



02 EVENTO: 01 ACTUACIÓN 411
SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

AKZO NOBEL N.V. ✓
Organizada bajo las leyes de Holanda.

No de identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Holanda ✓

Departamento o Estado

Dirección

Velperweg 76 ✓

Ciudad

6824 BM Arnhem

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO ✓

Dirección y Domicilio

Carrera 4 No 72-35 Piso 4° ✓

Ciudad

Bogotá, Colombia

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

1- Constant Adriaan Anton van BOECKEL
2- Cornelia Maria TROMP ✓

3- Tamara Theodora Maria GEERTSEN ✓

Identificación

1- Mercuriusstraat 32, 5345 LX Oss, Holanda

Dirección

2- Den Ong 3, 5371 DH Ravenstein, Holanda

3- Van der Hoevenastraat 70 6931, DD Westervoort, Holanda ✓

Ciudad

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

NUEVOS COMPUESTOS ANTITROMBÓTICOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE LOS CONTIENEN ✓

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI

☒

NO

☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA

☐

UNIONISTA

☒

(33) País

EP

Convención de París

Fecha

07 de Diciembre de 1999

No Solicitud

99204172 3

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses

a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo 11214- 801-022-9

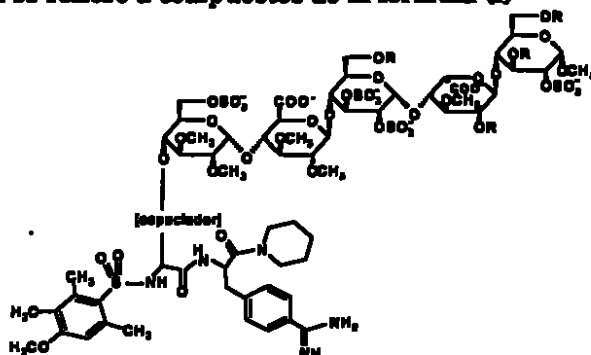
ASN/mmm-Id-113

(51) CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 31/7042; 31/155; 31/156; 1-6 DIC. 2000

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a compuestos de la fórmula (I)



Donde R es independientemente SO_3^- ó CH_3 ;
el espaciador es un espaciador flexible de una longitud de 13-25 átomos;
la carga del residuo de pentasacárido es compensada por contraiones cargados positivamente;
y el número total de grupos sulfato en el residuo de pentasacárido es 4, 5 ó 6;
o sales farmacéuticamente aceptables, profármacos o solvatos de los mismos.

Los compuestos de la invención tienen actividad antitrombótica y pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con la trombina.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☒
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☒
Recibo de la tasa respectiva <i>PN 0/100 608.000.</i>	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copla de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copla certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☒
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCIÓN Y DECLARO QUE LA INVENCIÓN ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE EMILIO FERRERO

CC. 438.019 de Usaquén

T.P.No. 31.929

MEMORIA DESCRIPTIVA

La invención se refiere a un nuevo compuesto antitrombótico, a una composición farmacéutica que contiene el compuesto como un ingrediente activo, y también al uso de dicho compuesto para la fabricación de medicamentos.

