



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21)(22) Заявка: **2009126147/15, 15.11.2007**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**15.11.2007**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
**08.12.2006 US 60/873,792**  
**02.07.2007 US 60/947,629**(43) Дата публикации заявки: **20.01.2011** Бюл. № 2(45) Опубликовано: **10.06.2012** Бюл. № 16(56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: **RU 2194074, 10.12.2002. US 6844367,**  
**18.01.2005. ХОЛОДОВ Л.Е. и др.**  
**Клиническая фармакокинетика. - М.:**  
**Медицина, 1985, с.83-98, 134-138, 160, 378-380.**  
**Под ред. СЕРГЕЕВ М. Краткий курс**  
**молекулярной фармакологии. - М., 1975,**  
**с.10. PETHOU M Experimental proof for the**  
**structure of a thrombin-inhibiting heparin**  
**molecule.Chemistry. 2001, №7(4), с. 858-73. он-**  
**лайн [найденно 21.09.11] [найденно из**  
**Интернет .**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
 национальной фазе: **08.07.2009**(86) Заявка РСТ:  
**US 2007/084887 (15.11.2007)**(87) Публикация заявки РСТ:  
**WO 2008/073670 (19.06.2008)**

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3,**  
**ООО "Юридическая фирма Городисский и**  
**Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

**СИНХА Ума (US),**  
**ХОЛЛЕНБАХ Стенли Дж. (US),**  
**ЭЙБ Кит (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**МИЛЛЕННИУМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,**  
**ИНК. (US)****(54) СТАНДАРТНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ТРОМБОЗА  
 ПЕРОРАЛЬНЫМ ВВЕДЕНИЕМ ИНГИБИТОРА ФАКТОРА ХА**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и  
 предназначена для ингибирования коагуляции  
 крови у пациента-человека. Применяютбетриксабан или его фармацевтически  
 приемлемые соли. Совокупная суточная доза  
 от 0,01 до 2,0 мг/кг. Группа изобретений  
 позволяет воздействовать на ингибирование

R U 2 4 5 2 4 8 4 C 2

R U 2 4 5 2 4 8 4 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
**A61K 31/40** (2006.01)  
**A61P 7/02** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2009126147/15, 15.11.2007**

(24) Effective date for property rights:  
**15.11.2007**

Priority:

(30) Convention priority:  
**08.12.2006 US 60/873,792**  
**02.07.2007 US 60/947,629**

(43) Application published: **20.01.2011 Bull. 2**

(45) Date of publication: **10.06.2012 Bull. 16**

(85) Commencement of national phase: **08.07.2009**

(86) PCT application:  
**US 2007/084887 (15.11.2007)**

(87) PCT publication:  
**WO 2008/073670 (19.06.2008)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3, OOO**  
**"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",**  
**pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

**SINKhA Uma (US),**  
**KhOLLENBAKh Stenli Dzh. (US),**  
**EhJB Kit (US)**

(73) Proprietor(s):

**MILLENNIUM FARMAS'JuTIKALZ, INK. (US)**

(54) **STANDARD DRUG PREPARATIONS AND METHODS OF TREATING THROMBOSIS BY ORAL ADMINISTRATION OF FACTOR XA INHIBITOR**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine and aims at blood coagulation inhibition in a human patient. It involves applying betrixaban or

its pharmaceutically acceptable salts. Total daily dose makes 0.01 to 2.0 mg/kg.

EFFECT: group of inventions has an effect on thrombin formation and anti-Xa activity inhibition.

6 tbl, 12 dwg, 9 ex, 11 cl

R U 2 4 5 2 4 8 4 C 2

R U 2 4 5 2 4 8 4 C 2

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

По данной заявке испрашивается приоритет согласно 35 U.S.A. § 119(e) на основании предварительных патентных заявок US № 60/873792, поданной 8 декабря 2006 г., и US № 60/947629, поданной 2 июля 2007 г., которые включены в  
5 настоящее описание в полном объеме.

### **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

#### **Область изобретения**

Данное изобретение относится к способам ингибирования коагуляции с  
10 использованием конкретной дозы ингибитора фактора Ха. Изобретение также относится к анализу, который позволяет определять образование тромбина в крови, чтобы оценить антитромботическую активность испытуемого соединения.

#### **Уровень техники**

Гемостаз, остановка кровотечения, происходит в результате хирургического  
15 вмешательства или за счет физиологических свойств вазоконстрикции и коагуляции. Хотя и тромбоциты, и коагуляция крови вовлечены в восстанавливающий гемостаз и в тромботические заболевания, в основном конкретные компоненты каскада коагуляции являются ответственными за амплификацию и ускорение процессов,  
20 вовлекаемых в агрегацию тромбоцитов и отложение фибрина, которые являются главными событиями в тромбозе и гемостазе.

Образование сгустка вызывает превращение фибриногена в фибрин, который полимеризуется в сетчатую структуру для восстановления гемостаза после  
25 повреждения. Подобный процесс приводит к закупоренным кровеносным сосудам при тромботических заболеваниях. Превращение фибриногена в фибрин катализируется тромбином, конечным продуктом ряда реакций в каскаде коагуляции крови. Тромбин также играет ключевую роль в активации тромбоцитов, внося тем самым свой вклад в тромбоз в условиях как артериального, так и венозного кровяного потока. По этим  
30 причинам теоретически допустимо, что эффективное регулирование тромбина может приводить к эффективному регулированию тромбоза. Некоторые классы применяемых в настоящее время антикоагулянтов непосредственно или косвенно воздействуют на тромбин (например, нефракционированные гепарины, низкомолекулярные гепарины, гепариноподобные соединения, пентасахарид и  
35 варфарин). Непосредственному или косвенному ингибированию активности тромбина уделяется главное внимание при клинических разработках различных антикоагулянтов (обзор, выполненный Eriksson and Quinlan, Drugs 11: 1411-1429, 2006).

Протромбин, предшественник тромбина, превращается в активный фермент  
40 фактором Ха (fXa). Локализованная активация генерации тканевый фактор/опосредуемый фактором VIIa фактор Ха амплифицируется комплексом фактор IXa/фактор VIIa и ведет к сборке протромбиназы на активированных тромбоцитах. Фактор Ха как часть комплекса протромбиназы является единственным ферментом, ответственным за продолжительное образование тромбина в сосудистой  
45 системе. Фактор Ха является серин-протеазой, активированной формой его предшественника фактора X, и членом связывающих ион кальция, содержащих гамма-карбоксихлутаминовую кислоту (GLA), зависимых от витамина K и участвующих в коагуляции крови факторов. В отличие от тромбина, который действует на различных  
50 белковых субстратах, включая фибриноген и рецепторы PAR (активируемые протеазой рецепторы, Coughlin, J. Thrombosis Haemostasis 3: 1800-1814, 2005), фактор Ха, по-видимому, имеет единственный физиологический субстрат, а именно протромбин. Так как одна молекула фактора Ха может быть способна генерировать

более чем 1000 молекул тромбина (Mann, et al., J. Thrombosis Haemostasis 1: 1504-1514, 2003), непосредственное ингибирование фактора Ха, как путь косвенного ингибирования образования тромбина, может быть эффективной антикоагулянтной стратегией. Это суждение основано на ключевой роли протромбиназы в синтезе тромбина и на том факте, что ингибирование протромбиназы будет иметь явное воздействие на все пути агрегации тромбоцитов и свертывания крови.

Активированные протеазы, такие как фактор VIIa, фактор IXa или фактор Ха, сами по себе имеют слабую протеолитическую активность. Однако их сборка в зависимые от кофактора, связанные с мембраной комплексы значительно повышает их каталитические эффективности. Этот эффект наиболее драматичен для фактора Ха, когда эффективность увеличивается множителем  $10^5$  (Mann, et al., Blood 76(1):1-16, 1990). Благодаря более высокой концентрации зимогенов, присутствующих в крови (1,4 мкМ протромбина против 150 нМ фактора Ха), и кинетике активации меньшее количество фактора Ха, чем требуется для ингибирования тромбина, необходимо для достижения антикоагулянтного эффекта. Косвенное подтверждение гипотезы превосходства фактора Ха в качестве терапевтической мишени по сравнению с тромбином может быть также найдено в клинических исследованиях по предотвращению тромбоза глубоких вен. Фондапаринукс, зависимый от антитромбина III ингибитор фактора Ха, превосходит эноксапарин (низкомолекулярный гепарин, который ингибирует и тромбин, и фактор Ха), как было доказано в четырех широких исследованиях по ортопедической хирургии (Turpie, et al., Archives Internal Medicine 162(16):1833-1840, 2002). Следовательно, подтверждено, что соединения, которые избирательно ингибируют фактор Ха, могут быть применимы в качестве диагностических агентов *in vitro* или для терапевтического введения при некоторых тромботических расстройствах, см., например, WO 94/13693.

### **Сущность изобретения**

Сравнительное моделирование степени изменений активности протромбиназы до уровней антитромботической эффективности привело к обнаружению терапевтической активности ингибиторов фактора Ха в отношении людей. Данное изобретение относится к способу ингибирования коагуляции у пациента-человека с использованием ингибирующего коагуляцию количества ингибитора фактора Ха. Конкретно, перорально доступные непосредственные ингибиторы фактора Ха эффективны для ингибирования коагуляции у пациента-человека, когда их вводят пациенту в совокупном суточном количестве между около 0,01 и около 2,0 миллиграммов на килограмм на основе общей массы пациента ("мг/кг").

Предполагается, что такая доза будет эффективной для любого соединения, которое специфически ингибирует фактор Ха, и особенно эффективна для ингибиторов фактора Ха формул I, II, III, IV или V, которые описаны ниже.

Изобретение также относится к способу определения статуса коагуляции у пациента. Предполагается, что этот способ определения статуса коагуляции может быть использован для испытания многих различных классов антикоагулянтов в дополнение к ингибиторам фактора Ха.

В одном аспекте изобретения способ содержит введение пациенту ингибирующего коагуляцию количества соединения формулы I:

**A-Q-D-E-G-J-X**

**I**

где

А выбран из таких групп, как

(a) C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил;

(b) C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-циклоалкил;

5 (c) -N(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>), N(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>)-C(=NR<sup>3</sup>)-, N(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>)-C(=NR<sup>3</sup>)-N(R<sup>4</sup>)-, R<sup>1</sup>-C(=NR<sup>3</sup>)-, R<sup>1</sup>-C(=NR<sup>3</sup>)-N(R<sup>4</sup>)-;

(d) фенил, который независимо замещен 0-2 заместителями R;

10 (e) нафтил, который независимо замещен 0-2 заместителями R, и моноциклическая или конденсированная бициклическая гетероциклическая кольцевая система, имеющая от 5 до 10 атомов в кольце, где 1-4 атома кольца кольцевой системы выбраны из N, O и S и где кольцевая система может быть замещенной 0-2 заместителями R;

R выбран из

15 H, галогена, -CN, -CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -C(=O)-N(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-N(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>), -NO<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>), -SO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=NR<sup>3</sup>)-R<sup>1</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=NR<sup>3</sup>)-N(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-N(R<sup>4</sup>)-C(=NR<sup>3</sup>)-N(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>), -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NR<sup>1</sup>-группы, прикрепленной к 3-6-членному гетероциклическому кольцу, содержащему 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S, -C<sub>1-4</sub> алкила, -C<sub>2-6</sub> алкенила, -C<sub>2-6</sub> алкинила, -C<sub>3-8</sub> циклоалкила, -C<sub>0-4</sub> алкил-C<sub>3-8</sub> циклоалкила, -CF<sub>3</sub>, OR<sup>2</sup> и 5-6-членной гетероциклической системы, содержащей 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S, где 1-4 атома водорода гетероциклической системы могут быть независимо заменены заместителем, выбранным из группы, состоящей из таких заместителей, как галоген, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>1-4</sub> алкил-CN, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил и -NO<sub>2</sub>;

m представляет собой целое число 0-2;

30 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> независимо выбраны из группы, состоящей из таких заместителей, как H, -OR<sup>5</sup>, -N(-R<sup>5</sup>, -R<sup>6</sup>), -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилфенил и -C<sub>0-4</sub> алкилнафтил, где 1-4 атома водорода на кольцевых атомах фенильной и нафтильной частей молекулы могут быть независимо заменены заместителем, выбранным из группы, состоящей из таких заместителей, как галоген, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -CN и -NO<sub>2</sub>; или R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup>, или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup>, взятые вместе, могут образовывать 3-8-членный циклоалкил или гетероциклическую кольцевую систему, где гетероциклическая кольцевая система может иметь от 3 до 10 кольцевых атомов с 1-2 кольцами в кольцевой системе и содержать 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S, где 1-4 атома водорода гетероциклической кольцевой системы могут быть независимо заменены заместителем, выбранным из группы, состоящей из таких заместителей, как галоген, C<sub>1-4</sub> алкил, -CN, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил и -NO<sub>2</sub>;

R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> независимо выбраны из группы, состоящей из таких заместителей, как

45 H, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилфенил и -C<sub>0-4</sub> алкилнафтил, где 1-4 атома водорода на кольцевых атомах фенильной и нафтильной частей молекулы могут быть независимо заменены заместителем, выбранным из группы, состоящей из таких заместителей, как галоген, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -CN и -NO<sub>2</sub>; или R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup>, взятые вместе, могут образовывать 3-8-членный циклоалкил или гетероциклическую кольцевую систему, где гетероциклическая кольцевая система может иметь от 3 до 10 кольцевых атомов с 1-2

кольцами в кольцевой системе и содержать 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S, где 1-4 атома водорода гетероциклической кольцевой системы могут быть независимо заменены заместителем, выбранным из группы, состоящей из таких заместителей, как галоген, -C<sub>1-4</sub> алкил, -CN, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил и -NO<sub>2</sub>;

Q представляет заместитель, выбранный из группы, состоящей из таких заместителей, как

непосредственная связь, -CH<sub>2</sub>-, -C(=O)-, -O-, -N(R<sup>7</sup>)-, -N(R<sup>7</sup>)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>N(R<sup>7</sup>)-, -C(=NR<sup>7</sup>)-, -C(=O)-N(R<sup>7</sup>)-, -N(R<sup>7</sup>)-C(=O)-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>-N(R<sup>7</sup>)- и -N(R<sup>7</sup>)-SO<sub>2</sub>-;

R<sup>7</sup> выбран из группы, состоящей из таких заместителей, как

H, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкиленфенил и -C<sub>0-4</sub> алкиленнафтил, где 1-4 атома водорода на кольцевых атомах фенильной и нафтильной частей молекулы могут быть независимо заменены заместителем, выбранным из группы, состоящей из таких заместителей, как галоген, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -CN и -NO<sub>2</sub>;

D представляет непосредственную связь или заместитель, выбранный из группы, состоящей из таких заместителей, как

(a) фенил, который независимо замещен 0-2 заместителями R<sup>1a</sup>;

(b) нафтил, который независимо замещен 0-2 заместителями R<sup>1a</sup>, и

(c) моноциклическая или конденсированная бициклическая гетероциклическая кольцевая система, имеющая от 5 до 10 атомов в кольце, где 1-4 атома кольца кольцевой системы выбраны из N, O и S и где кольцевая система может быть замещенной 0-2 заместителями R<sup>1a</sup>;

R<sup>1a</sup> выбран из

галогена, -C<sub>1-4</sub> алкила, -C<sub>2-6</sub> алкенила, -C<sub>2-6</sub> алкинила, -C<sub>3-8</sub> циклоалкила, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкила, -CN, -NO<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sup>2a</sup>, R<sup>3a</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO<sub>2</sub>R<sup>2a</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONR<sup>2a</sup>R<sup>3a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>2a</sup>R<sup>3a</sup>), -SO<sub>2</sub>R<sup>2a</sup>, -CF<sub>3</sub>, -OR<sup>2a</sup> и 5-6-членной ароматической гетероциклической системы, содержащей 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S, где 1-4 атома водорода ароматической гетероциклической системы могут быть независимо заменены заместителем, выбранным из группы, состоящей из таких заместителей, как галоген, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -CN и -NO<sub>2</sub>;

R<sup>2a</sup> и R<sup>3a</sup> независимо выбраны из группы, состоящей из таких заместителей, как

H, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкиленфенил и -C<sub>0-4</sub> алкиленнафтил, где 1-4 атома водорода на кольцевых атомах фенильной и нафтильной частей молекулы могут быть независимо заменены заместителем, выбранным из группы, состоящей из таких заместителей, как галоген, -C<sub>1-4</sub> алкил, -C<sub>2-6</sub> алкенил, -C<sub>2-6</sub> алкинил, -C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -C<sub>0-4</sub> алкилен-C<sub>3-8</sub> циклоалкил, -CN и -NO<sub>2</sub>;

n представляет собой целое число 0-2;

E представляет непосредственную связь или заместитель, выбранный из группы, состоящей из таких заместителей, как

-C<sub>1-2</sub> алкилен, -O-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -C<sub>0-1</sub> алкилен-C(=O), -C<sub>0-1</sub> алкилен-C(=O)-N(-R<sup>8</sup>)-C<sub>0-1</sub> алкилен-, -C<sub>0-1</sub> алкилен-N(R<sup>8</sup>)-C(=O)-C<sub>0-1</sub> алкилен-, -N(-R<sup>8</sup>)-C(=O)-N(-R<sup>8</sup>)- и C<sub>0-1</sub> алкилен-N(-R<sup>8</sup>)-;

$R^8$  выбран из группы, состоящей из таких заместителей, как  
 Н,  $-C_{1-4}$  алкил,  $-C_{0-4}$  алкиленарил,  $-C_{0-4}$  алкиленгетероарил,  $-C_{1-4}$  алкилен- $C(=O)$ -  
 ОН,  $-C_{1-4}$  алкилен- $C(=O)$ -О- $C_{1-4}$  алкил и  $-C_{1-4}$  алкилен- $C(=O)$ -N( $-R^{2b}$ ,  $-R^{3b}$ );

5  $R^{2b}$  и  $R^{3b}$  независимо выбраны из группы, состоящей из таких заместителей, как  
 Н,  $-C_{1-4}$  алкил,  $-C_{0-4}$  алкилен-арил,  $-C_{0-4}$  алкилен-гетероциклическая группа, и  $R^{2b}$   
 и  $R^{3d}$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, могут образовывать 5-8-  
 членное гетероциклическое кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, выбранных из N, O  
 10 и S, где гетероциклическое кольцо может быть замещенным 0-2 группами  $R^{1c}$ ;

$R^{1c}$  выбран из группы, состоящей из таких заместителей, как  
 галоген,  $-C_{1-4}$  алкил,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-C(=O)$ -N( $-R^{2c}$ ,  $-R^{3c}$ ),  $-C(=O)$ -OR $^{2c}$ ,  $-(CH_2)_q$ -N( $-R^{2c}$ ,  
 $-R^{3c}$ ),  $-SO_2$ -N( $-R^{2c}$ ,  $-R^{3c}$ ),  $-SO_2R^{2c}$ ,  $-CF_3$  и  $-(CH_2)_q$ -OR $^{2c}$ ,

15  $R^{2c}$  и  $R^{3c}$  независимо выбраны из группы, состоящей из таких заместителей, как  
 Н,  $-C_{1-4}$  алкил и  $-C_{1-4}$  алкилен-арил;

q представляет собой целое число 0-2;

G выбран из группы, состоящей из таких заместителей, как

20 (a)  $C_2$  алкенил или  $C_{3-8}$  циклоалкенил, где точками присоединения алкенила и  
 циклоалкенила являются атомы углерода алкенила и где  $-C_2$  алкенил или  $-C_{3-8}$   
 циклоалкенил замещены 0-4 группами  $R^{1d}$ ;

(b) фенильная группа, где кольцевые атомы углерода фениленовой группы  
 замещены 0-4 группами  $R^{1d}$ ;

25 (c) 3-8-членная гетероциклическая кольцевая система, содержащая 1-4 гетероатома,  
 выбранных из N, O и S, где 0-2 атома кольца могут быть замещены 0-4 группами  $R^{1d}$ ; и

(c) 8-10-членная конденсированная гетероциклическая бициклическая кольцевая  
 система, содержащая 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S, где 0-2 атома кольца  
 30 конденсированной бициклической кольцевой системы могут быть замещены 0-4  
 группами  $R^{1d}$ ;

$R^{1d}$  выбран из группы, состоящей из

35 Н, галогена,  $-C_{1-6}$  алкила, арила,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-(CH_2)_{0-6}$ -NR $^{2d}$ R $^{3d}$ ,  $-SO_2$ NR $^{2d}$ R $^{3d}$ , -  
 $SO_2$ R $^{2d}$ ,  $-CF_3$ ,  $-(CH_2)_{0-6}$ -OR $^{2d}$ ,  $-O$ -( $CH_2$ ) $_{1-6}$ OR $^{2d}$ ,  $-O$ -( $CH_2$ ) $_{1-6}$ -C(=O)-O-R $^{2d}$ ,  $-O$ -( $CH_2$ ) $_{1-6}$ -C(=  
 O)-N( $R^{2d}$ ,  $R^{3d}$ ),  $-N(R^{5a})$ -( $CH_2$ ) $_{1-6}$ -OR $^{2d}$ ,  $-N(R^{5a})$ -( $CH_2$ ) $_{1-6}$ -N( $R^{2d}$ ,  $R^{3d}$ ),  $-C(=O)$ -  
 N( $R^{2d}$ ,  $R^{3d}$ ),  $-N(R^{5a})$ -( $CH_2$ ) $_{1-6}$ -C(=O)-N( $R^{2d}$ ,  $R^{3d}$ ),  $-N$ -( $CH_2$ ) $_{1-6}$ -OR $^{2d}$ ) $_2$ ,  $-N(R^{5a})$ -( $CH_2$ ) $_{1-6}$ -  
 OR $^{2d}$ ,  $-N(R^{5a})$ -C(=O)-R $^{2d}$ ,  $-N(R^{5a})$ - $SO_2$ -R $^{2d}$ ,  $-(CH_2)_{0-6}$ -C(=O)-O-R $^{2d}$ ,  $-(CH_2)_{0-6}$ -C(=O)-  
 40 N( $R^{2d}$ ,  $R^{3d}$ ),  $-(CH_2)_{0-6}$ -C(=NR $^{2d}$ )-N( $R^{3d}$ ,  $R^{4d}$ ),  $-(CH_2)_{0-6}$ -N( $R^{5a}$ )C(=NR $^{2d}$ )-N( $R^{3d}$ ,  $R^{4d}$ ), -  
 ( $CH_2$ ) $_{0-6}$ -N( $R^{3d}$ ) $C_{5-6}$ -членного гетероциклического кольца, содержащего 1-4  
 гетероатома, выбранных из N, O и S и  $-(CH_2)_{0-6}$ -5-6-членное гетероциклическое кольцо,  
 содержащее 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S;

45  $R^{5a}$ ,  $R^{2d}$ ,  $R^{3d}$  и  $R^{4d}$  независимо выбраны из группы, состоящей из

Н,  $-C_{1-6}$  алкила,  $-C_{1-6}$  алкиларила,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ; карбоциклического арила,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ;  
 или  $R^{2d}$  и  $R^{3d}$ , взятые вместе с атомами N, к которым они независимо присоединены,  
 образуют 5-7-членное гетероциклическое кольцо, или  $R^{3d}$  и  $R^{4d}$ , взятые вместе с  
 50 атомами N, к которым они присоединены, образуют 5-8-членное гетероциклическое  
 кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S;

J представляет непосредственную связь или выбран из группы, состоящей из

$-N(-R^9)$ -C(=O)-,  $-C(=O)$ -N( $-R^9$ )-,  $-O$ -,  $-S$ -,  $-SO$ -,  $-SO_2$ -,  $-CH_2$ -,  $-N(-R^9)$ - и  $-N(-R^9)$ - $SO_2$ -;



$R^9$ , независимо выбран из группы, состоящей из

H,  $-C_{1-4}$  алкила,  $-C_{0-4}$  алкил-карбоциклического арила,  $-(CH_2)_{0-4}$ -5-6-членного гетероциклического кольца, содержащего 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S;

