in  
patients undergoing anticoagulant therapy: focus on  
new anticoagulant agents", BLOOD, vol. 111, no.  
10, 15 May 2008 (2008-05-15), pages 4871-4879,  
XP055053182, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/  
blood-2007-10-120543, table 2

(57) В изобретении предложены новые соединения общей формулы (II)



(II)

где L и L', M и M', Y и Y' являются такими, как определено в формуле изобретения, и их фармацевтически приемлемые соли. Указанные соединения представляют собой производные пиперазина, реверсирующие действие антикоагулянтов. Также предложены способы получения указанных соединений, фармацевтические композиции, содержащие указанные соединения, способы применения указанных соединений для реверсирования антикоагулирующего действия ингибиторов коагуляции, а также диагностический набор, включающий указанные соединения.

В заявке на данное изобретение испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/564559, поданной 29 ноября 2011 г., по предварительной заявке на патент США № 61/614292, поданной 22 марта 2012 г., по предварительной заявке на патент США № 61/641698, поданной 2 мая 2012 г., и по предварительной заявке на патент США № 61/666291, поданной 29 июня 2012 г., полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### **Область техники**

В настоящем изобретении описаны соединения, которые полностью или частично реверсируют антикоагулирующее действие ингибиторов коагуляции, таких как нефракционированный гепарин ("НФГ"), низкомолекулярный гепарин ("НМГ"), фондапаринукс, и других антитромбин-связывающих антикоагулянтов, а также прямых ингибиторов Ха и Па.

#### **Уровень техники**

Коагуляционный каскад представляет собой нормальный физиологический процесс, который направлен на предотвращение значительных потерь крови или кровотечения после повреждения сосудов. Однако бывают случаи, когда сгусток крови (тромб) образуется, когда это не нужно. Например, некоторые состояния с высокой степенью риска, такие как острая медицинская болезнь, продолжительная неподвижность, хирургическая операция или рак, могут повышать риск развития сгустка крови, что может потенциально приводить к серьезным последствиям, таким как атеросклеротическое сердечно-сосудистое заболевание и/или патологический сердечный ритм.

Коагуляционный каскад состоит из серии этапов, в которых протеаза расщепляет, а затем активирует следующую протеазу в последовательности. Каждая протеаза может активировать несколько молекул следующей протеазы в серии, усиливая этот биологический каскад. Конечный результат этих реакций заключается в превращении фибриногена, растворимого белка, в нерастворимые волокна фибрина. Вместе с тромбоцитами волокна фибрина образуют устойчивый сгусток крови.

Антитромбин (АТ), ингибитор серин-протеазы, представляет собой главный плазматический ингибитор коагуляционных протеаз. АТ блокирует коагуляционный каскад, например, за счет ингибирования тромбина (фактора Па) и активированного фактора X (фактора Ха). Гепарин (нефракционированный гепарин) и низкомолекулярные гепарины (НМГ; фракционированный гепарин) ингибируют коагуляционный процесс за счет связывания с АТ по пентасахаридной последовательности. Это связывание приводит к конформационному изменению АТ, которое ускоряет его ингибирование факторов Па, Ха, а также других протеаз, участвующих в свертывании крови. Будучи диссоциированным, гепарин и НМГ могут свободно связываться с другой молекулой антитромбина, а затем ингибировать дополнительные количества тромбина и фактора Ха.

Нефракционированный гепарин представляет собой смесь гликозаминогликанов (GAG), которые, как было обнаружено в 1916 году учеными McLean и Howell в университете Джонса Хопкинса, обладают антикоагулирующими свойствами в печени собак. Помимо антикоагуляции, было обнаружено, что нефракционированный гепарин обладает другими свойствами, включая противовоспалительное действие и ангиогенез. НМГ представляют собой гепарины, состоящие из коротких цепей полисахарида, как правило, имеющие молекулярный вес менее 8000 Да. НМГ и гепарин используют для предотвращения свертывания крови в организме, а также используют в различных ситуациях в клинических учреждениях.

Гепарин выпускают в виде жидкого раствора, вводимого парентерально. НМГ, такой как эноксапарин, представляет собой низкомолекулярную фракцию гепарина. Его также выпускают в виде жидкого раствора для инъекций. В настоящее время доступные такие торговые марки НМГ, одобренные FDA в Соединенных штатах, как LOVENOX® (международное непатентованное название эноксапарин) и FRAGMENT® (международное непатентованное название дальтепарин).

Низкомолекулярный или фракционированный гепарин обладает более высокой специфичностью к активности фактора крови Ха и фактора Па, по сравнению с нефракционированным гепарином. Кроме того, НМГ обладает более воспроизводимым эффектом на активированное парциальное тромбопластиновое время (aPTT), показатель времени коагуляции. LWMH характеризуется более низкой встречаемостью гепарин-индуцированной тромбоцитопении (HIT). Поскольку НМГ обладает более предсказуемой эффективностью и более низкой встречаемостью неблагоприятных эффектов, таких как HIT, пациенты могут самостоятельно вводить инъекции НМГ дома, хотя его также часто используют в больнице. По этим причинам НМГ завоевал лидирующие позиции на рынке антикоагулянтов.

Протамин, положительно заряженная молекула, может быть использован для реверсирования антикоагуляции, обусловленной введением сильно отрицательно заряженного нефракционированного гепарина или низкомолекулярного гепарина (НМГ). Протамин представляет собой природный продукт, который ассоциируется с перебоями в поставках, что подчеркивает необходимость в дополнительных, в идеале синтетических альтернативных агентах обратного действия. Антикоагулирующая активность НМГ может быть частично, но не полностью, реверсирована внутривенным введением протамина. Причина пониженной антикоагулирующей реверсирующей активности протамина в случае НМГ, предположительно, заключается в более низком связывающем сродстве к фракции НМГ в крови, чем к нефракцио-

нированному гепарину. Протамин следует вводить медленно из-за гипотензивного эффекта и причин, касающихся анафилаксии.

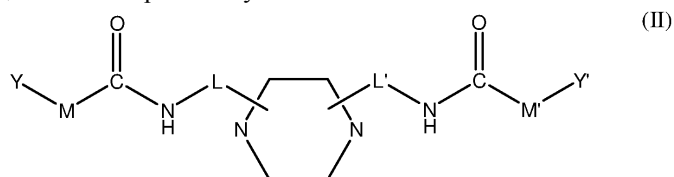
Недавно официальное разрешение начали получать дополнительные антикоагуляционные агенты. Примеры таких антикоагулянтов включают дабигатран или PRADAXA®, аргатробан или ARGATROBAN®, ривароксабан или XARELTO®, аписабан или ELIQUIS®, эдоксабан или LIXIANA®, и фондапаринукс или ARIXTRA®. Эти антикоагулянты ингибируют распространение коагуляции фактора IIa или фактора Ха.

Для таких антикоагулянтов, как дабигатран, фондапаринукс, ривароксабан и аписабан, одобренных агентов обратного действия нет. В настоящее время в данной области техники для реверсирования действия дабигатрана или PRADAXA® используют активированный уголь, пытаются удалить дабигатран из крови, а также используют переливание крови. Помимо публикации Eerenberg et al. Circulation, 4 октября 2011 г.; 124(14): 1573-9, эл. публикация 6 сентября 2011 г., в которой описано, что в небольшом клиническом испытании концентрат комплекса протромбина мог реверсировать дабигатран, но не ривароксабан, отсутствуют данные или клинически доступный антидот для реверсирования любых из этих ингибиторов факторов коагуляции IIa или Ха. Следовательно, если пациентам для антикоагуляции ввели эти агенты, то неблагоприятные эффекты, связанные с передозировкой, очень большими или летальными кровотечениями, являются более опасными, чем побочные эффекты, связанные с введением нефракционированного гепарина. Таким образом, недостаток агентов обратного действия ограничивает применение этих лекарств.

По этой причине существует давняя, острая и неудовлетворенная клиническая необходимость в новых агентах, реверсирующих действие антикоагулянтов.

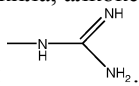
#### Краткое описание изобретения

Разработаны ингибиторы гепарина, гепариновых фрагментов, фондапаринукса и другие ингибиторы фактора Ха или фактора IIa. Общая структура рассматриваемых агентов, реверсирующих действие антикоагулянтов, представляет собой R-Z-R', где R и R' представляют собой положительно заряженные агенты при физиологическом pH, и могут быть одинаковыми или различными молекулами, а Z представляет собой гидрофобное циклическое или конденсированное кольцевое соединение. В одном варианте реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой соединение, представленное формулой (II), или его фармацевтически приемлемую соль:

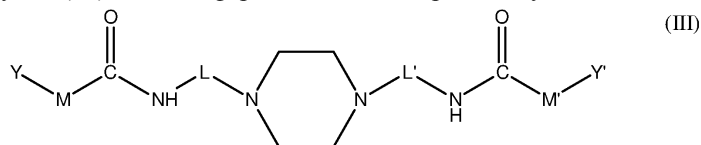


где каждый из L и L' представляет собой замещенную или незамещенную C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкиленовую цепь; каждый M и M' представляет собой замещенную алкиленовую цепь, при этом указанные заместители в алкиленовой цепи выбраны из C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, гидроксила, гидрокси-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, amino, amino-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, алкокси и C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилалкокси; и

каждый из Y и Y' представляет собой

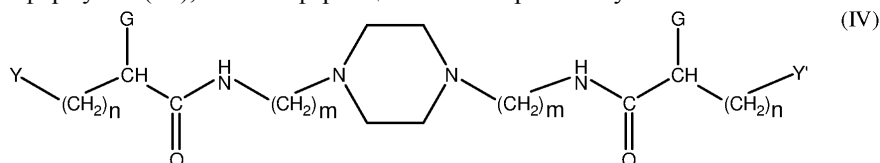


В другом варианте реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой соединение, представленное формулой (III), или его фармацевтически приемлемую соль:



где L, L', M, M', Y и Y' являются такими, как описано в настоящем документе.

В другом варианте реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой соединение, представленное формулой (IV), или его фармацевтически приемлемую соль:



где Y и Y' являются такими, как описано в настоящем документе;

n равен от 3 до 5;

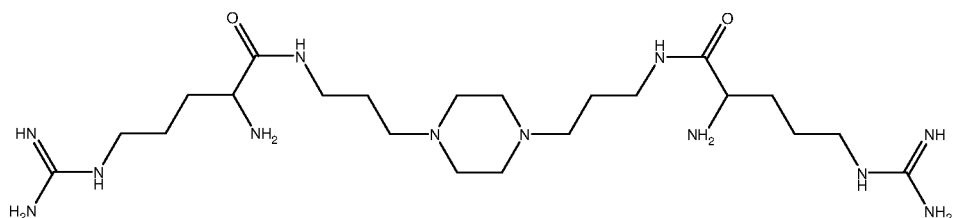
m равен от 3 до 6;

G выбран из -NH<sub>2</sub> и OH.

Наиболее предпочтительно G представляет собой амино.

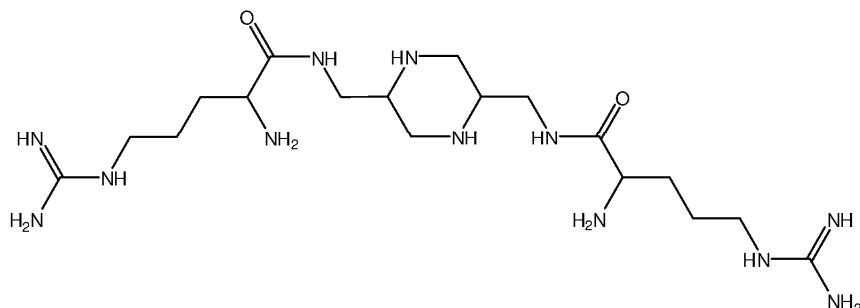
В предпочтительном варианте реализации соединение представляет собой диаргининпиперазин (DAP), изображенный на формуле (V), или родственное соединение, изображенное на формуле (VI), или фармацевтически приемлемые соли любого из этих соединений:

(V)



2-амино-5-гуанидинопентановой кислоты (3-{4-[3-(2-амино-5-гуанидинопентаноиламино)пропил]-пиперазин-1-ил}пропил)амид; или

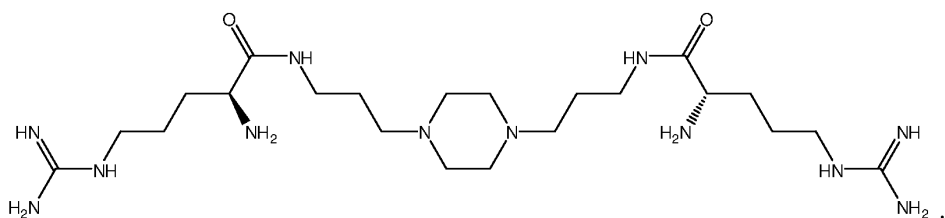
(VI)



2-амино-5-гуанидинопентановой кислоты {5-[(2-амино-5-гуанидинопентаноиламино)метил]-пиперазин-2-илметил}амид.

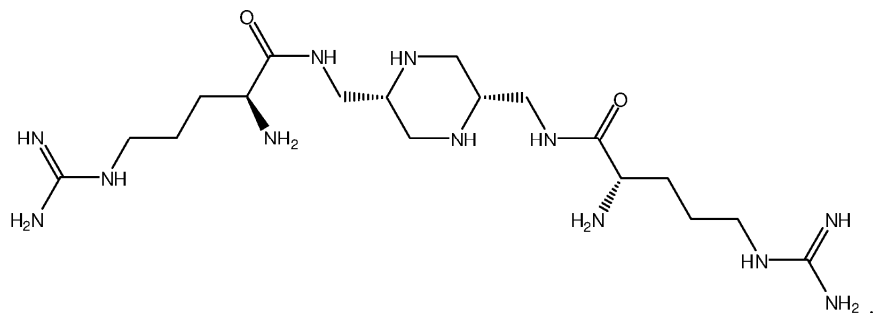
В конкретном варианте реализации соединение формулы (V) представляет собой стереоизомер, изображенный на формуле (VII)

(VII)



В другом конкретном варианте реализации соединение формулы (VI) представляет собой стереоизомер, изображенный на формуле (VIII)

(VIII)



Соединения настоящего изобретения могут быть введены в фармацевтической композиции, такой как водный раствор, в виде болюса и/или внутривенной инфузии, подкожной инъекции или перорально. В предпочтительном варианте реализации соединения вводят инъекцией (внутривенной, внутримышечной или подкожной) в носители, таком как дистиллированная стерильная вода, солевой раствор, буфер-

ный солевой раствор или другое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество для инъекций. В некоторых вариантах реализации ингибитор может быть введен перорально, в слизистую оболочку (назально, пульмонально, вагинально, ректально или буккально) или с помощью депо.

Соединения настоящего изобретения могут быть введены в фармацевтической композиции пациенту, нуждающемуся в реверсировании действия гепарина, НМГ или другой антикоагуляции, опосредованной ингибитором тромбина, в эффективном количестве для восстановления нормальной коагуляции и гемостаза. Фармацевтические композиции, содержащие соединения настоящего изобретения, пригодны для применения в больнице или для не экстренного реверсирования на дому. Их вводят пациенту, нуждающемуся в реверсировании действия гепарина, НМГ или другой антикоагуляции, опосредованной ингибитором тромбина, в эффективном количестве для восстановления коагуляции. Соединения и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, также могут быть использованы для снижения активности гепарин-связывающих факторов роста и/или для полного или частичного реверсирования действия комбинации одного или более антикоагулирующих агентов фактора Па и/или фактора Ха.

Так, соединения настоящего изобретения могут быть использованы в способе полного или частичного реверсирования антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции. Соединения настоящего изобретения также могут быть использованы в составе диагностического набора, например, диагностического набора для определения концентрации антикоагулянта в крови.

Примеры показывают, что DAP напрямую связывает ривароксабан, аписабан, нефракционированный гепарин, фондапаринукс и НМГ, реверсируя действие антикоагулянта. DAP реверсирует *in vivo* антикоагуляцию при пероральном введении ривароксабана и подкожном введении НМГ, по результатам измерения аРТТ, а также при подкожном введении фондапаринукса, по результатам измерения активности Ха у крыс. Реверсирующее действие DAP, подтвержденное статистически значимым уменьшением кровопотери в анализе отсечения хвоста крыс, было продемонстрировано для аписабана, дабигатрана, эдоксабана и ривароксабана. DAP полностью реверсирует действие аписабана и ривароксабана в массовом соотношении доз около 10:1 DAP:антикоагулянт в крови человека *ex vivo*, по результатам измерения с помощью набора анти-Ха. DAP демонстрирует дозозависимое реверсирующее действие в отношении аписабана и ривароксабана в крови человека *ex vivo*. Реверсирование ривароксабана в свежем образце цельной крови человека подтверждено измерениями аРТТ *ex vivo*. DAP не связывает аргатробан в концентрациях до 1:1000 *in vitro*. DAP *in vivo* реверсирует действие дабигатрана, введенного перорально, по результатам измерения аРТТ у крыс. Антикоагулирующее действие на крысах, которым ввели дозу аргатробана, сохранилось после 200х внутривенной дозы DAP, что демонстрирует безопасность DAP и специфичность реверсирующего взаимодействия для гепарина и новых пероральных антикоагулянтов. Таким образом, эти примеры демонстрируют комплексообразование DAP с гепарином и НМГ, а также тот факт, что DAP служит превосходным агентом, реверсирующим действие гепарина, гепарин-подобных соединений и других ингибиторов тромбина, включая дабигатран, одобренные низкомолекулярные гепарины, а также ривароксабан (XARELTO®), фондапаринукс (ARIXTRA®), эдоксабан (LIXIANA®) и аписабан (ELIQUIS®), по результатам *in vitro* анализов с кровью человека, анти-Ха и аРТТ тестов и/или *in vivo* анализа отсечения хвоста у крыс.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой диаграмму теплового потока в зависимости от температуры, измеренную дифференциальной сканирующей калориметрией (ДСК), в которой DAP нагревали от -20 до 200°C ("1" или "первое нагревание"), охлаждали до -20°C и снова нагревали до 200°C ("2" или "второе нагревание").