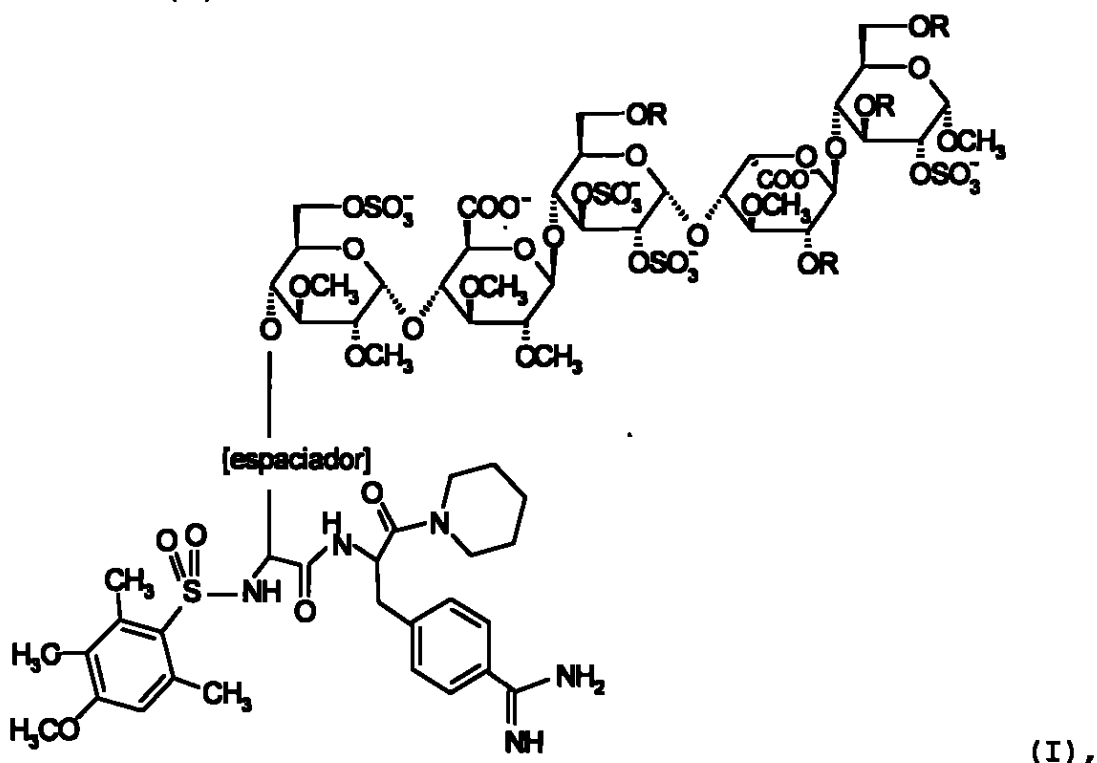
Las serina proteasas son enzimas que juegan un papel importante en la cascada de coagulación de la sangre. Una serina proteasa importante es el factor Xa, que cataliza la conversión de protrombina en trombina. La trombina es la enzima serina proteasa final en la cascada de coagulación. La función principal de la trombina es la descomposición del fibrinógeno para generar monómeros de fibrina, que son entrecruzados para formar un gel insoluble. Además, la trombina regula su propia producción por activación de los factores V y VIII previamente en la cascada. También tiene acciones importantes a nivel celular, donde actúa sobre receptores específicos para provocar la conglutinación de las plaquetas, la activación de las células del endotelio y la proliferación de fibroblastos. Por lo tanto, la trombina tiene un papel central regulador en la hemostasis y la formación de trombos.

En el desarrollo de los inhibidores sintéticos de las serina proteasas, recientemente se ha informado de un conjugado sintético de NAPAP-pentasacárido como un antitrombótico que tiene un perfil doble, de actividad antitrombina directa y actividad anti-Xa mediada por ATIII (ATIII: antitrombina III) (Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999, 9(14), 2013-8). A pesar de que el antitrombótico informado puede ser un compuesto interesante, la reactividad cruzada con HIT y la neutralización por PF4

estarán asociadas con este compuesto debido al alto contenido de sulfato del residuo de pentasacárido (Thromb. Haem. Suppl. 1997, p363 PD1485).

Se ha encontrado ahora que los compuestos de fórmula (I) son antitrombóticos que tienen un perfil doble excelente y ventajoso. Los compuestos de fórmula (I) tienen una vida media farmacológica interesante, permitiendo el tratamiento una vez al día, y son escasamente neutralizados por PF4. Además, los riesgos de sangramiento son bajos. En general, los compuestos de fórmula (I) tienen una combinación atractiva de propiedades farmacológicas.

Fórmula (I):



donde R es independientemente SO₃⁻ ó CH₃;

el espaciador es un espaciador flexible de una longitud de 13-25 átomos, de preferencia 16-22, siendo lo más preferido 19 átomos; la carga del residuo de pentasacárido es compensada por contraiones cargados positivamente;