$-(CH_2)_{1-6}-C(=O)-O-C_{1-4}$  алкила и  $-(CH_2)_{1-6}-C(=O)-N(R^{6a}, R^{6b})$ ;

$R^{6a}$  и  $R^{6b}$ , каждый независимо, выбран из группы, состоящей из

H и  $-C_{1-6}$  алкила;

X выбран из группы, состоящей из таких заместителей, как

(a) фенил, замещенный 0-3 группами  $R^{1e}$ ;

(b) нафтил, замещенный 0-3 группами  $R^{1e}$ , и

(c) 6-членная ароматическая гетероциклическая кольцевая система, содержащая 1-3 атома N и имеющая 0-3 атома в кольце, замещенные 0-3 группами  $R^{1e}$ , и

(d) 8-10-членная конденсированная ароматическая гетероциклическая бициклическая кольцевая система, содержащая 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S, и 0-3 атома кольца конденсированной гетероциклической бициклической кольцевой системы замещены 0-3 группами  $R^{1e}$ ;

$R^{1e}$  независимо выбран из группы, состоящей из таких заместителей, как

галоген,  $-CF_3$ ,  $-C_{1-4}$  алкил, карбоциклический арил,  $-C_{0-2}$ -алкилен-CN,  $-O-R^{2e}$ ,  $-C_{0-2}$ -алкилен- $C(=O)-O-R^{2e}$ ,  $-C_{0-2}$ -алкилен- $C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e})$ ,  $-C_{0-2}$ -алкилен- $NO_2$ ,  $-C_{0-2}$ -алкилен- $N(R^{2e}, R^{3e})$ ,  $-C_{0-2}$ -алкилен- $SO_2-N(R^{2e}, R^{3e})$ ,  $-C_{0-2}$ -алкилен- $SO_2-R^{2e}$ ,

тригалогеналкил,  $-O-C_{0-2}$ -алкилен- $O-R^{2e}$ ,  $-C_{0-2}$ -алкилен- $O-R^{2e}$ ,  $-O-C_{1-4}$ -алкилен- $C(=O)-$

$N(R^{2e}, R^{3e})$ ,  $-O-C_{1-4}$ -алкилен- $C(=O)-O-R^{2e}$ ,  $-C_{0-2}$ -алкилен- $N(R^{2e})-C(=O)-R^{3e}$ ,  $-C_{0-2}$ -

алкилен- $N(-R^{2e})-SO_2-R^{3e}$ ,  $-CH_2-N(R^{2e})-C(=O)-R^{3e}$ ,  $-CH_2-N(R^{2e})-SO_2-R^{3e}$ ,  $-(CH_2)_{0-6}$

$NR^{2e}R^{3e}$ ,  $-C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e})$ ,  $-N(-(CH_2)_{1-6}-OR^{2e})_2$ ,  $-N(R^{10})-(CH_2)_{1-6}-OR^{2e}$ ,  $-N(R^{10})-C(=O)-$

$R^{2e}$ ,  $-N(R^{10})-SO_2-R^{2e}$ ,  $-C(=N(R^{10}))_2-N(R^{2e}, R^{3e})$  и  $-(CH_2)_{0-6}$ -5-6-членное гетероциклическое

кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, выбранных из N, O и S;

$R^{10}$ ,  $R^{2e}$  и  $R^{3e}$  независимо выбраны из группы, состоящей из

H,  $-C_{1-4}$  алкила,  $-C_{0-2}$  алкилен- $O-R^{1g}$ ,  $-C_{0-2}$  алкилен- $N(-R^{1g}, -R^{2g})$ ,  $-C_{1-4}$  алкилен-

карбоциклического арила,  $-C_{1-4}$  алкилен-гетероциклической группы, и  $R^{10}$  и  $R^{2e}$  или

$R^{2e}$  и  $R^{3e}$  вместе с атомом N, к которому они присоединены, могут образовывать 5-8-

членное гетероциклическое кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, выбранных из N, O

и S, которое может быть замещенным 0-2 группами  $R^{1g}$ ;

$R^{1g}$  и  $R^{2g}$  независимо выбраны из группы, состоящей из таких заместителей, как

H, галоген,  $-C_{1-4}$  алкил, карбоциклическая арильная группа, гетероциклическая группа,  $-CN$ ,  $-C(=O)-N(R^{3g})R^{4g}$ ,  $-C(=O)-OR^{3g}$ ,  $-NO_2$ ,  $-(CH_2)_p-NR^{3g}R^{4g}$ ,  $-SO_2NR^{3g}R^{4g}$ ,  $-SO_2R^{3g}$ ,  $-CF_3$  и  $-(CH_2)_pOR^{3g}$ ;

p означает целое число 0-2 и

$R^{3g}$  и  $R^{4g}$  независимо выбраны из группы, состоящей из таких заместителей, как

H,  $C_{1-4}$  алкил и  $-C_{0-4}$ -алкилен-карбоциклический арил;

или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления ингибирующее коагуляцию количество

соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между

около 0,01 и около 2,0 мг/кг. В другом варианте осуществления ингибирующее

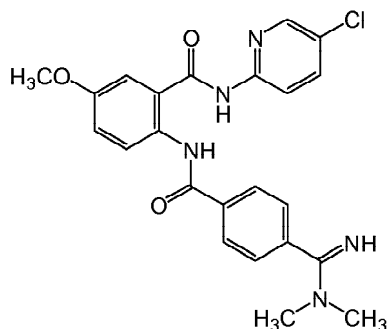
коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной

суточной дозой между около 0,1 и около 1,5 мг/кг. В еще одном варианте

осуществления ингибирующее коагуляцию количество между около 0,4 и около 1,2 мг/кг.

В одном варианте осуществления ингибирующее коагуляцию количество вводят пациенту один раз в сутки. В другом варианте осуществления ингибирующее коагуляцию количество вводят пациенту за одни сутки, но дают порциями несколько раз в сутки, т.е. дважды ("BID") или три раза в сутки ("TID").

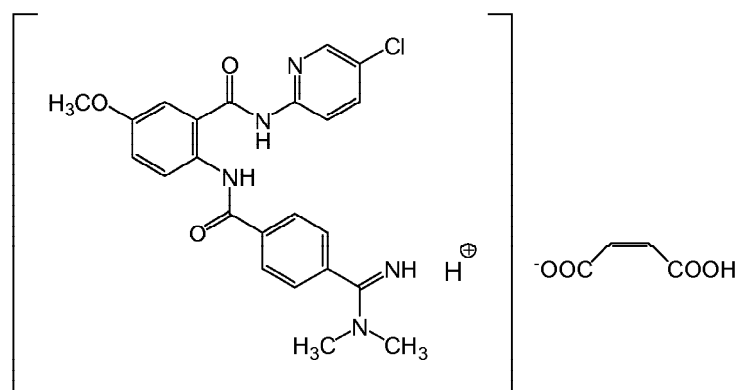
В одном варианте осуществления фармацевтически приемлемой солью соединения ингибитора фактора Ха является соль малеат. В другом варианте осуществления соединения формулы I является соединением формулы II:



## II

или его фармацевтически приемлемой солью. В некоторых вариантах осуществления соль является малеатом. В одном варианте осуществления ингибирующее коагуляцию количество является совокупной суточной дозой между около 0,01 и около 2,0 мг/кг, или между около 0,1 и около 1,5 мг/кг, или между около 0,4 и около 1,2 мг/кг.

В другом варианте осуществления соединение, ингибитор фактора Ха, является солью малеатом, имеющим структуру формулы III:



## III

Изобретение также относится к стандартному препарату, содержащему фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель и ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха формулы I, II, IV или V (как описано ниже) или его фармацевтически приемлемой соли или соли формулы III. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее коагуляцию количество находится между около 0,01 и около 2,0 мг/кг. В других вариантах осуществления доза находится между около 0,1 и около 1,5 мг/кг или между около 0,4 и около 1,2 мг/кг.

Изобретение также относится к анализу *in vitro* для определения

антитромботических свойств соединения *in vivo*. Анализ содержит следующие стадии:

а) введение испытуемого соединения в образец *in vitro* цельной крови или плазмы, содержащей тканевый фактор (ТФ) и обнаружимо меченный тромбиновый субстрат для формирования испытуемого образца;

б) определение степени активности тромбина в испытуемом образце путем отслеживания расщепления обнаружимо меченного тромбинового субстрата в испытуемом образце как функцию времени;

в) определение степени активности тромбина в контрольном образце путем отслеживания расщепления обнаружимо меченного тромбинового субстрата в контрольном образце как функцию времени, где контрольный образец содержит цельную кровь или плазму, содержащую тканевый фактор (ТФ) и обнаружимо меченный тромбиновый субстрат;

г) сравнение степени активности тромбина в испытуемом образце и в контрольном образце, где степень активности тромбина в испытуемом образце является показателем того, что испытуемое соединение имеет *in vivo* антитромботическую активность.

Кровь и плазма могут быть предохранены от коагуляции или не предохранены от коагуляции.

В некоторых вариантах осуществления изобретения обнаружимо меченным тромбиновым субстратом является Z-Gly-Gly-Arg-АМС.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1А показана корреляция образования тромбина с международным нормализованным отношением (INR) у пациентов, прошедших антикоагулянтную терапию варфарином. Образование тромбина измеряли на 10 минуте в образцах плазмы от пациентов, получающих стабильную терапию варфарином (n=137). Данные от пациентов, получающих стабильную терапию варфарином, представлены как квинтили результатов ЯМР. Планки погрешностей показывают стандартные ошибки.

На фиг. 1В показана корреляция образования тромбина с активированным парциальным тромбопластиновым временем (аРТТ) у пациентов, прошедших антикоагулянтную терапию эноксапарином. Образование тромбина плазмы измеряли у 16 пациентов, прошедших антикоагулянтную терапию эноксапарином. Единицы анти-fХа измеряли путем анализа СОАТЕСТ LMW согласно инструкциям производителя. Группы сравнивали путем t-теста Стьюдента.

На фиг. 1С показана корреляция образования тромбина с аРТТ у пациентов, прошедших антикоагулянтную терапию нефракционированным гепарином (UFN). Образование тромбина плазмы измеряли у 15 пациентов. Единицы анти-fХа измеряли путем анализа СОАТЕСТ LMW согласно инструкциям производителя. Группы сравнивали путем t-теста Стьюдента.

На фиг. 2 показано зависимое от дозы ингибирование тромбоза *in vivo* на модели обезьяны и дает основание полагать, что анализ *in vitro* позволяет судить об антитромботической активности *in vivo*. Оседание меченных индием тромбоцитов в камере в течение времени после инфузии носителя или бетриксабана. Число меченых тромбоцитов в камере нормализовали для подсчетов прединфузионных тромбоцитов для отдельных животных. Данные представляют среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Оседание тромбоцитов за 140 минут анализировали путем ANOVA с последующим тестом Dunnett. Доза 3 (26-38 нг/мл) давала значительное снижение по сравнению с контролем (P<0,05) и доза 4 (54-88 нг/мл) давала значительное снижение по сравнению с контролем (величина P<0,01).

На фиг. 3 показано зависимое от дозы ингибирование образования тромбина в цельной крови от здоровых людей-добровольцев. Цельную кровь обрабатывали бетриксабаном установленной концентрации (в нМ) перед началом испытания. Показаны относительные единицы флуоресценции, являющиеся результатом расщепления меченого тромбинового субстрата.

На фиг. 4А и 4В показано зависимое от дозы ингибирование образования тромбина в цельной крови от здоровых людей-добровольцев. Цельную кровь обрабатывали фондапаринуксом установленной концентрации (в нМ) перед началом испытания. Диапазон концентрации фондапаринукса, изображенный на фиг. 4В, соответствует уровням терапевтической антикоагуляции, применяемым в ортопедической хирургии и у пациентов с острым коронарным синдромом. Показаны относительные единицы флуоресценции, являющиеся результатом расщепления меченого тромбинового субстрата.

На фиг. 5 показаны данные анализов *in vitro*, проводимых с плазмой от здоровых людей-добровольцев, получавших перорально бетриксабан. Это более подробно обсуждается в примере 8.

На фиг. 6 показана процентная доля пациентов с венозной тромбозом (VTE) и 95% доверительными интервалами для бетриксабана и эноксапарина, как определено путем исследования в примере 9 с применением односторонней венографии между днями 10 и 14 и для эноксапариновых исторических контролей (В и С) из исследований с использованием двусторонней венографии, проводимой между днями 10 и 14 после ортопедической хирургии (полная замена колена). Это более тщательно обсуждается в примере 9. Подробности исследования, соответствующего Epoch В, сообщаются в Blood 102 (11); 2003. Подробности исследования, соответствующего Epoch С, сообщаются в ссылке Lassen et al. (J. Thromb Haemostasis 2007, сентябрь 15).

На фиг. 7 показано уменьшение от базисной линии образования тромбина при лечении различными дозами бетриксабана и эноксапарина на день 2, при выписывании и флебограмме. Показано среднее изменение от базисной линии относительных единиц флуоресценции ( $\pm$  стандартная ошибка от среднего значения) при образовании тромбина плазмы, путем осмотра и лечения. Пациенты, выписанные на день 2, также представлены средней величиной на этот день исследования.

На фиг. 8 показаны изменения активности анти-fXa изменяющихся доз бетриксабана и эноксапарина на день 2, при выписывании и при флебограмме. Показано среднее значение ( $\pm$  стандартная ошибка от среднего значения) активности анти-fXa (ед./мл), как измерено гепариновым анализом Coatest LMW, путем осмотра и лечения. Поддающийся определению предел анти-fXa был 0,05 ед./мл; величины ниже поддающегося определению предела были установлены до 0,025. Пациенты, выписанные на день 2, также представлены средней величиной на этот день исследования.

На фиг. 9 показана концентрация бетриксабана в плазме (нг/мл) изменяющихся доз бетриксабана на день 2, при выписывании и при флебограмме.

#### **Подробное описание изобретения**

Прежде чем будут описаны композиции и способы, должно быть понятно, что изобретение не ограничивается описанными конкретными методиками, протоколами, клеточными линиями, анализами и реагентами, так как они могут изменяться. Следует также понимать, что используемая здесь терминология предназначена для описания конкретных вариантов осуществления данного изобретения и не предназначена для

какого-либо ограничения сферы действия данного изобретения, которая сформулирована в прилагаемой формуле изобретения.

Если не определено иначе, все используемые здесь технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны специалисту в области техники, к которой данное изобретение принадлежит. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны здесь, могут быть использованы при применении на практике или испытании данного изобретения, теперь будут описаны предпочтительные способы, устройства и материалы. Все технические и патентные публикации, цитируемые здесь, приобщены ссылкой во всей их полноте. Ничто здесь не должно быть истолковано как допущение, что изобретению не дано право датировать более ранним числом такое раскрытие на основании предшествующего изобретения.

При осуществлении на практике данного изобретения будут использованы, если не указано иное, традиционные методики тканевой культуры, иммунологии, молекулярной биологии, клеточной биологии и рекомбинантной DNA, которые относятся к компетенции специалиста. См., например, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition; the series Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5<sup>th</sup> edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; U.S. Patent No. 4,683,195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)).

Все цифровые обозначения, например, pH, температуры, времени, концентрации и молекулярной массы, включая пределы, являются приближенными значениями, которые изменяются (+) или (-) приращениями 0,1. Следует понимать, что, хотя это и не всегда эксплицитно установлено, описанные здесь реагенты являются только примерными и их эквиваленты известны в технике.

### 1. Определения

В соответствии с данным изобретением и тем, как использованы здесь, следующие термины определены следующими значениями, если эксплицитно не установлено иное.

Используемая в описании и формуле изобретения форма единственного числа с артиклями "a", "an" и "the" имеет отношение и к множественному числу, если из контекста четко не следует иное. Например, термин "клетка" включает множество клеток, включая их смеси.

Используемый здесь термин "содержащий" или "содержит" предназначается для обозначения того, что композиции и способы включают упомянутые элементы, но не исключают другие. Выражение "состоящий по существу из", используемое здесь для определения композиций и способов, будет означать исключение других элементов какой-либо существенной значимости для комбинации для установленной цели. Так,

композиция, состоящая по существу из элементов, которые определены здесь, не будет исключать следовые количества загрязняющих примесей после способа изоляции и очистки и фармацевтически приемлемые носители, такие как забуференный фосфатом физиологический раствор, консерванты и тому подобное. Выражение "состоящий из" будет означать исключение более чем следовых количеств элементов других ингредиентов и существенных стадий способа введения композиций по данному изобретению или стадий процесса получения композиции или достижения планируемого результата. Варианты осуществления, характеризуемые каждым из указанных переходных терминов, входят в сферу действия данного изобретения.

Термин "совокупная суточная доза" относится к количеству лекарства или соединения, вводимому в течение 24-часового периода.

Термин "испытуемый образец" или "раствор для анализа" содержит цельную кровь или плазму крови (предохраненные от свертывания или не предохраненные от свертывания), тканевый фактор ("TF"), обнаружимо меченный тромбиновый субстрат и испытуемое соединение. Раствор может также содержать некоторое количество подходящих растворителей, таких как диметилсульфоксид (DMSO). В одном варианте осуществления кровь или плазму в испытуемом образце не обрабатывают или не титруют с ферментами, включающими ферменты ядов рептилий, такими как Reptilase®. В другом варианте осуществления кровь или плазма не обогащены тромбоцитами.

Термин "тканевый фактор", или TF, означает фактор, который присутствует в субэндотелиальной ткани, тромбоцитах и лейкоцитах и является необходимым для иницирования образования тромбина из зимогенного протромбина. TF упоминается также как тромбопластин, фактор III или CD142. TF, используемый в способах по изобретению, - это предпочтительно рекомбинантный TF человека, такой TF коммерчески доступен от Dade Behring Pharmaceuticals или American Diagnostica, Inc. TF, используемый в анализах, может быть также эндогенным или сочетанием эндогенного и экзогенного.

Используемый здесь термин "испытуемое соединение" относится к непептидному соединению, имеющему молекулярную массу менее чем 1500 Дальтон. Этот термин также относится к малым гепариноидным и сахаридным частям молекул, имеющим молекулярную массу менее чем 5000 Дальтон.

Термин "контрольный образец" относится к испытуемому образцу или раствору для анализа, в которых отсутствует испытуемое соединение.

Термин "не предохраненная от коагуляции цельная кровь" относится к крови, отобранной у пациента, который не подвергался антикоагулянтной терапии антитромботическим агентом. Он также относится к крови от пациента, который мог подвергаться антикоагулянтной терапии, но какое-либо полезное воздействие или эффект больше не реализуется.

Термин "предохраненная от коагуляции цельная кровь" или "предохраненная от коагуляции плазма" относится к крови или плазме, взятой у пациентов, которые недавно подвергались антикоагулянтной терапии или проходят такое лечение в настоящее время. Он также относится к крови от людей-доноров, которую получают венепункцией и собирают в среду, содержащую экзогенно добавленный антикоагулянт, такой как цитрат, EDTA или гепарин.

Термин "обнаружимо меченный тромбиновый субстрат" относится к тромбиновому субстрату, который помечен чем-либо из хорошо известных меток. К таким меткам относятся, но без ограничения перечисленным, флуоресцентные метки,

флуоресцентные метки, хемилюминесцентные метки, электрохемилюминесцентные метки и радиоактивные метки. В одном варианте осуществления изобретения меченым субстратом является Z-Gly-Gly-Arg-AMC, коммерчески доступный от Bachem.

5 Термин "антитромботическая активность" относится к способности соединений ингибировать образование тромба с приемлемыми эффектами по классическим единицам измерения параметров коагуляции, тромбоцитов и функции тромбоцитов. Состояния, характеризующиеся нежелательным тромбозом, включают те, которые вовлекают артериальную и венозную сосудистую сеть. Что касается артериальной 10 сосудистой сети, аномальное тромбообразование характеризует хрупкость образовавшейся атеросклеротической бляшки, которая является главной причиной острого инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии, а также характеризующей окклюзивное коронарное тромбообразование, являющееся результатом или тромболитической терапии, или чрескожной транслюминальной коронарной 15 ангиопластики (PTCA).

Что касается венозной сосудистой сети, аномальное тромбообразование характеризует состояние, наблюдаемое у пациентов, подвергающихся радикальной хирургии на нижних конечностях или брюшной области, которые часто страдают от 20 тромбообразования в венозной сосудистой сети, что имеет результатом уменьшенный кровоток к пораженной конечности и предрасположенность к легочной тромбоэмболии. Аномальное тромбообразование также характеризует диссеминированную внутрисосудистую коагулопатию, обычно происходящую в обеих 25 сосудистых системах во время септического шока, некоторых вирусных инфекций и рака, состояния, при котором происходит быстрое потребление факторов коагуляции и системная коагуляция, что имеет результатом образование жизнеопасного тромба, происходящее по всей микрососудистой сети, приводящее к широко распространенному поражению органа.

30 Очевидность антитромботической активности будет приводить к полезности в антикоагулянтной терапии для предотвращения коагуляции хранимой цельной крови и для предотвращения коагуляции в других биологических образцах для испытания или хранения.

35 Термин "алкенил" относится к трехвалентному ненасыщенному алифатическому радикалу с прямой или разветвленной цепью. Термин "алкинил" (в написании через "i" или "u") относится к алифатическому радикалу с прямой или разветвленной цепью, который содержит по меньшей мере два атома углерода, соединенные тройной 40 связью. Если число атомов углерода не указано, алкенил и алкинил, каждый, относятся к радикалам, имеющим от 2 до 12 атомов углерода.

Термин "алкил" относится к насыщенным алифатическим группам, включая группы с прямой и разветвленной цепью и циклические группы, имеющие указанное 45 число атомов углерода, или, если число не указано, имеющие вплоть до 12 атомов углерода. Используемый здесь термин "циклоалкил" относится к моно-, би- или трициклическому алифатическому кольцу, имеющему от 3 до 14 атомов углерода и, предпочтительно, от 3 до 7 атомов углерода. Термин "алкилен" относится к алкильной группе, которая является двухвалентной, т.е.  $-CH_2-$ .

Используемые здесь термины "карбоциклическая кольцевая структура" и " $C_{3-16}$  карбоциклическая моно-, би- или трициклическая кольцевая структура" или тому 50 подобные, каждый предназначается для обозначения стабильных кольцевых структур, имеющих в качестве кольцевых атомов только атомы углерода, где кольцевая структура является замещенным или незамещенным членом, выбранным из группы,

состоящей из таких заместителей, как стабильное моноциклическое кольцо, которое является ароматическим кольцом ("арил"), имеющим шесть атомов в кольце; стабильное моноциклическое неароматическое кольцо, имеющее от 3 до 7 атомов в кольце; стабильная бициклическая кольцевая структура, имеющая всего от 7 до 12 кольцевых атомов в двух кольцах, где бициклическая кольцевая структура выбрана из группы, состоящей из кольцевых структур, в которых оба кольца являются ароматическими, кольцевых структур, в которых одно из колец является ароматическим, и кольцевых структур, в которых оба кольца являются неароматическими; и стабильная трициклическая кольцевая структура, имеющая всего от 10 до 16 атомов в трех кольцах, где трициклическая кольцевая структура выбрана из группы, состоящей из кольцевых структур, в которых три кольца являются ароматическими, кольцевых структур, в которых два кольца являются ароматическими, и кольцевых структур, в которых три кольца являются неароматическими. В каждом случае неароматические кольца, когда они присутствуют в моноциклической, бициклической или трициклической кольцевой структуре, структура может быть независимо насыщенной, частично насыщенной или полностью насыщенной. Примеры таких карбоциклических кольцевых структур включают, но без ограничения указанным, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, адамантил, циклооктил, [3.3.0]бициклооктан, [4.3.0]бициклононан, [4.4.0]бициклодекан (декалин), [2.2.2]бициклооктан, флуоренил, фенил, нафтил, инданил, адамантил или тетрагидронафтил (тетралин). Кроме того, описанные здесь кольцевые структуры могут быть присоединены к одной или нескольким подвесным группам через любой атом углерода, что имеет результатом стабильную структуру. Термин "замещенный", который использован в сочетании с карбоциклическими кольцевыми структурами, означает, что атомы водорода, присоединенные к углеродным атомам кольца описанных здесь кольцевых структур, могут быть замещены одним или несколькими заместителями, указанными для такой структуры, если такое замещение (замещения) будет иметь результатом стабильное соединение.