Фиг. 2 представляет собой диаграмму только DAP, только НМГ и комбинации DAP-НМГ как функцию объемного процента, по сравнению с размером (d, нм), измеренную динамическим светорассеянием (ДСР).

Фиг. 3 представляет собой диаграмму только DAP, только ривароксабана и DAP-ривароксабана в соотношениях 1:1 и 10:1, DAP:ривароксабан как функцию объема (процента), по сравнению с размером (d, нм), измеренную с помощью ДСР.

Фиг. 4 представляет собой диаграмму связывания только DAP, только аписабана и DAP-аписабана в соотношениях 1:1, 10:1 и 100:1 как функцию объема (процента), по сравнению с размером (d, нм), измеренную с помощью ДСР.

Фиг. 5 представляет собой диаграмму связывания только DAP, только фондапаринукса и DAP-фондапаринукса в соотношениях 1:1, 10:1 и 100:1 как функцию объема (процента), по сравнению с размером (d, нм), измеренную с помощью ДСР.

Фиг. 6 представляет собой диаграмму связывания только DAP, только НМГ и DAP-НМГ в соотношениях 1:1, 1:10 и 100:1 как функцию объема (процента), по сравнению с размером (d, нм), измеренную с помощью ДСР.

Фиг. 7 представляет собой диаграмму связывания только DAP, только аргатробана и DAP-аргатробана в соотношениях 1:1, 10:1, 100:1 и 1000:1 как функцию объема (процента), по сравнению с размером (d, нм), измеренную с помощью ДСР.

Фиг. 8 представляет собой диаграмму активированного парциального тромбопластинового времени (аРТТ, секунды), измеренного в зависимости от времени (часы) в течение 5 ч после подкожного введения 10 мг бемипарина (НМГ) крысе. Через 4 ч после испытания крысе ввели внутривенную дозу 200 мг/кг (100 мг) DAP.

Фиг. 9 представляет собой диаграмму активированного парциального тромбопластинового времени (аРТТ, секунды), измеренного в зависимости от времени (часы) после перорального введения PRADAXA® (дабигатран) крысе с последующим внутривенным введением 200 и 100 мг/кг (100г и 50 мг) DAP.

Фиг. 10 представляет собой диаграмму активированного парциального тромбопластинового времени (аРТТ), измеренного в зависимости от времени (часы) после подкожного введения нефракционированного гепарина (НФГ) крысе с последующим внутривенным введением 200 мг/кг (100 мг) и 400 мг/кг (200 мг) DAP.

Фиг. 11 представляет собой диаграмму (секунды), измеренного в зависимости от времени (часы) после перорального введения 5 мг/кг ривароксабана крысе с последующим введением 5 мг/кг (2 мг) DAP.

Фиг. 12 представляет собой диаграмму активной концентрации фондапаринукса (мкг/мл), измеренную в зависимости от времени (минуты после реверсирования) после подкожного введения 5 мг/кг фондапаринукса крысе, с последующим внутривенным введением 200 мг/кг DAP (т.е. "реверсирование").

Фиг. 13 представляет собой диаграмму аРТТ (секунды), измеренную в зависимости от времени (минуты после реверсирования) после перорального введения 15,5 мг/кг PRADAXA® (дабигатран) крысе, с последующим внутривенным введением 100 мг/кг DAP (т.е. "реверсирование").

Фиг. 14 представляет собой диаграмму времени аРТТ (секунды) для 0, 2, 10, 25, 50 и 100 мг введенного внутривенно DAP.

Фиг. 15 представляет собой диаграмму собранной крови (т.е. суммарные кровопотери) за 30 мин в анализе кровотечения при отсечении хвоста крысы, при введении крысам 2 мг ривароксабана и 0 мг DAP, 2 мг ривароксабана и 2,5 мг DAP, 2 мг ривароксабана и 12,5 мг DAP или плацебо дозы реверсирующего агента и антикоагулянта ("плацебо"). В группах по три крысы одного возраста, доза 12,5 мг DAP привела к уменьшению кровопотери до уровня плацебо дозы, со статистически значимой разницей (\*  $p < 0,05$ ) по сравнению с крысами, которым ввели только ривароксабан.

Фиг. 16 представляет собой диаграмму собранной крови (т.е. суммарные кровопотери) за 30 мин в анализе кровотечения при отсечении хвоста крысы, при введении крысам 1,25 мг аписабана и 0 мг DAP, 1,25 мг аписабана и 5 мг DAP, 1,25 мг аписабана и 1,25 мг DAP или плацебо дозы реверсирующего агента и антикоагулянта ("плацебо"). В группах по три крысы одного возраста, дозы 5 и 12,5 мг DAP привели к уменьшению кровопотери до уровня плацебо дозы, со статистически значимой разницей (\*\*  $p < 0,01$ ) по сравнению с крысами, которым ввели только аписабан.

Фиг. 17 представляет собой диаграмму собранной крови (т.е. суммарные кровопотери) за 30 мин в анализе кровотечения при отсечении хвоста крысы, при введении крысам 1,25 мг эдоксабана и 0 мг DAP, 1,25 мг эдоксабана и 12,5 мг DAP или плацебо дозы реверсирующего агента и антикоагулянта ("плацебо"). В группах по три крысы одного возраста, доза 12,5 мг DAP привела к уменьшению кровопотери до уровня плацебо дозы, со статистически значимой разницей (\*  $p < 0,05$ ) по сравнению с крысами, которым ввели только эдоксабан.

Фиг. 18 представляет собой диаграмму собранной крови (т.е. суммарные кровопотери) за 30 мин в анализе кровотечения при отсечении хвоста крысы, при введении крысам 15 мг дабигатрана этексилата и 0 мг DAP, 15 мг дабигатрана этексилата и 5 мг DAP, 15 мг дабигатрана этексилата и 1,25 мг DAP или плацебо дозы реверсирующего агента и антикоагулянта ("плацебо"). В группах по три крысы одного возраста, доза 12,5 мг DAP привела к уменьшению кровопотери до уровня плацебо дозы, со статистически значимой разницей (\*\*  $p < 0,01$ ) по сравнению с крысами, которым ввели только дабигатрана этексилат.

Фиг. 19 представляет собой диаграмму аРТТ (секунды), измеренного в свежей крови человека, обработанной ex vivo 50 мкг/мл DAP, 0,25 мкг/мл ривароксабана, 50 мкг/мл DAP и 0,25 мкг/мл ривароксабана или солевым раствором.

Фиг. 20 представляет собой диаграмму, демонстрирующую эффективную антикоагулирующую концентрацию, измеренную в анализе активности антифактора Ха в плазме человека, обработанной ex vivo 218 мкл/л только ривароксабана или в комбинации с 1250 мг/л DAP и 459 мкг/л только ривароксабана или в комбинации с 6250 мкг/л DAP.

Фиг. 21 представляет собой диаграмму, демонстрирующую эффективную антикоагулирующую концентрацию, измеренную в анализе активности антифактора Ха в плазме человека, обработанной ex vivo 156 мкл/л только аписабана или в комбинации с 1156 мкг/л DAP и 313 мкг/л только аписабана или в комбинации с 3125 мкг/л DAP.

Фиг. 22 представляет собой диаграмму, демонстрирующую эффективную антикоагулирующую концентрацию, измеренную в анализе активности антифактора Ха в плазме человека, обработанной ex vivo 218 мкл/л ривароксабана, отдельно или в комбинации с повышающимися количествами (1,25, 12,5,

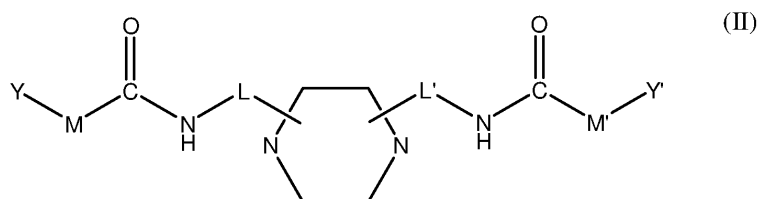
125 и 1250 мкг/л) DAP.

### Подробное описание изобретения

I. Агенты, реверсирующие действие антикоагулянтов.

Описаны новые агенты, реверсирующие действие антикоагулянтов. Соединения настоящего изобретения включают соединения, описанные в настоящем документе, а также их фармацевтически приемлемые соли.

Были разработаны ингибиторы гепарина, гепариновых фрагментов, фондапаринукса и ингибиторов фактора Ха или фактора Па (например, пероральных ингибиторов фактора Ха или фактора Па). Общая структура рассматриваемых агентов, реверсирующих действие антикоагулянтов, представляет собой R-Z-R', где R и R' представляют собой положительно заряженные агенты при физиологическом pH, и могут быть одинаковыми или различными молекулами, а Z представляет собой гидрофобное циклическое или конденсированное кольцевое соединение. В одном варианте реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой соединение, представленное формулой (II), или его фармацевтически приемлемую соль:

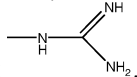


при этом каждый из L и L' представляет собой замещенную или незамещенную C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкиленовую цепь;

каждый из M и M' представляет собой замещенную C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкиленовую цепь,

при этом указанные заместители в алкиленовой цепи выбраны из C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, гидроксила, гидрокси-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, amino, amino-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, алкокси и C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилалкокси;

каждый из Y и Y' представляет собой



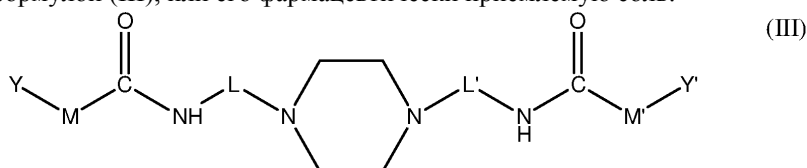
При использовании в настоящем документе алкиленовая цепь представляет собой двухвалентный алкиленовый фрагмент, который имеет длину от C<sub>1</sub> до C<sub>10</sub>, предпочтительно от C<sub>3</sub> до C<sub>6</sub> и который может быть замещенным или незамещенным. Иллюстративные заместители включают алкил, гидроксил, гидроксилалкил, amino, aminoалкил, алкокси, алкилалкокси. При использовании в настоящем документе термин "алкил" представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, предпочтительно C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> прямой или разветвленный углеводород. В некоторых вариантах реализации соединение представляет собой пиперазиновое производное, в котором боковые аминокислотные цепи содержат один или более положительно заряженных атомов или атомов, которые становятся положительно заряженными в физиологических условиях. Примеры включают диаргинин-пиперазин. Другие аминокислоты, которые являются положительно заряженными или становятся положительно заряженными в физиологических условиях, могут быть представлять собой замену аргинина. Термин "ароматические" при использовании в настоящем документе относится к 5-12-членным, предпочтительно 5-, 6- и 7-членным ароматическим, гетероциклическим, конденсированным ароматическим, конденсированным гетероциклическим, биароматическим или бигетероциклическим кольцевым системам, необязательно замещенным. В широком определении, "Ar", используемый в настоящем документе, включает 5-, 6- и 7-членные однокольцевые ароматические группы, которые могут содержать от нуля до четырех гетероатомов, например бензол, пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, триаол, пиазол, пиридин, пиазин, пиридазин и пиримидин и т.п. Арильные группы, имеющие гетероатомы в кольцевой структуре, также могут быть упомянуты как "арильные гетероциклы" или "гетероароматические". Ароматическое кольцо может быть замещенным в одном или более положениях кольца такими заместителями, как описаны выше, например галоген, азид, алкил, аралкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, гидроксил, алкоксил, amino, нитро, сульфидрил, имино, амидо, фосфонат, фосфинат, карбонил, карбоксил, силил, простой эфир, алкилтио, сульфонил, сульфонамидо, кетон, альдегид, сложный эфир, гетероцикл, ароматические или гетероароматические фрагменты, -CF<sub>3</sub>, -CN или т.п.

Термин "Ar" включает также полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических кольца, в которых два или более атома углерода являются общими для двух смежных колец (т.е. "конденсированные кольца", при этом по меньшей мере одно из указанных колец является ароматическим, например, другое циклическое кольцо или кольца могут быть циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами и/или гетероциклами. Примеры гетероциклических колец включают, но не ограничиваясь этим, бензимидазолил, бензофуранил, бензотиофуранил, бензотиофенил, бензоксазолил, бензоксазолинил, бензтиазолил, бензтриазолил, бензтетразолил, бензизоксазолил, бензизотиазолил, бензимидазолинил, карбазолил, 4aH-карбазолил, карболинил, хроманил, хроменил, циннолинил, декагидрохинолинил, 2H,6H-1,5,2-дифтазинил, дигидрофурано[2,3-b]тетрагидрофуран, фуранил, фуразанил, имида-

золидинил, имидазолинил, имидазолил, 1Н-индазолил, индоленил, индолинил, индолизинил, индолил, 3Н-индолил, изатиноил, изобензофуранил, изохроманил, изоиндазолил, изоиндолинил, изоиндолил, изохинолинил, изотиазолил, изоксазолил, метилендиоксифенил, морфолинил, нафтириди-  
нил, октагидроизохинолинил, оксадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, оксазолидинил, оксазолил, оксиндолил, пиримидинил, фенантринидинл, фенантро-  
линил, феназинил, фенотиазинил, феноксатинил, феноксазинил, фталазинил, пиперазинил, пиперидинил, пиперидонил, 4-пиперидонил, пиперонил, птеридинил, пуринил, пиранил, пиразинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиразолил, пиридазинил, пиридооксазол, пиридоимидазол, пиридотиазол, пиридинил, пи-  
ридил, пиримидинил, пирролидинил, пирролинил, 2Н-пирролил, пирролил, хиназолинил, хинолинил, 4Н-хинолизинил, хиноксалинил, хинуклидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидроизохинолинил, тетрагидрохинолинил, тетразолил, 6Н-1,2,5-тиадазинил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, тиантренил, тиазолил, тиенил, тиенотиазолил, тиенооксазолил, тиеноимидазолил, тиофенил и ксантенил.

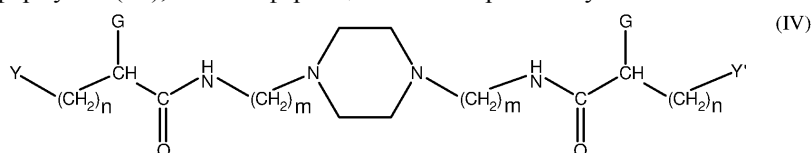
"Гетероцикл" или "гетероциклический" при использовании в настоящем документе относится к циклическому радикалу, присоединенному через кольцевой атом углерода или азота моноциклического или бициклического кольца, содержащему 3-10 кольцевых атомов, предпочтительно от 5 до 6 кольцевых атомов, состоящему из углерода и от одного до четырех гетероатомов, каждый выбран из группы, состоящей из перексидного кислорода, серы и N(R), где R отсутствует или представляет собой H, O, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, фенил или бензил, и необязательно содержащему 1-3 двойные связи, и необязательно замещенному одним или более заместителями. Примеры гетероциклических колец включают, но не ограничиваясь этим, бензимидазолил, бензофуранил, бензотиофуранил, бензотиофенил, бензоксазолил, бензоксазолинил, бензтиазолил, бензтриазолил, бензтетразолил, бензизоксазолил, бензизотиазолил, бензимидазолинил, карбазолил, 4aH-карбазолил, карболинил, хроманил, хроменил, циннолинил, декагидрохинолинил, 2H,6H-1,5,2-дитиазинил, дигидрофуро[2,3-b]тетрагидрофуран, фуранил, фуразанил, имидазолидинил, имидазолинил, имидазолил, 1H-индазолил, индоленил, индолинил, индолизинил, индолил, 3H-индолил, изатиноил, изобензофуранил, изохроманил, изоиндазолил, изоиндолинил, изоиндолил, изохинолинил, изотиазолил, изоксазолил, метилендиоксифенил, морфолинил, нафтиридилил, октагидроизохинолинил, оксадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, оксазолидинил, оксазолил, оксиндолил, пиримидинил, фенантринидинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, феноксатинил, феноксазинил, фталазинил, пиперазинил, пиперидинил, пиперидонил, 4-пиперидонил, пиперонил, птеридинил, пуринил, пиранил, пиразинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиразолил, пиридазинил, пиридооксазол, пиридоимидазол, пиридоотиазол, пиридинил, пиридил, пиримидинил, пирролидинил, пирролинил, 2H-пирролил, пирролил, хиназолинил, хинолинил, 4H-хинолизинил, хиноксалинил, хинуклидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидроизохинолинил, тетрагидрохинолинил, тетразолил, 6H-1,2,5-тиадиазолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, тиантренил, тиазолил, тиенил, тиенотиазолил, тиенооксазолил, тиеноимидазолил, тиофенил и ксантенил.

В другом варианте реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой соединение, представленное формулой (III), или его фармацевтически приемлемую соль:



где  $L, L', M, M', Y$  и  $Y'$  являются такими, как описано ранее.

В другом варианте реализации настоящего изобретения ингибитор представляет собой соединение, представленное формулой (IV), или его фармацевтически приемлемую соль:



где  $Y$  и  $Y'$  являются такими, как описано ранее;

и равен от 3 до 5;

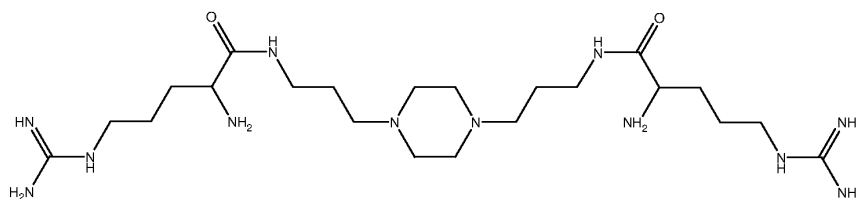
т равен от 3 до 6;

G выбран из  $-\text{NH}_2$  и  $\text{OH}$ .