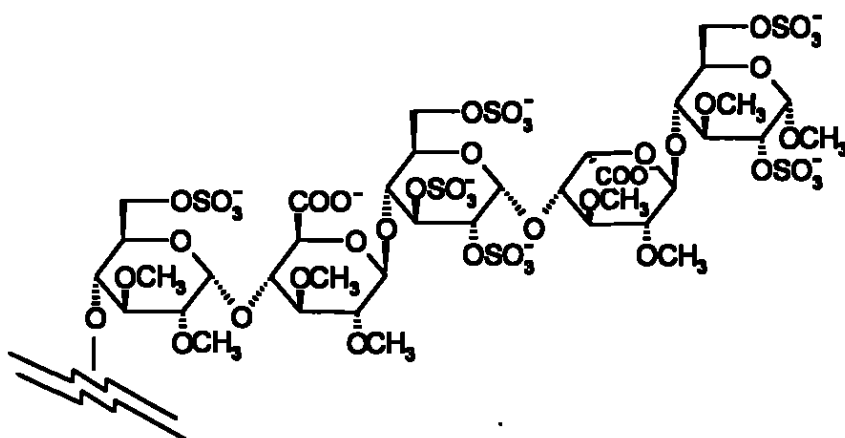
y el número total de grupos sulfato en el residuo de pentasacárido es 4, 5 ó 6;

o una sal farmacéuticamente aceptable, un profármaco o un solvato del mismo.

Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar y prevenir las enfermedades mediadas por trombina y asociadas con trombina. Esto incluye un número de estados trombóticos y protrombóticos en los cuales se activa la cascada de coagulación, que incluyen, pero no están limitados a, trombosis de vena profunda, embolia pulmonar, tromboflebitis, oclusión arterial por trombosis o embolia, reoclusión arterial durante o después de angioplastia o trombolisis, re-estenosis después de un daño arterial o de procedimientos cardiológicos invasivos, trombosis o embolia venosa postoperatoria, aterosclerosis aguda o crónica, ataque apoplético, infarto al miocardio, cáncer y metástasis, y enfermedades neurodegenerativas. Los compuestos de la invención también pueden usarse como anticoagulantes en circuitos sanguíneos extracorporales, como sea necesario en diálisis y cirugía. Los compuestos de la invención también pueden usarse como anticoagulantes *in vitro*.

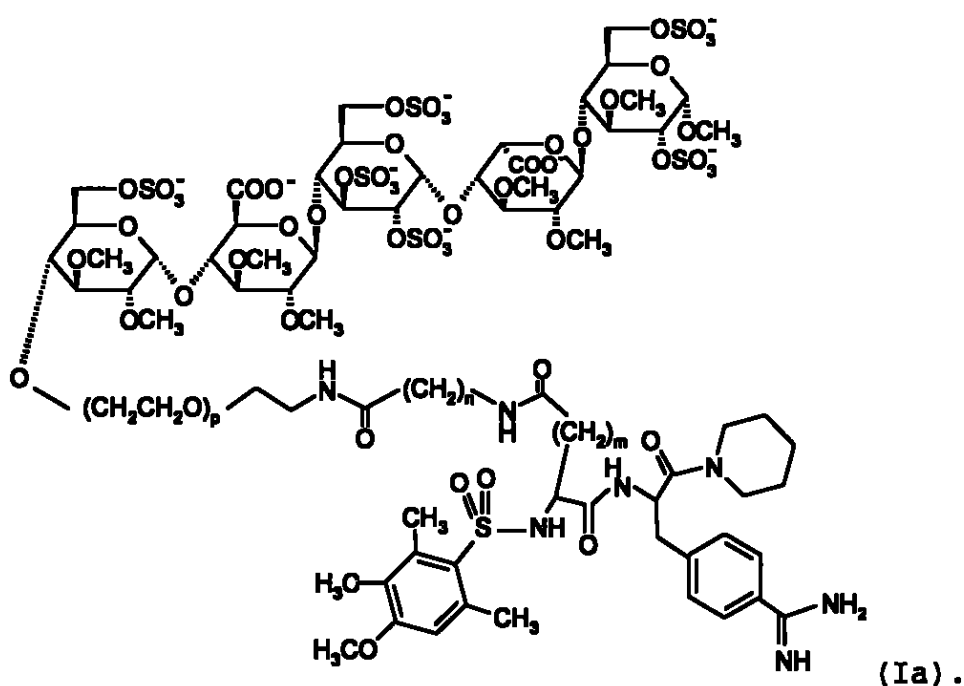
Los compuestos de fórmula (I) son específicamente útiles como antitrombóticos para indicaciones arteriales.