Термин "арил", который включен в термин "карбоциклическая кольцевая структура", относится к незамещенному или замещенному ароматическому кольцу, замещенному одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из таких заместителей, как низший алкокси (-O-C<sub>1-6</sub> алкил), низший алкил (-C<sub>1-6</sub> алкил), низший алкиламино (-NRR, где 1 или 2 R представляют низший алкил), гидроксильный, галоген, циано, гидроксил, меркапто, нитро, тиоалкокси (-S-алкил), карбоксальдегид (-OC(O)-H), карбоксил(-C(O)OH), карбоалкокси (-C(O)-O-алкил) и карбоксамид (-C(O)-NH<sub>2</sub>), включая, но без ограничения, группы карбоциклический арил, гетероциклический арил и биарил и тому подобное, все они необязательно могут быть замещенными. Предпочтительные арильные группы включают фенил, галогенфенил, низший алкилфенил, нафтил, бифенил, фенантренил и нафтаценил.

Термин "арилалкил", который включен в термин "карбоциклический арил", относится к одной, двум или трем арильным группам, имеющим обозначенное число атомов углерода, присоединенным к алкильной группе, имеющей обозначенное число атомов углерода. Подходящие арилалкильные группы включают, но без ограничения перечисленным, бензил, пиколил, нафтилметил, фенетил, бензгидрил, тритил и тому подобное, все они необязательно могут быть замещенными.

Используемый здесь термин "гетероциклическое кольцо" или "гетероциклическая кольцевая система" предназначается для обозначения замещенного или незамещенного члена, выбранного из группы, состоящей из таких заместителей, как



стабильное моноциклическое кольцо, имеющее от 5 до 7 членов в самом кольце и имеющее от 1 до 4 гетероатомов кольца, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, стабильная бициклическая кольцевая структура, имеющая в целом от 7 до 12 атомов углерода в двух кольцах, где по меньшей мере одно из двух колец имеет от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из N, O и S, включая бициклические кольцевые структуры, где любое из описанных стабильных моноциклических гетероциклических колец конденсировано с кольцом гексана или бензола; и стабильная трициклическая гетероциклическая кольцевая структура, имеющая в целом от 10 до 16 атомов углерода в трех кольцах, где по меньшей мере одно из трех колец имеет от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S. Какой-либо из атомов азота и серы, присутствующих в гетероциклическом кольце такой гетероциклической кольцевой структуры, может быть окисленным. Если не указано иное, термины "гетероциклическое кольцо" и "гетероциклическая кольцевая система" включают ароматические кольца, а также неароматические кольца, которые могут быть насыщенными, частично насыщенными или полностью насыщенными неароматическими кольцами. Также, если не указано иное, термин "гетероциклическая кольцевая система" включает кольцевые структуры, где все кольца содержат по меньшей мере один гетероатом, а также структуры, имеющие менее, чем все кольца в кольцевой структуре, содержащие по меньшей мере один гетероатом, например бициклические кольцевые структуры, где одно кольцо является кольцом бензола и одно из колец имеет один или несколько гетероатомов, включены в термин "гетероциклические кольцевые системы", а также бициклические кольцевые структуры, где каждое из двух колец имеет по меньшей мере один гетероатом. Более того, описанные здесь кольцевые структуры могут быть присоединены к одной или нескольким указанным подвесным группам через какой-либо гетероатом или атом углерода, что имеет результатом стабильную структуру. Далее, термин "замещенный" означает, что один или несколько гетероатомов на атоме (атомах) углерода кольца или атом(ы) азота каждого кольца в описанных здесь кольцевых структурах могут быть замещены одним или несколькими из указанных заместителей, если такое замещение (замещения) будут иметь результатом стабильное соединение. Атомы азота в кольцевой структуре могут быть кватернизованными, но такие соединения специфически указаны или включены в термин "фармацевтически приемлемая соль" для конкретного соединения. Когда общее число атомов O и S в единственном гетероциклическом кольце больше чем 1, предпочтительно, чтобы такие атомы не были соседними друг с другом. Предпочтительно наличие не более 1 атома O или S в одном и том же кольце данной гетероциклической кольцевой структуры.

Примерами моноциклических и бициклических гетероциклических кольцевых систем в алфавитном порядке (англ. алфавита) являются акридинил, азоцинил, бензимидазолил, бензофуранил, бензотиофуранил, бензотиофенил, бензоксазолил, бензтиазолил, бензтриазолил, бензтетразолил, бензизоксазолил, бензизотиазолил, бензимидазалинил, карбазолил, 4 $\alpha$ H-карбазолил, карболинил, хроманил, хроменил, циннолинил, декагидрохинолинил, 2H,6H-1,5,2-дитиазинил, дигидрофуоро[2,3- $\beta$ ] тетрагидрофуран, фуранил, фуразанил, имидазолидинил, имидазолинил, имидазолил, 1H-индазолил, индолинил, индолизинил, индолил, 3H-индолил, изобензофуранил, изохроманил, изоиндазолил, изоиндолинил, изоиндолил, изохинолинил, (бензимидазолил), изотиазолил, изоксазолил, морфолинил, нафтиридинил, октагидроизохинолинил, оксадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, оксазолидинил, оксазолил, оксазолидинил,

5 пиримидинил, фенантридинил, фенантролинил, феназинил, фенотиазинил, феноксатиинил, феноксазинил, фталазинил, пиперазинил, пиперидинил, птеридинил,
 10 пуринил, пиранил, пиразинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиразолил, пиридазинил, пиридооксазол, пиридоимидазол, пиридотиазол, пиридинил, пиридил, пиримидинил,
 15 пирролидинил, пирролинил, 2Н-пирролил, пирролил, хиназолинил, хинолинил, 4Н-хинолизинил, хиноксалинил, хинуклидинил, тетрагидрофуранил,
 тетрагидроизохинолинил, тетрагидрохинолинил, 6Н-1,2,5-тиадиазинил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, тиантренил,
 20 тиазолил, тиенил, тиенотиазолил, тиенооксазолил, тиеноимидазолил, тиофенил, триазинил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, 1,2,5-триазолил, 1,3,4-триазолил и
 ксантенил. Предпочтительные гетероциклические кольцевые структуры включают, но без ограничения перечисленным, пиридинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил,
 25 пирролидинил, имидазолил, индолил, бензимидазолил, 1Н-индазолил, оксазолинил или изатиноил. Включенными являются также соединения с конденсированными кольцами
 и спиросоединения, содержащие, например, указанные выше гетероциклические кольцевые структуры.

20 Используемый здесь термин "ароматическая гетероциклическая кольцевая система" имеет по существу то же самое определение, что и моноциклические и бициклические
 кольцевые системы, за исключением того, что по меньшей мере одно кольцо кольцевой системы является ароматическим гетероциклическим кольцом, или
 бициклическое кольцо имеет ароматическое или неароматическое гетероциклическое
 25 кольцо, конденсированное с ароматической карбоциклической кольцевой структурой.

25 Используемый здесь термин "галоген" относится к заместителям Cl, Br, F или I. Термин "галогеналкил" и тому подобное относится к алифатическим углеродным
 радикалам, имеющим по меньшей мере один атом водорода, замененный атомом Cl, Br, F или I, включая смеси атомов различных галогенов. Тригалогеналкил включает
 30 трифторметил и тому подобное, например.

Термин "метилен" относится к  $-CH_2-$ .

Термин "фармацевтически приемлемые соли" включает соли соединений,
 35 полученные при объединении соединения и органической или неорганической кислоты. Такие соединения применимы и в форме свободного основания, и в форме
 соли. На практике применение солевой формы равнозначно применению формы основания, аддитивные соли с кислотами и основаниями входят в сферу действия
 данного изобретения.

Термин "Фармацевтически приемлемые аддитивные соли с кислотами" относится к
 40 солям, сохраняющим биологическую эффективность и свойства свободных оснований, причем эти соли не являются нежелательными биологически или в ином отношении,
 образованным с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная
 кислота и тому подобные, и с органическими кислотами, такими как уксусная кислота,
 45 пропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, фумаровая
 кислота, виннокаменная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, коричная кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота,
 50 п-толуолсульфоновая кислота, салициловая кислота и тому подобное.

"Фармацевтически приемлемые аддитивные соли с основаниями" включают соли,
 полученные из неорганических оснований, такие как соли натрия, калия, лития,
 аммония, кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца, алюминия и тому подобное.

Особенно предпочтительны соли аммония, калия, натрия, кальция и магния. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических нетоксичных оснований, включают соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенных аминов, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины и  
5 ионообменные смолы основного характера, таких как изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диэтиламиноэтанол, триметамин, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин,  
10 пурины, пиперизин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминосмолы и тому подобное. Особенно предпочтительными органическими нетоксичными основаниями являются изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметамин, дициклогексиламин, холин и кофеин.

"Биологическое свойство" для целей здесь означает проявляющуюся *in vivo*  
15 эффекторную или антигенную функцию или активность, которая непосредственно или косвенно осуществляется соединением по данному изобретению, которые часто выявляются анализами *in vitro*. Эффекторные функции включают связывание рецептора или лиганда, какую-либо ферментативную активность или фермент-модулирующую активность, какую-либо активность связывания носителя, какую-либо  
20 гормональную активность, какую-либо активность в промотировании или ингибировании адгезии клеток к внеклеточному матриксу или молекулам поверхности клетки или какую-либо структурную роль. Антигенные функции включают обладание эпитопом или антигенным сайтом, который способен взаимодействовать с  
25 антителами, возникающими против него.

В соединениях по данному изобретению атомы углерода, связанные с четырьмя неидентичными заместителями, являются асимметричными. Следовательно, соединения могут существовать как диастереоизомеры, энантиомеры и их смеси. В  
30 описанном здесь синтезе могут быть использованы рацематы, энантиомеры или диастереомеры в качестве исходных материалов или промежуточных соединений. Диастереомерные продукты, являющиеся результатом таких синтезов, могут быть разделены хроматографическими или кристаллизационными методами или другими методами, известными в технике. Подобным образом смеси энантиомерных  
35 продуктов могут быть разделены с использованием тех же методик или другими методами, известными в технике. Каждый из асимметричных атомов углерода, когда он присутствует в соединениях по данному изобретению, может быть в одной из двух конфигураций (R или S), и обе находятся в сфере действия данного изобретения.

## 40 2. Способы ингибирования коагуляции крови и унифицированные дозированные составы

Один аспект изобретения относится к способам ингибирования коагуляции крови человека-пациента путем введения пациенту ингибирующего коагуляцию количества соединения ингибитора фактора Ха. Этот аспект связан с тем, что неожиданно было  
45 установлено, что стандартная лекарственная доза соединений ингибиторов фактора Ха, раскрытых здесь, необходимая для ингибирования коагуляции у примата, является более низкой, чем стандартная лекарственная доза, необходимая для достижения подобных степеней ингибирования коагуляции на других животных моделях, таких как грызуны. Как описано дополнительно на примерах и фигурах, эта видовая специфичность была продемонстрирована в анализах *in vivo* и *in vitro* увеличениями  
50 продолжительности протромбинового времени (PT) в плазме крысы, кролика, бабуина и человека. Двухкратное увеличение PT было достигнуто при

концентрациях 8,9 мкМ у крысы и 1,6 мкМ у кролика по сравнению с приматами, где двухкратное изменение РТ наблюдалось при 1 мкМ у бабуина и 0,4 мкМ у людей.

5 Ингибирующие фактор Ха соединения применимы при лечении болезненных состояний у млекопитающих, которые имеют расстройства коагуляции, например при  
лечении или предупреждении нестабильной стенокардии, устойчивой стенокардии, инфаркта миокарда, отдельных ишемических приступов, тромботического удара, эмболического удара, диссеминированной внутрисосудистой коагуляции, включая  
10 лечение септического шока, тромбоза глубоких вен при профилактике легочной эмболии или лечении реокклюзии или рестеноза перенесших реперфузию коронарных артерий. Кроме того, эти соединения применимы для лечения или профилактики тех болезней, которые вовлечены в образование и/или действие комплекса фактор Ха/протромбиназа. Сюда относятся некоторые тромботические и протромботические  
15 состояния, в которых активируется каскад коагуляции, которые включают, но без ограничения перечисленным, тромбоз глубоких вен, легочную эмболию, инфаркт миокарда, удар, тромбоэмболические осложнения хирургии и периферическую артериальную окклюзию. Другие болезни, которые можно лечить или предупреждать введением соединений по данному изобретению, включают, без ограничения,  
20 окклюзивное образование коронарного тромба в результате или тромболитической терапии, или чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики, тромбообразование в венозной сосудистой сети, диссеминированную внутрисосудистую коагулопатию, состояние, когда происходит быстрое потребление факторов коагуляции и системная коагуляция, которая имеет результатом  
25 образование жизнеопасного тромба, происходящее в микрососудистой сети, приводящее к обширному поражению органа, геморрагический удар, почечный диализ, окисление крови и сердечная катетеризация.

Согласно одному аспекту изобретение относится к способу ингибирования  
30 коагуляции у человека-пациента, нуждающегося в этом, содержащему введение пациенту ингибирующего коагуляцию количества соединения ингибитора фактора Ха или его фармацевтически приемлемой соли, где ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между  
35 около 0,01 и около 2,0 мг/кг. Конкретные варианты соединений ингибиторов фактора Ха показаны формулами I, II, IV, V и их солями (такими как соль формулы III), как пояснено ниже. Дополнительные варианты осуществления относятся к способам ингибирования коагуляции у человека-пациента, нуждающегося в этом, содержащим  
введение пациенту ингибирующего коагуляцию количества соединения ингибитора  
40 фактора Ха или его фармацевтически приемлемой соли, где ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,05 и 2,0 мг/кг; в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой  
45 между 0,1 и 2,0 мг/кг, или в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,1 или 0,2 и 1,5 мг/кг; или в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,4  
и 1,2 мг/кг; или в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения  
50 ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,43 и 1,15 мг/кг; или в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,45 и 0,55 мг/кг. В еще одном варианте осуществления изобретения количество соединения ингибитора

фактора Ха, вводимое человеку, таково, что уровень его содержания в сыворотке около 1 мкМ или менее.

Другой аспект изобретения относится к стандартным лекарственным препаратам, содержащим фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель и ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха или его фармацевтически приемлемой соли, где ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,01 и 2,0 мг/кг; в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,05 и 2,0 мг/кг, в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,1 и 2,0 мг/кг; или в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,2 и 1,5 мг/кг; или в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,4 и 1,2 мг/кг; или в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между 0,43 и 1,15 мг/кг, или в качестве варианта ингибирующее коагуляцию количество соединения ингибитора фактора Ха является совокупной суточной дозой между около 0,45 и около 0,55 мг/кг.

Составы далее описаны в разделе, озаглавленном "Составы".

### 3. Анализ образования тромбина

Существующие в настоящее время единицы измерения для отслеживания статуса коагуляции (активированное парциальное тромбопластиновое время (аРТТ), протромбиновое время (РТ), международное нормализованное отношение (INR), время активированного коагулирования (АСТ), анти FXa единицы были разработаны для существующих антикоагулянтов (т.е. для гепарина и варфарина). Доступные испытания недостаточно чувствительны для оценки терапевтических концентраций непосредственных ингибиторов FXa.

Так как истинной мишенью ингибиторов Ха является не связанный с мембраной комплекс протромбиназы, измеряемое образование тромбина было бы превосходной единицей измерения степени антикоагуляции, достигаемой у пациентов, получавших непосредственные ингибиторы fXa. Бетриксабан, доступный перорально ингибитор fXa на продвинутых стадиях клинической разработки (фаза II), применяли, чтобы подтвердить эту гипотезу. Бетриксабан является нацеленным на активный сайт, конкурентноспособным ингибитором fXa человека ( $K_i=117$  пМ) и проявляет более чем 86000-кратную специфичность против соответствующих протеаз, таких как тромбин, фактор VIIa, фактор IXa, активированный белок C, тканевый активатор плазминогена, плазмин и трипсин. Бетриксабан является сильным ингибитором комплекса протромбиназы ( $K_i=801$  пМ).

Известные по предшествующему уровню техники анализы, такие как те, которые описаны в источнике Sinha et al., AТВВ 2003, 23: 1098-1104, включенном в настоящее описание в полном объеме, отличаются от тех, которые описаны здесь, тем, что необходимы дополнительные стадии, такие как обработка крови змеиным ядом, или материалы, или тем, что проводят особые измерения. Например, анализы, описанные в источнике Sinha et al., требовали, чтобы плазма крови была обработана Reptilase® для удаления фибриногена, или чтобы была использована обогащенная тромбоцитами плазма, или чтобы тромбин был измерен опосредованно с

применением маркеров, таких как комплексы тромбин-антитромбин III.

В одном из аспектов изобретение относится к анализам *in vitro*, которые являются предикативными относительно того, имеет ли соединение *in vivo* антитромботическую активность. Антитромботическая активность может быть определена с использованием измерения активности тромбина цельной крови. Количество тромбина коррелируется с антикоагулянтной активностью на фиг. 1А, 1В и 1С. Этот анализ дополнительно коррелируется с антикоагулянтной активностью *in vivo* и обсуждается более подробно на фиг. 2 и в примерах.

Анализы предусматривают определение активности тромбина в присутствии испытуемого соединения и без него. В одном варианте осуществления готовят раствор для анализа. Раствор для анализа составляют из не предохраненной от коагуляции цельной крови, тканевого фактора (ТФ) и обнаружимо меченого тромбинового субстрата, такого как Z-Gly-Gly-Arg-АМС. Представляющее интерес испытуемое соединение добавляют к раствору для анализа и расщепление обнаружимо меченого тромбинового субстрата измеряют как функцию времени. Порядок введения компонентов в раствор для анализа может изменяться.

Контрольный анализ также проводят с раствором для анализа в отсутствие испытуемого соединения. Уменьшение активности тромбина, показателем чего является уменьшение расщепления тромбинового субстрата, в анализе с испытуемым соединением по отношению к контрольному анализу показывает, что испытуемое соединение имеет антитромботическую активность *in vivo*.

В альтернативном варианте осуществления анализ не содержит экзогенно добавляемый ТФ. Вместо этого раствор для анализа перемешивают, чтобы активировать ТФ, эндогенно присутствующий в клетках в цельной крови.

В других вариантах анализа раствор для анализа составляют из предохраненной от коагуляции цельной крови или предохраненной от коагуляции плазмы вместо не предохраненной от коагуляции цельной крови.

Соответственно в одном аспекте изобретение относится к анализу *in vitro* для определения того, будет ли соединение иметь антитромботическую активность *in vivo*, содержащему

а) введение испытуемого соединения в образец *in vitro* не предохраненной от коагуляции цельной крови, содержащей тканевый фактор (ТФ) и обнаружимо меченный тромбиновый субстрат для формирования испытуемого образца;

(b) определение степени активности тромбина в испытуемом образце путем отслеживания расщепления обнаружимо меченого тромбинового субстрата в испытуемом образце как функцию времени;

с) определение степени активности тромбина в контрольном образце путем отслеживания расщепления обнаружимо меченого тромбинового субстрата в контрольном образце как функцию времени, где контрольный образец содержит не предохраненную от коагуляции цельную кровь, содержащую тканевый фактор (ТФ) и обнаружимо меченный тромбиновый субстрат;

d) сравнение степени активности тромбина в испытуемом образце и в контрольном образце, где более низкая степень активности тромбина в испытуемом образце является показателем того, что испытуемое соединение имеет *in vivo* антитромботическую активность.

В других конкретных вариантах осуществления предохраненную от коагуляции цельную кровь из а) заменяют или не предохраненной от коагуляции цельной кровью, предохраненной от коагуляции плазмой или не предохраненной от коагуляции

плазмой.

## 2. Соединения ингибиторы фактора Ха

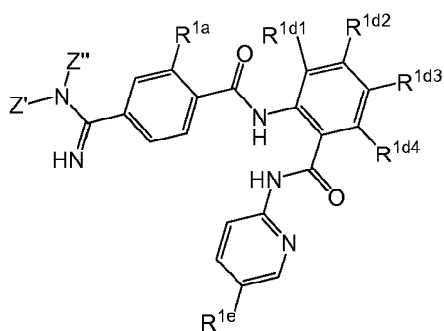
Были сообщения о нескольких ингибиторах фактора Ха как о пептидах, выделенных из питающихся кровью организмов, а также о соединениях, которые являются ингибиторами, не принадлежащими к типу больших пептидов.

Дополнительные ингибиторы фактора Ха включают низкомолекулярные органические соединения, такие как содержащие азот гетероциклические соединения, которые имеют замещающие амидиногруппы, где две функциональные группы соединений могут связываться с фактором Ха при двух его активных сайтах.

Например, WO 98/28269 описывает соединения пиразола, имеющие концевую амидино(-C(=NH)-NH<sub>2</sub>)группу; WO 97/21437 описывает соединения бензимидазола, замещенные радикалом основного характера, которые соединены с нафтильной группой посредством прямой или разветвленной цепи алкилена, -C(=O)- или -S(=O)<sub>2</sub>-мостиковой группы; WO 99/10316 описывает соединения, имеющие группу 4-фенил-N-алкиламидинопиперидина и 4-фенокси-N-алкиламидинопиперидина, присоединенную к 3-амидинофенильной группе через карбоксамидалкиленамино-мостик, и EP 798295 описывает соединения, имеющие группу 4-фенокси-N-алкиламидинопиперидина, присоединенную к амидинонафтильной группе через замещенную или незамещенную сульфонамидную или карбоксамидную мостиковую группу. Дополнительные известные ингибиторы фактора Ха включают те, которые имеют структуру, содержащую фенил-амидино, фенил и галогенфенил, соединенные посредством амидных связей (патент США № 6376515 и 6844367). Другие ингибиторы фактора Ха имеют галогенфенил, замещенный галогенпиридиллом (см. патенты США № 6376515 В2 и 6835739). В конкретных вариантах осуществления данного изобретения ингибиторами фактора Ха являются соединения формулы I, указанной выше.