Наиболее предпочтительно G представляет собой amino. Так, в одном из вариантов реализации соединения настоящего изобретения представляет собой диаргининпиперазин ("DAP"), такой как соединение формулы V, или родственное соединение формулы (VI), или фармацевтически приемлемые соли любого из этих соединений:

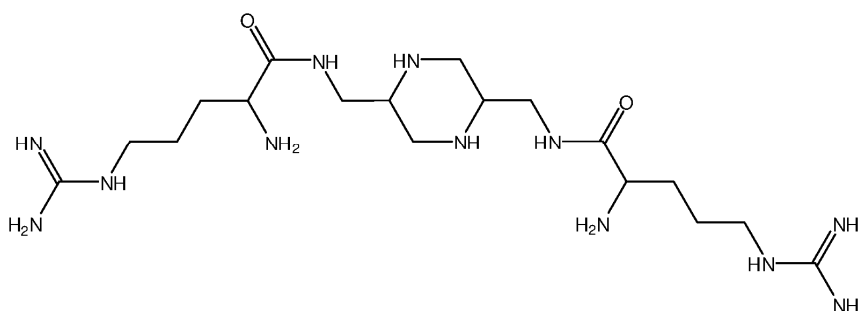


(V)



2-амино-5-гуанидинопентановой кислоты (3-{4-[3-(2-амино-5-гуанидинопентаноиламино)пропил]-пиперазин-1-ил}пропил)амид; или

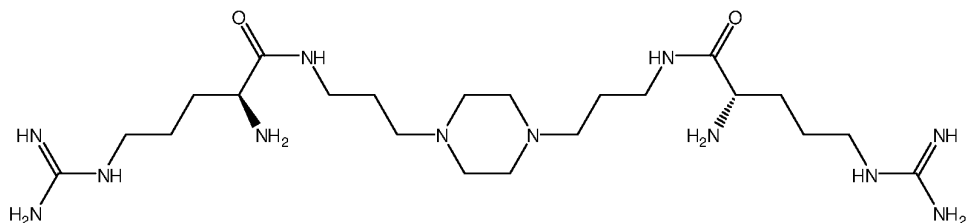
(VI)



2-амино-5-гуанидинопентановой кислоты {5-[(2-амино-5-гуанидинопентаноиламино)метил]-пиперазин-2-илметил}амид.

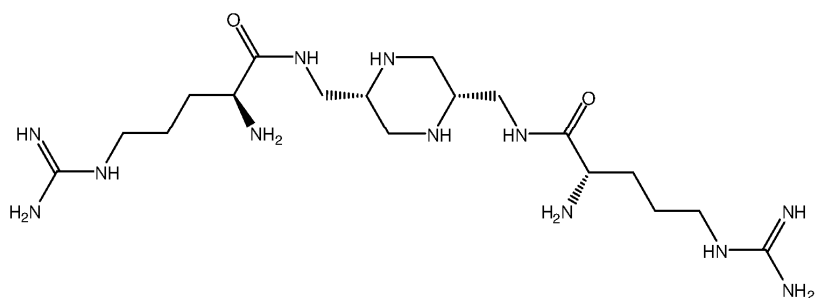
В конкретном варианте реализации соединение формулы (V) представляет собой стереоизомер, изображенный на формуле (VII)

(VII)



В другом конкретном варианте реализации соединение формулы (VI) представляет собой стереоизомер, изображенный на формуле (VIII)

(VIII)



Выражение "фармацевтически приемлемая соль" соединения, используемое в настоящем документе, означает соль, которая является фармацевтически приемлемой и которая обладает заданной фармакологической активностью исходного соединения. Фармацевтически приемлемые соли включают соли кислотных или основных групп, присутствующих в соединениях настоящего изобретения. Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот включают, но не ограничиваясь этим, гидрохлоридные, гидробромидные, гидройодидные, нитратные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, гидрофосфатные, изоникотинатные, ацетатные, лактатные, салицилатные, цитратные, тартратные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные, глюкоаронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-толуолсульфонатные и памоатные (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-

золсульфонатные, п-толуолсульфонатные и памоатные (т.е. 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли. Подходящие соли оснований включают, но не ограничиваясь этим, соли алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия, цинка и диэтанолamina.

Соединения настоящего изобретения подавляют активность ингибиторов коагуляции. Один из предложенных механизмов действия соединений настоящего изобретения заключается в связывании отрицательно заряженных молекул (например, фондапаринукса, нефракционированного гепарина, НМГ, описанных в настоящем документе). Другие ингибиторы коагуляции (например, ингибиторы фактора Па и фактора Ха, такие как дабигатран, аписабан, эдоксабан и ривароксабан, описанные в настоящем документе) также имеют отрицательные заряды; следовательно, соединения настоящего изобретения могут ингибировать эти ингибиторы коагуляции за счет нейтрализации их отрицательно заряженных фрагментов.

Другой предложенный механизм действия соединения настоящего изобретения заключается в слабых физических взаимодействиях, таких как водородное связывание и гидрофобные взаимодействия с ингибиторами коагуляции. Пероральные ингибиторы фактора Па и Ха имеют гидрофобные части, которые могут обуславливать гидрофобное связывание с соединением настоящего изобретения, например, DAP. Так, в некоторых вариантах реализации соединения настоящего изобретения содержат по меньшей мере один циклический гидрофобный фрагмент, например, одно кольцо или комбинацию алифатических или ароматических колец, включая конденсированные кольца. В других вариантах реализации соединения настоящего изобретения содержат по меньшей мере один циклический гидрофобный фрагмент и по меньшей мере два положительно заряженных или частично заряженных фрагмента при физиологическом pH.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, один или оба аргинина в соединениях формул (V) и (VI) (или соединения формул (VII) и (VIII)) замещены одной или более положительно заряженными аминокислотами, их производными или аналогичным образом заряженными соединениями, например, лизином, гистидином, орнитином. Аргинины в соединениях формул (V) и (VI) или положительно заряженные аминокислоты, заменяющие такие аргинины, могут быть природными аминокислотами (т.е. L-аминокислотами), их энантиомерами (т.е. D-аминокислотами) или их рацемическими или иными смесями. "Энантиомеры" относятся к двум стереоизомерам соединения, которые не совмещаются с зеркальным отражением друг друга. Стереохимические определения и обозначения, используемые в настоящем документе, как правило, следуют указаниям публикаций S.P. Parker, ред., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984), McGraw-Hill Book Company, Нью-Йорк; Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994), John Wiley & Sons, Inc., Нью-Йорк. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, т.е. они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризованного света. В описании оптически активного соединения приставки D и L или R и S используют для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра(ов). Приставки D и L или (+) и (-) используют для обозначения знака вращения плоскополяризованного света соединением настоящего изобретения, где (-) или L обозначает, что соединение является левовращающим. Соединение с приставкой (+) или D является правовращающим. Для данной химической структуры эти стереоизомеры являются идентичными, за исключением того, что они представляют собой зеркальные отражения друг друга. Отдельный стереоизомер может упоминаться также как энантиомер, а смесь таких изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 упоминается как рацемическая смесь или рацемат, что может иметь место, если химическая реакция или способ не является стереоселективным или стереоспецифичным. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольной смеси двух энантиомерных частиц, лишенной оптической активности. В других вариантах реализации настоящего изобретения соединение настоящего изобретения содержит по меньшей мере один циклический гидрофобный фрагмент, например, одно кольцо или комбинацию алифатических и ароматических колец, включая конденсированные кольца. Рассматриваемые соединения содержат по меньшей мере один циклический гидрофобный фрагмент и по меньшей мере два положительно заряженных или частично заряженных фрагмента при физиологическом pH. При разработке терапевтических агентов на пептидной основе следует учитывать особые ограничения, поскольку такие агенты могут вызывать нежелательные и зачастую сильные иммунологические реакции при введении субъекту. Соединение настоящего изобретения разработано так, что оно имеет достаточно низкий молекулярный вес для минимизации проблем иммуногенности. В одном из вариантов реализации, во избежание активации иммунного ответа, соединение разработано так, что его молекулярный вес составляет менее чем около 5000 Да, такое значение как около 1000 Да или менее, например около 500 Да. В одном из вариантов реализации молекулярный вес соединения составляет около 512 Да. Предпочтительно, что соединения настоящего изобретения не связываются или иным образом не ухудшают функцию ERG, калиевого ионного канала, который способствует электрической проводимости сердца. Ингибирование этого калиевого канала может приводить к потенциально летальному удлинению интервала QT, а некоторые в остальном успешные потенциальные лекарственные соединения демонстрируют связывание ERG.

Кроме того, предпочтительно, что соединение настоящего изобретения не ингибирует или не служит в качестве подложки для связанных с мембраной ферментов цитохрома р450 (CYP). CYP представ-

ляют собой главные ферменты, участвующие в метаболизме лекарства, и модуляция активности CYP может препятствовать клиренсу и метаболизму других лекарств, введенных субъектов, вызывая нежелательные взаимодействия между лекарствами.

Также предпочтительно, что соединения настоящего изобретения не проявляют существенного связывания белка плазмы *in vitro* (например, связывания альбумина). Поскольку соединения настоящего изобретения в значительной степени не связаны с белками плазмы, они демонстрируют короткие периоды активности, минимизируя риск передозировки в результате их накопления.

## II. Синтез агентов, реверсирующих действие антикоагулянтов.

Соединения и их фармацевтически приемлемые соли, описанные в настоящем документе, получают с помощью различных способов, исходя из имеющихся в продаже соединений, известных соединений или соединений, полученных по известным способам. Иллюстративные синтетические пути для получения одного из соединений, описанных в настоящем документе (соединение формулы (V), диаргининпиперазин, "DAP"), включены в схемы, представленные ниже. Представленные ниже схемы применимы также для стереоизомерного соединения DAP формулы (VII) с выбором соответствующих стереоизомерных исходных соединений. Другие соединения настоящего изобретения могут быть синтезированы по таким же схемам синтеза. Специалистам в данной области понятно, что порядок стадий, представленных в настоящем документе, может быть изменен для размещения функциональности в целевой молекуле. Специалистам в данной области понятно также, что для синтеза могут быть необходимы различные стадии защиты и снятия защиты. Необходимость защиты и снятия защиты, а также выбор подходящих защитных групп представлен, например, в публикации Greene and Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 2-е изд., John Wiley & Sons (1991), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения защитная группа представляет собой третичную бутилоксикарбонильную группу (Boc). В других вариантах реализации настоящего изобретения защитная группа представляет собой 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильную группу (Pbf). В другом варианте реализации защитная группа для аминокислоты может быть, но не ограничиваясь этим, 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонилом (Pmc). Защитные группы могут быть удалены множеством способов. Снятие защитной группы включает, например, обработку защищенного соединения трифторуксусной кислотой (TFA), водным раствором HCl или нагреванием в уксусной кислоте.

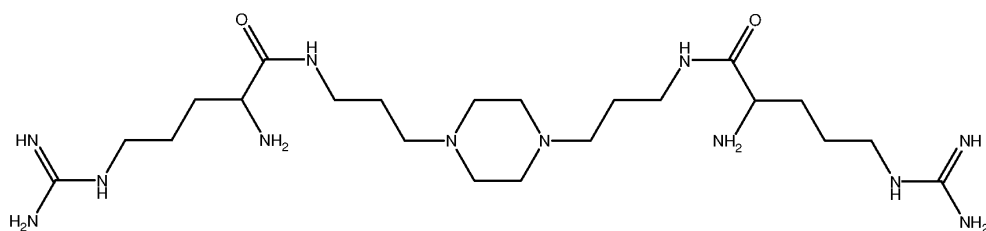
Поскольку снятие защитных групп, например, удаление защитных групп в кислотных условиях, может приводить к образованию катионных частиц, которые могут алкилировать функциональные группы в пептидной цепи, на стадии снятия защиты могут быть добавлены поглотители, которые взаимодействуют со всеми свободными химически активными частицами. Примеры поглотителей включают, но не ограничиваясь этим, воду, производные анизола и производные тиола. Так, в одном из вариантов реализации снятие защитных групп включает обработку защищенного соединения TFA и поглотителем (например, TFA и водой).

На стадиях синтеза могут быть использованы различные растворители, например, органические растворители. Подходящие растворители включают, но не ограничиваясь этим, диметилсульфоксид, диметилформамид (DMF), тетрагидрофуран, метанол, этанол, метилхлорид, толуол и ацетон. В некоторых вариантах реализации растворитель представляет собой DMF.

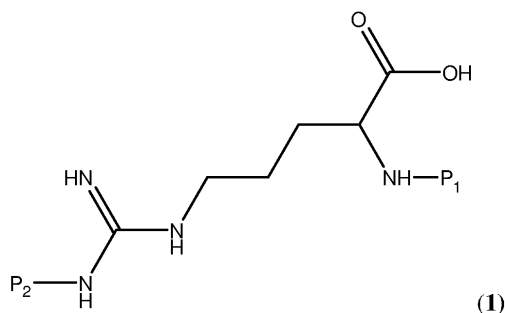
На стадиях синтеза могут быть использованы подходящие агенты связывания кислот. Они включают, но не ограничиваясь этим, органические основания, такие как, например, пиридин, триэтиламин, триэтанолламин, 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU) и диизопропилэтиламин (DIEA); и неорганические основания, такие как, например, гидрид натрия, карбонат калия и карбонаты натрия. В некоторых вариантах реализации агент связывания кислот представляет собой DIEA.

Синтез может включать реагенты связывания пептида. Реагенты связывания пептида могут включать, но не ограничиваясь этим, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), N-гидроксисбензотриазол (HOBt), карбонилдиимидазол (CDI), дициклогексилкарбодиимид (DCC), активный эфир N-гидроксисукцинимид (OSu), O-бензотриазол-N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU) и их комбинации. В одном из вариантов реализации реагент связывания пептида представляет собой HBTU. В другом варианте реализации реагент связывания пептида представляет собой EDC/HOBt. В другом варианте реализации реагент связывания пептида представляет собой активный эфир OSu. Кроме того, синтез может включать стадию, на которой очищают неочищенный продукт, например, колоночной хроматографией. Заданные продукты на каждой стадии или группе стадий могут быть разделены и/или очищены до заданной степени однородности с помощью методик, общеизвестных в данной области. Как правило, такое разделение включает многофазную экстракцию, кристаллизацию из растворителя или смеси растворителей, дистилляцию, сублимацию или хроматографию. Хроматография может включать любое количество способов, включая, например: способы и оборудование обращенно-фазовой и нормально-фазовой; эксклюзионной; ионообменной; жидкостной хроматографии высокого, среднего и низкого давления; аналитическую маломасштабную; хроматографию с псевдодвижущимся слоем (ПДС) и препаративную тонкослойную или толстослойную хроматографию, а также приемы маломасштабной

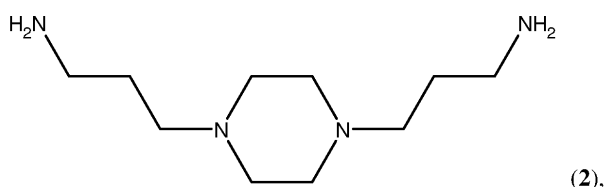
тонкослойной и флэш-хроматографии. На одной из схем соединение формулы V (DAP)  
(V)



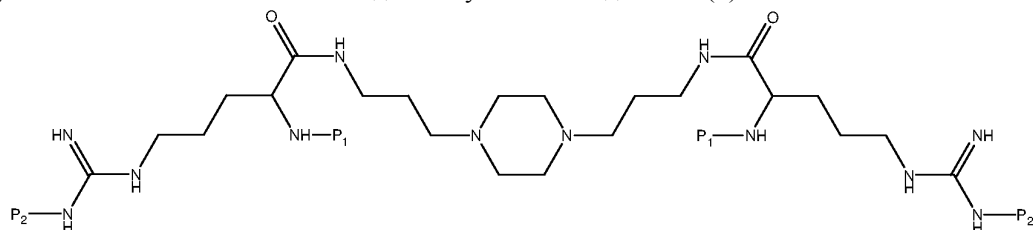
синтезируют взаимодействием избытка эквивалентов (например, по меньшей мере около 2 экв.) соединения (1)



с 1 экв. соединения (2)



в присутствии агента связывания пептида с получением соединения (3)



(3),

где  $P_1$  представляет собой защитную группу, а  $P_2$  представляет собой защитную группу или водород.

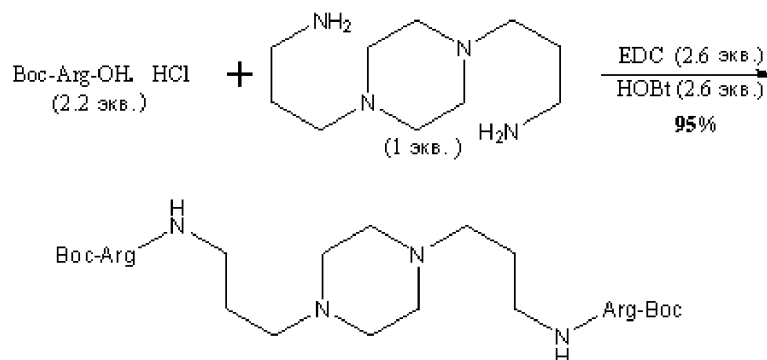
В одном из вариантов реализации реагент связывания пептида представляет собой HBTU, EDC/HOBt или активный эфир OSu. В одном из вариантов реализации защитная группа  $P_1$  представляет собой Boc. В другом варианте реализации защитная группа  $P_2$  представляет собой Pbf. В другом варианте реализации защитная группа  $P_1$  представляет собой Boc, а  $P_2$  представляет собой водород.

Затем соединение (3) может быть очищено. Очистка может включать различные способы колоночной хроматографии, известные в данной области.

Защитная группа соединения (3) может быть удалена различными способами, известными в данной области, с получением соединения формулы (V). Снятие защиты может быть достигнуто, например, удалением защитных групп с помощью трифторуксусной кислоты (ТФК) и воды, ТФК и воды или другого поглотителя, включая, но не ограничиваясь этим, водный раствор HCl, или нагреванием в уксусной кислоте.