Los compuestos preferidos de acuerdo con la invención son compuestos donde el residuo de pentasacárido tiene la estructura



La naturaleza química del espaciador es de menor importancia para la actividad antitrombótica de los compuestos de la invención. Sin embargo, el espaciador de los compuestos de la invención es flexible, lo que significa que el espaciador no contiene elementos rígidos, tales como enlaces insaturados o estructuras cíclicas. Los espaciadores adecuados pueden ser diseñados fácilmente por un experto en el arte. Los espaciadores preferidos contienen al menos un elemento $-(CH_2CH_2O)-$. Los espaciadores más preferidos contienen tres elementos $-(CH_2-CH_2-O)-$. El espaciador más preferido es $^*-(CH_2CH_2O)_3-(CH_2)_2-NH-C(O)-(CH_2)_3-NH-C(O)-CH_2-$, estando el extremo indicado con * unido al residuo de pentasacárido.

Los compuestos preferidos de fórmula I son los compuestos de fórmula (Ia), donde p es 1-5, n es 1-5, m es 1 ó 2. El compuesto más preferido es el compuesto de fórmula (Ia), donde p es 3, n es 3, m es 1.



Un contraión cargado positivamente significa H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , y similares. De preferencia, los compuestos de fórmula (I) están en la forma de su sal sódica.

El término "profármaco" significa un compuesto de la invención en que el grupo amino de la porción amidino está protegido, por ejemplo por hidroxí o un grupo (1-6C)alcoxi-carbonilo.

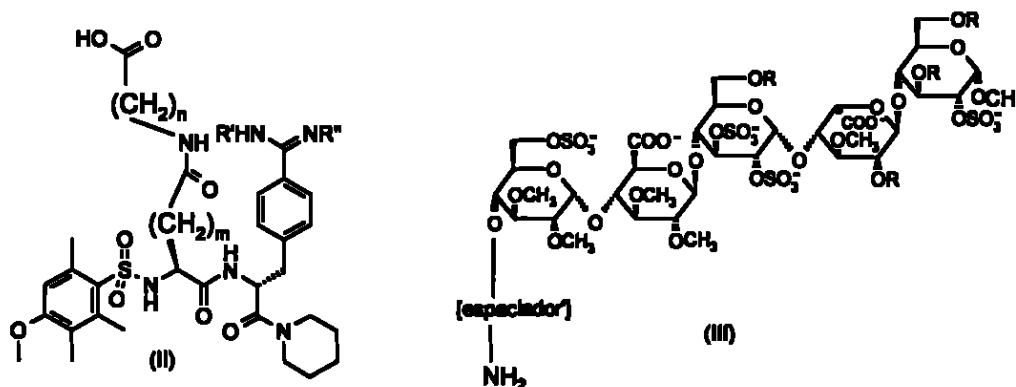
Los solvatos de acuerdo con la invención incluyen los hidratos.

Los compuestos de la invención, que pueden existir en la forma de una base libre, pueden ser aislados de la mezcla de reacción en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden obtenerse tratando la base libre de fórmula (I) con un ácido orgánico o inorgánico tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, yoduro de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido maleico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido

succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido ascórbico y similares.

Los compuestos de esta invención poseen átomos de carbono quirales y, por lo tanto, pueden ser obtenidos como un enantiómero puro, o como una mezcla de enantiómeros, o como una mezcla que contiene diastereómeros. Los métodos para obtener los enantiómeros puros son bien conocidos en el arte, por ejemplo cristalización de sales que se obtienen de ácidos ópticamente activos y la mezcla racémica, o cromatografía usando columnas quirales. Para los diastereómeros, pueden usarse columnas de fase directa o de fase inversa.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse primero activando el grupo carboxilato del análogo de NAPAP de fórmula II, y posteriormente agregando un residuo pentasacárido-espaciador que contiene un grupo amina (fórmula III), opcionalmente seguido por la desprotección de la porción amidina.



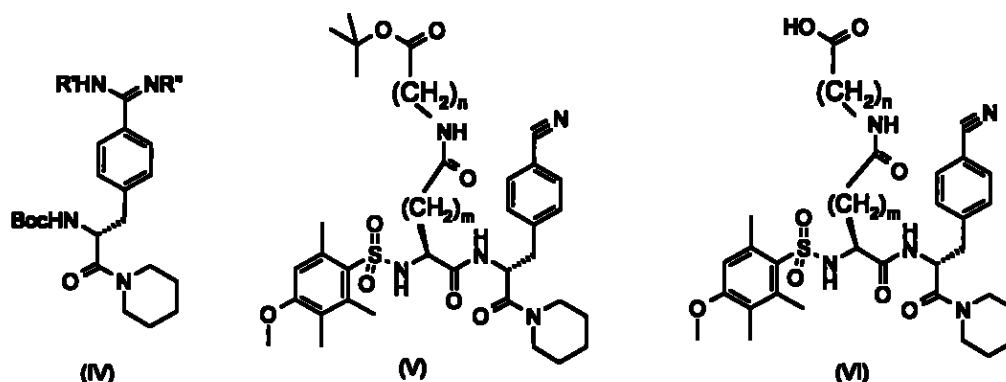
El grupo carboxilato en los compuestos de fórmula II puede ser activado como un anhídrido mixto o, de mayor preferencia, como un éster activado tal como el éster de N-hidroxisuccinimida, pentafluorofenol o N-hidroxibenzotriazol.