Соединения формулы I раскрыты в патентах США № 6844367 и 6376515, включенных в настоящее описание в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитором фактора Ха является соединение формулы IV:



IV

где

Z' и Z'', каждый независимо, представляют C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, который необязательно замещен гидроксильной группой, группой карбоновой кислоты или группой сложного эфира карбоновой кислоты;

R<sup>1a</sup> выбран из группы, состоящей из

H, -F, -Cl и -Br;

R<sup>1d2</sup> и R<sup>1d4</sup>, каждый, представляют H;

R<sup>1d1</sup> и R<sup>1d3</sup>, каждый независимо, выбраны из группы, состоящей из

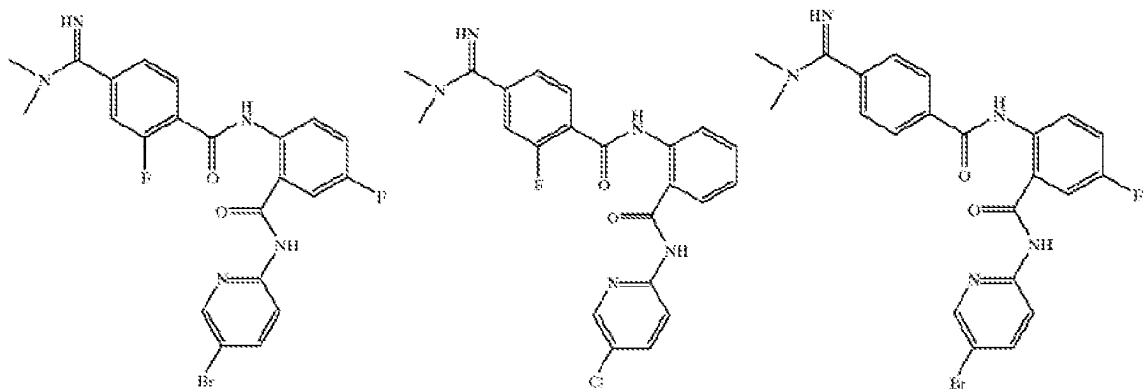
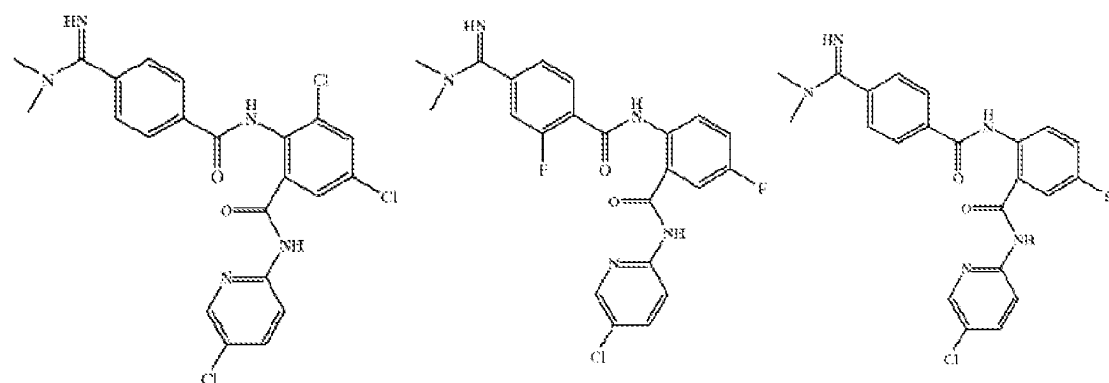
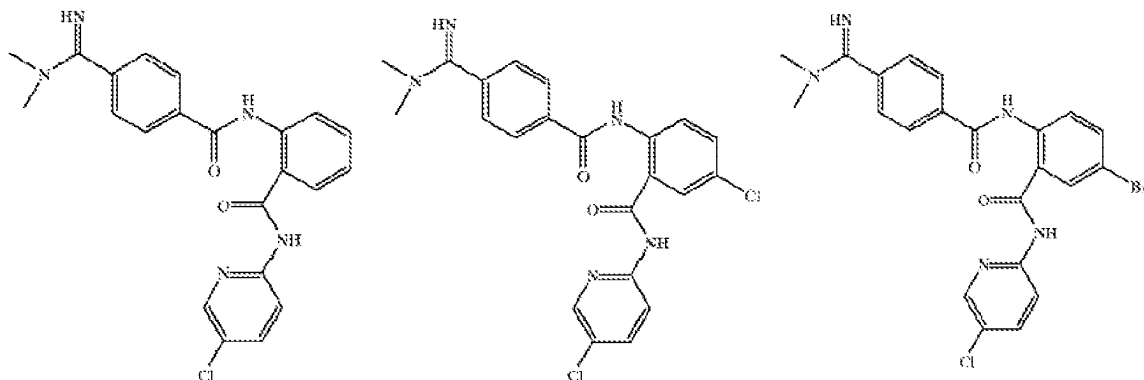
H, -Cl, -F, -Br, -OH и -OCH<sub>3</sub> и

R<sup>1e</sup> выбран из группы, состоящей из

-F, -Cl, -Br, -OH, -CH<sub>3</sub> и -OCH<sub>3</sub>,

или его фармацевтически приемлемая соль.

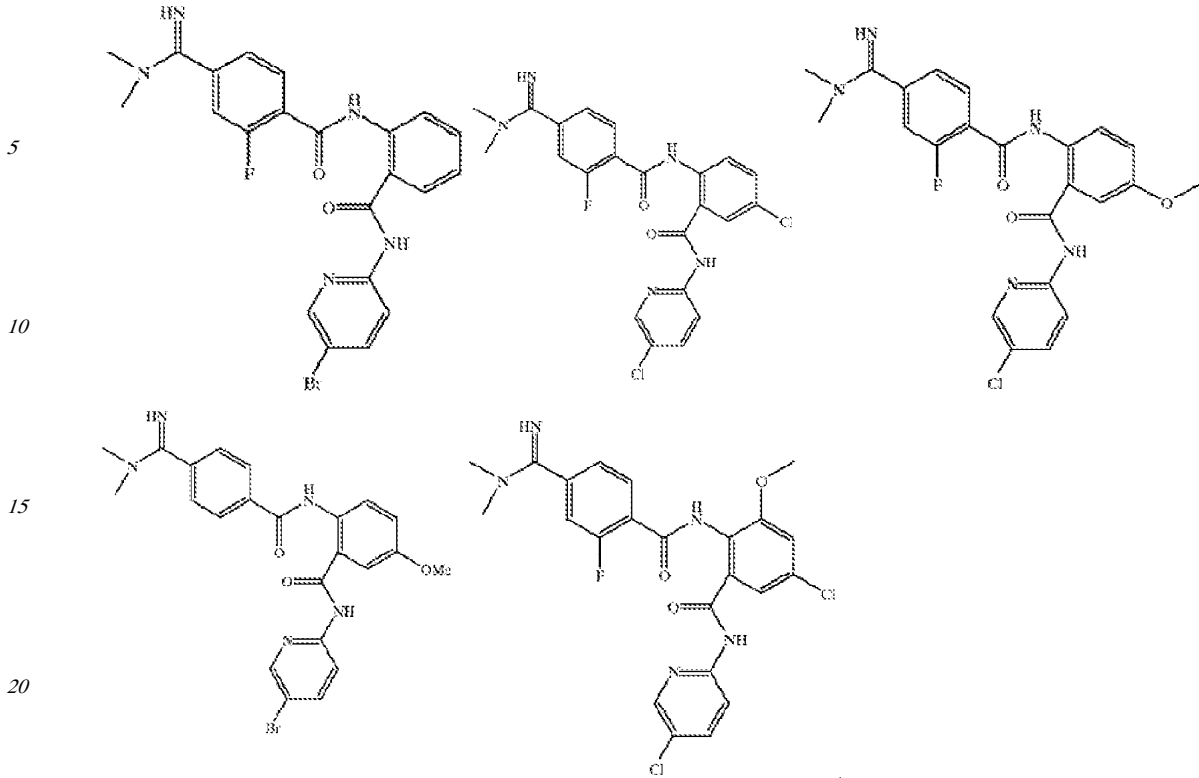
Примеры соединений формулы IV выбраны из группы, состоящей из



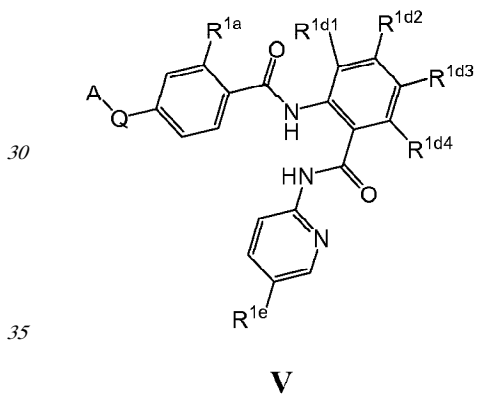
45

50

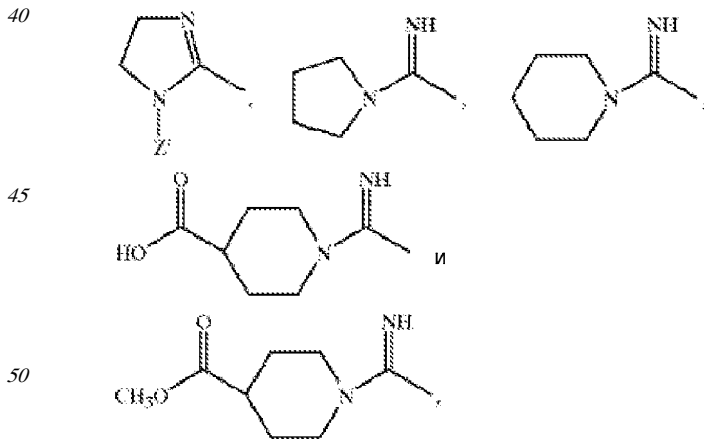




25 В другом варианте осуществления изобретения ингибитором фактора Ха является соединение формулы V:



40 где A-Q представляет заместитель, выбранный из группы, состоящей из



где Z' представляет C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, который необязательно замещен гидроксилем,

группой карбоновой кислоты или группой сложного эфира карбоновой кислоты;

$R^{1a}$  выбран из группы, состоящей из

H, -F, -Cl и Br;

5  $R^{1d2}$  и  $R^{1d4}$ , каждый, представляют H;

$R^{1d1}$  и  $R^{1d3}$ , каждый независимо, выбраны из группы, состоящей из

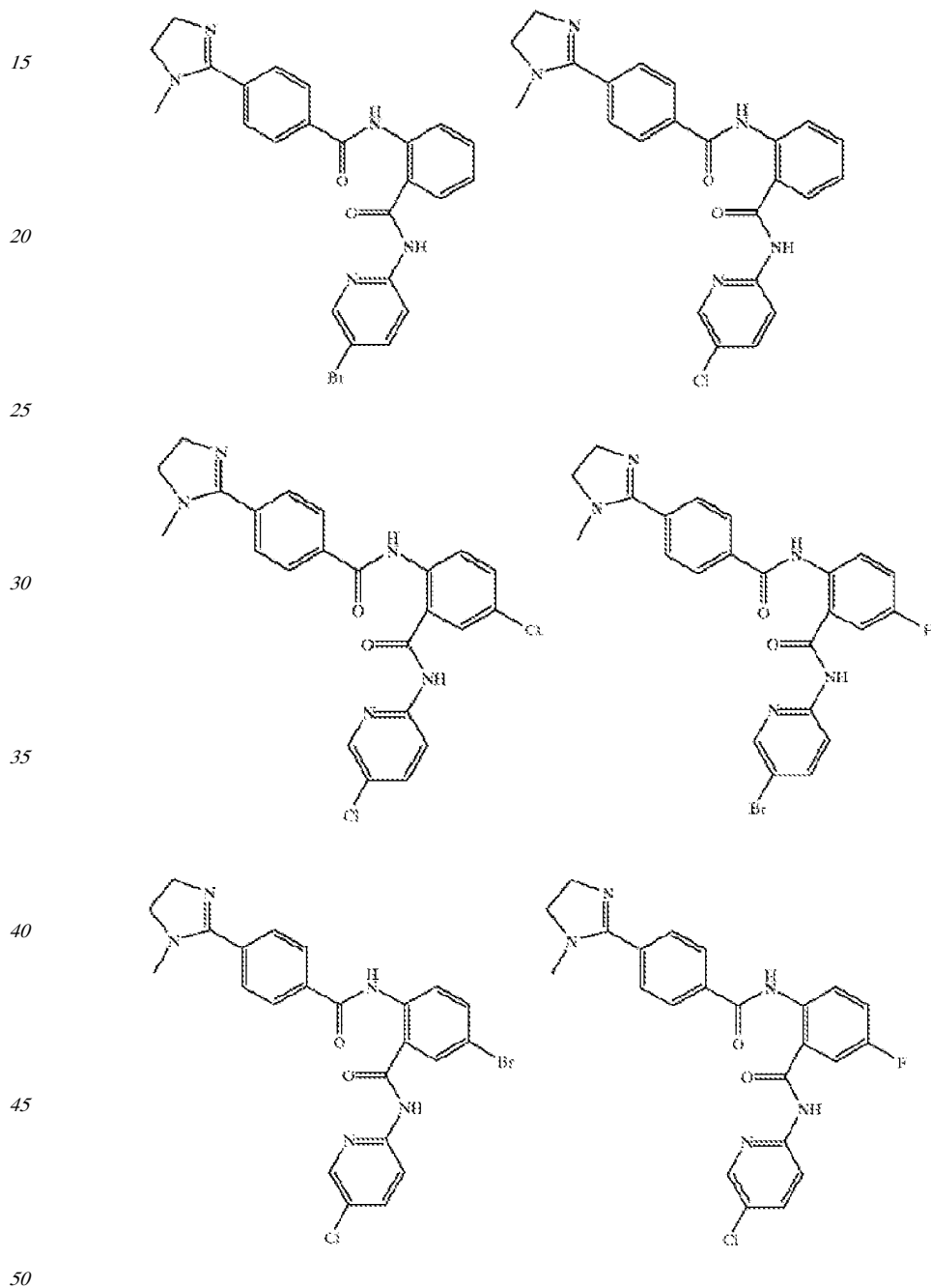
H, -Cl, -F, -Br, -OH и -OCH<sub>3</sub>;

$R^{1e}$  выбран из группы, состоящей из

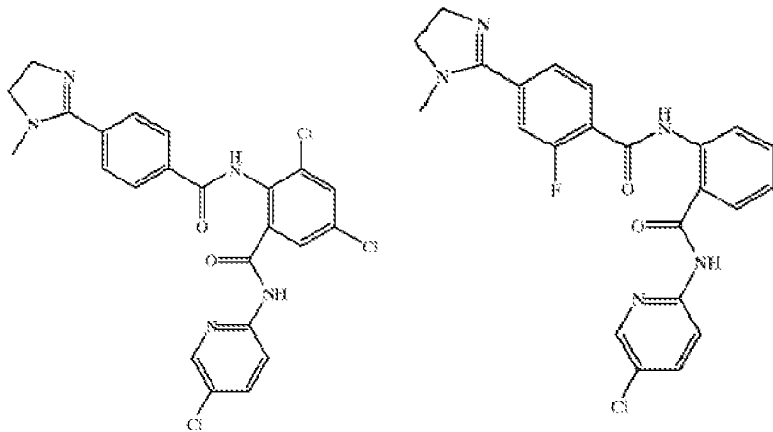
10 -F, -Cl, -Br, -OH, -CH<sub>3</sub> и -OCH<sub>3</sub>,

или его фармацевтически приемлемая соль.

Примеры соединений формулы V включают, но без ограничения указанными:

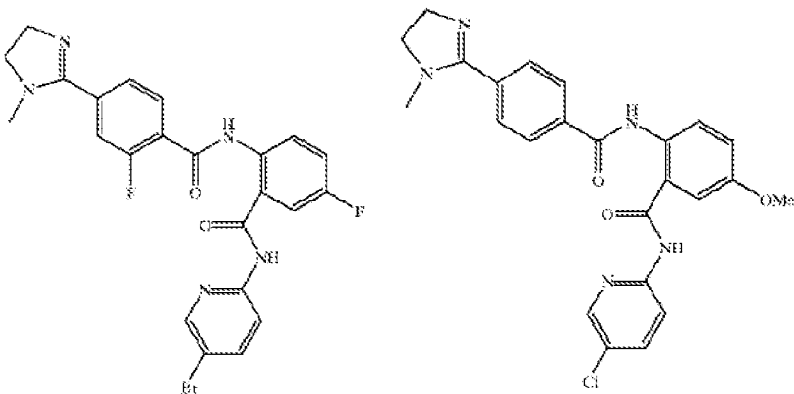


5



10

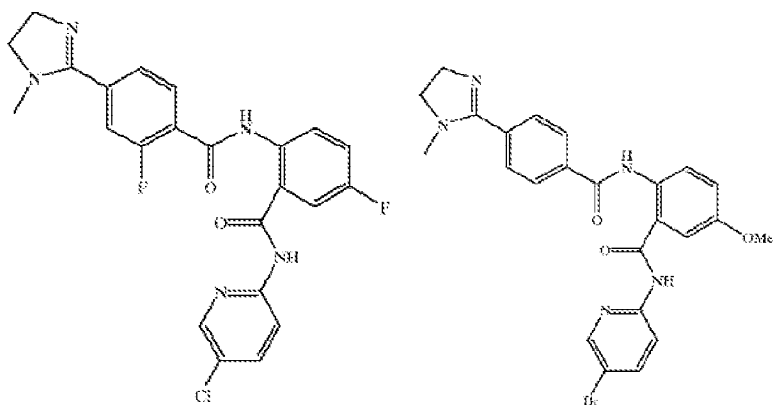
15



20

25

30



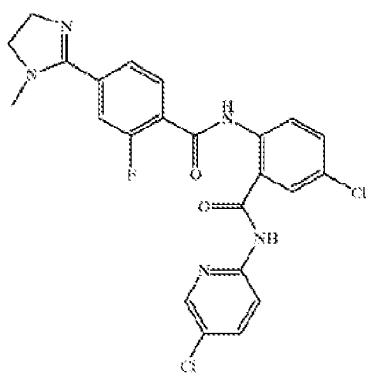
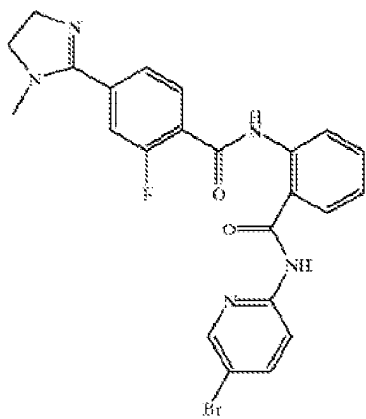
35

40

45

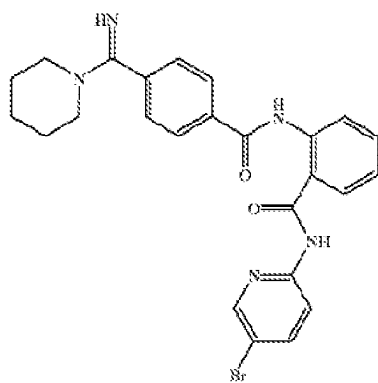
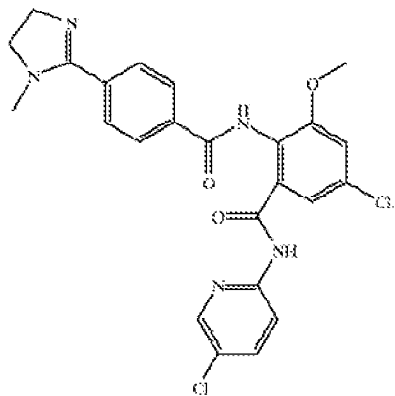
50

5



10

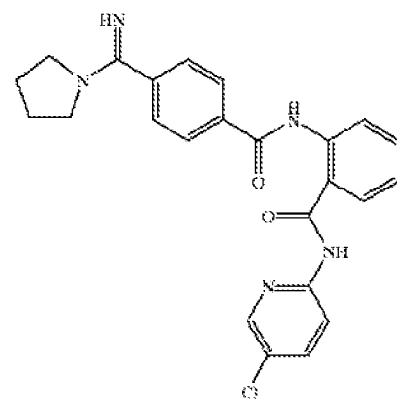
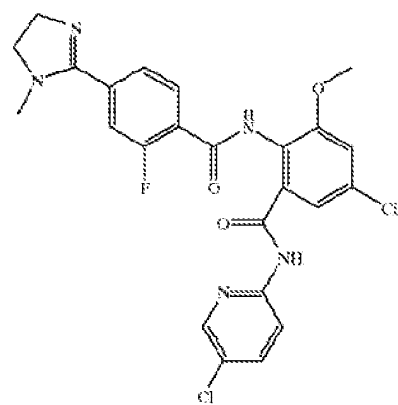
15



20

25

30

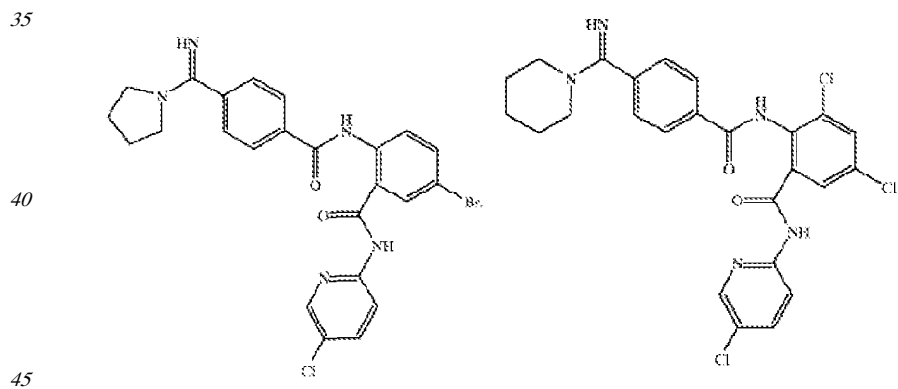
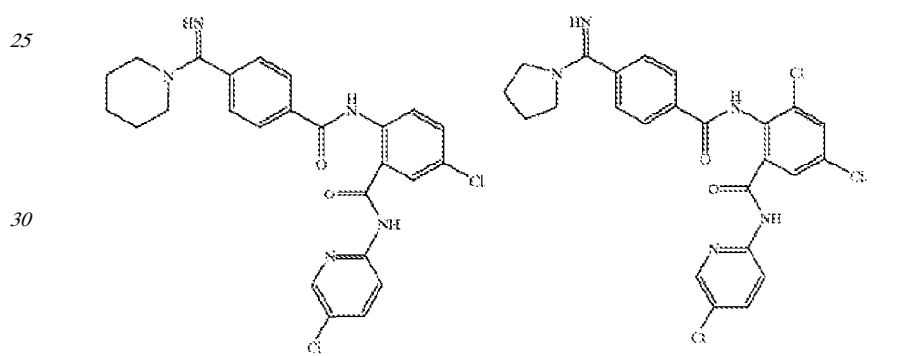
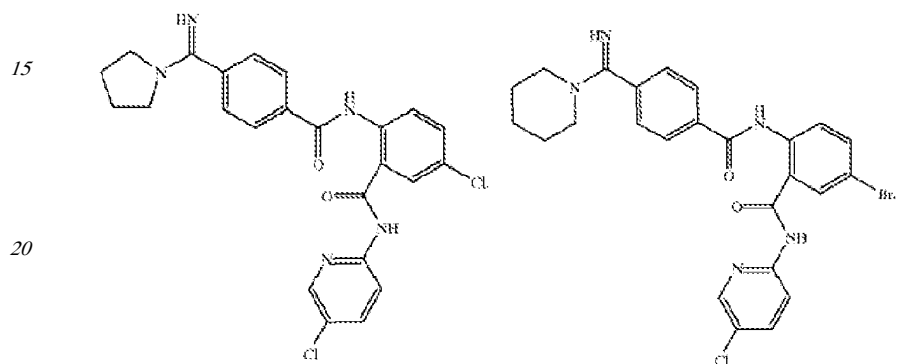
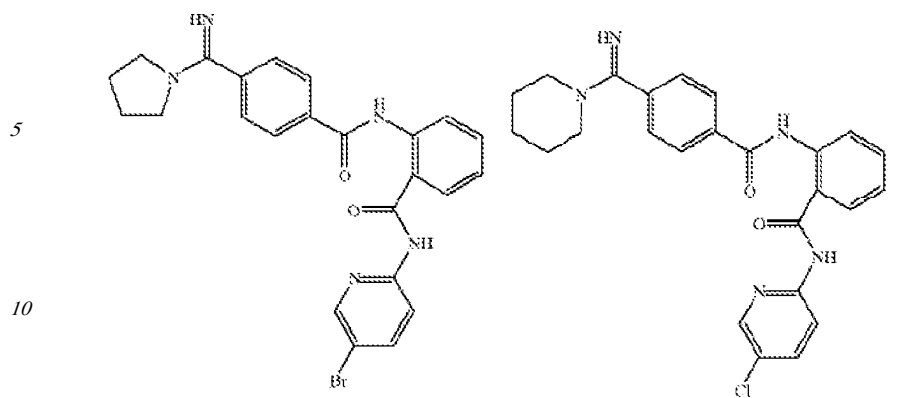