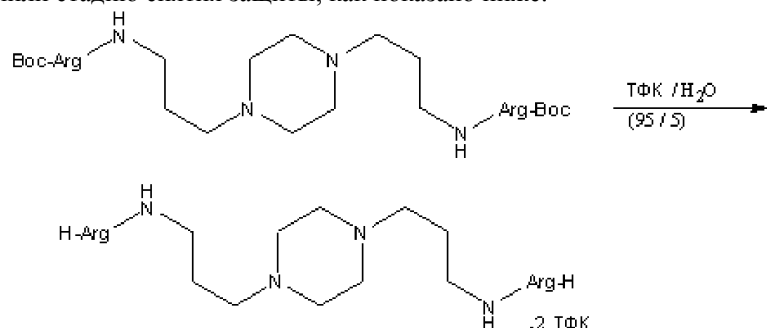
Соединение может быть дополнительно очищено с помощью способа колоночной хроматографии, такого как ионообменная хроматография с солевыми буферами или препаративная ВЭЖХ с трифторуксусной кислотой или уксусной кислотой в качестве буфера.

На более конкретной схеме указанное связывание включает взаимодействие соединения 1, где  $P_1$  представляет собой Boc и  $P_2$  представляет собой водород (изображенного ниже как Boc-Arg-OH HCl), с соединением (2), как показано ниже:



Чистота полученного неочищенного продукта составила более 95%, по данным тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Затем выполнили стадию снятия защиты, как показано ниже:



Продукт со снятой защитой очистили препаративной ВЭЖХ, используя буфер 1% уксусной кислоты. Наблюдали продукт с чистотой >98%. Остаточную ТФК удалили с помощью мелкосерийной смолы DOWEX. Молекулярный вес DAP (соединения формулы (V)) составил 512,4, и указанное соединение, синтезированное по представленной выше схеме, демонстрировало следующий основной пик масс-спектропии:  $[M+H]^+ = 513,4$ .

### III. Фармацевтические композиции.

Представлены фармацевтические композиции, содержащие соединения, описанные в настоящем документе. Такие композиции могут содержать, помимо соединения настоящего изобретения, фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Термин "фармацевтически приемлемый" означает нетоксичный материал, который совместен с физическими и химическими характеристиками активного ингредиента и не ухудшает эффективность биологического действия активного соединения. Композиции могут содержать различные разбавители, наполнители, соли, буферы, стабилизаторы, солюбилизаторы и другие материалы, хорошо известные в данной области. Характеристики носителя зависят от способа введения и являются в основном общеизвестными в данной области. Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может обеспечивать возможность энтерального введения - введения композиции, где указанная композиция абсорбируется через пищеварительный тракт, например, пероральный прием, ректальное введение. В других вариантах реализации фармацевтическая композиция настоящего изобретения может обеспечивать возможность парентерального введения - введения композиции, где указанную композицию вводят способом, отличным от пищеварительного тракта, например, внутривенным, подкожным, кожным, назальным, пульмональным, вагинальным, буккальным путем.

Подходящие фармацевтические композиции, например композиции для перорального введения, могут быть получены так, как описано в ссылках, таких как "Pharmaceutical dosage form tablets", ред. Liberman et. al. (Нью-Йорк, Marcel Dekker, Inc., 1989 г.), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20-е изд., Lippincott Williams & Wilkins, Балтимор, штат Мэриленд, 2000 г., и "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6-е изд., Ansel et.al. (Медиа, штат Пенсильвания: Williams and Wilkins, 1995 г.), включенных в настоящий документ посредством ссылки, в которых представлена информация о носителях, материалах (например, материалах покрытий), оборудовании и способах получения таблеток и капсул, а также лекарственных форм таблеток, капсул и гранул с замедленным высвобождением.

Примеры подходящих материалов покрытий включают, но не ограничиваясь этим, целлюлозные полимеры, такие как целлюлозы ацетат-фталат, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлозы фталат и гидроксипропилметилцеллюлозы ацетат-сукцинат;

поливинилацетат-фталат, полимеры и сополимеры акриловой кислоты, и метакриловые смолы, которые имеются в продаже под торговым названием Eudragit (Roth Pharma, Вестерштадт, Германия), зеин, шеллак и полисахариды. Кроме того, материалы покрытий могут содержать стандартные носители, такие как пластификаторы, пигменты, красители, глиданты, стабилизаторы, порообразователи и поверхностно-активные вещества.

Необязательные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, присутствующие в таблетках, шариках, гранулах или частицах, содержащих лекарство, включают, но не ограничиваясь этим, разбавители, связующие вещества, смазывающие вещества, средства для улучшения распадаемости таблеток, красители, стабилизаторы и поверхностно-активные вещества.

Разбавители, также называемые "наполнители", обычно необходимы для увеличения объема твердой лекарственной формы для обеспечения удобного размера для прессования таблеток или формирования шариков и гранул. Подходящие разбавители включают, но не ограничиваясь этим, дигидрат дикальция фосфата, сульфат кальция, лактозу, сахарозу, маннит, сорбит, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, каолин, хлорид натрия, сухой крахмал, гидролизованные крахмалы, прежелатинизированный крахмал, диоксид кремния, оксид титана, силикат магния-алюминия и порошкообразный сахар.

Связующие вещества используют для придания когезивных качеств твердой лекарственной композиции и для обеспечения за счет этого целостности таблетки или шарика, или гранулы после формирования лекарственных форм. Подходящие связующие материалы включают, но не ограничиваясь этим, крахмал, прежелатинизированный крахмал, желатин, сахара (включая сахарозу, глюкозу, декстрозу, лактозу и сорбит), полиэтиленгликоль, воски, природные и синтетические смолы, такие как гуммиарабик, трагакант, альгинат натрия, целлюлозы, включая гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, этилцеллюлозу и вигум, а также синтетические полимеры, такие как сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, сополимеры метакриловой кислоты, сополимеры метилметакрилата, сополимеры аминокислот-метакрилата, полиакриловую кислоту/полиметакриловую кислоту и поливинилпирролидон.

Смазывающие вещества используют для облегчения производства таблеток. Примеры подходящих смазывающих веществ включают, но не ограничиваясь этим, стеарат магния, стеарат кальция, стеариновую кислоту, бегенат глицерина, полиэтиленгликоль, тальк и минеральное масло.

Средства для улучшения распадаемости таблеток используют для облегчения распада лекарственной формы или "разрушения" после введения, и они, как правило, включают, но не ограничиваясь этим, крахмал, натрия крахмалгликолят, натрий-карбоксиметил крахмал, карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилцеллюлозу, прежелатинизированный крахмал, глины, целлюлозу, альгинин, смолы или поперечно сшитые полимеры, такие как поперечно сшитый ПВП (Polyplasdone XL производства GAF Chemical Corp).

Стабилизаторы используют для ингибирования или подавления реакций разложения лекарства, которые включают, например, окислительные реакции. Поверхностно-активные вещества могут быть анионными, катионными, амфотерными или неионогенными поверхностно-активными агентами. Подходящие анионные поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваясь этим, вещества, содержащие ионы карбоксилата, сульфоната и сульфата. Примеры анионных поверхностно-активных веществ включают длинноцепные алкилсульфонаты и алкил-арилсульфонаты натрия, калия, аммония, такие как додецилбензолсульфонат натрия; диалкилнатрия сульфосукцинаты, такие как додецилбензолсульфонат натрия; диалкилнатрия сульфосукцинаты, такие как натрия бис-(2-этилтиоксил)сульфосукцинат; и алкилсульфаты, такие как лаурилсульфат натрия. Катионные поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваясь этим, четвертичные аммониевые соединения, такие как бензалкония хлорид, бензетония хлорид, цетримония бромид, стеарил-диметилбензил-аммония хлорид, полиоксиэтилен и амин кокосового масла. Примеры неионогенных поверхностно-активных веществ включают этиленгликоля моностеарат, пропиленгликоля миристат, глицерилмоностеарат, глицерилстеарат, полиглицерил-4-олеат, сорбитан ацилат, сахарозы ацилат, ПЭГ-150 лаурат, ПЭГ-400 монолаурат, полиоксиэтилена монолаурат, полисорбаты, полиоксиэтилена октилфениловый эфир, ПЭГ-1000 цетиловый эфир, полиоксиэтилена тридециловый эфир, полипропиленгликоля бутиловый эфир, Poloxamer® 401, стеароил-моноизопропаноламид и полиоксиэтилена гидрированный талловый амид. Примеры амфотерных поверхностно-активных веществ включают натрия N-додецил-бета-аланин, натрия N-лаурил-бета-иминодипропионат, миристоамфоацетат, лаурил-бетаин и лаурил-сульфобетаин.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут быть разработаны для обеспечения замедленного, устойчивого, пульсирующего или другого модифицированного высвобождения.

При необходимости, таблетки, шарики, гранулы или частицы также могут небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие средства, красители, pH буферные агенты и консерванты. Для усиления поглощения или модификации высвобождения также могут быть использованы биоадгезивные композиции. Такие композиции известны в данной области. См., например, заявку на патент США № 20060045865, автор Jacob, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Также могут быть применимы фармацевтические композиции, обеспечивающие возможность доставки назальным или пульмональным введением. Аэрозоли для доставки терапевтических агентов в дыхательные пути описаны, например, в публикации Adjei, A. and Garren, J. *Pharm. Res.*, 7: 565-569 (1990) и Zanen, P. and Lamm, J.-W.J. *Int. J. Pharm.*, 114: 111-115 (1995). Дыхательные пути включают верхние дыхательные пути, в том числе ротоглотку и гортань, за ними следуют нижние дыхательные пути, которые включают трахею, затем ответвления на бронхи и бронхиолы. Верхние и нижние дыхательные пути называют дыхательными путями, в которых не происходит газообмен. Конечные бронхиолы затем делятся на дыхательные бронхиолы, которые затем ведут к окончательной зоне дыхания, альвеолам или глубоким легким. Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," в *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313 (1990). Глубокие легкие или альвеолы, представляют собой основную мишень для ингаляционных терапевтических аэрозолей для системной доставки лекарств.

Лекарства, вводимые ингаляцией, могут принимать форму жидких аэрозольных композиций.

Для инъектируемых композиций (например, внутривенных композиций) носитель представляет собой дистиллированную стерильную воду, солевой раствор, буферный солевой раствор или другое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество для инъекций. Добавки могут включать консерванты и кислоты или основания для регулировки pH, для изменения растворимости или поглощения.

В одном из вариантов реализации, если фармацевтическая композиция содержит соединение DAP формулы (V) (или его стереоизомер формулы (VII)), и указанная композиция обеспечивает возможность парентерального введения в форме инъекции, то соединение растворяют в воде с подходящими модификаторами тоничности и моляльности (как фосфатно-солевой буферный раствор). Растворимость DAP в воде составляет более 100 мг/мл. В одном из вариантов реализации DAP представлен в виде стерильного раствора для внутривенного введения. В одном аспекте моляльность фармацевтической композиции, в которой DAP обеспечивает возможность внутривенного введения, доведена до 290 мосмоль/л с помощью хлорида натрия, а pH доведен до 7,4 с помощью гидроксида натрия. Предпочтительно фармацевтическую композицию вводят в виде внутривенного болюса с медленным струйным введением.

#### IV. Способы применения.

В настоящем изобретении представлен способ полного или частичного реверсирования антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения (например, соединения формулы (I)-(VII) или (VIII)) или его фармацевтически приемлемой соли. В настоящем изобретении представлен также способ ускорения коагуляции у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный субъект принимает ингибитор коагуляции, который включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли. Кроме того, в настоящем изобретении представлен способ нейтрализации или подавления действия ингибитора коагуляции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли.

В настоящем изобретении ингибитор коагуляции (упоминаемый также как антикоагулянт) представляет собой молекулу, которая ингибирует процесс коагуляции. Иллюстративные ингибиторы коагуляции включают, но не ограничиваясь этим, активаторы антитромбина (например, нефракционированный гепарин и НМГ), ингибиторы фактора IIa и ингибиторы фактора Xa.

#### Гепарин.

Гепарин представляет собой природный мукополисахарид, который действует в организме в качестве кофактора антитромбина для предотвращения внутрисосудистого свертывания. Это вещество вырабатывается базофилами и мастоцитами, которые в большом количестве встречаются в соединительной ткани, окружающей капилляры, в частности, в легких и в печени. В форме натриевой соли гепарин терапевтически используют в качестве антикоагулянта.

#### Низкомолекулярный гепарин.

Низкомолекулярный гепарин (НМГ) получают из гепарина, используя различные способы деполимеризации, включая окислительную деполимеризацию с пероксидом водорода, которая используется в производстве ардепарина (NORMIFLO®); дезаминирующее расщепление с изоамил-нитритом, которое используется в производстве цертопарина (SANDOPARIN®); щелочное бета-элиминирующее расщепление бензилового эфира гепарина, которое используется в производстве эноксапарина (LOVENOX® и CLEXANE®); окислительную деполимеризацию с  $\text{Cu}^{2+}$  и пероксидом водорода, которая используется в производстве парнапарина (FLUXUM®); бета-элиминирующее расщепление с помощью фермента гепариназы, которое используется в производстве тинзапарина (INNOHEP® и LOGIPARIN®); дезаминирующее расщепление с азотистой кислотой, которое используется в производстве дальтепарина (FRAGMENT®), ревипарина (CLIVARIN®) и надропарина (FRAXIPARIN®), что приводит к образованию неприродного остатка ангидроманнозы на восстановительном конце полученных олигосахаридов. Затем он может быть преобразован в ангидроманнит с помощью подходящего восстанавливающего аген-

та. Химическое и ферментативное бета-элиминирование приводит к образованию неприродного ненасыщенного уронатного остатка (UA) на не восстановительном конце. Обзор антикоагулирующего действия некоторых НМГ представлен в табл. 1.

Таблица 1

Данные молекулярного веса и антикоагулирующего действия  
существующих продуктов НМГ

НМГ	Средний молекулярный вес	Отношение активности анти-Ха/анти-Па
БЕМИПАРИН	3600	9,7
ЦЕРТОПАРИН	5400	2,4
ДАЛЬТЕПАРИН	6000	2,5
ЭНОКСАПАРИН	4500	3,9
НАДРОПАРИН	4300	3,3
ПАРНАПАРИН	5000	2,3
РЕВИПАРИН	4400	4,2
ТИНЗАПАРИН	6500	1,6

Выборка из публикации Gray E. et al., Thromb Haemost, 99: 807-818 (2008).

Клинически, НМГ (средний молекулярный вес около 4,5 кДа) отличается от гепарина (т.е. "нефракционированного гепарина"; средний молекулярный вес около 15 кДа) в различных аспектах: (1) для НМГ требуется менее частое подкожное дозирование для послеоперационной профилактики венозной тромбоэмболии; (2) для НМГ требуется однократная или двукратная суточная инъекция для пациентов, проходящих лечение венозной тромбоэмболии и стенокардии, вместо внутривенной инфузии, необходимой в случае с гепарином; (3) для НМГ не требуется мониторинг параметра коагуляции aPTT; (4) НМГ обеспечивает меньший риск кровотечения; (5) долговременное применение НМГ обеспечивает меньший риск остеопороза; и (6) НМГ обеспечивает меньший риск гепарин-индуцированной тромбоцитопении (потенциальный побочный эффект введения гепарина). Однако антикоагулирующее действие гепарина, как правило, обратимо при введении сульфата протамина, тогда как действие протамина на НМГ ограничено. Кроме того, НМГ слабее действует на активность тромбина (фактор Па), по сравнению с гепарином, тогда как НМГ и гепарин имеют одинаковое действие на активность фактора Ха.

Ингибиторы тромбина и другие ингибиторы фактора Па или Ха.

Примеры ингибиторов тромбина (фактора Па) и фактора Ха включают антикоагулянты, такие как дабигатран (PRADAXA®), ривароксабан (XARELTO®), аписабан (ELIQUIS®), эдоксабан (LIXIANA®), фондапаринукс (ARIXTRA®) и аргатробан (ARGATROBAN®).

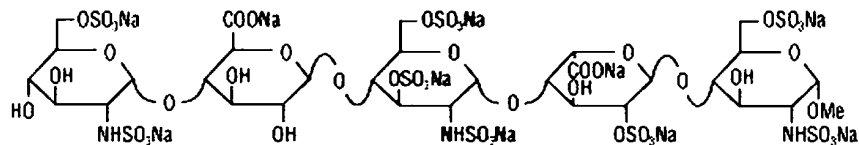
Химическое название перорального антикоагулянта PRADAXA®, дабигатрана этексилат-мезилата, прямого ингибитора тромбина: ®-аланин, N-[[2-[[[4-[[[гексилокси]карбонил]амино]иминометил]фенил]-амино]метил]-1-метил-1Н-бензимидазол-5-ил]карбонил]-N-2-пиридинил-, этиловый эфир, метансульфонат. Дабигатран и его ацильные глюкуроны представляют собой конкурентные, прямые ингибиторы тромбина. Поскольку тромбина (фактор Па, серин-протеаза) обеспечивают возможность превращения фибриногена в фибрин в ходе коагуляционного каскада, его ингибирование предотвращает образование тромба.

Ривароксабан, ингибитор фактора Ха, представляет собой активный ингредиент в XARELTO®, и имеет химическое название 5-хлор-N-({(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксо-4-морфолинил)фенил]-1,3-оксазолидин-5-ил}метил)-2-тиофенкарбоксамид. Ривароксабан представляет собой чистый (S)-энантиомер. XARELTO® представляет собой перорально биодоступный ингибитор фактора Ха, который селективно ингибирует активный сайт фактора Ха и не требует кофактора (такого как антитромбин III) для своего действия. Аписабан или ELIQUIS® представляет собой 1-(4-метоксифенил)-7-оксо-6-[4-(2-оксопиперидин-1-ил)фенил]-4,5-дигидропиразоло[5,4-с]пиридин-3-карбоксамид. Он представляет собой перорально вводимый прямой ингибитор фактора Ха, одобренный в Европе и в настоящее время проходящий испытания III фазы в США для предупреждения венозной тромбоэмболии.