En la etapa de acoplamiento, el grupo benzamidina en la fórmula II puede estar desprotegido ($R' = R'' = H$), u opcionalmente puede ser protegido usando un grupo carbamato, de preferencia aliloxicarbonilo (R' y/o R'' es $H_2C=CH-CH-C(O)O$) o benciloxicarbonilo (R' y/o R'' es $PhCH_2-C(O)O$). Los grupos protectores aliloxicarbonilo y benciloxicarbonilo pueden ser removidos bajo condiciones relativamente suaves. El grupo aliloxicarbonilo puede ser removido usando Pd en presencia de un nucleófilo débil tal como morfolina o un éster malónico. El grupo benciloxicarbonilo puede ser removido bajo condiciones tales como hidrógeno / Pd(C). Alternativamente, pueden usarse precursores sintéticos de benzamidina tales como N-alcoxibenzamidina o N-benciloxibenzamidina ($R' = H$, $R'' =$ alcoxi o benciloxi). Estos precursores sintéticos pueden ser transformados en benzamidina usando condiciones reductoras tales como hidrogenación (por ejemplo, Fujii, T. y colaboradores, Chem. Pharm. Bull, 39, 301, 1991, y Fujii, T. y colaboradores, Chem. Pharm. Bull, 42, 1231, 1994).

El precursor de benzamidina preferido es 1,2,4-oxadiazolin-5-ona ($-R'-R''-$ = $-C(O)O-$). Este precursor puede ser convertido en la benzamidina por hidrogenación (Bolton, R.E. y colaboradores, Tetrahedron Letters, Vol. 36, N° 25, 1995, pp 4471-4474).

Los compuestos de fórmula II pueden prepararse de diversas maneras utilizando métodos conocidos en el arte. Un método para preparar los compuestos de fórmula II donde $R' = R'' = H$; n es 3, m es 1, se describe en la patente europea EP 0513543. Los compuestos de fórmula II en los cuales la amidina está protegida, por ejemplo con un grupo aliloxicarbonilo o benciloxicarbonilo, pueden prepararse a partir de compuestos de fórmula IV donde la amidina está protegida con un grupo

aliloxicarbonilo o benciloxicarbonilo, utilizando métodos comúnmente conocidos en el arte para el acoplamiento de fragmentos de péptidos. Los carbamatos de fórmula IV pueden prepararse, por ejemplo, a partir de la amidina correspondiente (fórmula IV, $R' = R'' = H$), como está descrito en la literatura, por ejemplo Weller, T y colaboradores, J. Med. Chem. **39**, 3119, 1996).



Los compuestos N-alcoxibenzamidina y N-benciloxibenzamidina de fórmula II pueden prepararse a partir del compuesto V (descrito en la patente europea EP 0513543), por tratamiento de este ciano compuesto con O-alquil-hidroxilamina u O-bencil-hidroxilamina, seguido por la remoción del éster t-butilico usando condiciones ácidas. Alternativamente, los compuestos N-alcoxibenzamidina y N-benciloxibenzamidina de fórmula II pueden prepararse primero por remoción del éster t-butilico del compuesto V usando condiciones ácidas para dar el compuesto VI, y reacción subsiguiente de este ciano compuesto con O-alquil-hidroxilamina u O-bencil-hidroxilamina.

Los compuestos de fórmula II donde $-R'-R''-$ = $-C(O)O-$ (el grupo 1,2,4-oxadiazolin-5-ona) pueden prepararse a partir de compuestos de fórmula IV donde $-R'-R''-$ = $-C(O)O-$, utilizando métodos conocidos en el arte para el acoplamiento de fragmentos de péptidos.