35

40

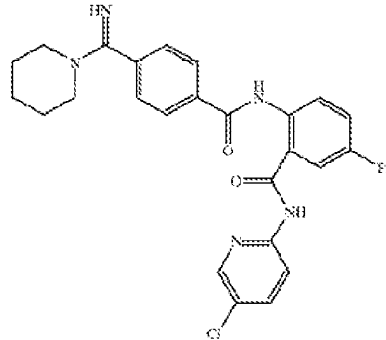
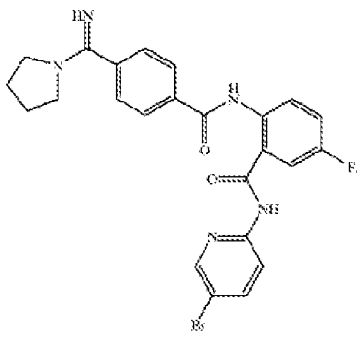
45

50



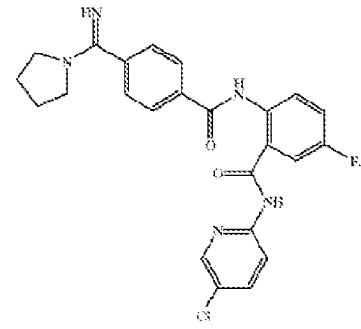
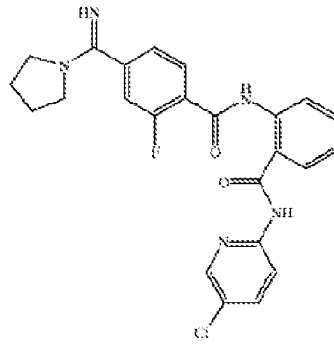
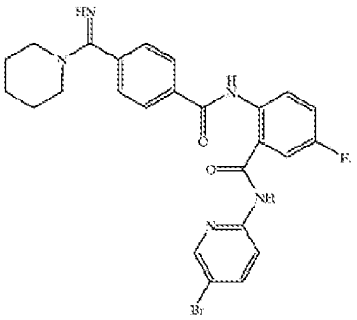
50

5



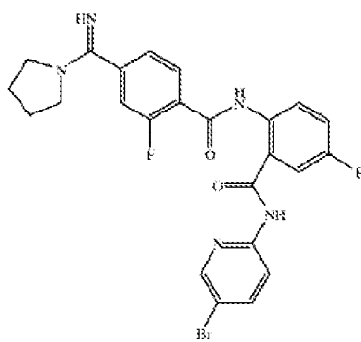
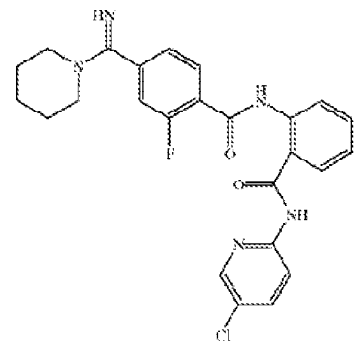
10

15



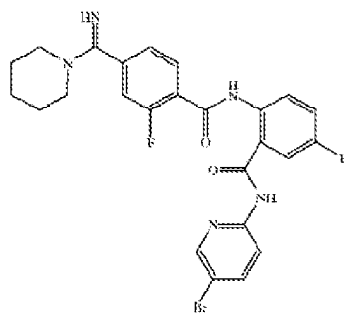
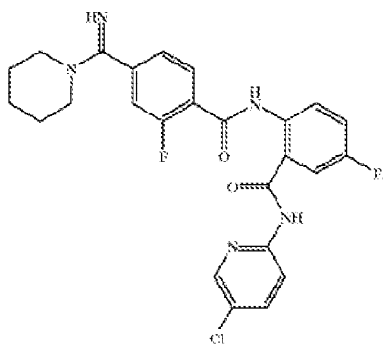
20

25



30

35

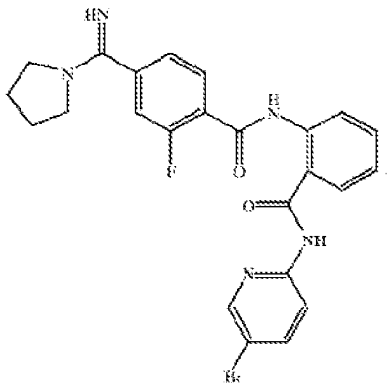


40

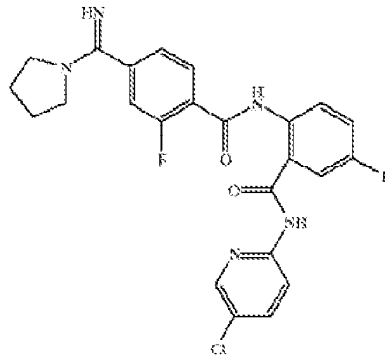
45

50

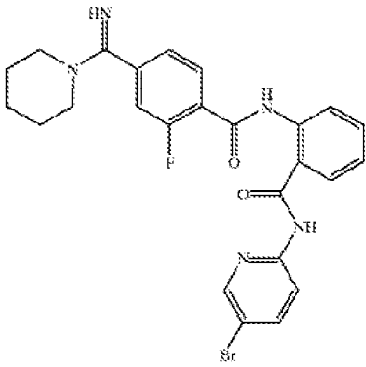
5



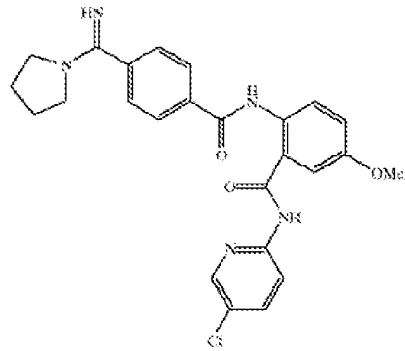
10



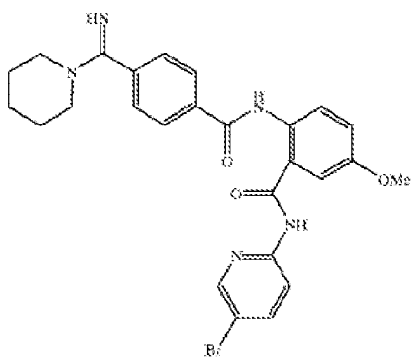
15



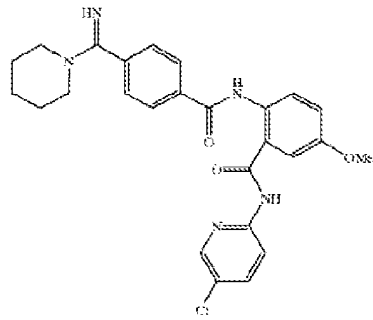
20



25



30

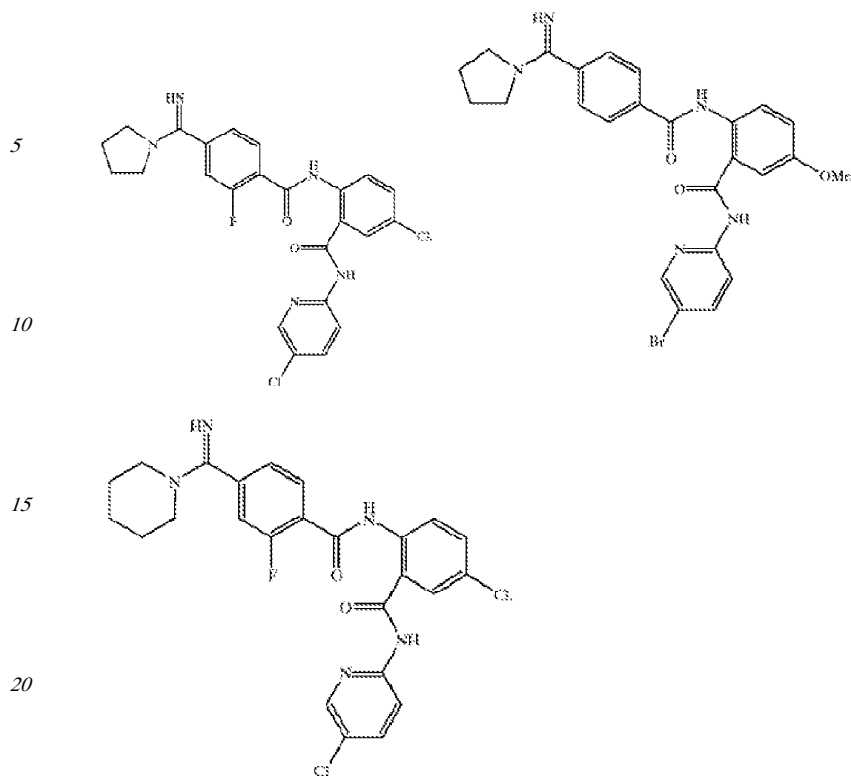


35

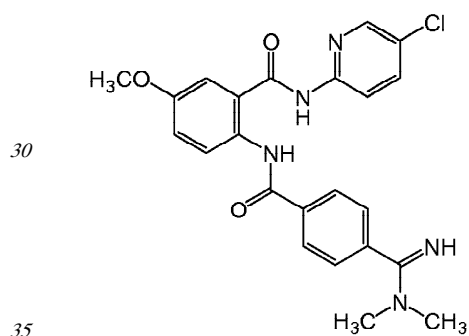
40

45

50



25 В дополнительных вариантах осуществления изобретения ингибиторами фактора Ха являются соединения формулы II:



## II

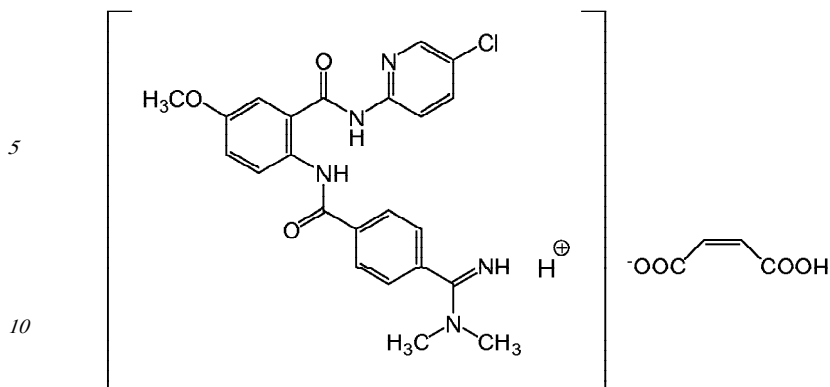
а также все их фармацевтически приемлемые изомеры, соли, гидраты, сольваты и пролекарственные производные. Соединения формулы II раскрыты как пример 206 в патентах США № 6376515 и 6835739, оба они включены в настоящее описание в полном объеме. Соединение формулы II имеет родовое название бетриксабан и иногда здесь так упоминается.

45 В конкретном варианте соль соединения формулы II является малеатом. Соль малеат образована протонированием одного или нескольких атомов азота соединения формулы II. В одном варианте азот амидиногруппы (=NH) соединения формулы II протонируют (=NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) до образования соли.

В одном варианте соль малеат соединения формулы II представлена формулой III:

50





15 Она также упоминается здесь как бетриксабан малеат.

В другом варианте данное изобретение относится к соли формулы III, имеющей кристаллическую полиморфную форму. В предпочтительных вариантах осуществления кристаллическая полиморфная форма проявляется порошковой рентгенограммой, имеющей по меньшей мере четыре и более, предпочтительно

20 восемь, следующих примерных положений характерных пиков: 4,9, 9,7, 13,8, 14,1, 15,2, 17,6, 18,5, 20,8, 21,6, 22,7, 24,1, 26,3, 26,8 градусов 2θ. В другом варианте осуществления порошковая рентгенограмма имеет примерные положения характерных пиков: 4,9, 9,7, 11,8, 13,8, 14,1, 15,2, 17,6, 18,5, 19,9, 20,8, 21,6, 22,7,

25 24,1, 25,0, 26,3, 26,8 градусов 2θ. Изобретение предполагает, что примерные характерные пики будут иметь отклонение вплоть до около ±0,2 градуса 2θ. См. РСТ/US 82006/43635, поданную 7 ноября 2006 г., включенную в настоящее описание в полном объеме, для получения дополнительной информации о солях и полиморфах солей соединения формулы II.

#### 30 4. Препараты

Один вариант осуществления изобретения относится к стандартному лекарственному препарату. Стандартный лекарственный препарат содержит фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор фактора Ха, который описан

35 выше, и фармацевтически приемлемый носитель. Ингибитор фактора Ха присутствует в эффективном для ингибирования коагуляции количестве, которое обычно находится между около 0,1 мг/кг и около 2,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления дозу готовят для введения один или два раза в сутки, так что общее количество в сутки является эффективным для коагуляции количеством. В некоторых вариантах

40 осуществления стандартная лекарственная препаративная форма предназначена для пероральной доставки.

В мероприятиях против тромботических расстройств соединения и/или соли по данному изобретению могут быть использованы в композициях, таких как таблетки,

45 капсулы, пастилки или эликсиры для перорального введения, суппозитории, стерильные растворы или суспензии для введения инъекцией и тому подобное, или могут быть введены в состав формованных изделий. Способ введения может изменяться от субъекта к субъекту и будет зависеть от таких факторов, как тип млекопитающего, которого лечат, его пол, масса, диета, сопутствующее лечение,

50 общее клиническое состояние, конкретные используемые соединения и/или их соли, конкретное применение, для которого используют указанные соединения и/или их соли, и других факторов, которые будут известны специалисту-медику.

Капсулы, применимые по данному изобретению, могут быть изготовлены по

традиционным и известным технологиям икапсулирования, таким как те, которые описаны в патенте США № 5735105. Капсула обычно представляет собой полую оболочку по существу цилиндрической формы, имеющую длину и диаметр, достаточные для того, чтобы разместить внутри капсулы композиции фармацевтического раствора, содержащие соответствующую дозу активного ингредиента. Внешняя часть капсул может содержать пластификатор, воду, желатин, модифицированные крахмалы, камеди, каррагенаны и их смеси. Специалисты в этой области должны понимать, что композиции являются соответствующими.

В дополнение к активному ингредиенту таблетки, применимые по данному изобретению, могут содержать наполнители, связующие, агенты для прессования, смазки, дезинтегрирующие добавки, красители, воду, тальк и другие элементы, известные специалисту в этой области. Таблетки могут быть гомогенными с единственным слоем на сердцевине или могут иметь несколько слоев, чтобы обеспечить предпочтительные профили высвобождения. В некоторых случаях таблетки по данному изобретению могут иметь покрытие, например растворимое в кишечнике покрытие. Специалист в этой области будет также принимать во внимание, что другие наполнители применимы в таблетках по данному изобретению.

Пастилки, применимые по данному изобретению, включают соответствующее количество активного ингредиента, а также какие-либо наполнители, связующие, дезинтегрирующие вещества, растворители, солубилизирующие агенты, подсластители, окрашивающие вещества и какие-либо другие ингредиенты, которые специалист в этой области сочтет необходимыми. Пастилки по данному изобретению созданы так, чтобы растворяться и высвободить активный агент в контакте с полостью рта пациента. Специалист в этой области будет иметь в виду, что другие способы доставки применимы по данному изобретению.

Составы соединений и/или солей по данному изобретению готовят для хранения или введения смешиванием соли, имеющей желательную степень чистоты с фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями, стабилизаторами и т.д., и они могут быть предоставлены в виде составов с замедленным или отсроченным высвобождением. Приемлемые носители или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (A.R. Gennaro Ed. 1985). Такие материалы нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат, ацетат и соединения других органических кислот и/или соли, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, низкомолекулярные (менее чем около десяти остатков) пептиды, такие как полиаргинин, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидинон, аминокислоты, такие как глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота или аргинин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая целлюлозу или ее производные, глюкозу, маннозу или декстрины, хелатообразователи, такие как EDTA, сахарные спирты, такие как маннит или сорбит, противоионы, такие как натрий, и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, Pluronic или полиэтиленгликоль.

Лекарственные препараты соединений и/или солей по данному изобретению, чтобы быть пригодными для терапевтического введения, должны быть стерильными. Стерильность легко достигается путем фильтрования через стерильные мембраны, такие как мембраны 0,2 микрометра, или другими традиционными способами.

Составы обычно должны храниться в лиофилизованной форме или в виде водного раствора. рН препаратов по данному изобретению обычно должен быть между 3 и 11, более предпочтительно от 5 до 9 и наиболее предпочтительно от 7 до 8. Должно быть понятно, что применение конкретных указанных наполнителей, носителей или стабилизаторов будет иметь результатом образование циклических полипептидных соединений и/или солей. Тогда как предпочтительным путем введения является введение инъекцией, предусмотрены также и другие способы введения, такие как внутривенно (болус и/или вливание), подкожно, внутримышечно, в ободочную кишку, ректально, назально или интраперитонеально, с использованием разнообразных дозированных форм, таких как суппозитории, имплантируемые шарики или маленькие цилиндры, аэрозоли, составы для перорального введения (такие как таблетки, капсулы и пастилки) и составы для местного применения, такие как мази, капли и кожные пластыри. Стерильные мембраны по данному изобретению при желании включают в формованные изделия, такие как имплантаты, которые могут использовать инертные материалы, такие как биоразлагаемые полимеры или синтетические силиконы, например Silastic, силиконовый каучук или другие коммерчески доступные полимеры.

Соединения и/или соли по изобретению могут быть также введены в форме липосомных систем доставки, таких как малые однослойные везикулы, большие однослойные везикулы и многослойные везикулы. Липосомы могут быть сформированы из разнообразных липидов, таких как холестерин, стериламин или фосфатидилхолины.

Соединения и/или соли по данному изобретению могут быть также доставлены путем использования антител, фрагментов антитела, факторов роста, гормонов или других направляющих частей молекул, с которыми связывают молекулы соли. Соединения и/или соли по данному изобретению могут быть также связаны с соответствующими полимерами в качестве нацеливаемых лекарственных носителей. Такие полимеры могут включать поливинилпирролидинон, сополимер пирана, полигидроксипропил-метакриламид-фенол, полигидроксиэтил-аспартамид-фенол или полиэтиленоксид-полилизин, замещенный пальмитоильными остатками. Кроме того, соединения и/или соли по изобретению могут быть связаны с классом биоразлагаемых полимеров, применимых для достижения регулируемого высвобождения лекарства, например, с полимолочной кислотой, полигликолевой кислотой, сополимерами полимолочной и полигликолевой кислоты, поли-эпсилон-капролактоном, полигидроксимасляной кислотой, сложными полиортоэфирами, полиацетальями, полидигидропиранами, полицианоакрилатами и поперечно сшитыми или амфипатическими блок-сополимерами гидрогелей. Полимеры и полупроницаемые полимерные матрицы могут быть сформованы в формованные изделия, такие как клапаны, стенты, трубки, протезы и тому подобное.

## **5. Получение соединения**

### **а. Соли соединения формулы II**

Соединение формулы II может быть превращено в соли различных неорганических и органических кислот, включая, но без ограничения, соль HCl, лактат, малеат, феноксиацетат, пропионат, сукцинат, адипинат, аскорбат, камфорат, глюконат, фосфат, тартрат, цитрат, мезилат, фумарат, гликолат, нафталин-1,5-дисульфонат, гентизат и бензолсульфонат. Специалист в этой области должен признавать, что другие кислоты могут быть использованы для получения солей, содержащих соединение формулы I, которые применимы по данному изобретению.

Предполагается, что соли по изобретению легко могут быть превращены в другие соли по изобретению.

Некоторые способы применимы для получения солей, описанных выше, и известны специалистам в этой области. Например, взаимодействие соединения формулы II с одним или несколькими молярными эквивалентами желательной кислоты в растворителе или в смеси растворителей, в которой соль нерастворима, или в растворителе типа воды, после чего растворитель удаляют выпариванием, перегонкой или сушкой вымораживанием. В качестве варианта соединение формулы II может быть пропущено над ионообменной смолой, чтобы образовать желательную соль, или одна солевая форма продукта может быть превращена в другую с использованием того же самого общего процесса.

Соединение формулы II может быть получено согласно процедуре, описанной ниже. Соль малеат соединения формулы II выбрана за ее превосходную кристалличность, термическую и гидролитическую стабильность и высокую чистоту.

#### **b. Бетриксабан**

Соединение формулы II или бетриксабан может быть получен согласно любой из нескольких различных методологий или в граммовом масштабе (<1 кг) или в килограммовом масштабе (>1 кг). Способ граммового масштаба описан ниже в примере 2. Другой способ граммового масштаба описан в патенте США № 6844367B1, см. пример 266, который включен в настоящее описание в полном объеме.

В качестве варианта соединение формулы II может быть получено в килограммовом масштабе с использованием процедуры, описанной в примере 2. Образование диметиламида формулы II вовлекает нуклеофильную атаку на цианогруппу депротонированным амином, который образован из вторичного амина и алкиллития. Используемый здесь термин "алкил" относится к углеводородному радикалу из 1-8 атомов углерода. Специалисту должно быть понятно, что депротонированный амин может быть образован другими способами и образование амидиновой функциональности формулы II может быть достигнуто различными другими способами.

Растворителем, применимым в способе по данному изобретению, который описан выше, является апротонный растворитель, такой как тетрагидрофуран (THF), простой диэтиловый эфир, диметоксиметан, диоксан, гексан, метил-трет-бутиловый простой эфир, гептан и циклогексан. В дополнение, образование депротонированного амина может быть осуществлено при температурах ниже 10°C. Нуклеофильное присоединение амина, чтобы получить соединение формулы I, также может быть проведено при температурах ниже 10°C. Специалисту в этой области понятно, что способы по данному изобретению могут быть осуществлены на практике с использованием различных других растворителей, реагентов и температур реакции.

В дополнение, тогда как способ по данному изобретению получения соединения формулы II в граммовом масштабе подобен процедуре, используемой в килограммовом масштабе, увеличение масштаба реакции более чем 3400%. Более того, на некоторых стадиях достигают повышенных выходов, используя уменьшенные количества избыточных реагентов. Специалисту в этой области должно быть понятно, что соединение формулы I может быть получено по другим химическим методологиям как в граммовом, так и в килограммовом масштабе.

#### **ПРИМЕРЫ**

Если не установлено иначе, сокращения, используемые в данном описании, имеют следующие значения:

	Å	=	Ангстрем
	A%	=	общая процентная площадь
	aq.	=	водный
5	cm	=	сантиметр
	d	=	дублет
	DSC	=	дифференциальная сканирующая калориметрия
	EDTA	=	этилендиаминтетрауксусная кислота
	eq.	=	эквивалент
10	EtOH	=	этанол
	g	=	грамм
	HPLC	=	жидкостная хроматография высокого разрешения
	hr	=	час
	Hz	=	Герц
	IR	=	инфракрасный
15	J	=	константа взаимодействия
	kg	=	килограмм
	kV	=	килоВольты
	L	=	литр
	LOD	=	предел обнаружения
20	M	=	молярный
	m	=	мультиплет
	mA	=	миллиАмпер
	Me	=	метил
	MeO	=	метокси
25	MeOH	=	метанол
	mg	=	миллиграмм
	min	=	минута
	mL	=	миллилитр
	mm	=	миллиметр
	MTBE	=	метил трет-бутиловый простой эфир
30	N	=	нормальный
	nM	=	наномолярный
	NMR	=	ядерный магнитный резонанс
	s	=	синглет
	TDS	=	суммарные растворенные твердые вещества
35	TGA	=	термический гравиметрический анализ
	THF	=	тетрагидрофуран
	µM	=	микромолярный
	VID	=	дважды в сутки

### Пример 1

#### Получение кристаллической полиморфной соли формулы III

##### а. Получение в граммовом масштабе

В 3-горлую круглодонную колбу емкостью 1500 мл, снабженную холодильником, загружали соединение в форме свободного основания формулы I (25 г, 1 экв.) и добавляли смесь 9:1 EtOH/вода (500 мл) при перемешивании. Полученную суспензию нагревали до 70°C. Малеиновую кислоту (12,77 г, 2 экв.) добавляли по каплям в виде раствора (100 мл 9:1 EtOH/вода), и после добавления 50 мл раствор становился заметно более прозрачным. После завершения добавления раствора мелеиновой кислоты температуру поддерживали при 80°C в течение 5 минут. Сосуду позволяли медленно остывать до 45°C и затем добавляли 400 мл MTBE. Раствор перемешивали еще 12 часов. Полученный осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Соль соединения формулы I (малеат) извлекали с выходом 45% (14,2 г).