Эдоксабан или LIXIANA® представляет собой N'-(5-хлорпиридин-2-ил)-N-[(1S,2R,4S)-4-(диметилкарбамоил)-2-[(5-метил-6,7-дигидро-4Н-[1,3]тиазоло[5,4-с]пиридин-2-карбонил)амино]-циклогексил]оксамид. Эдоксабан представляет собой прямой ингибитор фактора Ха, и он одобрен в Японии для применения для предупреждения венозной тромбоэмболии.



ARIXTRA® представляет собой фондапаринукс натрия. Он представляет собой синтетический и специфический ингибитор активированного фактора X (Ха). Фондапаринукс натрия представляет собой метил О-2-дезоксиг-6-О-сульфо-2-(сульфоамино)-α-D-глюкопиранозил-(1→4)-О-β-D-глюкопирануранозил-(1→4)-О-2-дезоксиг-3,6-ди-О-сульфо-2-(сульфоамино)-α-D-глюкопиранозил-(1→4)-О-2-О-сульфо-α-L-идопирануранозил-(1→4)-2-дезоксиг-6-О-сульфо-2-(сульфоамино)-α-D-глюкопиранозид, деканатриевую соль. Молекулярная формула фондапаринукса натрия  $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ , и его молекулярный вес составляет 1728. Структурная формула представлена ниже:



Антитромботическая активность фондапаринукса натрия является результатом селективного ингибирования фактора Ха, опосредованного антитромбином III (АТIII). За счет селективного связывания с АТIII, фондапаринукс натрия ускоряет (примерно в 300 раз) естественную нейтрализацию фактора Ха за счет АТIII. Нейтрализация фактора Ха нарушает каскад коагуляции крови и посредством этого ингибирует образование тромбина и формирование тромба. Фондапаринукс натрия не инактивирует тромбин (активированный фактор II), и не имеет известного влияния на функцию тромбоцитов. В рекомендованной дозе фондапаринукс натрия не влияет на фибринолитическую активность или время кровотечения. Фармакодинамика/фармакокинетика фондапаринукса натрия получены из концентраций фондапаринукса в плазме, количественно определенных по активности антифактора Ха. Для калибровки анти-Ха анализа может быть использован только фондапаринукс. (Международные стандарты гепарина или НМГ не подходят для этого применения). Таким образом, активность фондапаринукса натрия выражают в миллиграммах (мг) от калибратора фондапаринукса. Анти-Ха активность лекарства увеличивается при увеличении концентрации лекарства, достигая максимальных значений приблизительно за 3 ч. Фондапаринукс натрия, введенный подкожной инъекцией, быстро и полностью поглощается (абсолютная биодоступность составляет 100%). У пациентов, проходящих лечение фондапаринуксом натрия, инъекция 2,5 мг, один раз в сутки, пик стационарной концентрации в плазме составляет, в среднем, от 0,39 до 0,50 мг/л и достигается приблизительно через 3 ч после введения дозы. У этих пациентов минимальная стационарная концентрация в плазме составляет от 0,14 до 0,19 мг/л. У пациентов с симптоматическим тромбозом глубоких вен и легочной эмболией, проходящих лечение фондапаринуксом натрия с инъекциями 5 мг (вес тела <50 кг), 7,5 мг (вес тела 50-100 кг) и 10 мг (вес тела >100 кг), один раз в сутки, дозы с поправкой на вес тела, обеспечивают такие же средние стационарные пики и минимальные концентрации в плазме во всех весовых категориях. Средняя пиковая стационарная концентрация в плазме находится в диапазоне от 1,20 до 1,26 мг/л. У этих пациентов средняя минимальная стационарная концентрация в плазме находится в диапазоне от 0,46 до 0,62 мг/л.

ARGATROBAN® представляет собой синтетический прямой ингибитор тромбина (фактора IIa), полученный из L-аргинина. Химическое название ARGATROBAN®: 1-[5-[(аминоиминометил)амино]-1-оксо-2-[[1,2,3,4-тетрагидро-3-метил-8-хинолинил]сульфонил]амино]пентил]-4-метил-2-пиперидинкарбоновая кислота, моногидрат. Молекулярная формула ARGATROBAN®:  $C_{23}H_{36}N_6O_5S \cdot H_2O$ .

Молекулярный вес составляет 526,66. ARGATROBAN® представляет собой прямой ингибитор тромбина, который обратимо связывается с активным сайтом тромбина. ARGATROBAN® не требует кофактора антитромбина III для своей антитромботической активности. ARGATROBAN® вводят инъекцией, и он проявляет свое антикоагулирующее действие за счет ингибирования тромбин-катализируемых или тромбин-индуцируемых реакций, включая образование фибрина; активации факторов коагуляции V, VIII и XIII; активации белка C; и агрегации тромбоцитов. Антикоагулирующий эффект представляет собой любое действие ингибитора коагуляции (например, гепарина, НМГ, ингибитора фактора Ха, ингибитора фактора IIa), которое является результатом его блокирования распространения коагуляционных каскадов. Не ограничивающие примеры антикоагуляционных эффектов включают повышающую регуляцию активности антитромбина, уменьшение активности фактора Ха, уменьшение активности фактора IIa, увеличение кровопотери и любые другие обстоятельства, в которых активность или концентрация факторов свертывания изменяется таким образом, что замедляется формирование сгустков крови. Активность ингибитора коагуляции (т.е. его антикоагулирующее действие) может быть измерена различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, хромогенный анализ активности антифактора Ха, анализ активированного парциального тромбопластинного времени, протромбинового времени, анализ кровотечения (например, анализ кровотечения из хвоста крысы), тромбоэластографию, анализ образования тромбина, время разбавленного яда гадюки Рассела, экариновое время свертывания крови, каолиновое время свертывания крови, международное нормализованное соотношение (INR), испытание фибриногена (Клаус), тромбиновое время (ТСТ), смешанное время и время лизиса эуглобулина. Эти способы

помогают определить различные параметры антикоагуляции и известны специалистам в данной области. Так, в некоторых вариантах реализации антикоагуляцию можно контролировать одним из перечисленных выше анализов или их комбинацией.

Анализ антифактора Ха напрямую измеряет активность антифактора Ха. Методология анализа антифактора Ха заключается в том, что плазму пациента добавляют к известному количеству избытка фактора Ха и избытка антитромбина. Если ингибитор фактора Ха присутствует в плазме пациента, он снижает ферментативную активность фактора Ха. Количество остаточного фактора Ха обратно пропорционально количеству агента анти-Ха в плазме. Количество остаточного фактора Ха обнаруживают добавлением хромогенного субстрата, который имитирует природный субстрат фактора Ха, давая возможность его расщепления остаточным фактором Ха, высвобождая окрашенное соединение, которое может быть обнаружено спектрофотометром. Недостаток антитромбина в организме пациента не влияет на анализ, поскольку в реакции предусмотрены избыточные количества антитромбина. Результаты представляют в концентрации антикоагулянта в единицах/мл антифактора Ха, так что высокие значения указывают на высокие уровни антикоагуляции, а низкие значения указывают на низкие уровни антикоагуляции.

Анализ активированного парциального тромбопластинового времени (аРТТ) представляет собой анализ, в котором измеряют время, необходимое для свертывания крови. Образцы крови собирают для непосредственного измерения, или собирают в пробирки с оксалатом и цитратом для предотвращения коагуляции под действием кальция до выполнения анализа. В этом анализе в плазме смешивают фосфолипид, активатор (диоксид кремния, целит, каолин, эллаговую кислоту и т.д.) и кальций для инициации коагуляции. В анализе измеряют время до образования тромба (сгустка). Анализ кровотечения из хвоста крыс или анализ отсечения хвоста крыс представляет собой анализ, в котором измеряют кровопотери, например, кровопотери после введения лекарства. В одном из вариантов реализации при испытании влияния соединения настоящего изобретения (например, DAP) во время  $T_{\max}$  антикоагулянта внутривенно вводят DAP. Через 20 мин отсекают хвосты крыс приблизительно в 1 мм от кончика, помещают в солевой раствор комнатной температуры, собирают кровь в течение 30 мин и взвешивают.

Анализы, используемые для измерения активности ингибиторов коагуляции, могут быть использованы в лаборатории или в больнице для измерения реверсирования антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции, например, реверсирования антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции за счет введения фармацевтической композиции, содержащей соединение настоящего изобретения. Так, в одном из вариантов реализации эти анализы используют для измерения полного или частичного реверсирования антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции (такого как гепарин, НМГ, ингибитор фактора Па и ингибитор фактора Ха). Полное реверсирование антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции возникает при нейтрализации антикоагулирующего действия. В одном из вариантов реализации полное реверсирование антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции, измеренное анализом анти-Ха активности, возникает при изменении концентрации антикоагулянта ниже минимальной эффективной концентрации (МЭК) для антикоагуляции. МЭК при использовании в настоящем документе представляет собой минимальное количество лекарства (например, ингибитора коагуляции), необходимое для терапевтического эффекта. В другом варианте реализации полное реверсирование антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции, измеренное в анализе аРТТ, возникает при возвращении аРТТ на уровень в пределах 10% от исходного значения. Исходное значение при использовании в настоящем документе относится к аРТТ в отсутствие ингибиторов коагуляции.

Во многих случаях антикоагуляция все еще необходима, но в меньшей степени. В этом случае может быть показано частичное реверсирование антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции. Частичное реверсирование антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции, измеренное в анализе анти-Ха активности, возникает при изменении концентрации антикоагулянта до значения ниже концентрации антикоагулянта в отсутствие агента, реверсирующего антикоагулирующее действие (например, соединения настоящего изобретения), но остается на уровне выше МЭК для антикоагуляции. Так, в некоторых вариантах реализации частичное реверсирование антикоагулирующего действия ингибиторов коагуляции возникает, если концентрация антикоагулянта ниже, чем примерно четырехкратная МЭК, предпочтительно примерно двукратная МЭК, более предпочтительно менее чем примерно двукратная МЭК (например, примерно равна МЭК). Частичное реверсирование антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции, измеренное анализом аРТТ, возникает, если аРТТ снижается до более низкого значения, чем в отсутствие агента, реверсирующего антикоагулирующее действие (например, соединения настоящего изобретения), но выше исходного значения. Так, в других вариантах реализации частичное реверсирование антикоагулирующего действия ингибиторов коагуляции возникает, если измеренное значение аРТТ снижено до показателя ниже, чем примерно четырехкратное исходное значение, предпочтительно примерно двукратное исходное значение, более предпочтительно менее чем около двукратное исходное значение. Как правило, степень и продолжительность реверсирования антикоагуляции определяет лечащий врач или ветеринар.

При использовании в настоящем документе "субъект, нуждающийся в этом" представляет собой субъекта, нуждающегося в экстренном или плановом реверсировании антикоагуляции, например, субъ-

ект, страдающий от передозировки антикоагулянта, субъект, страдающий от кровотечения (например, кровотечение в результате травмы или самопроизвольное кровотечение в желудочно-кишечном тракте или в ином месте), субъект, нуждающийся в плановом хирургическом вмешательстве, субъект, подлежащий инвазивной или неинвазивной процедуре, для которой необходима биопсия, субъект, подлежащий процедуре, в которой процедурная ошибка может приводить к риску кровотечения, если субъект продолжает находиться под действием антикоагулянта, субъект, нуждающийся в спинальной или эпидуральной анестезии. "Субъект, нуждающийся в этом" может быть пациентом, у которого наличие прямого ингибитора фактора (фактора Ха, фактора Па и/или антитромбина) вызывает или может вызывать эффекты кровотечения. Таким образом, "субъект, нуждающийся в этом", может быть субъектом, принимающим антикоагуляционную терапию (например, субъект, принимающий гепарин, НМГ, ингибитор фактора Па или ингибитор фактора Ха) например, для предупреждения инсульта, хирургических и диагностических операций на сердце, при сердечной аритмии, для предупреждения тромбоза глубоких вен (DVT), легочной эмболии, общего предупреждения образования патологических кровяных сгустков.

"Субъект, нуждающийся в этом" при использовании в настоящем документе представляет собой животное. "Субъект, нуждающийся в этом" включает, без ограничения, человека, мышей, крыс, морских свинок, собак, кошек, лошадей, коров, свиней, обезьян, шимпанзе, бабуинов или макак-резусов. В одном из вариантов реализации, "субъект, нуждающийся в этом" представляет собой млекопитающее. В другом варианте реализации "субъект, нуждающийся в этом" представляет собой человека.

При использовании в настоящем документе "терапевтически эффективное количество относится к количеству агента, реверсирующего действие антикоагулянтов (например, соединения настоящего изобретения, описанного в настоящем документе), которое является эффективным, при введении однократной или многократных доз (например, болюса и/или поддерживающих доз) субъекту, для нейтрализации или ингибирования (полного или частичного реверсирования) антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции или для ускорения коагуляции.

В одном аспекте терапевтически эффективное количество составляет дозу агента, реверсирующего действие антикоагулянта, которая находится в диапазоне от 0,01 до 10000 раз по весу от дозы антикоагулянта. В другом аспекте агент, реверсирующий действие антикоагулянта, вводят в массовом соотношении доз от около 1:1 до 1000:1 агента, реверсирующего действие антикоагулянта, к антикоагулянту, например, 100:1 агента, реверсирующего действие антикоагулянта, к антикоагулянту, такое значение как 10:1 агента, реверсирующего действие антикоагулянта, к антикоагулянту. В одном из вариантов реализации представленного способа терапевтически эффективное количество агента, реверсирующего действие антикоагулянта, может быть введено подкожным, внутримышечным или внутривенным путем введения. Например, оно может быть введено внутривенно в виде стерильного раствора. В другом варианте реализации терапевтически эффективное количество агента, реверсирующего действие антикоагулянта, вводят пероральным, назальным или пульмональным путем или в слизистую область (рот, прямая кишка или влагалище).

Терапевтически эффективное количество агента, реверсирующего действие антикоагулянта (т.е. соединения настоящего изобретения), обычно варьируется от около 0,001 мг/кг до около 1 г/кг веса тела в сутки; в другом варианте реализации - от около 0,01 до около 600 мг/кг веса тела в сутки; в другом варианте реализации - от около 0,01 до около 250 мг/кг веса тела в сутки; в другом варианте реализации - от около 0,01 до около 400 мг/кг веса тела в сутки; в другом варианте реализации - от около 0,01 до около 200 мг/кг веса тела в сутки; в другом варианте реализации - от около 0,01 до около 100 мг/кг веса тела в сутки; в одном из вариантов реализации - от около 0,01 до около 25 мг/кг веса тела в сутки; в другом варианте реализации - от около 0,1 до около 10 мг/кг веса тела в сутки; в другом варианте реализации - от около 0,001 до около 100 мг/кг веса тела в сутки; в другом варианте реализации - от около 0,001 до около 10 мг/кг веса тела в сутки и в другом варианте реализации - от около 0,001 до около 1 мг/кг веса тела в сутки. Для определения терапевтически эффективного количества могут быть использованы стандартные анализы коагуляции (такие как описаны в настоящем документе) и другие *in vitro* анализы. В некоторых аспектах настоящего изобретения соединение настоящего изобретения может быть введено совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом. В одном из вариантов реализации по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент может быть витамином К, который обычно используют для коррекции различий свертывания, вызванных варфариновыми соединениями.

В настоящем изобретении представлен также диагностический анализ для определения концентрации антикоагулянта в крови. Как показано ниже в примере 13, DAP демонстрирует дозозависимый тренд в реверсировании ривароксабана *ex vivo* в плазме человека, с использованием хромогенного анализа антифактора Ха с разрешением 510k. Таким образом, соединения настоящего изобретения, например, DAP, могут быть использованы в диагностическом анализе для определения концентрации антикоагулянта, например, ингибитора фактора Ха, в крови. В таком анализе соединения настоящего изобретения, например, DAP, может быть использовано или вместе с имеющимися реагентами набора, или в качестве субстрата прямого связывания вместо синтетических факторов, присутствующих в имеющихся наборах.

В одном из вариантов реализации диагностический анализ может включать соединение настоящего изобретения (например, DAP) в качестве связывающего субстрата, при этом соединение настоящего изобретения связывает антикоагулянт в образце крови, и количественно измеряют остаточную активность фактора свертывания (например, фактора Ха) для определения концентрации антикоагулянта в образце. В другом варианте реализации диагностический анализ может включать соединение настоящего изобретения (например, DAP), сопряженное с магнитными микрочастицами, при этом соединение настоящего изобретения может связывать антикоагулянт в образце крови для удаления указанного антикоагулянта из образца или для его концентрирования. Хромогенный или портативный анализ на основе DAP по настоящему изобретению может способствовать определению концентрации антикоагулянта у субъектов, что в настоящее время представляет собой значительную неудовлетворенную клиническую потребность, поскольку существующие способы диагностики не позволяют с высокой точностью определять концентрации прямых ингибиторов в крови.

Кроме того, в настоящем изобретении представлен анализ, например хромогенный анализ, для определения концентрации соединения настоящего изобретения, например DAP, необходимой для реверсирования антикоагулянта, присутствующего в крови. В одном из вариантов реализации в указанном анализе используют DAP в качестве прямого связывающего агента для различных антикоагулянтов. В настоящем изобретении представлен также анализ, например хромогенный анализ, для определения количества соединения настоящего изобретения, например DAP, в крови. В таком анализе могут быть использованы заданные концентрации антикоагулянта.

В настоящем изобретении представлен также диагностический набор, который предназначен для диагностического анализа, описанного выше в настоящем документе. Так, в одном из вариантов реализации указанный набор используют для определения концентрации антикоагулянта в крови. Указанный набор может содержать другие компоненты, упаковку, инструкции, реагенты и/или другие материалы для облегчения определения концентрации антикоагулянта (например, ингибитора фактора Ха) или DAP и для облегчения применения набора. Кроме того, набор может быть использован для определения того, не будет ли ухудшена комбинация варфарина и другого антикоагулянта, отличного от варфарина, действием соединения настоящего изобретения, при сохранении других антикоагулянтов.