La síntesis de los residuos amino-oligosacárido-espaciador de fórmula III puede efectuarse, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la patente europea EP 0649854. Los residuos de sacáridos de los compuestos de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos en el arte, por ejemplo de la patente WO 99/25720.

El acoplamiento de péptidos, una etapa de procedimiento en el método descrito más arriba para preparar los compuestos de la invención, puede efectuarse por métodos comúnmente conocidos en el arte para el acoplamiento - o condensación - de fragmentos de péptidos, tales como el método de azida, el método de anhídridos mixtos, el método de ésteres activados o, de preferencia, el método de carbodiimida, especialmente con la adición de compuestos catalíticos y supresores de la racemización, como N-hidroxisuccinimida y N-hidroxibenzotriazol. Un resumen se da en The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, E. Gross y J. Meienhofer, Eds. (Academic Press, New York, 1981) y Bodanszky, M., Principles of peptide synthesis, Springer-Verlag, 1984.

Las funciones amina presentes en los compuestos pueden ser protegidas durante el procedimiento de síntesis por un grupo protector de N, lo que significa un grupo usado comúnmente en la química de los péptidos para la protección de un grupo α -amino, tal como el grupo *ter*-butiloxicarbonilo (Boc), el grupo benciloxicarbonilo (Z), el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) o el grupo ftaloílo (Phth). La remoción de los grupos protectores puede efectuarse de diferentes maneras, dependiendo de la naturaleza de esos grupos protectores. Habitualmente, la desprotección se efectúa bajo condiciones ácidas y en presencia de eliminadores. Un resumen de los grupos protectores de amino y

los métodos para su remoción se da en The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, ya mencionado más arriba, y también se describe en Greene, T.W. y Wuts, P.G.M. en Protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons Inc. 1991.

Los compuestos de la invención pueden ser administrados entérica o parenteralmente. La dosis exacta y el régimen de estos compuestos y las composiciones de los mismos, serán necesariamente dependientes de las necesidades del sujeto individual al cual el medicamento está siendo administrado, el grado de aflicción o necesidad, y el juicio del profesional médico. En general, la administración parenteral requiere dosificaciones más bajas que otros métodos de administración que son más dependientes de la absorción. Sin embargo, las dosificaciones diarias para los seres humanos de preferencia son de 0,001-100 mg por kg de peso corporal, de mayor preferencia de 0,01-10 mg por kg de peso corporal.

El medicamento fabricado con los compuestos de esta invención también puede ser usado como un adyuvante en terapia anticoagulante aguda. En este caso, el medicamento es administrado con otros compuestos útiles para tratar estos estados de enfermedad.

Mezclados con auxiliares farmacéuticamente adecuados, por ejemplo como se describe en la referencia estándar Gennaro y colaboradores, Remington's Pharmaceutical Sciences, (18a. Ed., Mack Publishing Company, 1990, ver especialmente Parte 8: Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture), los compuestos pueden ser comprimidos a unidades de dosificación sólidas, tales como píldoras o tabletas, o ser procesados a cápsulas o supositorios. Por medio de líquidos farmacéuticamente adecuados, los compuestos también pueden ser aplicados en la forma de una solución, suspensión, emulsión, por ejemplo para el

uso como un preparado para inyección, o como un aerosol, por ejemplo para el uso como un aerosol nasal.

Para fabricar unidades de dosificación, por ejemplo tabletas, se contempla el uso de aditivos convencionales, tales como rellenos, colorantes, aglutinantes poliméricos y similares. En general, puede usarse cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable que no interfiera con la función de los compuestos activos.

Los vehículos adecuados con los cuales las composiciones pueden ser administradas incluyen lactosa, almidón, derivados de celulosa y similares, o mezclas de los mismos, usados en cantidades adecuadas.

La invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Abreviaturas usadas:

Ac = acetilo

Bn = bencilo

DBU = 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DCC = diciclohexilcarbodiimida

DMF = N,N-dimetilformamida

Su = succinimidilo

Me = metilo

TBTU = tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

TEA = trietilamina

TFA = ácido trifluoroacético

Z = benciloxycarbonilo

Los números de los compuestos se refieren a los compuestos en los Esquemas 1 a 7.