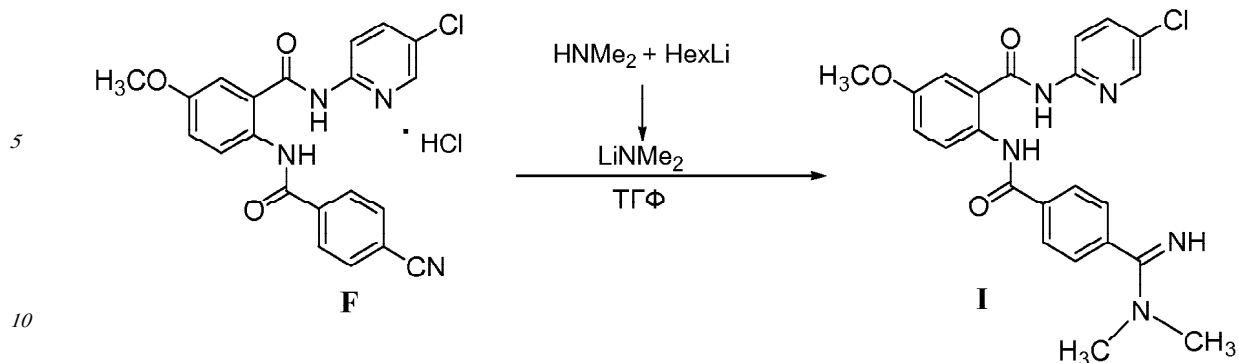
##### б. Получение в килограммовом масштабе

Соединение формулы I (24,6 кг) загружали в реактор GLMS емкостью 760 л (реактор А). Добавляли малеиновую кислоту (12,7 кг, 2,0 экв.) этанол (445 кг, 18,1 части) и воду высокой чистоты (140 кг, 5,7 части). Реакционную смесь доводили до 22°C (19-25°C) и перемешивали при этой температуре в течение приблизительно 1 часа, затем перемещали через барьерный фильтр в кондиционированный реактор Hastelloy емкостью 780 л (реактор В). Насос реактора А и линии промывали по направлению в реактор В дополнительным этанолом (около 45 кг) через барьерный фильтр. Фильтрат концентрировали в вакууме при максимальной температуре теплой гликолевой бани (чтобы нагреть кожух реактора) 45°C, пока не оставалось приблизительно 140 л (5,7 части объема). Пробы содержимого реактора В в процессе анализировали ЯМР, который показал, что молярное отношение этанол:соль малеат соединения формулы I было 26. Воду высокой чистоты (49 кг, 2,0 части) загружали в реактор В и концентрирование в вакууме продолжали, пока не достигали объема в реакторе приблизительно 140 л (5,7 части). Проводимый в процессе ЯМР показал, что молярное отношение этанол:соль малеат соединения формулы I было 14. Воду высокой чистоты (49 кг, 2,0 части) снова загружали и концентрирование в вакууме продолжали до достижения объема в реакторе приблизительно 140 л. Проводимый в процессе ЯМР показал, что молярное отношение этанол:соль малеат соединения формулы I было 5. Температуру содержимого реактора В доводили до 22°C (19-25°C) и визуально убеждались в образовании суспензии. Реакционную смесь перемешивали при 22°C (19-25°C) приблизительно 2 ч и затем фильтровали на центрифуге 30", снабженной фильтрующей тканью. Насос реактора В и линии промывали по направлению в центрифугу 30" через барьерный фильтр двумя порциями воды высокой чистоты (около 30 кг каждая). Пробы осадка на фильтре анализировали HPLC в процессе, которая показала, что чистота продукта была 99,1 A%, наивысшая загрязненность была 0,26 A%, и поэтому перекристаллизация не требовалась. Осадок на фильтре (33,1 кг) сушили в вакууме при максимальной температуре теплой гликолевой бани (чтобы нагреть кожух реактора) 40°C. Приблизительно через 30,5 ч анализ LOD в процессе показал содержание растворителя 0%. Сухой продукт выгружали (26,4 кг) и хранили при 2-8°C. Выход конечного продукта 85% был несколько выше ожидаемого (ожидаемый 50-80%). Чистоту соли (малеат) определяли по наличию содержания гидролизованного амидина, которое измеряли HPLC, и было обнаружено, что чистота >99%.

<sup>1</sup>H NMR (DMCO-d<sub>6</sub>): δ 3,0 (с, 3H), 3,2 (с, 3H), 3,82 (с, 3H), 7,2 (д, 1H, J=9,0 Гц), 7,42 (с, 1H), 7,68 (д, 1H, J=8,0 Гц), 7,95-8,15 (м, 2H), 8,12 (м), 8,18 (м, 1H), 8,42 (с, 1H), 9,0 (с, 1H), 11,0 (с, 1H), 11,2 (с, 1H); IR(KBr, см<sup>-1</sup>): 3300, 1685, 1600, 1515, 1380, 1270, 1200, 1100, 1050, 880, 800, 710.

## Пример 2

### Получение соединения формулы II



#### а. Получение в граммовом масштабе

Суспензию соединения формулы F (455 г, 1,0 экв.) в THF (4,67 кг, 10,3 части) получали и доводили до  $<10^\circ\text{C}$ . Литийдиметиламид получали следующим образом: гексиллитий (2,3 н./гексан, 2,45 л, 5,5 экв.) добавляли к раствору диметиламина (2 н./THF, 2,8 л, 5,5 экв.), поддерживая при  $<10^\circ\text{C}$ . Раствор литий-диметиламида загружали в суспензию, содержащую соединение формулы F, поддерживая температуру в сосуде  $<10^\circ\text{C}$ . Прохождение реакции отслеживали HPLC в процессе, которая подтвердила, что количество соединения формулы F было  $<1,0\ \text{A}\%$ . Буферный раствор  $\text{NaHCO}_3$  (490 г, 1,1 части, 5,7 экв.) и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (490 г, 1,1 части, 4,5 экв.) в деионизированной воде (6,6 кг, 14,51 части) готовили и указанную реакционную смесь перемещали в этот водный раствор, поддерживая  $<5^\circ\text{C}$ . Осажденный продукт и полученную суспензию доводили до  $20^\circ\text{C}$  в течение периода 12 ч. Твердое вещество отфильтровывали и полученный осадок на фильтре промывали 3,5 кг (7,7 части) деионизированной воды. Твердое вещество отфильтровывали, используя грубый лабораторный фильтр из стеклокерамики, и промывали добавлением холодного ( $0-5^\circ\text{C}$ ) абсолютного этанола (628 г, 1,4 части). Продукт сушили при  $30-35^\circ\text{C}$ . Сухой продукт получали в количестве 458 г (выход 73%).

#### б. Получение в килограммовом масштабе

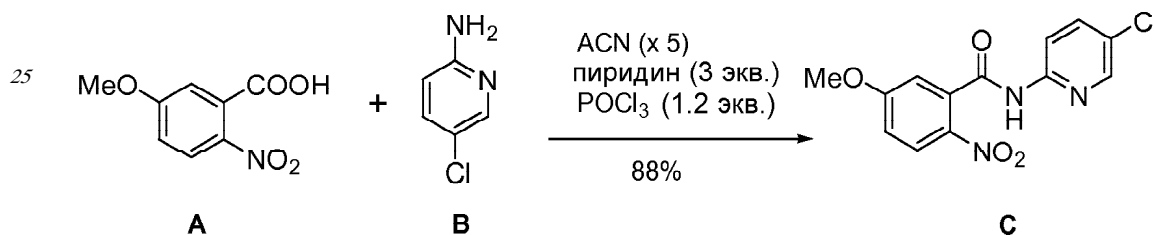
Суспензию соединения формулы F (31,5 кг, 1,0 экв.) в THF (251 кг, 8,0 частей) получали в реакторе Hastelloy емкостью 780 л (реактор А) и доводили до  $0^\circ\text{C}$  (от  $-3$  до  $3^\circ\text{C}$ ). 2М Диметиламин в THF (161,0 кг, 5,0 экв.) и THF (63 кг, 2 части) загружали в реактор GLMS емкостью 1900 л (реактор В) и доводили до  $0^\circ\text{C}$  (от  $-3$  до  $3^\circ\text{C}$ ) с максимальным перемешиванием. Гексиллитий (2,3 М, 97,2 кг, 4,5 экв.) медленно загружали в реактор В, поддерживая максимальную температуру  $10^\circ\text{C}$ . Насос и линии промывали THF (3,2 кг) по направлению в реактор В. Содержимое реактора В доводили до  $0^\circ\text{C}$  (от  $-3$  до  $3^\circ\text{C}$ ), затем перемещали в реактор А, поддерживая температуру реактора А  $\leq 10^\circ\text{C}$ . Насос реактора В и линии промывали THF (31,4 кг, 1,0 часть) вперед по потоку. Содержимое реактора А доводили до  $0^\circ\text{C}$  (от  $-3$  до  $3^\circ\text{C}$ ) и перемешивали при этой температуре до завершения реакции, что проверяли HPLC (1-2 ч). После 1 ч перемешивания анализ HPLC в процессе показал, что осталось 0 А% исходного материала (критерий в процессе: максимально 1 А%). Содержимое реактора А доводили до  $-5^\circ\text{C}$  (от  $-8$  до  $-3^\circ\text{C}$ ). В процессе проводили очистку реактора В водой. Два предварительно приготовленных водных раствора ( $\text{NaHCO}_3$  (35,0 кг, 1,1 части) в воде (236 кг, 7,5 части) и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (35,0 кг, 1,1 части) в воде (236 кг, 7,5 части) загружали в реактор В и доводили до  $-3^\circ\text{C}$  (от  $0$  до  $6^\circ\text{C}$ ). Содержимое реактора А переносили в реактор В через изолированную линию, поддерживая температуру реактора В при  $-8^\circ\text{C}$  до максимума  $5^\circ\text{C}$ . Насос реактора А и линии промывали по

направлению вперед холодным [-5°C (от -8 до -3°C)] THF (31,4 кг, 1,0 часть). Содержимое реактора В довели до 22°C (19-25°C) и перемешивали около 3 ч. Образование суспензии подтверждали визуально и содержимое реактора В фильтровали на центрифуге 30", снабженной фильтровальной тканью. Насос реактора В и линии промывали вперед в центрифугу 30", снабженную фильтровальной тканью, питьевой водой (63 кг, 2 части). Влажный осадок на фильтре (66,5 кг) перемещали назад в реактор В и подвергали суспензии промывке в питьевой воде (1005 кг, 32 части) при 22°C (19-25°C) около 1 ч. Продукт фильтровали на центрифуге 30" (после очистки в процессе и снабжения фильтровальной тканью) и насос и линии реактора В промывали в направлении вперед питьевой водой (63 кг, 2 части). Пробы промывной воды отбирали для тестирования TDS, которые, как было обнаружено, были 0,46%. Насос реактора В, линии и влажный осадок на фильтре дополнительно промывали холодным [0°C (-3 до 3°C)] этанолом (44 кг, 1,39 части). Влажный осадок на фильтре сушили в вакууме с максимальной температурой водяной бани (чтобы нагреть кожух сушилки) 35°C. LOD в процессе был 0% после приблизительно 24 ч сушки, и продукт выгружали (24,8 кг) с выходом 76,7%. HPLC показала 98% чистоту с дехлорированным загрязнением 1,14%.

### Пример 3

#### Получение соединения формулы F

#### Стадия 1. Синтез 2-нитро-N-(5-хлорпиридин-2-ил)-5-метокси-бензамида (C)

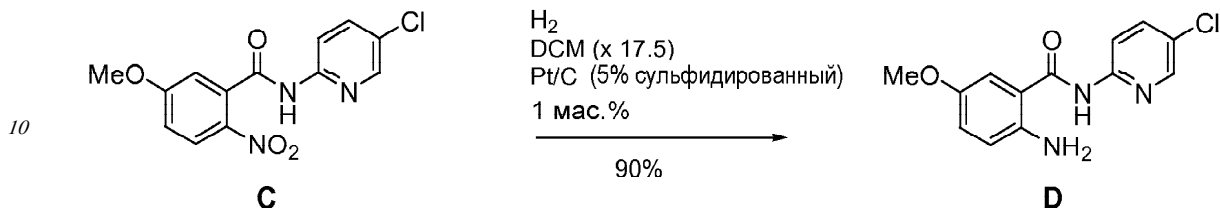


5-Метокси-2-нитробензойную кислоту (А) (25 кг, 1,0 экв.), 2-амино-5-хлорпиридин (В) (16,3 кг, 1,0 экв.) и ацетонитрил (87,5 кг, 3,5 части) загружали в реактор GLMS емкостью 380 л. Реакционную смесь довели до 22°C (19-25°C) и добавляли водный пиридин (30,0 кг, 3,0 экв.). Насос и линии промывали в направлении вперед ацетонитрилом (22,5 кг, 0,9 части) и содержимое реактора довели до температуры 19-22°C. Оксихлорид фосфора (23,3 кг, 1,20 экв.) загружали в содержимое реактора дозировочным насосом, поддерживая температуру 25°C (22-28°C). Дозировочный насос и линии промывали в направлении вперед ацетонитрилом (12,5 кг, 0,5 части), поддерживая температуру 25°C (22-28°C). Реакционная смесь обычно превращалась из суспензии в прозрачный раствор после добавления около 1/3 POCl<sub>3</sub>. В конце добавления он становился мутным. После завершения добавления реакционную смесь перемешивали при 25°C (22-28°C) в течение около 1 ч, в это время анализ HPLC подтверждал завершение реакции. Раствор охлаждали до 15°C (12-18°C) и медленно загружали питьевую воду (156,3 кг, 6,25 части), поддерживая температуру реакции между 12 и 30°C. Реакционную смесь затем довели до 22°C (19-25°C) и перемешивали около 5 ч до тех пор, пока не прекращалось выделение тепла. Образование суспензии наблюдали визуально и содержимое реактора фильтровали на работающем под давлением нутч-фильтре, снабженном фильтровальной тканью. Реактор, насос и линии промывали в направлении вперед на работающий под давлением нутч-фильтр двумя порциями питьевой воды (62,5 кг, 2,5 части каждая). Фильтрат имел величину pH 7. Продукт (41,8 кг) сушили в вакууме с максимальной



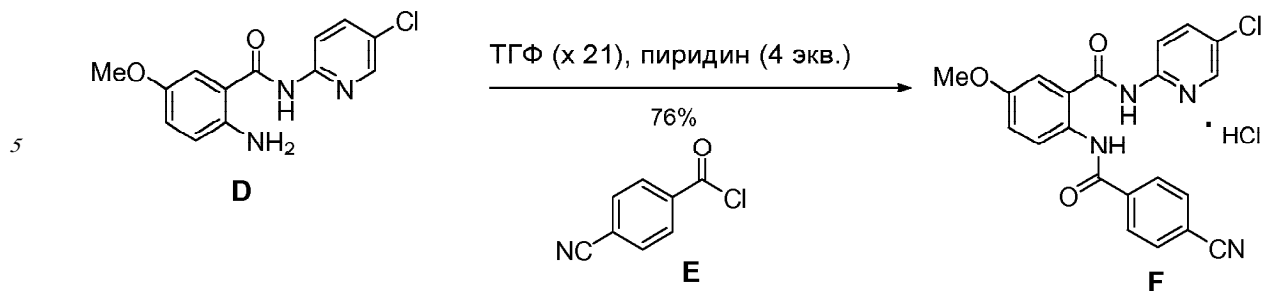
температурой водяной бани (чтобы нагреть кожух сушилки) 50°C. Приблизительно через 12 ч проводимый в процессе анализ LOD показал содержание растворителя 0,72%. Сухой продукт (С) выгружали (34,4 кг) с выходом 88,2% и чистотой 99,1% по HPLC.

5 **Стадия 2. Синтез 2-амино-N-(5-хлор-пиридин-2-ил)-5-метокси-бензамида (D)**



В реактор Hastelloy емкостью 780 л загружали соединение С (33 кг, 1,0 экв.), 5% платину-на-углероде (сульфидированный, 0,33 кг, 0,010 части) и дихлорметан (578 кг, 17,5 части). Перемешивание начинали и содержимое реактора довели до 22°C (19-25°C). В реакторе создавали давление приблизительно 30 фунтов на кв. дюйм водородом и реакционную смесь осторожно нагревали до 28°C (25-31°C). Гидрогенизацию содержимого реактора проводили под давлением около 30 фунтов на кв. дюйм при 28°C (25-31°C, максимум 31°C) до тех пор, пока реакция не была завершена по данным HPLC. Через 16,5 ч реакцию считали завершенной после подтверждения исчезновения исходного материала (0,472 А%). Осуществляли циркуляцию содержимого реактора через кондиционированную целитную прокладку (0,2-0,5 кг целита, кондиционированного 20-55 кг дихлорметана), приготовленную в спарклер-фильтре 8", чтобы удалить платиновый катализатор. Реактор и слой целита промывали в направлении вперед двумя порциями дихлорметана (83 кг, 2,5 части каждая). Фильтрат перемещали в реактор GLMS емкостью 570 л и концентрировали при атмосферном давлении до 132 л (4 части объема). Этанол (69 кг, 2,1 части) загружали и концентрирование продолжали при атмосферном давлении приблизительно до 99 л (3 части объема). ЯМР в процессе показал, что содержание дихлорметана было 39%. Этанол (69 кг, 2,1 части) снова загружали и концентрирование продолжали снова приблизительно до 99 л (3 части объема). ЯМР в процессе показал, что содержание дихлорметана было 5%. Реакционную смесь затем довели до 3°C (0-6°C), перемешивали около 1 ч и полученную суспензию фильтровали на закрытом кожухом, работающем под давлением нутч-фильтре, снабженном фильтровальной тканью. Реактор, насос и линии промывали в направлении вперед холодным [3°C(0-6°C)] этанолом (26 кг, 0,8 части). Влажный осадок на фильтре (36,6 кг) сушили в вакууме при 40-50°C с максимальной температурой водяной бани (чтобы нагреть кожух сушилки) 50°C. Анализ LOD показал, что содержание растворителя было 0,1%. Сухой продукт (D) выгружали (26,4 кг) с выходом 89,5%. HPLC показала чистоту 98,4 А% с дехлорированным загрязнением 0,083%.

50 **Стадия 3. Синтез гидрохлорида N-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-(4-цианобензоиламино)-5-метоксибензамида (F)**



В реактор Hastelloy емкостью 780 л загружали 4-цианобензоилхлорид (E) (17,2 кг, 1,1 экв.) и THF (92 кг, 3,5 части). Содержимое реактора перемешивали при 22°C (19-25°C) до тех пор, пока не растворились все твердые вещества. Полученный раствор перемещали в нижний приемник и реактор промывали в направлении вперед THF (26 кг, 1 часть). Соединение D (26,4 кг, 1 экв.), THF (396 кг, 15 частей) и пиридин (2,90 кг, 0,4 экв.) загружали в чистый реактор. Насос и линии промывали в направлении вперед THF (34 кг, 1,3 части). Посредством дозирующего насоса раствор 4-цианобензоилхлорид/THF загружали в реактор, поддерживая температуру  $\leq 30^\circ\text{C}$ , и промывали в направлении вперед THF (приблизительно 10 кг). Полученную желтовато-окрашенную суспензию перемешивали при 22°C (19-25°C) около 2 ч. Анализ HPLC в процессе, сделанный через 2 ч, показал содержание соединения формулы D 0%, что является показателем завершения реакции. Суспензию фильтровали на работающем под давлением нутч-фильтре, снабженном фильтровальной тканью. Реактор, насос, линии и влажный осадок промывали тремя порциями этанола (приблизительно по 15 кг каждая). Влажный осадок на фильтре выгружали (65,4 кг) и перемещали назад в реактор для промывки суспензии этанолом (317 кг, 12 частей) при 22°C (19-25°C) в течение около 1 ч. Суспензию фильтровали на работающем под давлением нутч-фильтре и реактор, насос, линии и влажный осадок на фильтре промывали двумя порциями этанола (приблизительно по 15 кг каждая) и двумя порциями THF (приблизительно по 15 кг каждая). Влажный осадок на фильтре сушили в вакууме с максимальной температурой теплой гликолевой бани (чтобы нагреть кожух сушилки) 40°C. После 14,5 ч сушки LOD был 0,75%. Высушенный материал размалывали (сито 0,125"), получая 31,8 кг продукта, который сушили в вакууме еще 10,5 ч. LOD после сушки был 1,8%, и продукт выгружали (31,5 кг) с выходом 74,8% (ожидаемый 60-90%). HPLC показала чистоту 100%.

#### 40 Пример 4

##### Биоанализ для определения антитромботической активности

Этот пример описывает анализ *in vitro* для определения антитромботической активности *in vivo*. Прогнозирующий принцип анализа подтвержден с помощью созданной *in vivo* бабуиновой модели, описанной ниже. Используемое в анализе соединение соответствует соединению формулы II или его соли.

##### 45 Материалы и способы

Для исследований *in vitro* создавали пул плазмы из крови, отобранной венепункцией в 3,2% (1:9 об./об.) тринатрий цитрат минимум у десяти доноров. Используемым специфическим тромбиновым субстратом был Z-GGR-AMC (Bachem). Тканевый фактор (Innovin, "TF") закупали у Dade Bechring. Кроличий античеловеческий TF IgG и очищенный рекомбинантный человеческий TF были от American Diagnostica. Наборы COATEST LMW гепарин/гепарин были от Chomogenix. Источники

антикоагулянтов для испытаний были следующие: эноксапарин натрий (Aventis Pharmaceuticals), фондапаринукс натрий (Glaxo Smith Kline), бивалирудин (The Medicines Company), ингибитор fXa C921-78 (Betz, A. et al., Biochem., 1999; 38-14582-14591); ривароксабан и разаксабан.

Образование тромбина в пуле плазмы в отсутствие или в присутствии различных антикоагулянтов и у получавших варфарин пациентов инициировали добавлением Innovin и кальция. Образование тромбина измеряли по непрерывному сигналу, создаваемому расщеплением тромбинового субстрата, в течение 10-минутного периода с помощью флуоресцентного ридера Flex Station (Molecular Probe). Флуоресцентный сигнал (макс.-мин. относительные флуоресцентные единицы) представлен в единицах (RFU) или в произвольных единицах (AU) образования тромбина, и единицы анти-fXa измеряли Coatest. Количественное определение концентрации TF в Innovin проводили путем иммуноблоттинга с кроличьим античеловеческим TF IgG с последующей денситометрией и сравнением с очищенным человеческим TF (остатки 1-263, экспрессированные в бакуловирусе).

Для подтверждения *ex vivo* анализа плазму отбирали у 168 пациентов, получавших антикоагулянтную терапию. В число этих субъектов входили медицински стабильные госпитализированные пациенты или пациенты, обслуживаемые амбулаторно и которые получали варфарин (без изменения дозы варфарина в течение приблизительно 7 дней). Кровь отбирали, только если вскрытие вены и регулярные замеры традиционных антикоагуляционных тестов (INR, aPTT и т.п.) уже были назначены, и никаких дополнительных проколов иглой не делали для этого исследования. Дополнительные 5 мл крови отбирали и помещали в предохраненные от коагуляции цитратом натрия пробирки. Образцы затем дважды центрифугировали, чтобы собрать фракцию плазмы и эту плазму затем сразу хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Результаты

Анализ был чувствительным к антикоагулянтам с изменяющимися механизмами действия. Добавление нефракционированного гепарина (UFH) или низкомолекулярного гепарина (LMWH) к плазме здоровых доноров производит зависимое от дозы ингибирование при анализе. Подобно этому непосредственные тромбиновые или fXa ингибиторы также вызывают пропорциональное дозе ингибирующее действие. Влияние специфических ингибиторов тромбина или фактора Ха на TF-индуцируемое образование тромбина в плазме показано в таблице 1.