Как показано в следующих примерах, соединение настоящего изобретения (например, DAP) может связывать гепарин, инактивируя его *in vivo*. Таким образом, помимо его влияния на коагуляцию, соединение настоящего изобретения также может быть использовано для исключения биохимического действия гепарина из тканей. Например, другие гепарин-связывающие молекулы демонстрируют способность снижать фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и другие гепарин-связывающие факторы роста. Было показано, что депривация VEGF и FGF применима в противораковой терапии, что делает соединения настоящего изобретения возможными кандидатами для лечения рака. Следовательно, в одном аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения, предупреждения или улучшения рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли.

Как показано в примерах, одно из соединений настоящего изобретения, DAP, связывает XARELTO®, ELIQUIS®, ARIXTRA® и НМГ *in vitro*, по результатам измерения динамическим светорассеянием (ДСР). DAP сохраняет подкожно введенный ARIXTRA® и НМГ *in vivo*. DAP сохраняет XARELTO®, ELIQUIS®, PRADAXA®, LIXIANA®, нефракционированный гепарин и бемипарин *in vivo*. DAP, введенный крысам внутривенно в дозах 100, 250 и 400 мг/кг, не демонстрировал никаких неблагоприятных эффектов. DAP у крыс перорально биодоступен. DAP демонстрирует отсутствие связывания с ERG человека, не ингибирует или не служит в качестве подложки для ферментов CYP и заметно не связывает какие-либо белки плазмы (данные не показаны). Кроме того, очевидно, что DAP имеет короткий период полуэлиминации, поскольку антикоагуляция, вызванная PRADAXA®, восстановилась через 20-30 мин после внутривенной болюсной дозы DAP у крыс. Более того, DAP устойчив к стерилизации (сохраняется при нагревании до 200°C) и к хранению в виде лиофилизированного порошка при 4°C в течение более одного года. Результаты реверсирования действия антикоагулянтов для DAP представлены в табл. 2.

Таблица 2

## Реверсирование действия антикоагулянтов

Торговая марка	Международное непатентованное название	Компания	Ингибируемый фактор крови	Способ введения	Связывание DAP	Реверсирующие агенты
Lovenox® Hibor®	Эноксапарин Бемипарин	Sanofi, Sandoz/ Momenta, Rovi	~80-90% Ха, ~10-20% IIa	подкожная инъекция	X	Протамин* и DAP
Arixtra®	Фондапаринукс	GSK	Ха	подкожная инъекция	X	DAP
Eliquis®	Апиксабан	Pfizer, BMS	Ха	перорально	X	DAP
Xarelto®	Ривароксабан	Bayer, Janssen, J&J	Ха	перорально	X	DAP
Argatroban®	Аргатробан	GSK	IIa	подкожная инъекция	--	нет
Pradaxa®	Дабигатрана этексилат	Boehringer Ingelheim	IIa	перорально	X	DAP

\*Протамин частично реверсирует низкомолекулярные гепарины.

Таблица 3

## Корреляция in vitro-in vivo

Международное непатентованное название лекарства	Молярное отношение связывания по ДСР [DAP/ лекарство]	Молярное отношение реверсирования [DAP/лекарство]	in vivo измерение	Ингибируемый фактор (-ы) крови	Способ введения
Ривароксабан	9	3*	Анализ кровотечения	Ха	Пероральный
Апиксабан	10	8*	Анализ кровотечения	Ха	Пероральный
Фондапаринукс	3	130	Набор Ха	Ха	Подкожная инъекция
Бемипарин	7	140	aPTT	~80-90% Ха, ~10-20% IIa	Подкожная инъекция
Аргатробан	Н.д.	Н.д.	aPTT	IIa	Подкожная инъекция

Пероральная биодоступность для ривароксабана принята за 60%, для апиксабана - 50% и для дабигатрана - 5%; биодоступность для инъектируемых антикоагулянтов принята за 100%.

Результаты in vitro-in vivo корреляции при лечении DAP представлены в табл. 3. Молярное отношение связывания по ДСР рассчитали делением минимального массового отношения DAP к антикоагулянту, который демонстрирует значительное связывание, определенное по сливанию в фосфатно-солевом буферном растворе до видимого диаметра более 50 нм, на молекулярное весовое отношение DAP и указанного антикоагулянта. Молекулярные массы, использованные при расчетах, составили 512 Да (DAP), 436 Да (ривароксабан), 460 Да (апиксабан), 1,7 кДа (фондапаринукс), 3,6 кДа (бемипарин), 628 Да (дабигатран) и 509 Да (ARGATROBAN®). Таким же образом рассчитали реверсирующее молярное отношение, используя минимальную in vivo реверсирующую дозу DAP, необходимую для достижения реверсирования, по результатам измерения анализом кровотечения при отсечении хвоста крыс, хромогенным набором анти-Ха или по активированному парциальному тромбопластиновому времени (aPTT). Для анализа кровотечения антикоагулянт считали реверсированным, если снижение кровопотери за период в 30 мин после отсечения хвоста, при погружении отрезанного хвоста в солевой раствор комнатной температуры, было в пределах 25% от контрольного значения (без введения антикоагулянта). При измерении набором Ха, реверсирование достигалось, если эффективная концентрация антикоагулянта изменилась до значения ниже минимальной эффективной концентрации (МЭК) для антикоагуляции. По результатам измерения aPTT, реверсирование считали достигнутым, если aPTT крысы, находящейся под действием антикоагулянта, возвращалось к значению в пределах 10% от исходного значения. В случае фондапаринукса, несмотря на то, что минимально введенная доза in vivo составила 200 мг/кг DAP, данные in vitro показывают, что возможны и более низкие реверсирующие дозы.

Полное содержание всех ссылок, патентных заявок и патентов, цитируемых в тексте, включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Примеры

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрировано в следующих не ограничивающих примерах. Эти примеры представлены для облегчения понимания настоящего изобретения, но они не предназначены и не должны толковаться как ограничивающие его рамки каким-либо образом. Примеры не включают подробное описание стандартных способов, хорошо известных специалистам в данной области.

Пример 1. In vitro испытание стабильности диаргинин-пиперазина ("DAP").

Материалы и способы.

Ацетатную соль DAP приготовили так, как описано в настоящем документе. Как описано в этих примерах, твердый или порошкообразный DAP относится к ацетатной соли, тогда как DAP в растворе относится к свободному основанию, поскольку соль ионизируется в водном растворе. Как описано в этих примерах, используемое соединение DAP представляло собой соединение формулы (VII).

Порошкообразный DAP испытывали на термостойкость двумя способами. DAP хранили при 4°C в течение 7 месяцев до его использования. Дополнительно, твердое вещество DAP испытывали дифференциальной сканирующей калориметрией (ДСК), нагревая от -20 до 200°C, снова охлаждая до -20°C и снова нагревая до 200°C.

Результаты.

Порошкообразный DAP был устойчивым при 4°C в течение более 12 месяцев. Результаты ДСК представлены на фиг. 1. Второе нагревание ("2") показало такое же термическое поведение, что и первое нагревание ("1"), что указывает на сохранение DAP при повторном нагревании до 200°C. Это наблюдение показывает, что DAP может выдерживать нагревание до температур, превышающих температуры, необходимые для стерилизации.

Пример 2. Связывание DAP с гепарином и НМГ.

Материалы и способы.

Для оценки связывания 1 мг/мл нефракционированного гепарина и 1 мг/мл бемипарина (НМГ; HIBOR®) отдельно или в комбинации с 100 мг/мл DAP в воде (массовое отношение DAP к гепарину или НМГ 100:1) использовали динамическое светорассеяние (ДСР).

Результаты.

DAP физически связывается в воде как с нефракционированным гепарином (фиг. 2), так и с НМГ (не показано) с образованием физических агрегатов, которые увеличивают видимый диаметр. При смешивании растворов DAP с растворами НМГ или нефракционированного гепарина, они образуют частицы за счет физических взаимодействий, что подкрепляет теорию, что DAP реверсирует антикоагулирующее действие гепарина и LMWG за счет физического связывания с этими молекулами.

Пример 3 Связывание DAP с антикоагулянтами, измеренное с помощью ДСР.

Материалы и способы.

Отдельно ривароксабан (XARELTO®), отдельно DAP и комбинации OAP:ривароксабана с массовыми отношениями 1:1 и 10:1 добавляли в водный раствор и анализировали с помощью динамического светорассеяния (ДСР) для оценки связывания DAP и ривароксабана. Такой же эксперимент выполнили отдельно с аликсабаном (ELIQUIS®), отдельно с DAP и с комбинациями OAP:аликсабана с массовыми отношениями 1:1, 10:1 и 100:1. Таким же образом отдельно испытали фондапаринукс (ARIXTRA®), отдельно DAP и комбинации фондапаринукса:OAP с массовыми отношениями 1:1, 10:1 и 100:1. Испытали также отдельно НМГ (бемипарин; HIBOR®), отдельно DAP и комбинации НМГ:DAP с массовыми отношениями 1:1, 10:1 и 100:1. Испытанная концентрация НМГ составила 0,1 мг/мл. Таким образом, испытывали DAP при 1:1, 0,1 мг/мл, испытывали DAP при 10:1, 1 мг/мл и испытывали DAP при 100:1, 10 мг/мл. Кроме того, испытывали отдельно дабигатран, отдельно DAP и комбинации дабигатрана:OAP с массовыми отношениями 1:1, 10:1, 100:1, 1000:1 и 10000:1 DAP. Наконец, испытывали отдельно ARGATROBAN®, отдельно DAP или комбинации аргатробана:OAP с массовыми отношениями 1:1, 10:1, 100:1 и 1000:1.

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 3 для ривароксабана; на фиг. 4 для аликсабана; на фиг. 5 для фондапаринукса (ARIXTRA®), на фиг. 6 для НМГ и на фиг. 7 для аргатробана. Каждая фигура иллюстрирует индивидуальные пики, представляющие отдельно DAP и антикоагулянт в водном растворе. При смешивании антикоагулянта с DAP при достаточно высоких массовых отношениях наблюдали изменение размера. В этом анализе даже слабое увеличение размера указывает на физическое взаимодействие между двумя веществами; но для оценки корреляции in vitro-in vivo использовали только значительные изменения видимого диаметра. Видимый диаметр представляет собой меру степени взаимодействия.

Пример 4. Реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию НМГ in vivo.

Материалы и способы.

Самцам крыс-альбиносов весом 470 г вводили 10 мг бемипарина (избыточная доза НМГ) подкожной инъекцией. Измеряли время aPTT в течение 5 ч. Через 4 ч после введения НМГ крысам вводили внутривенную дозу 200 мг/кг DAP (100 мг DAP).

#### Результаты.

При введении НМГ аРТТ увеличилось с 53 до 246 с через 4 ч. Внутривенное введение 200 мг/кг DAP (100 мг DAP) снизило время аРТТ до значения ниже исходного уровня за 60 мин (фиг. 8).

Пример 5. Реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию дабигатрана (PRADAXA®) *in vivo*; испытание избыточной дозы.

#### Материалы и способы.

Самцам крыс-альбиносов весом 430 г вводили 40 мг/кг PRADAXA® (20 мг PRADAXA®; избыточная доза PRADAXA®) через ротовой зонд. Приблизительно через 2 ч после обработки PRADAXA® ввели 200 мг/кг DAP (100 мг DAP) в виде внутривенной болюсной инъекции. Приблизительно через 2 ч крысам ввели дозу 100 мг/кг DAP (50 мг DAP). Еще через 1 ч крысам ввели еще одну дозу 100 мг/кг DAP (50 мг DAP). В течение всего экспериментального периода измеряли аРТТ.

#### Результаты.

Результаты представлены на фиг. 9 и 13. Через 2 ч после введения PRADAXA® увеличилось с 43 до 81 с, демонстрируя значительное антикоагулирующее действие. 100 мг DAP ввели внутривенной болюсной инъекцией, в результате чего аРТТ уменьшилось до значения ниже исходного показателя за 25 мин. Через 2 ч аРТТ снова увеличилось до 79 с, и крысам ввели дозу 50 мг DAP. Через 30 мин аРТТ уменьшилось до значения ниже исходного показателя. Оба раза, через 60 мин после введения DAP значения аРТТ возвращались к показателям, превышающим исходное значение. После второй дозы DAP аРТТ увеличилось до 53 с. Третью дозу DAP, 100 мг/кг DAP (50 мг DAP) ввели внутривенно, и аРТТ снизилось до исходного значения за 20 мин. Фиг. 13 иллюстрирует аналогичный эксперимент, в котором после введения 15,5 мг/кг PRADAXA® аРТТ уменьшилось до нормального значения примерно за 30 мин после начала обработки 100 мг/кг DAP.

Пример 6. Реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию нефракционированного гепарина ("НФГ") *in vivo*.

#### Материалы и способы.

Самцам крыс-альбиносов весом 515 г вводили 10 мг/кг нефракционированного гепарина (5 мг НФГ) подкожной инъекцией. 200 мг/кг DAP (100 мг DAP) вводили двумя внутривенными болюсными инъекциями после введения НФГ. Затем крысам ввели дозу 400 мг/кг DAP (200 мг DAP). В течение всего экспериментального периода измеряли аРТТ.

#### Результаты.

Как показано на фиг. 10, время аРТТ существенно увеличилось с 28 до 102 с в течение 1 ч после введения гепарина. Внутривенно ввели 100 мг DAP, в результате чего время аРТТ через 20 мин увеличилось до 48 с. Через 1 ч аРТТ увеличилось до 120 с, затем внутривенно ввели еще 100 мг DAP. Через 15 мин аРТТ уменьшилось до 47 с. Через 1 ч аРТТ увеличилось до 96 с, затем внутривенно ввели дозу 200 мг DAP. Через 10 мин аРТТ уменьшилось до 33 с.

Пример 7. Реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию ривароксабана (XARELTO®) *in vivo*.

#### Материалы и способы.

Крысам перорально вводили 5 мг/кг ривароксабана (XARELTO®). Через 4 ч внутривенно вводили 5 мг/кг DAP (2 мг DAP). аРТТ измеряли в ноль, 15, 30, 45, 60 и 240 мин, до введения DAP. аРТТ снова измеряли приблизительно через 5, 10, 25, 35, 45, 60, 120 и 240 мин после введения DAP.

#### Результаты.

Пример 8. Реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию фондапаринукса (ARIXTRA®) *in vivo*.

#### Материалы и способы.

Крысам подкожно вводили 5 мг/кг фондапаринукса. Через 2 ч внутривенно вводили 200 мг/кг DAP. Активность измеряли с помощью хромогенного анализа фактора Ха с разрешением 510k (Biophen) через 10, 20, 30 и 60 мин после введения DAP.

#### Результаты.

На фиг. 12 представлено DAP-опосредованное реверсирование антикоагуляции фондапаринукса через 10 мин после введения.

Пример 9. Внутривенное введение DAP не влияет на аРТТ.

#### Материалы и способы.

Самцам крыс линии CD с подобранной массой тела внутривенно вводили 0, 2, 10, 25, 50 или 100 мг DAP и измеряли аРТТ.

#### Результаты.

Результаты, представленные на фиг. 16, демонстрируют, что DAP, введенный внутривенно, не влияет на аРТТ дозозависимым образом в отсутствие антикоагулянтов. Величины ошибки представляют стандартную погрешность для семи аРТТ измерений, усредненных в течение 90 мин.

Пример 10. Реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию в модели отсечения хвоста крыс.

#### Материалы и способы.

Каждой из трех крыс вводили 2 мг ривароксабана. Одной крысе вводили реверсирующее плацебо, не содержащее DAP, второй крысе вводили 2,5 мг DAP, а третьей вводили 12,5 мг DAP. Четвертой крысе

вводили плацебо с антикоагулянтом и реверсирующими дозами ("плацебо"). Через 20 мин после введения реверсирующей дозы отсекали 1 мм от кончика хвоста, помещали в солевой раствор комнатной температуры, собирали кровопотери в течение 30 мин и взвешивали.

Такой же прием использовали с 1,25 мг апиксабана (ELIQUIS®), отдельно или в комбинации с 5 или 12,5 мг DAP; с 15,5 мг дабигатрана этексилата (PRADAXA®), отдельно или в комбинации с 5 или 12,5 мг DAP; и с 5 мг эдоксабана (LIXIANA®), отдельно или в комбинации с 12,5 мг DAP.

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 15 для ривароксабана, на фиг. 16 - для апиксабана, на фиг. 17 - для эдоксабана и на фиг. 18 - для дабигатрана этексилата. Анализ кровотечения при отсечении хвоста крыс аналогичен клинической ситуации, в которой необходимо экстренное реверсирование действия антикоагулянта. Результаты демонстрируют, что DAP эффективно реверсирует действие антикоагулянта, приводя к статистически значимому снижению кровопотерь, по сравнению с крысами, которым ввели только антикоагулянт.

Пример 11. Реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию ривароксабана (XARELTO®) в свежих образцах крови человека *ex vivo*.

Материалы и способы.

Образцы крови взяли у добровольца. Ривароксабан при 0,25 мкг/мл добавляли отдельно или в комбинации с 50 мкг/мл DAP. Контрольные образцы содержали 50 мкг/мл DAP или солевой раствор. aPTT измеряли в течение 2 мин после сбора крови.

Результаты.

Фиг. 19 иллюстрирует, что введение DAP приводит к реверсированию ривароксабан-индуцированной антикоагуляции в свежих образцах крови человека, по результатам измерения aPTT. Величины ошибки представляют стандартную погрешность для трех независимых экспериментов.

Пример 12. Реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию ривароксабана и апиксабана в плазме человека *ex vivo*.

Материалы и способы.

В плазму человека добавляли 218 или 459 мкг/л ривароксабана с или без 1250 или 6250 мкг/л DAP соответственно. Аналогично, в плазму человека добавляли 156 или 313 мкг/л апиксабана с или без 1156 или 3125 мкг/л DAP соответственно. Влияние DAP на антикоагуляцию измеряли с помощью хромогенного анализа антифактора Ха с разрешением 510k компании Biophen. Концентрации ривароксабана определили сравнением с калибровочными стандартами плазмы, а концентрации апиксабана вывели из разбавлений исходного раствора, поскольку калибровочные стандарты еще не доступны.