Compuesto 3

A una solución agitada de compuesto 1 (53,6 g, 143,6 mmoles) (R. Roy; W.K.C. Park; Q. Wu; S-N. Wang, Tetrahedron Lett., 1995, 36(25), 4377-80) y compuesto 2 (27,9 g, 89,3 mmoles) (S.J. Danishefsky; M.P. DeNinno; G.B. Philips; R.E. Zelle, Tetrahedron, EN, 1986, 42, 11, 2809-2819) en 930 mL de DMF, se agregó hidruro de sodio (7,7 g, dispersión al 60%, 192,2 mmoles) a 50°C. Después de 1 hora, la mezcla de reacción fue calentada a 120°C. Después de agitar por 5 minutos, la mezcla de reacción fue enfriada a 40°C, diluida con agua y extraída tres veces con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con agua y concentradas al vacío, dando el producto crudo 3 (54 g). TLC: Rf = 0,23, éter al 100%.

Compuesto 4

A una solución agitada de compuesto 3 (89,3 mmoles) en 800 mL de tolueno seco y 800 mL anhídrido acético, se agregó gota a gota una solución enfriada de 361,5 mL de ácido sulfúrico en anhídrido acético (16,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 345,0 mL de anhídrido acético) a -30°C. Después de 2 horas, la mezcla de reacción fue extinguida con 240 mL de TEA y agitada a temperatura ambiente. A la solución se agregó bicarbonato de sodio acuoso (al 5%) y la capa acuosa fue extraída tres veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas dos veces con agua y concentradas al vacío. Este

procedimiento fue repetido, resultando el compuesto 4 crudo (53 g). TLC: $R_f = 0,29$, éter al 100%.

Compuesto 5

A una solución agitada de compuesto 4 (89,3 mmoles) y etanotiol (11,1 mL, 150,3 mmoles) en 370 mL de tolueno seco, se agregó gota a gota una solución de BF_3 -eterato en tolueno (23,9 mL de BF_3 -eterato y 190 mL de tolueno) a 0°C . Después de agitar por 16 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue extinguida con TEA y bicarbonato de sodio acuoso, y extraída tres veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con agua y concentradas al vacío. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna (tolueno/acetato de etilo = 1/1 a 0/1, v/v), dando el compuesto 5 (21,4 g). TLC: $R_f = 0,31$, tolueno/acetato de etilo = 4/6, v/v.

Compuesto 7

Una solución de donante 5 (15,0 g, 30,3 mmoles) y aceptante 6 (23,0 g, 30,3 mmoles) (patente WO 99/25720) en éter seco/diclorometano (232 mL, 3/1, v/v) fue agitada por 30 minutos bajo un flujo de nitrógeno, en presencia de tamices moleculares activados de 4Å (7,6 g). Enseguida, una solución de 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína (5,5 g, 19,1 mmoles) y ácido triflico (0,49 mL, 5,6 mmoles) en dioxano/diclorometano (69,8 mL, 1/1, v/v), fue agregada gota a gota en 75 minutos a la mezcla de reacción a -20°C . Después de 30 minutos, se agregó TEA (5 mL) a la mezcla de reacción, que fue agitada durante 10 minutos y luego filtrada. El filtrado fue lavado con tiosulfato de sodio acuoso (al 10%) y bicarbonato de sodio acuoso (al 10%) y concentrado al vacío. El producto fue purificado por cromatografía en columna (0 a 5% de acetona en diclorometano),

15

dando el compuesto 7 (19,6 g). TLC: $R_f = 0,1$, éter/heptano = 8/2, v/v.

Compuesto 8

A una solución agitada de compuesto 7 (19,5 g, 16,4 mmoles) en tolueno seco/anhídrido acético (442 mL, 1/1, v/v), se agregó gota a gota una solución enfriada de 131,5 mL de ácido sulfúrico en anhídrido acético (11,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 120 mL de anhídrido acético) a -26°C . Después de 75 minutos, se agregó TEA (73,5 mL) a -20°C . El anhídrido acético fue descompuesto agregando gradualmente 330 mL de agua, manteniendo la temperatura entre 25°C y 30°C . Después de agitar por 16 horas, la mezcla fue vertida en 800 mL de agua y extraída dos veces con tolueno. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con agua y concentradas al vacío. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna (tolueno/acetato de etilo/etanol = 96/2/2, v/v/v) dando el producto 8 como una espuma blanca (13,2 g).

TLC: $R_f = 0,29$, tolueno/etanol = 9/1, v/v.