Таблица 1	
Лекарство	IC <sub>50</sub>
Фондапаринукс	160 нМ
Тромбиновый ингибитор бивалирудин	2,4 мкг/мл
fXa ингибитор C921-78	17 нМ
fXa ингибитор ривароксабан	80 нМ
fXa ингибитор разаксабан	125 нМ

Этот анализ применим также для измерения антикоагуляции у пациентов, резко или постоянно предохраненных от коагуляции. Измерение aPTT у пациентов, получавших UFH или LMWH, коррелировали с ингибированием образования тромбина. Что касается традиционных маркеров образования тромбина (TAT и F1.2, по измерениям ELISA), этот биоанализ обеспечивал превосходную корреляцию с измерениями INR. Результаты которых показаны на фиг. 1A, 1B и 1C. Степень образования тромбина (AU) за 10 мин измеряли на образцах плазмы от (а) получавших варфарин пациентов и данные наносили на график против величин INR

от 137 пациентов (фиг. 1А), (b) данные от получавших эноксапарин пациентов наносили на график против величин аРТТ от 16 пациентов (фиг. 1В) и (с) данные от получавших нефракционированный гепарин пациентов наносили на график против величин аРТТ от 15 пациентов (фиг. 1С).

### Пример 5

#### Сравнение бетриксабана с фондапаринуксом

Оценку в анализе протромбиназы цельной крови проводили, чтобы сравнить бетриксабан с фондапаринуксом, непрямым ингибитором fXa. Подобно фондапаринуксу бетриксабан в зависимости от дозы ингибировал опосредуемую тромбоцитами активность протромбиназы в этой системе испытания.

#### Материалы и способы

Амидолитические анализы ингибирования очищенного человеческого fXa и родственных протеаз проводили, как сообщалось ранее (Sinha, U et al. Eur. J. Pharmacol. 2000; 114:2313-6). Для определения ингибирующей активности протромбиназы претромбин-2 плазмы человека приобретали у Haematologic Technologies и тромбиновый субстрат Boc-Asp(OBzl)-Pro-Arg-AMC.HCl получали от Bachem. Анализ данных для получения кинетических параметров проводили с использованием программного обеспечения Dynafit (Biokin). Бетриксабан показал  $K_i$  0,117 (нМ) и  $K_i$  протромбиназы 0,801 (нМ).

Использовали анализ, описанный в примере 4. Бетриксабан испытывали на модели инкорпорации тромбогенного устройства во внутривенный шунт у бабуинов (Hanson SR et al. J. Clin. Invest. 1993; 92:2003-12). Двухкомпонентное тромбогенное устройство измеряет рост тромба на дакроновом имплантате и камере расширения с использованием меченных  $^{111}\text{In}$  тромбоцитов и меченного  $^{125}\text{I}$  фибриногена. Эту модель ранее использовали для исследования широкого разнообразия антикоагулянтов (нефракционированного и низкомолекулярного гепаринов, ингибиторов тромбина и fXa).

#### Результаты

Зависимое от дозы ингибирование венозного тромбоза наблюдали при четырех дозах (0,05, 0,12, 0,21 и 0,49 мг/кг) бетриксабана. Измерения ex vivo образования тромбина плазмы, аРТТ, РТ, активированное время свертывания ("АСТ") и единиц анти-fXa осуществляли в течение времени. В противоположность наблюдавшейся антитромботической активности (30-89% ингибирование оседания тромбоцитов, 0-87% ингибирование осаждения фибрина) было минимальное расширение параметров свертывания при обработке бетриксабаном. Результаты этого представлены в таблице 2 ниже.

Таблица 2			
Агент	Кратное изменение от контроля		
	Среднее $\pm$ SD		
	АСТ	РТ	аРТТ
Контроль	0,87 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,03
бетриксабан 0,05 мг/кг	1,14 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,03	1,07 $\pm$ 0,03
бетриксабан 0,12 мг/кг	1,14 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,06	1,07 $\pm$ 0,03
бетриксабан 0,21 мг/кг	1,11 $\pm$ 0,04	1,07 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,08
бетриксабан 0,49 мг/кг	1,28 $\pm$ 0,06	1,17 $\pm$ 0,11	1,29 $\pm$ 0,21

Единицы анти-fXa были ниже предела количественного определения для трех низших доз и 0,31 единицы/мл для наивысшей дозы. Шаблонные величины времени кровотечения не были нарушены ни для одного из получавших бетриксабан

животных. Параметр *ex vivo*, который коррелировал с антитромботической активностью, был пропорциональным дозе ингибированием (коэффициент корреляции  $R^2 = 0,99$ ) образования тромбина плазмы; которое находилось в пределах от 13% ингибирования при наименьшей дозе до 72% при наивысшей дозе. Следовательно, этот новый биоанализ протромбиназы предсказывает антитромботическую активность *in vivo*.

В таблице 3 ниже приведены данные по чувствительному к дозе ингибированию *in vivo* тромбоза на бабуиновой модели. В таблице 3 приведены также данные по анти-fXa активности в образцах плазмы бабуина во время вливания контроля или испытуемого соединения.

Таблица 3			
Дозируемая группа	Пределы концентрации в плазме бетриксабана (нг/мл)	% Ингибирование оседания тромбоцитов	% Ингибирование образования фибрина
Контроль	0	0,00	0,00
1	7-10	29,71	-0,38
2	13-21	44,20	37,50
3	26-38	65,22	71,97
4	54-88	88,77	87,12

Фиг.2 обеспечивает дополнительную ясность того, что анализ *in vitro* является прогнозирующим антитромботическую активность *in vivo*. Конкретно фиг. 2 показывает чувствительное к дозе ингибирование *in vitro* тромбоза на бабуиновой модели. Оседание меченных  $^{111}\text{In}$  тромбоцитов в течение времени в венозной камере во время вливания бетриксабана ( $n=3$  при каждой дозе). Контрольным животным вливание проводили с носителем ( $n=4$ ).

Фиг.3, 4А и 4В показывают ингибирование иницированного тканевым фактором образования тромбина в цельной крови человека бетриксабаном в сравнении с фондапаринуксом. Активность тромбина количественно определяли по расщеплению флуорогенного субстрата. Отклик на дозу при ингибировании образования тромбина измеряли путем добавления изменяющихся количеств бетриксабана и фондапаринукса к цельной крови от одиннадцати здоровых доноров. Показаны измерения относительных единиц флуоресценции (RFU) у типичного донора.

Это исследование показало *in vitro* и *in vivo* характеристики бетриксабана как сильного ингибитора очищенного человеческого fXa и комплекса протромбиназы. Конкретно была выявлена более чем 86000-кратная специфичность против родственных протеаз человека, таких как тромбин и активированный белок С. Было также зависимое от дозы ингибирование иницируемого тканевым фактором образования тромбина и зависимое от дозы ингибирование начавшегося тромбоза на примат-модели артериовенозного тромбоза без расширения параметров свертывания или времени кровотечения. Таким образом, по сравнению со стандартными измерениями коагуляции этот анализ был более предикативным в отношении эффективности *in vivo* на животной модели.

### Пример 6

#### Ингибирование протромбиназы и нерастворимого фактора Ха прогнозирует эффективность ингибиторов fXa *in vivo* на модели тромбоза глубоких вен (DVT)

Этот пример предназначен для проверки гипотезы, что действенность ингибиторов fXa против fXa, встроенного в комплекс протромбиназы, будет прогнозировать антитромботическую эффективность *in vivo*. Восемь ингибиторов fXa

из четырех структурно различных химических серий с диапазоном активностей против fXa испытывали по их способности ингибировать протромбиназный ферментный комплекс в плазме человека. Образование тромбина и последующее расщепление специфического тромбинового субстрата использовали в качестве меры активности протромбиназы, ингибирующей активности, определяемой по концентрации ингибитора, необходимой для получения 2-кратного удлинения времени до максимального продуцирования тромбина (2x lag). Были также определены *in vitro* кроличьи величины PT времени. *In vitro* кроличьи величины PT времени определяли путем добавления тромбопластина к кроличьей плазме. Ингибирование на кроличьей модели DVT оценивали, как описано ранее (Hollenbach et al., *Thromb. Haemost.*, 1994; 71-357) и соотносили с концентрациями лекарственного средства в плазме.

#### Материалы и способы

Соединения синтезировали (Zhu et al; *Curr. Top. Med. Chem.* 2001; 2:101-119; Betz et al. *Biochem.*, 1999; 36:14582-91). Концентрацию соединения, необходимую для ингибирования амидолитической активности очищенного растворимого человеческого fXa (Haematologic Technologies) на 50% (IC<sub>50</sub>), измеряли путем последующего образования п-нитроанилина из пептидного субстрата Z-D-Arg-Glu-Arg pNA (Diapharma) при 405 нм на ридер-планшете Spectramax (Molecular Devices) (Sinha, et al. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 395:51-59). Образование тромбина протромбиназой оценивали в обработанной Reptilase®, объединенной в общий резерв, обедненной тромбоцитами плазме человека путем измерения п-нитроанилина при 405 нм после расщепления пептидного тромбинового субстрата Pefachrom. TG (Pentapharm) (Sinha et al., *ATVB*; 2003; 23: 1098-1104). Концентрацию соединения, которая вызывала двукратное увеличение времени максимального образования тромбина, регистрировали как концентрацию 2x lag. Антитромботическую эффективность против кроличьего венозного тромбоза определяли путем измерения приращения тромба на хлопковой нитке, помещенной в полую вену посредством катетера, вставленного в левую бедренную вену. Уменьшение массы тромба после двухчасового вливания соединения выражали по отношению к контролю с носителем (Hollenbach et al., *Thromb. Haemost.*, 1994; 71-357).

Концентрации лекарственного средства в кроличьей плазме измеряли посредством LC-MS/MS. Кроличьи величины протромбинового времени измеряли, используя тромбопластин С плюс (Dade) на автоматизированном коагуляционном таймере (ACL 3000, Instrumentation Laboratory) (Sinha, et al. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 395:51-59).

#### Результаты

Все соединения ингибировали растворимый fXa на 50% при концентрациях менее чем 10 нМ. Однако порядок расположения в ряд по эффективности ингибирования растворимого fXa отличался от необходимого для ингибирования комплекса протромбиназы. Результаты показаны в таблице 4.

Таблица 4						
№	Класс соединения.	fXa IC <sub>50</sub> (нМ)	Протромбиназа 2x lag (мкМ)	Концентрация в плазме при DVT (мкМ)	Ингибирование тромбоза (%)	2x изменение PT на кроликах (мкМ)
1	Кетотиазол	0,5	0,18	0,06	94	7
2	Антрамиламид	1,3	0,22	1,14	37	2,7
3	Антрамиламид	0,7	0,24	1,65	47	1,7
4	Антрамиламид	0,4	0,25	1,04	47	1,0

5	Антраиламид	0,8	0,34	3,39	41	1,5
6	Нафталинпиразол	4,4	0,92	5,2	11	4,7
7	1,2-Бензолдиамин	3,5	1,35	4,6	19	8,8
8	Изоксазол	8,2	1,66	9,2	0	64

5

Наблюдалась плохая корреляция между величиной 2x lag для ингибирования протромбиназы и концентрацией, необходимой для достижения 2x изменения кроличьего PT ( $R^2 = 0,57$ ). Ни активности ингибирования fXa, ни изменение в кроличьем PT не предсказывали активности *in vivo* на модели тромбоза глубоких вен (DVT). Напротив, соединения могли быть широко подразделены на 3 степени эффективности ингибирования роста тромба *in vivo* в зависимости от их действенности в анализе протромбиназы *in vitro*. Соединение 1 имело самую низкую величину 2x lag 0,18 мкМ и было самым сильным ингибитором тромбоза *in vivo* с 94% ингибированием при концентрации в плазме 65 нМ. Вторая группа соединений с величинами 2x lag в анализе протромбиназы в пределах от 0,22 до 0,34 мкМ ингибировала *in vivo* образование тромбоза на 37-47% при концентрациях в плазме в пределах от 1,04 до 3,39 мкМ. Соединения в третьей категории были по меньшей мере сильными ингибиторами протромбиназы (величины 2x lag более чем 0,92 мкМ) и были не способны значительно ингибировать тромбоз *in vivo* даже при концентрациях в плазме 9,2 мкМ. Эти данные показали, что величина 2x lag, полученная в анализе протромбиназы, и отсутствие ингибирования растворимого fXa или продление кроличьего PT времени являются наиболее предикативными в отношении эффективности ингибитора fXa *in vivo* на кроличьей модели DVT.

25

Указанные ограничения применяемых в настоящее время антикоагулянтов, положение фактора Ха (fXa) при конвергенции и посторонних, и собственных путей коагуляции крови делают это привлекательной целью для разработки новых способов лечения. Что касается исследования взаимосвязи структуры и активности (SAR) сильных ингибиторов fXa, анализы, измеряющие ингибирование активности растворенной фазы протеазы fXa, являются очевидным исходным пунктом. Однако способность соединений ингибировать растворимый очищенный fXa не является истинным отражением взаимодействия между ингибитором и ферментом *in vivo*. Это потому, что наибольший вклад fXa в процесс коагуляции бывает, когда он объединяется с фактором Va как часть комплекса протромбиназы, вследствие чего активность протеазы увеличивается в 300000 раз по сравнению с fXa как фазы раствора. Эту повышенную активность fXa в комплексе протромбиназы значительно труднее ингибировать, поэтому любая оценка анти-fXa действенности соединения должна включать оценку ингибирования протромбиназы. Активность протромбиназы может быть измерена в бедной тромбоцитами плазме (PPP) и в таких условиях принимать в расчет влияние связывания белка плазмы на действенность соединения. Другим более прямым путем оценивания влияния соединений на процесс антикоагуляции является применение *in vitro* анализов свертывания, таких как протромбиновое время (PT) и активированное парциальное тромбопластиновое время (aPTT).

45

### Пример 7

#### Оценка биоанализа в изучении многократных повышающихся доз

50

ФИГ. 5 показывает данные анализов *in vitro*, проведенных с плазмой от здоровых людей-добровольцев, получавших перорально бетриксабан. Девять субъектов, каждый, получали капсулы по 40, 80 или 120 мг лекарственного средства каждые 12 часов в течение десяти последовательных дней. Контрольные субъекты (12) получали

плацебо или неантикоагулянтный лекарственный контроль. Образцы плазмы, отобранной у субъектов, подвергали биологическому анализу *in vitro* иницируемого тканевым фактором образования тромбина. Образцы плазмы анализировали также для определения концентрации лекарственного средства с применением жидкостной хроматографии высокого разрешения в тандеме с масс-спектрометрией. Результаты показали зависимую от дозы корреляцию между концентрацией бетриксабана в плазме и ингибированием образования тромбина в биологическом анализе.

### **Пример 8**

#### **Терапевтические для человека концентрации бетриксабана**

Анализы образования тромбина проводили, как описано в примере 4, с соединениями, добавляемыми *ex vivo* в цельную кровь человека. Величины РТ и аРТТ в различных образцах определяли с соединениями, добавляемыми к плазме, обедненной тромбоцитами. Образцы испытывали на ACL 3000plus (Coulter), РТ определяли с использованием Dade® Thromboplastin C plus и аРТТ определяли, используя Dade® Actin® FS активированный РТТ реагент.

Бетриксабан и фондапаринукс, косвенный ингибитор fXa, оба значительно ингибировали образование ТАТ и F1.2 в цельной крови человека. По сравнению с терапевтическим уровнем содержания фондапаринукса (200 нМ) бетриксабан (200 нМ) был более сильным в подавлении обоих маркеров образования тромбина.

#### **Материалы и способы**

Многokратные дозы бетриксабана проверяли на трех животных моделях. На первой модели измеряли приращение сгустка на хлопковых нитях, помещенных в брюшную полую вену кролика, сравнивали ингибирование массы тромба бетриксабаном с ингибированием супратерапевтическими дозами эноксапарина (гепарин LMW).

На второй модели сравнивали способность бетриксабана поддерживать раскрытое состояние сосуда в условиях артериального потока при вызванном FeCl<sub>3</sub> тромбозе в сонной артерии крысы с эффектом, достигаемым эноксапарином или клопидогрелем (антитромбоцитарный агент).

На третьей модели исследовали ингибирование оседания меченных <sup>111</sup>In тромбоцитов на дакроновых имплантатах и камерах расширения, размещенных в бедренных артериовенозных шунтах у бабуинов. На всех испытываемых моделях бетриксабан и эноксапарин вводили как вливания IV и клопидогрел давали перорально в течение трех дней. *Ex vivo* РТ и аРТТ измеряли на всех моделях. Модели достигали обязательного критерия артериального и венозного тромбоза, и бетриксабан проявлял чувствительную к дозе антитромботическую активность в каждой из трех моделей. Эффективность бетриксабана выгодно отличалась при сравнении с супратерапевтическими уровнями эноксапарина и клопидогрела.

Эффективность на модели венозного тромбоза у кролика определяли путем измерения приращения тромба на хлопковых нитях, помещенных в полую вену посредством катетера, вставленного в левую бедренную вену, как описано Hollenbach et al., *Thromb. Haemost.*, 1994; 71: 357-362), источник включен в настоящее описание в полном объеме. Уменьшение массы тромба после двухчасового вливания соединения выражено по отношению к контролю с носителем. См. также Sinha, et al. *Eur. J. Pharmacology* 395: 51-59 (2000), источник включен в настоящее описание в полном объеме.

Крысиная FeCl<sub>3</sub> модель с использованием левой сонной артерии адаптирована от Kurz, K.D. et al. *Thromb. Res.* 1990; 60(4): 269-280, источник включен в настоящее



описание в полном объеме. Стеноз артерии создавали шелковой лигатурой, уменьшающей кровотоков на 50% с легким раздавливающим повреждением с последующим применением 50% FeCl<sub>3</sub> для продления эксперимента. Кровоток отслеживали датчиком пульсации потока Допплера и регистрировали в течение 90 минут после применения FeCl<sub>3</sub>. Эноксапарин и бетриксабан вводили IV. Клопидогрел вводили перорально Q.D. в течение 3 дней.

Бабуиновую модель осуществляли при Oregon Health & Science University, следуя процедурам, описанным Hanson, S.R. et al. J. Clin. Invest. 1993; 92: 2003-2012, публикация включена в настоящее описание в полном объеме. Коротко, тромбоз вызывают двумя различными тромбогенными устройствами, введенными внутрь эскорпореального шунта бедренной артерии-вены (A-V). Артериальная модель использует стрессовые условия с высоким усилием сдвига для промотирования образования тромба на дакроновом имплантате. Венозная модель использует стрессовые условия с низким усилием сдвига для промотирования образования тромба в камере расширения. Тромбоциты и фибрин предварительно метят <sup>111</sup>In и <sup>125</sup>I фибриногеном, чтобы измерить оседание тромбоцитов и аккумуляцию фибрина соответственно.

### Результаты

Неожиданно, в отличие от моделей грызунов, эффективность у приматов была достигнута при более низких дозах с минимальным пролонгированием РТ. Видовая специфичность также была продемонстрирована продлениями *in vitro* РТ и аРТТ в плазме крысы, кролика, бабуина и человека. 2x изменение РТ было достигнуто при концентрациях 8,9, 1,6, 1 и 0,4 мкМ соответственно. Данные показывают, что дозы бетриксабана, которые ингибируют образование тромбина в крови человека и которые обеспечивают антикоагуляцию подобно тому, как это происходит у бабуина, получавшего 0,05-0,49 мг/кг, могут быть достаточны для предотвращения тромбоза у людей. Сравнительное моделирование степеней изменения РТ до уровней антитромботической эффективности также ведет к прогнозированию, что терапевтическая для человека активность бетриксабана может быть достигнута без сопутствующих изменений параметров свертывания *in vivo*. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5				
Модель тромбоза	Агент, доза	Антитромботическая активность	Кратное изменение аРТТ	Кратное изменение РТ
полной вены кролика	бетриксабан, 3 мг/кг	76% ингибирование	2,22	2,34
	эноксапарин, 2,2 мг/кг	96% ингибирование	2,06	1,01
сонной артерии крысы	бетриксабан, 19,1 мг/кг	90% раскрытое состояние	1,69	2,20
	эноксапарин, 7,6 мг/кг	70% раскрытое состояние	3,49	1,19
	клопидогрел, 3 мг/кг в сутки	80% раскрытое состояние	1,03	1,01
артериовенозная бабуина	бетриксабан, 0,49 мг/кг	90% ингибирование (венозное) 32% ингибирование (артериальное)	1,29	1,17

### Пример 9

#### Сравнение бетриксабана с эноксапарином в рандомизированном исследовании предотвращения случаев венозной тромбоэмболии после полной замены колена

Это исследование охватывало 215 пациентов, подвергшихся полной замене колена (ТКР), они методом случайного выбора были распределены в соотношении 2:2:1 или для получения дозы бетриксабана 15 мг или 40 мг перорально дважды в день,

или 30 мг эноксапарина (Епох), вводимого подкожно дважды в день, в течение 10-14 дней. Исследование было слепым в отношении дозы 15 против 40 мг, но не для бетриксабана против Епох. Конечной точкой основной эффективности было снижение венозной тромбоемболии ("VTE") (симптоматический или асимптоматический тромбоз глубоких вен на обязательной односторонней флебограмме или симптоматическая легочная эмболия) с 10 по 14 день. Конечные точки безопасности включали снижение главного и клинически значительного неглавного кровотечения в течение дня после флебографии. По всем конечным точкам эффективности и кровотечения решение принималось слепым методом независимым центральным арбитражным комитетом.

### **Материалы и способы**

Бетриксабан в этом исследовании вводили в желатиновых капсулах. Капсулы содержали малеат бетриксабана, моногидрат декстрозы и стеарат магния.

Начальную дозу бетриксабана принимали через 6-8 часов после хирургической операции и дважды в день (BID) после этого. Эноксапарин вводили подкожно через 12-24 часа после хирургической операции и каждые 12 часов (q 12 ч) после этого. Лечение продолжали в течение 10-14 дней, если не наблюдалось предписываемого протоколом критерия прекращения. После выписки из госпиталя пациенты сами принимали исследуемое лекарство. Последнюю дозу исследуемого лекарства вводили утром дня назначенной обязательной флебографии оперированной ноги (день с 10 по 14).

Образцы крови для определения концентраций лекарственного средства в плазме и фармакодинамические измерения получали при скрининге через 1-4 часа после введения утренней дозы исследуемого лекарства на день 2, на день выписывания и перед обязательной флебограммой на день с 10 по 14. Образцы плазмы анализировали на бетриксабан, применяя жидкостную хроматографию высокого разрешения в тандеме с масс-спектрометрией. Способ был утвержден для диапазона 0,100-50,0 нг/мл на основе анализа 0,2 мл плазмы. Количественную оценку проводили с использованием градуированной стандартной кривой, полученной из взвешенного регрессионного анализа методом наименьших квадратов.

Антикоагуляцию измеряли путем анализа ингибирования образования тромбина, как обсуждалось в примере 4, и по анти-Ха активности в дополнение к активированному парциальному тромбопластиновому времени (aPTT), протромбиновому времени (PT) и международному нормализованному отношению (NR). Унифицированный анализ анти-Ха был адаптирован из гепаринового набора Coatest LMW (Diapharma) и модифицирован для формата 96-луночного планшета. В этом анализе стандарты и образцы от пациентов анализировали в двух экземплярах, и предел количественного определения был 0,05 анти-Ха единиц/мл. Образование тромбина инициировали добавлением тканевого фактора (Innovin, Dade Behring) и кальция к предохраненной цитратом от свертывания плазме пациента (0,1 мл). Образование тромбина измеряли по расщеплению специфического тромбинового субстрата (Z-GGR-AMC, Bachem) в течение 10-минутного периода. Относительные единицы флуоресценции измеряли с помощью флуоресцентного ридера Flex Station (Molecular Devices) и использовали для количественной оценки образования тромбина. Все образцы плазмы пациентов анализировали в трех экземплярах и ингибирование образования тромбина давали как изменение от базовой линии относительной флуоресцентной единицы для каждого индивидуума.