Результаты.

Для обеих концентраций ривароксабана и апиксабана, DAP вызвал возврат эффективной концентрации антикоагулянта до значения ниже минимально эффективной концентрации. На фиг. 20 представлены результаты для ривароксабана, а на фиг. 21 представлены результаты для апиксабана.

Пример 13. Дозозависимое реверсирующее действие DAP на антикоагуляцию ривароксабана в плазме человека *ex vivo*.

Материалы и способы.

В плазму человека добавляли 218 мкг/л ривароксабана, отдельно или в комбинации с 1,25, 12,5, 125 или 1250 мкг/л DAP. Активность фактора Ха измеряли с помощью хромогенного аналитического набора анти-Ха с разрешением 510k компании Biophen. Концентрации ривароксабана определили сравнением с калибровочными стандартами плазмы.

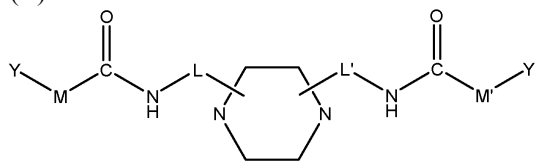
Результаты.

Фиг. 22 иллюстрирует, что DAP обладает дозозависимой эффективностью в отношении реверсирования антикоагулирующего действия ривароксабана в плазме человека, что демонстрируется его влиянием на концентрацию ривароксабана (измеряли анализом активности фактора Ха).



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

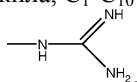
1. Соединение формулы (II)



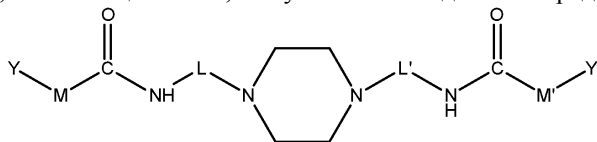
(II)

или его фармацевтически приемлемая соль,  
 где каждый из L и L' представляет собой замещенную или незамещенную C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкиленовую цепь;  
 каждый из M и M' представляет собой замещенную C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкиленовую цепь,  
 при этом указанные заместители в алкиленовой цепи выбраны из C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, гидроксила, гидрокси-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, amino, amino-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкокси и C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкокси;

каждый из Y и Y' представляет собой



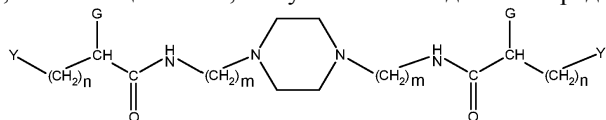
2. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанное соединение представлено формулой (III)



(III)

или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.2, отличающееся тем, что указанное соединение представлено формулой (IV)



(IV)

или его фармацевтически приемлемая соль,

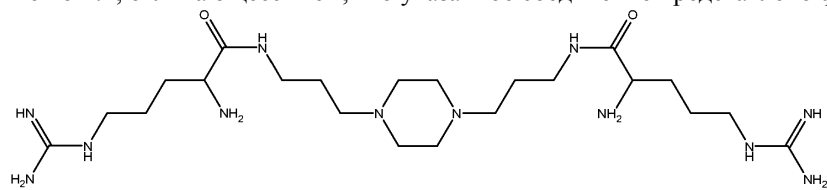
где n равен от 3 до 5;

m равен от 3 до 6;

G выбран из -NH<sub>2</sub> и OH.

4. Соединение по п.3, отличающееся тем, что G представляет собой amino.

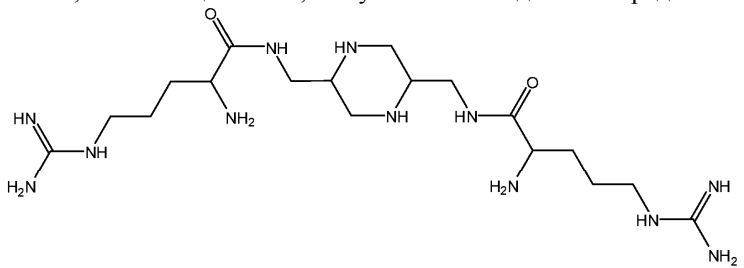
5. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанное соединение представлено формулой (V)



(V)

или его фармацевтически приемлемая соль.

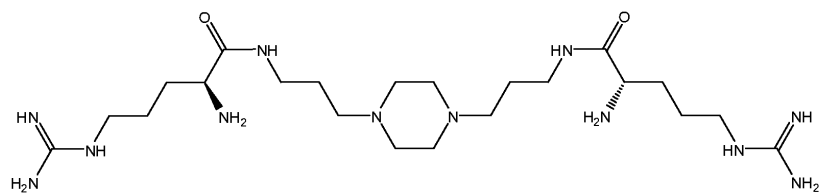
6. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанное соединение представлено формулой (VI)



(VI)

или его фармацевтически приемлемая соль.

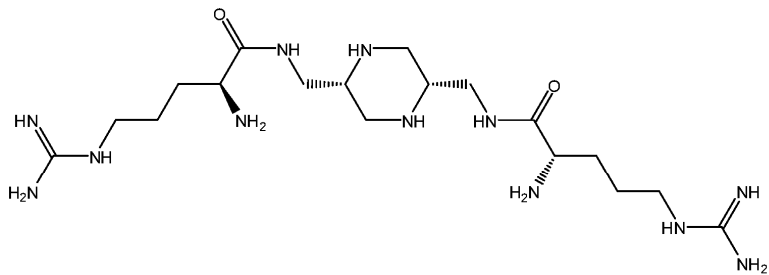
7. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанное соединение представлено формулой (VII)



(VII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

8. Соединение по п.1, отличающееся тем, что указанное соединение представлено формулой (VIII)



(VIII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Фармацевтическая композиция для реверсирования антикоагулирующей терапии, содержащая соединение по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Фармацевтическая композиция по п.9, отличающаяся тем, что указанная композиция выполнена с возможностью энтерального введения.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, отличающаяся тем, что указанная композиция выполнена с возможностью перорального введения.

12. Фармацевтическая композиция по п.9, отличающаяся тем, что указанная композиция выполнена с возможностью парентерального введения.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что указанная композиция выполнена с возможностью внутривенного или подкожного введения.

14. Способ полного или частичного реверсирования антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-8 или его фармацевтически приемлемой соли.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что указанный ингибитор коагуляции выбран из группы, состоящей из нефракционированного гепарина, низкомолекулярного гепарина (НМГ), ингибитора фактора Ха и ингибитора фактора Ха.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанный ингибитор коагуляции представляет собой ингибитор фактора Ха.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанный ингибитор фактора Ха выбран из группы, состоящей из ривароксана, апиксана, эдоксана и фондапаринукса.

18. Способ по п.14, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой млекопитающее.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

20. Способ по п.14, отличающийся тем, что полное или частичное реверсирование антикоагулирующего действия ингибитора коагуляции измеряют посредством анализа активности антифактора Ха.

21. Способ по п.14, отличающийся тем, что субъект, нуждающийся в этом, представляет собой субъекта с показаниями к экстренному или плановому реверсированию антикоагуляции.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что указанный субъект с показаниями к экстренному или плановому реверсированию антикоагуляции представляет собой субъекта, страдающего от передозировки антикоагулянта, субъекта, страдающего от кровотечения, субъекта, нуждающегося в плановом хирургическом вмешательстве, субъекта, проходящего инвазивную или неинвазивную процедуру, для которой необходима биопсия, субъекта, проходящего процедуру, в которой процедурная ошибка может привести к кровотечению, если субъект остается под действием антикоагулянта, или субъекта, нуждающегося в спинальной или эпидуральной анестезии.

23. Способ по п.21, отличающийся тем, что субъект, нуждающийся в этом, представляет собой субъекта, принимающего антикоагулянты для предупреждения инсульта, в целях хирургических и диагностических процедур, при сердечной аритмии, для предупреждения тромбоза глубоких вен (DVT), при легочной эмболии или в целом для предупреждения образования патологических сгустков крови.

24. Способ по п.15, отличающийся тем, что указанный ингибитор коагуляции представляет собой низкомолекулярный гепарин (НМГ), при этом указанный НМГ выбран из группы, состоящей из бемипарина, цертопарина, дальтепарина, эноксапарина, надропарина, парнапарина, ревипарина и тинзапарина.

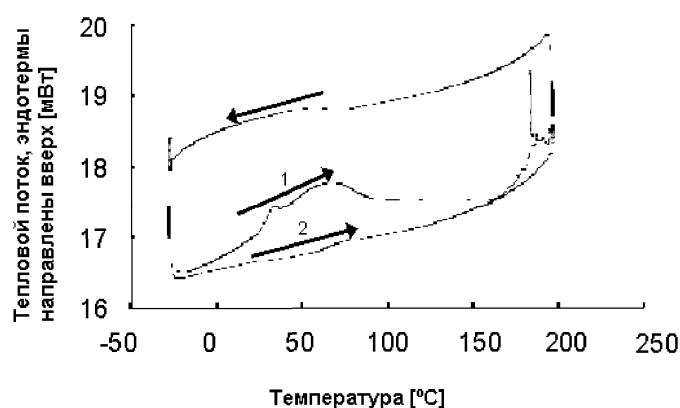
25. Способ по п.14, отличающийся тем, что указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят в массовом отношении доз от примерно 0,01:1 до примерно 1000:1 соединения или его фармацевтически приемлемой соли к антикоагулянту.

26. Способ по п.25, отличающийся тем, что указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят в массовом отношении доз примерно 10:1 соединения или его фармацевтически приемлемой соли к антикоагулянту.

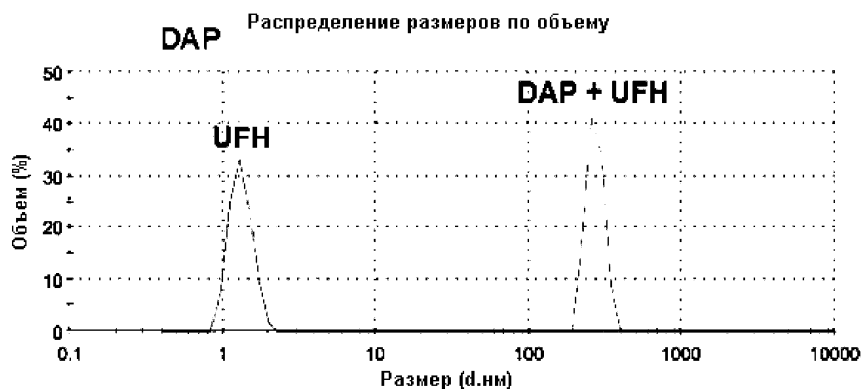
27. Способ по п.14, отличающийся тем, что указанный способ включает введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент представляет собой витамин К.

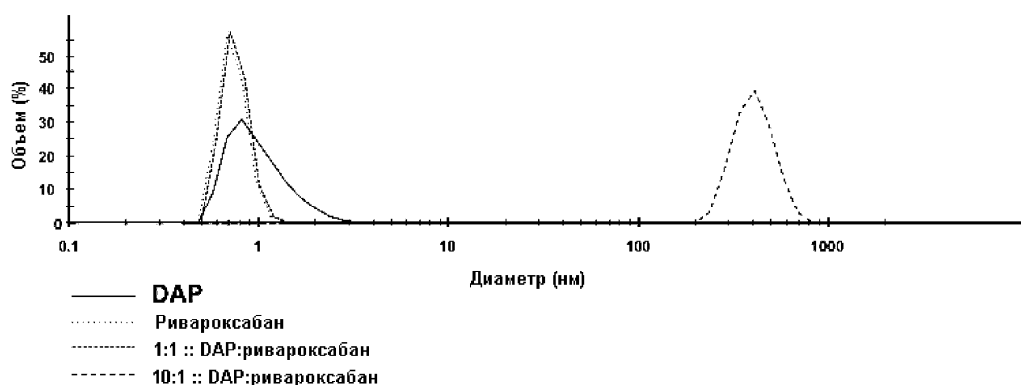
29. Диагностический набор для определения концентрации антикоагулянта в крови, содержащий соединение по любому из пп.1-8 и другие компоненты, упаковку, инструкции и/или реагенты.



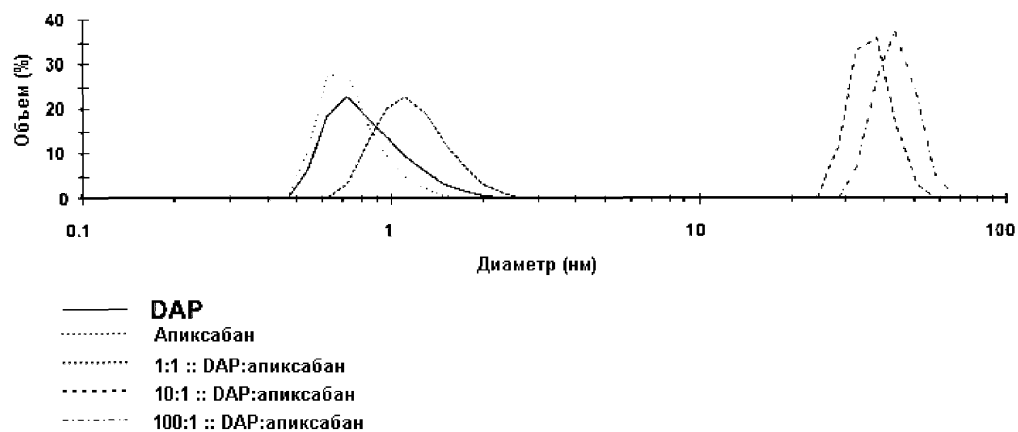
Фиг. 1



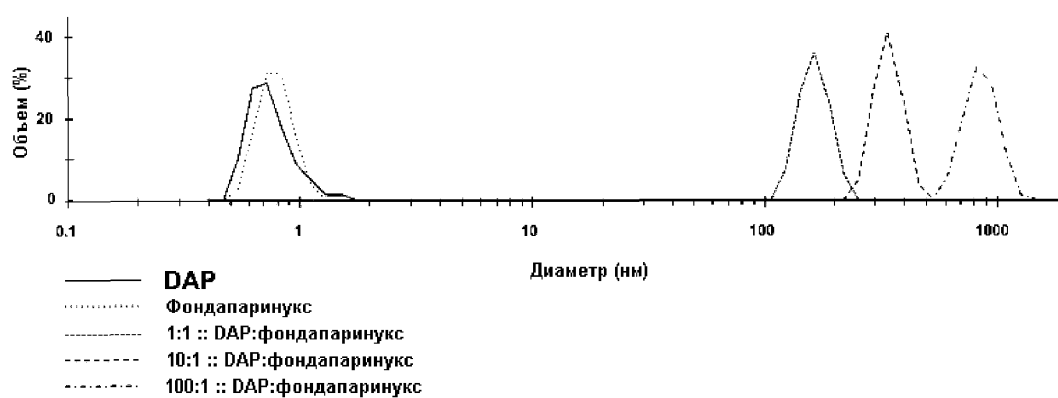
Фиг. 2



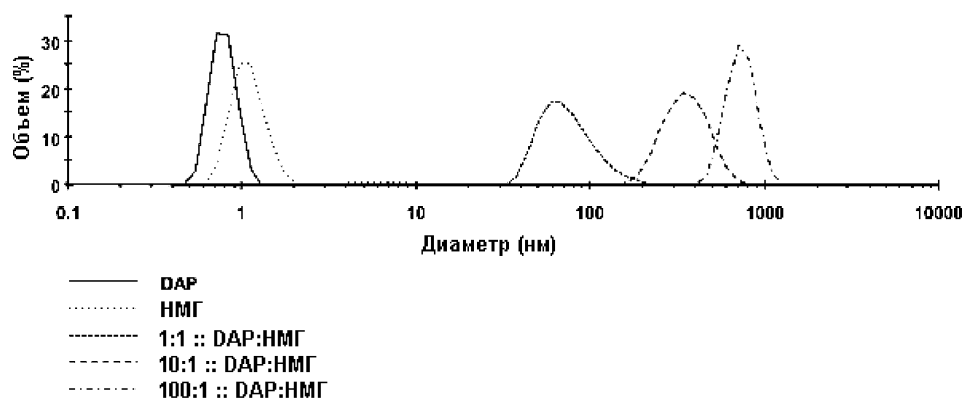
Фиг. 3



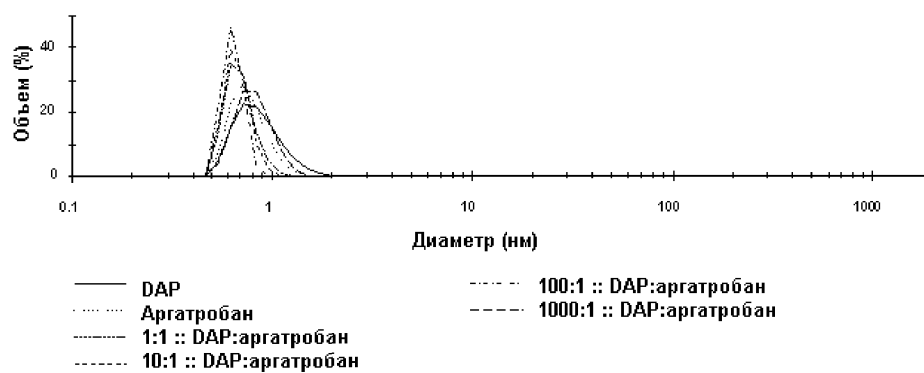
Фиг. 4



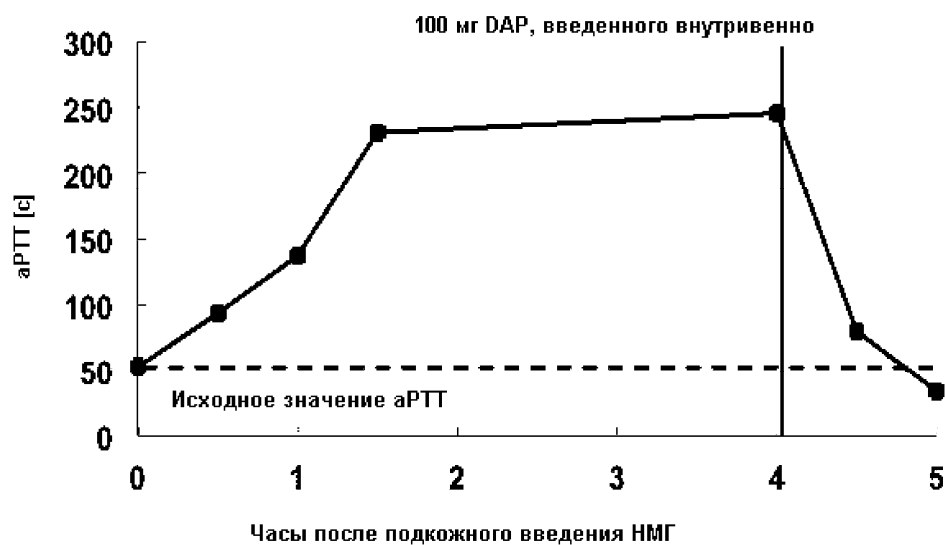
Фиг. 5



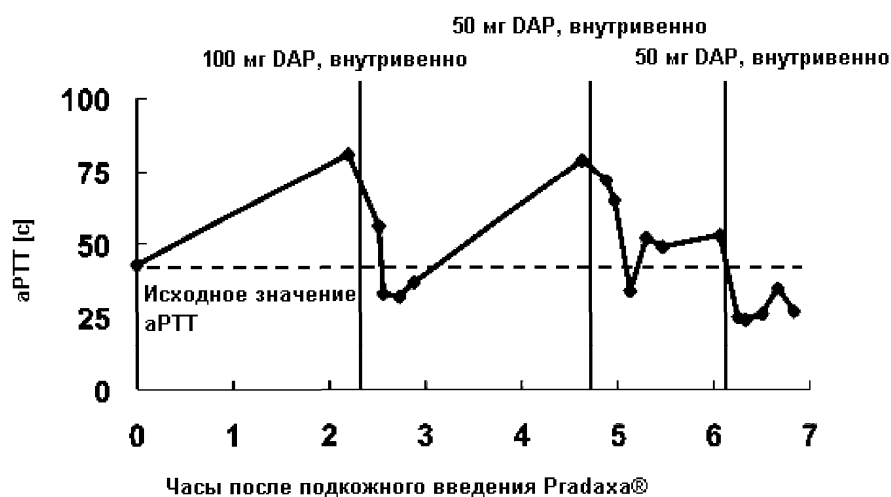
Фиг. 6



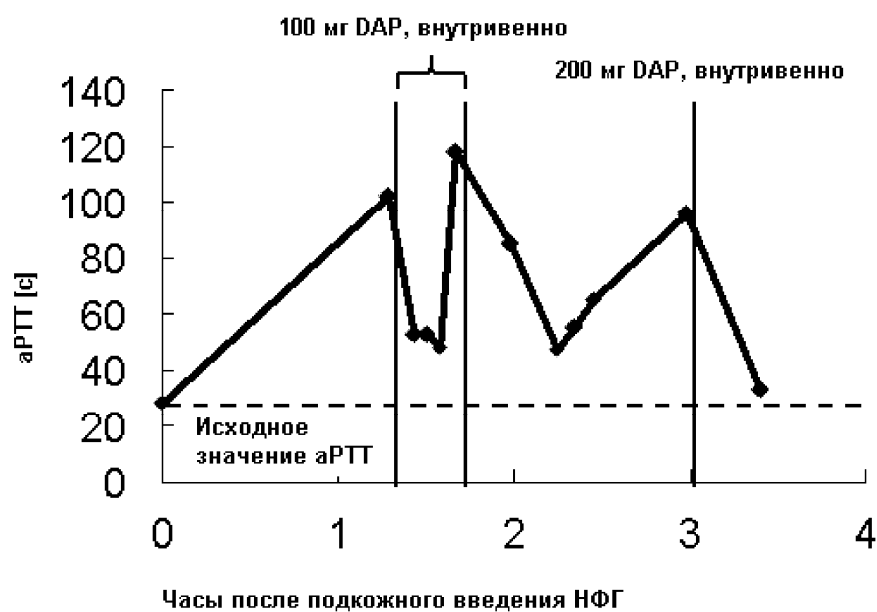
Фиг. 7



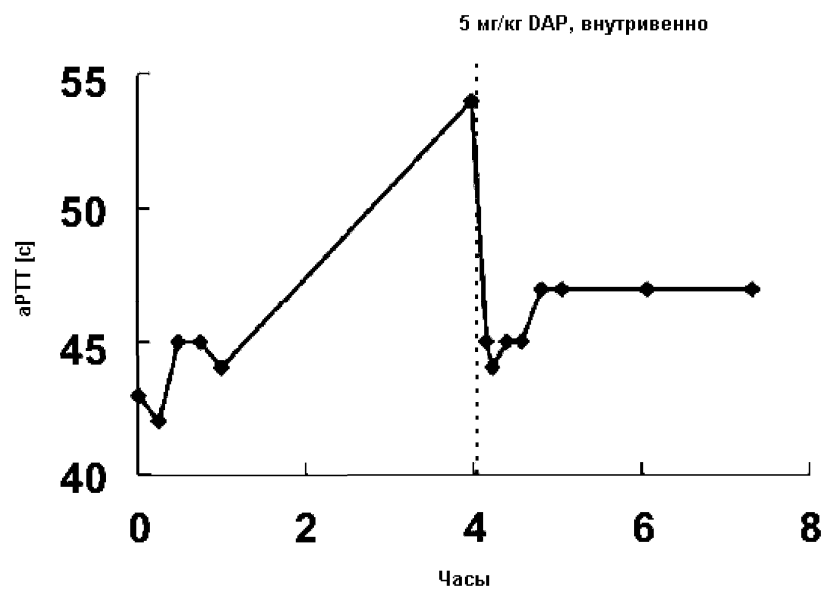
Фиг. 8



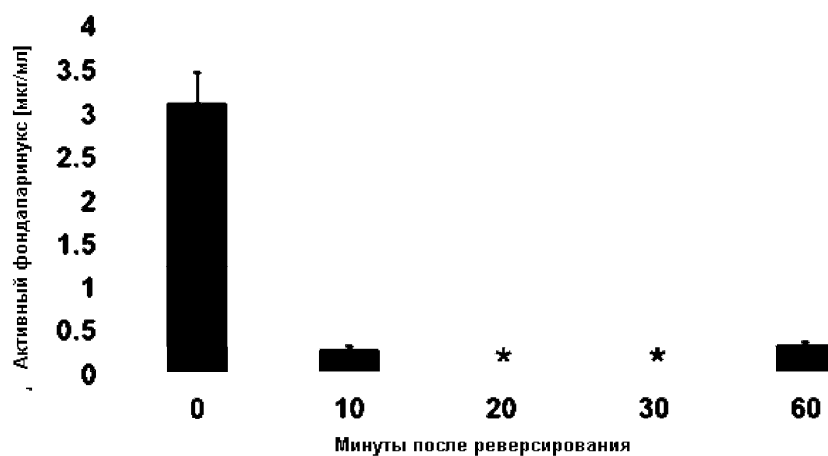
Фиг. 9



Фиг. 10

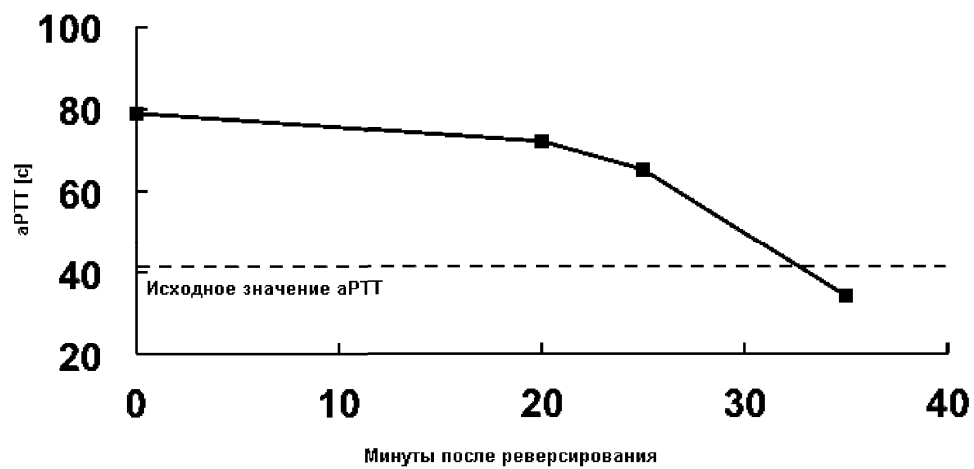


Фиг. 11

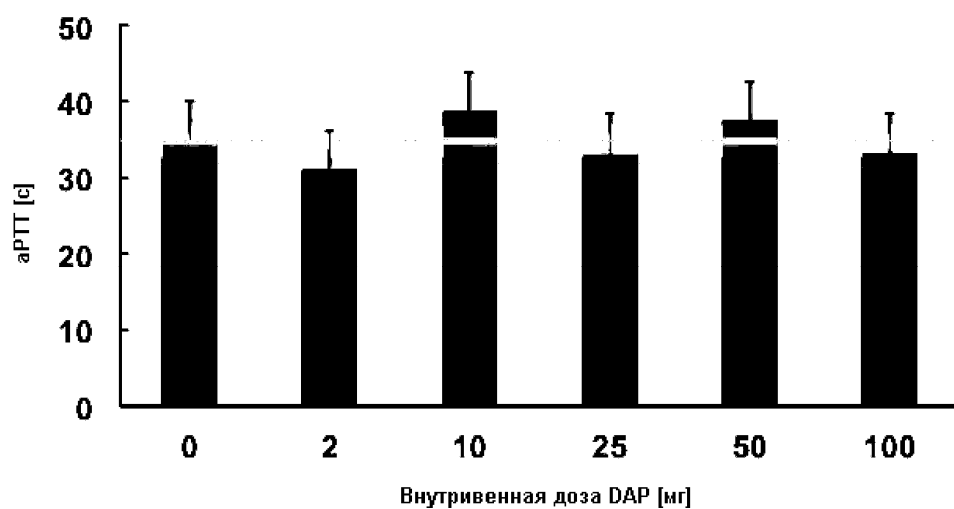


\*Указывает значение ниже предела обнаружения

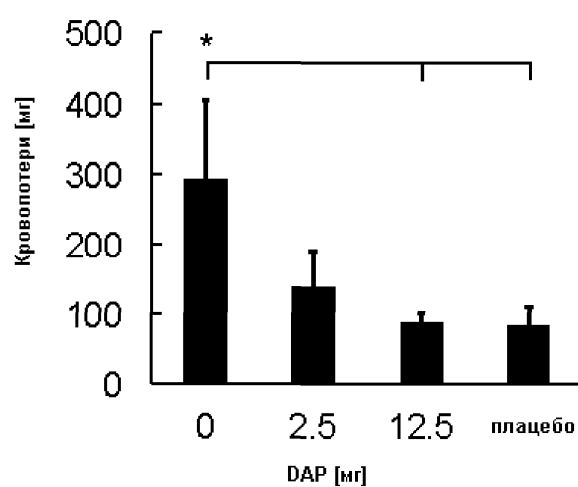
Фиг. 12



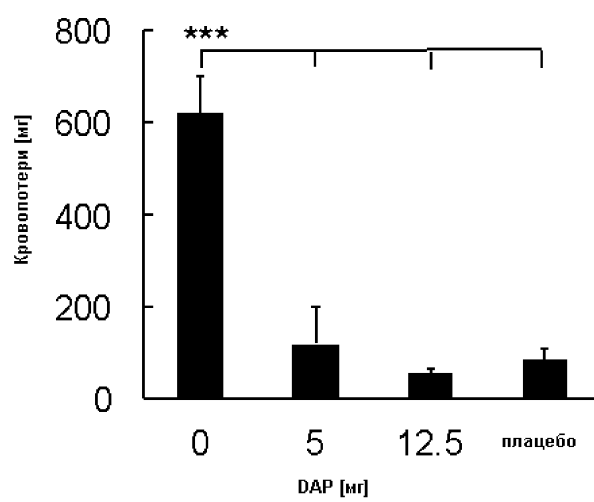
Фиг. 13



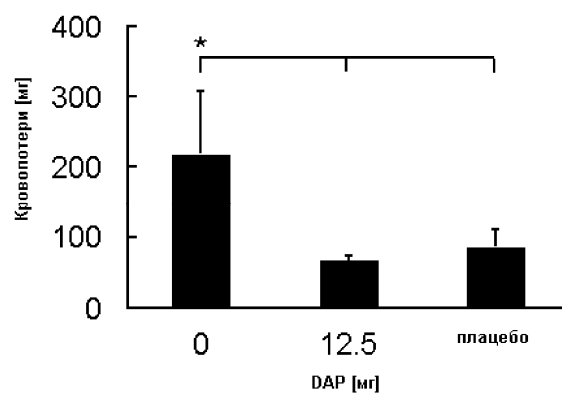
Фиг. 14



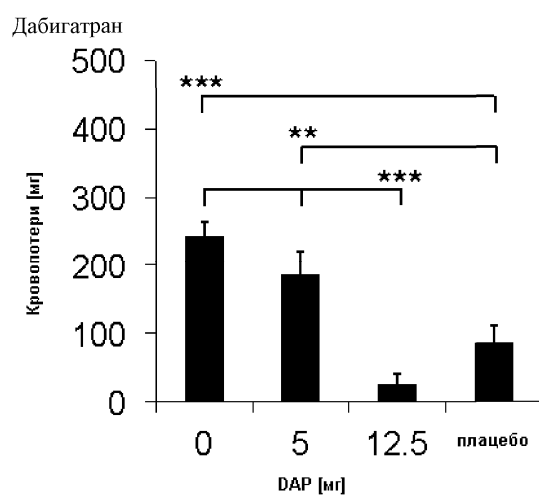
Фиг. 15



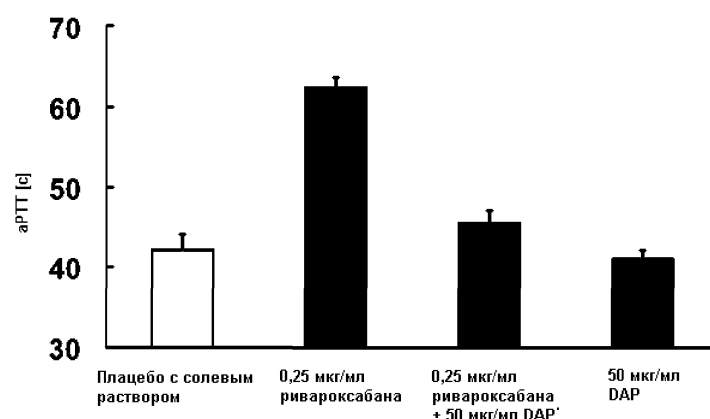
Фиг. 16



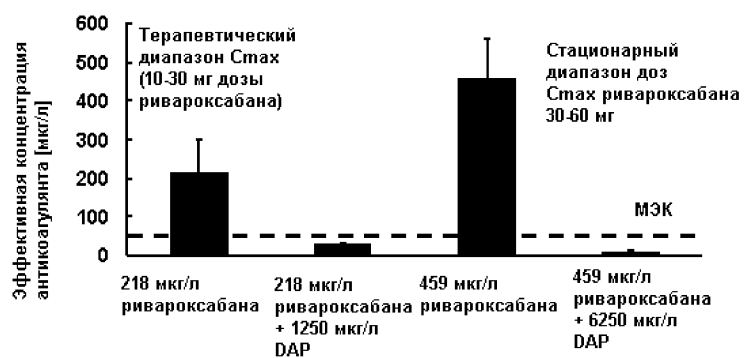
Фиг. 17



Фиг. 18

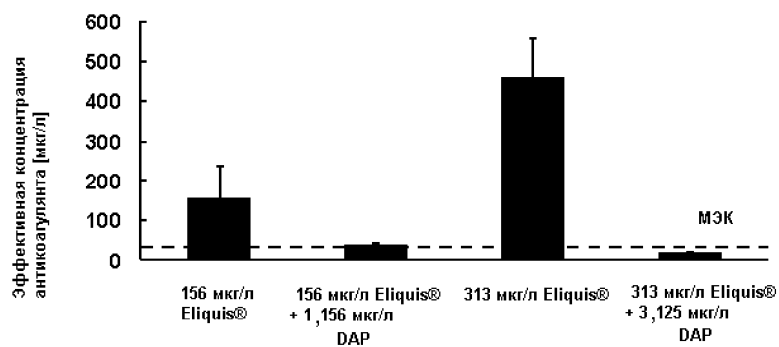


Фиг. 19

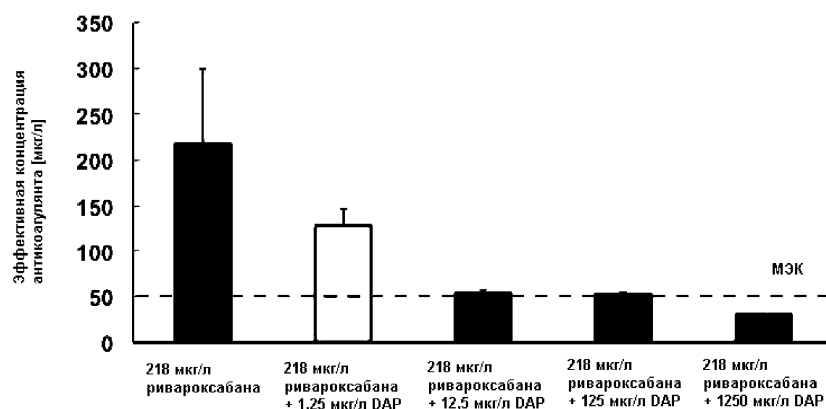


Фиг. 20





Фиг. 21



Фиг. 22



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2