### **Результаты**

Наблюдалось зависимое от дозы и от концентрации воздействие бетриксабана на

ингибирование образования тромбина и анти-Ха уровни. 175 пациентов (81,4%) имели оценку по эффективности и безопасности, как показано в таблице 6.

Таблица 6			
Результаты по основной эффективности и безопасности	Бетриксабан 15 мг BID	Бетриксабан 40 мг BID	Еноксапарин 30 мг BID
VTE (95% CI)	20 (12-32)	15 (8-27)	10 (3-23)
Главные кровотечения % (95% CI)	0 (0-4)	0 (0-4)	2 (0-12)
Клинически значит. неглавные кровотечения	0 (0-4)	2 (0-8)	5 (1-16)

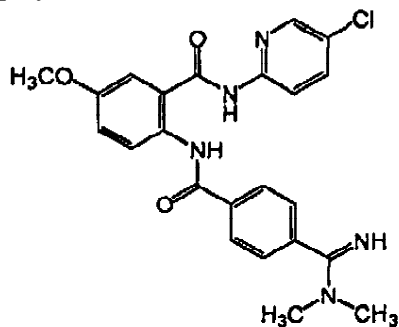
Фиг.6 показывает степени VTE и 95% достоверные интервалы для бетриксабана и для эноксапарина, которые определены в этом исследовании односторонней флебографией между днями 8 и 10, и для эноксапариновых гистологических контролей из исследований с использованием двусторонней флебографии, проведенной между днями 10 и 14 после ТКР. Фиг. 9 отражает концентрации бетриксабана в плазме после второй дозы (день 2), при выписывании и во время флебографии. Как предполагал данный продолжительный полупериод существования бетриксабана, средние концентрации лекарства увеличивались после первых нескольких доз и, по-видимому, достигали устойчивого состояния не позже выписывания (средний день 4) для обеих групп доз бетриксабана. Бетриксабан обнаруживал зависимое от дозы и зависимое от концентрации воздействие на ингибирование образования тромбина и анти-Ха уровни (фиг. 7 и 8). Воздействие бетриксабана 15 мг на ингибирование образования тромбина было подобным тому, которое наблюдалось с эноксапаринном, тогда как выявленный эффект от бетриксабана 40 мг был более выраженным. И наоборот, видимое влияние на анти-Ха активность было подобно воздействию бетриксабана 40 мг и эноксапарина и было меньше с бетриксабаном 15 мг. Лечение бетриксабаном существенно не влияло на другие параметры коагуляции (т.е. aPTT, PT и INR).

Бетриксабан был эффективным для предотвращения VTE после ТКР и был безопасным и хорошо переносимым.

Должно быть понятно, что хотя изобретение описано в связи с указанными выше вариантами осуществления, предшествующее описание и примеры предназначены для пояснения и не ограничивают объем изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации в сфере действия изобретения будут очевидны для специалистов в области техники, к которой относится изобретение.

### Формула изобретения

1. Способ ингибирования коагуляции у пациента-человека, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту ингибирующего коагуляцию количества соединения формулы II:



II

или его фармацевтически приемлемой соли, где ингибирующее коагуляцию количество соединения представляет собой совокупную суточную дозу от около 0,01 до около 2,0 мг/кг.

2. Способ по п.1, где совокупная суточная доза составляет от около 0,1 до около 2,0 мг/кг.

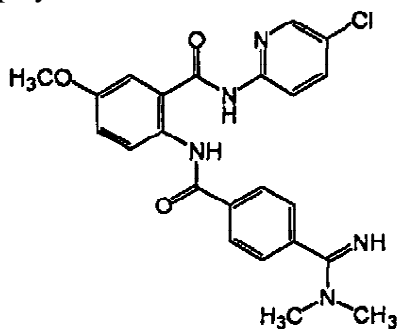
3. Способ по п.1, где совокупная суточная доза составляет от около 0,1 до около 1,5 мг/кг.

4. Способ по п.1, где совокупная суточная доза составляет от около 0,4 до около 1,2 мг/кг.

5. Способ по п.1, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой малеат.

6. Способ по любому из пп.1-5, где соединение вводят один раз в день.

7. Стандартная лекарственная препаративная форма, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и ингибирующее коагуляцию количество соединения формулы II:



## II

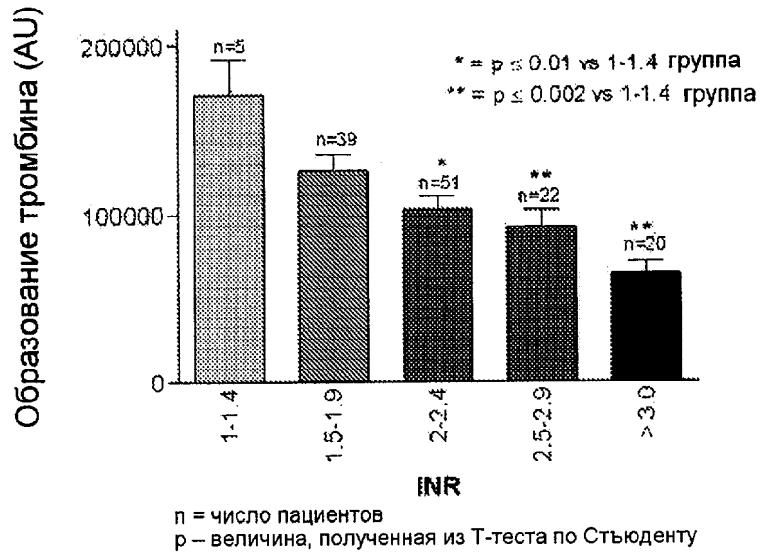
или его фармацевтически приемлемой соли, где ингибирующее коагуляцию количество соединения представляет собой совокупную суточную дозу, составляющей от около 0,01 до около 2,0 мг/кг.

8. Стандартная лекарственная препаративная форма по п.7, где совокупная суточная доза составляет от около 0,1 до около 2,0 мг/кг.

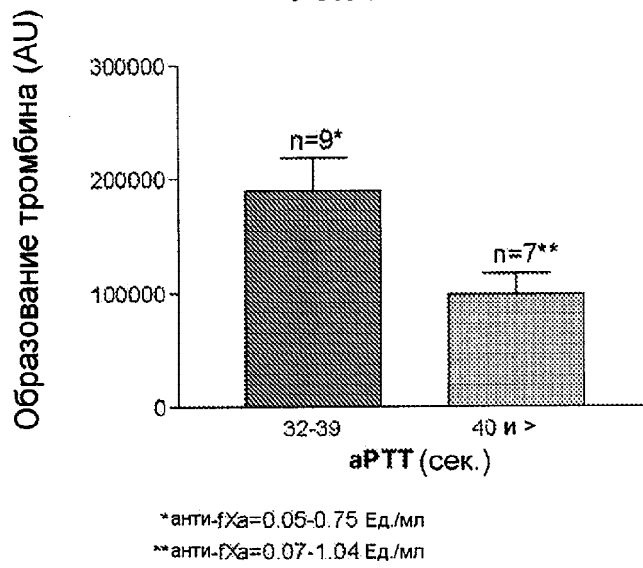
9. Стандартная лекарственная препаративная форма по п.7, где совокупная суточная доза составляет от около 0,1 до около 1,5 мг/кг.

10. Стандартная лекарственная препаративная форма по п.7, где совокупная суточная доза составляет от около 0,4 до около 1,2 мг/кг.

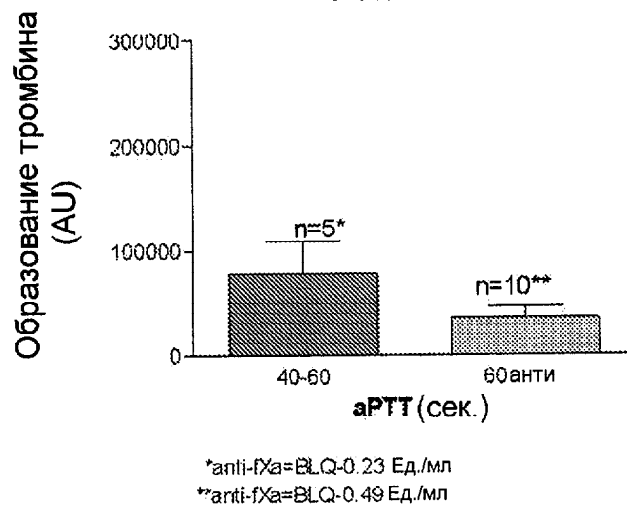
11. Стандартная лекарственная препаративная форма по любому из пп.7-10, где фармацевтически приемлемой солью соединения является малеат.



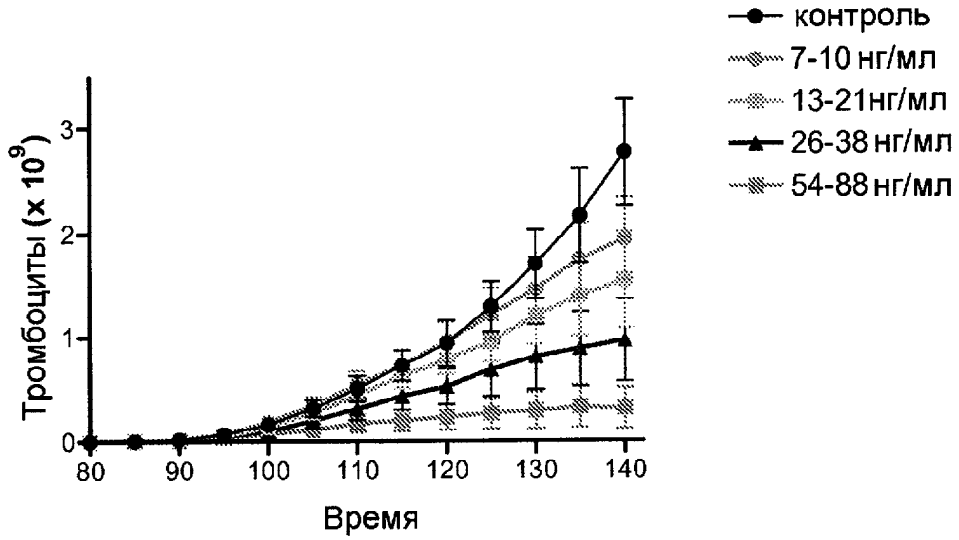
Фиг. 1А



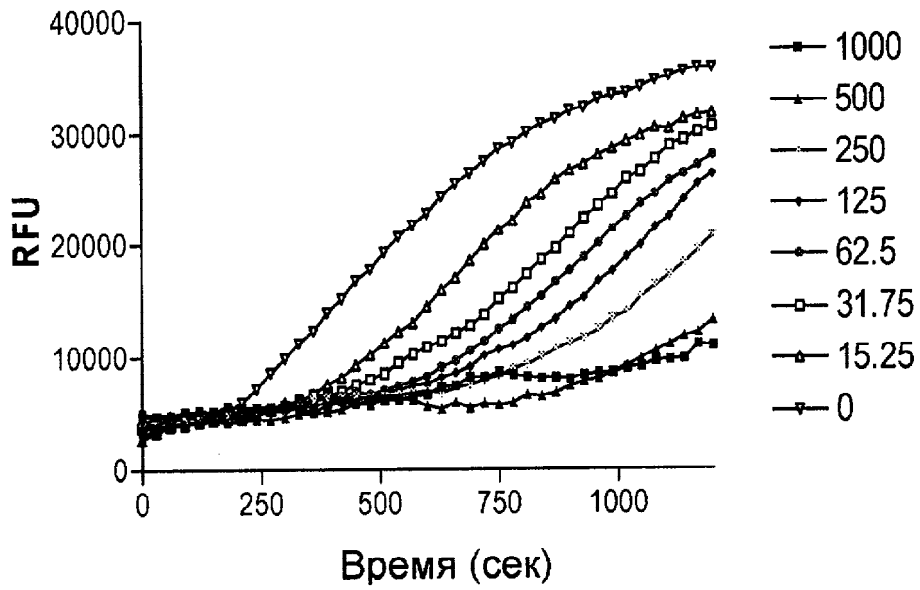
Фиг. 1В



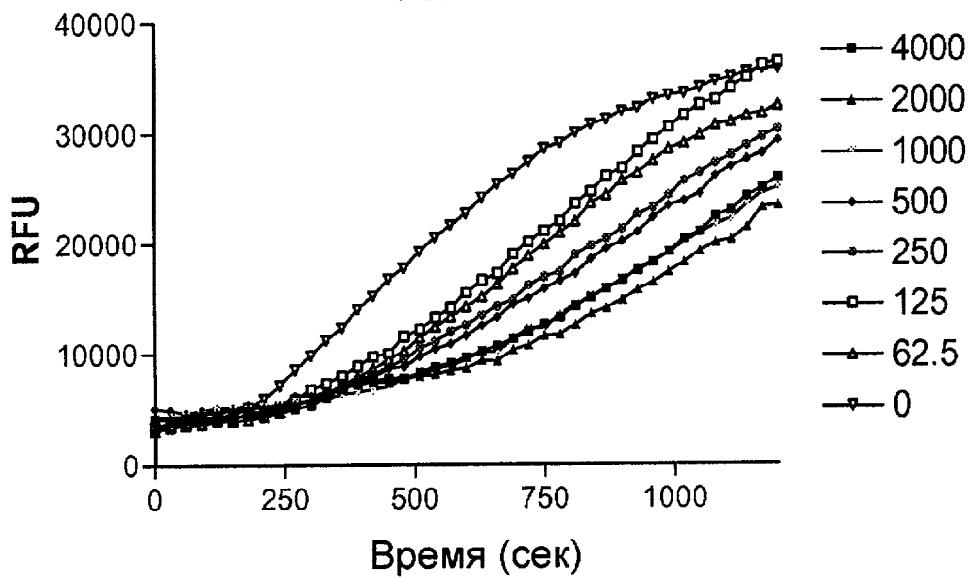
Фиг. 1С



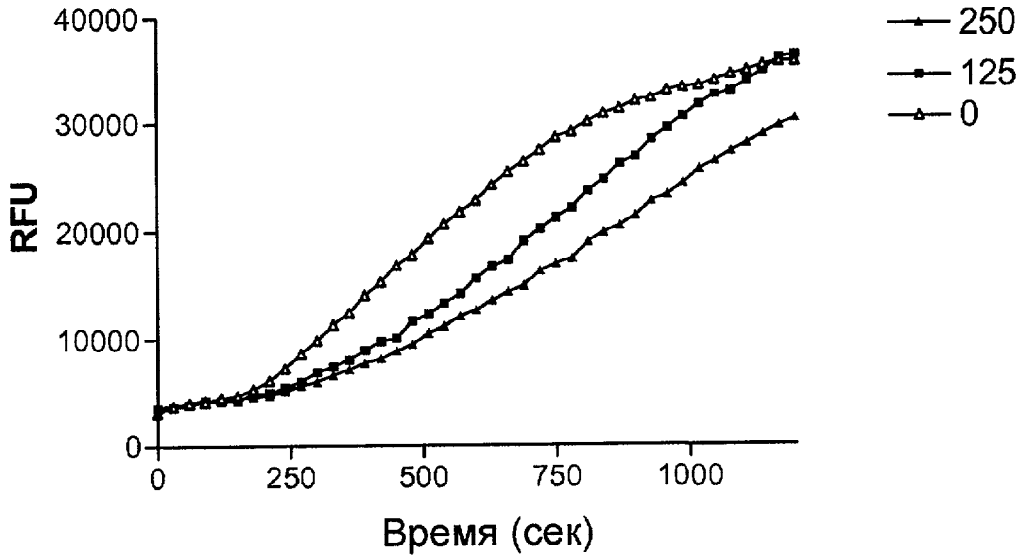
Фиг. 2



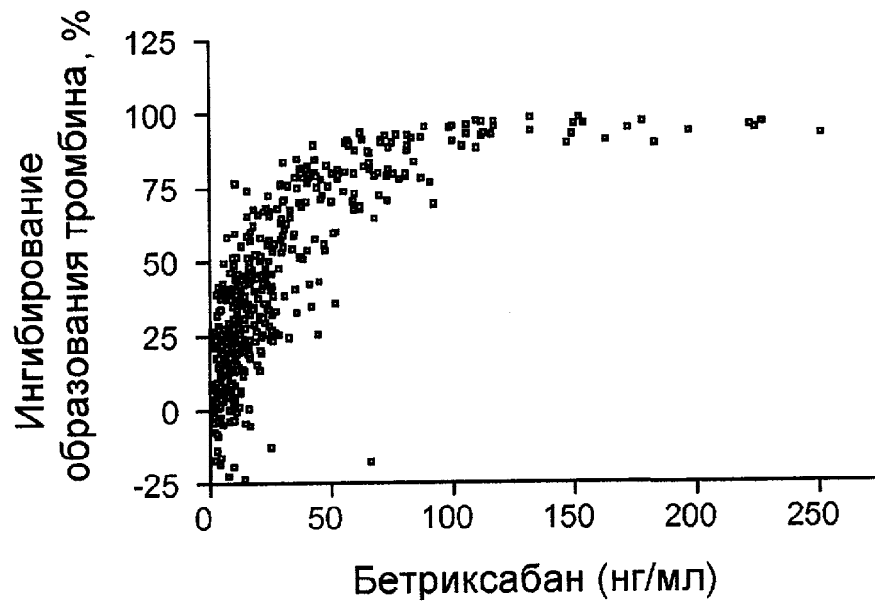
Фиг. 3



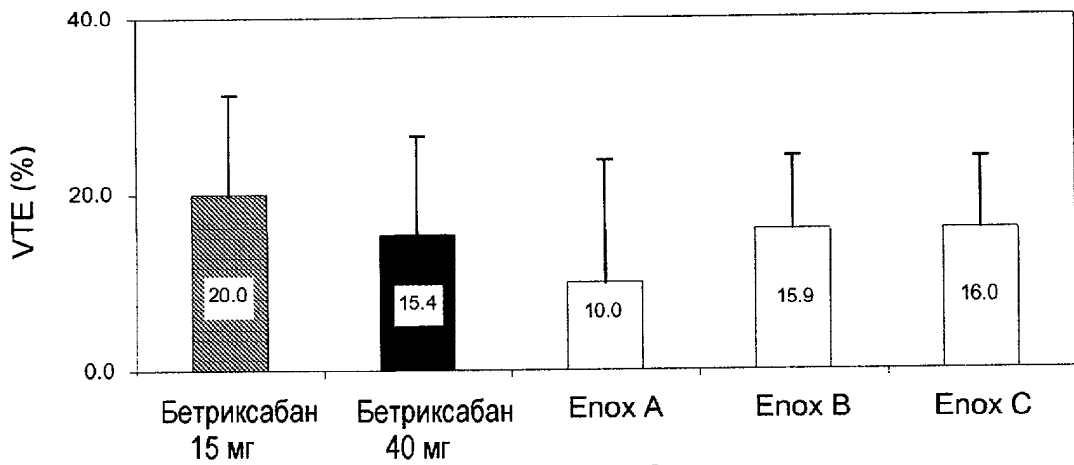
Фиг. 4А



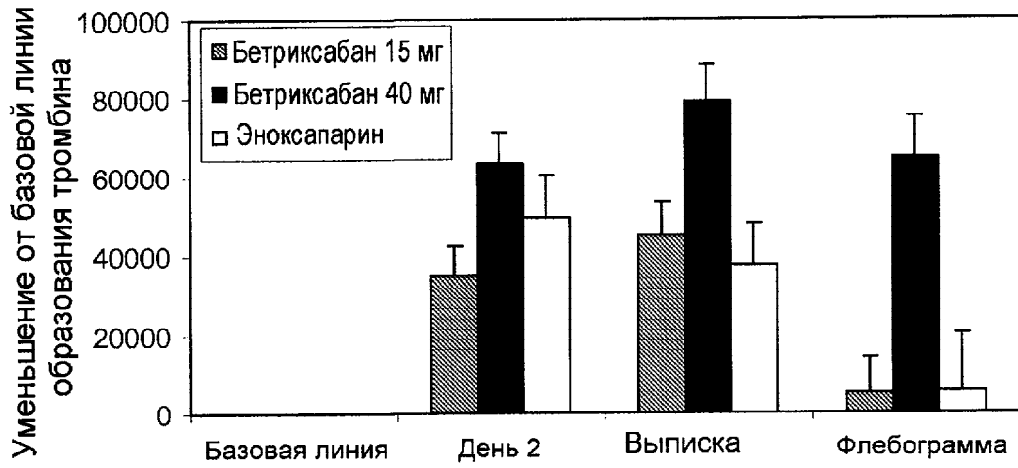
Фиг. 4В



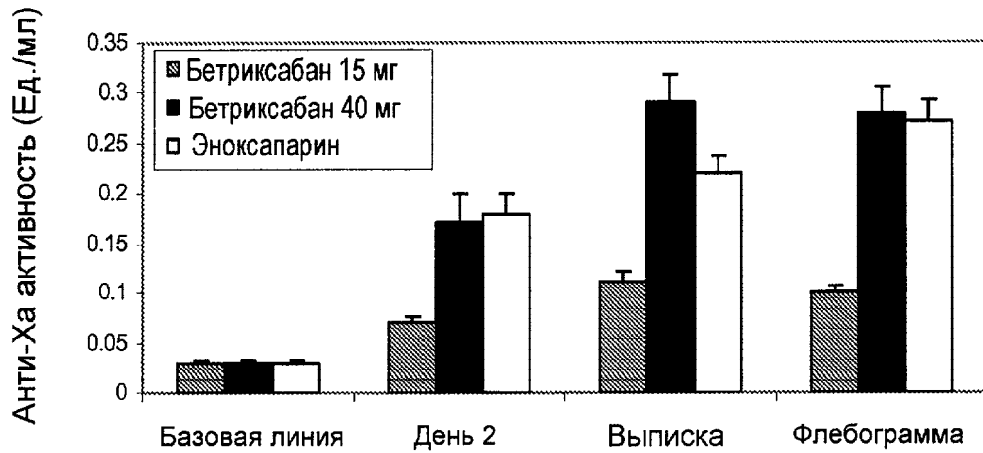
Фиг. 5



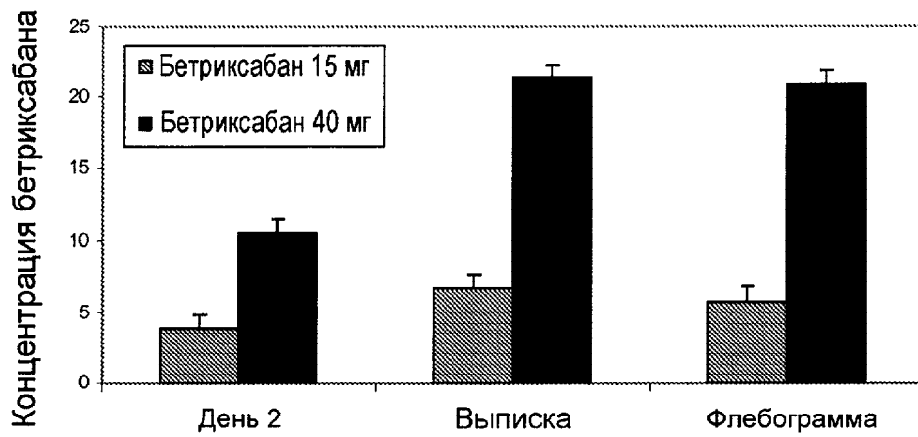
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9