Compuesto 9

A una solución de compuesto 8 (13,2 g, 11,7 mmoles) en tolueno seco (66 mL) a 32°C , se agregó morfolina (4,1 mL, 46,9 mmoles). Después de agitar por 42 horas a 32°C , la mezcla de reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente y se agregó ácido clorhídrico acuoso (17,6 mL, 4N). La mezcla fue diluida con agua y extraída dos veces con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas dos veces con agua, secadas en sulfato de sodio y concentradas al vacío dando el compuesto 9 crudo (12,6 g).

TLC: $R_f = 0,32$, tolueno/acetona = 7/3, v/v.

Compuesto 12

A una solución de compuesto 9 (12,6 g, 11,6 mmoles) en diclorometano (114 mL), se agregó tricloroacetoniitrilo (3,5 mL, 34,9 mmoles) y DBU (52,2 μ L, 0,35 mmol). Después de agitar por 2 horas a temperatura ambiente, se agregaron tamices moleculares activados de 4Å (24 g) y aceptante 11 (8,9 g, 13,0 mmoles) (patente WO 99/25720) en diclorometano (45 mL) a la mezcla de reacción. Después de agitar por 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla fue enfriada a -20°C y se le agregó gota a gota una solución de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (405 μ L, 2,1 mmoles) en diclorometano (100 mL). Después de agitar por 30 minutos, se agregó bicarbonato de sodio a -20°C , y la mezcla de reacción fue filtrada. El filtrado fue vertido en bicarbonato de sodio acuoso y extraído tres veces con diclorometano. Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas dos veces con agua y concentradas al vacío. El producto fue purificado por cromatografía en columna (1: SiO_2 : 0-10% de acetona en éter; 2: SiO_2 tolueno/acetona = 85/15 a 80/20, v/v; 3: RP-18: agua/acetonitrilo = 2/8 a 0/10, v/v) dando el compuesto puro 12 (8,9 g). TLC: R_f = 0,37, tolueno/acetona = 7/3, v/v.

Compuesto 14

Una suspensión de compuesto 12 (8,9 g, 5,1 mmoles) y Pd/C al 10% (8,9 g) en 312 mL de DMF y 45 mL de agua, fue agitada bajo una corriente continua de hidrógeno. Después de 4,5 horas, el catalizador de Pd/C fue removido por filtración. El filtrado fue concentrado hasta un volumen de 400 mL y tratado con Pd/C al 10% (1,5 g) bajo una corriente de hidrógeno durante 5,5 horas. El catalizador fue removido por filtración. Al

filtrado (900 mL) se le agregó hidróxido de sodio acuoso (32 mL, 4N). Después de agitar por 4 horas a temperatura ambiente, la mezcla fue acidificada hasta pH=6,6 con ácido clorhídrico 1N y luego concentrada al vacío. El producto crudo fue desalado en una columna Sephadex G-25 que fue eluida con agua. Las fracciones apropiadas fueron acumuladas y liofilizadas dando el compuesto 14 (4,0 g).

Compuesto 15

Pentasacárido 14 (700 mg, 0,61 mmol) fue disuelto en agua (13,2 mL) y DMF (3,3 mL) y tratado con N-(benciloxicarboniloxi)-succinimida (224 mg, 0,90 mmol) y N-etilmorfolina (233 µL, 1,83 mmol). Después de agitar por 15 minutos, la mezcla de reacción fue aplicada directamente sobre una columna RP-18, que fue eluida con agua/acetonitrilo 10/0 a 7/3. Las fracciones apropiadas fueron acumuladas y concentradas hasta un pequeño volumen, y aplicadas sobre una columna de intercambio iónico Dowex 50 WX4-H⁺ en agua. El eluido fue concentrado al vacío para dar el compuesto 15 puro (482 mg).

Compuesto 16

A una solución de compuesto 15 (471 mg, 0,37 mmol) en DMF (4,7 mL), se agregó complejo de trióxido de azufre-piridina (1,1 g, 6,6 mmoles), y la mezcla fue agitada por 16 horas a 30°C. La mezcla fue enfriada hasta temperatura ambiente y agregada gota a gota a una solución al 10% enfriada de bicarbonato de sodio (16,7 mL, 19,9 mmoles) y agitada durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla fue concentrada hasta un pequeño volumen y aplicada sobre una columna Sephadex G-25, que fue eluida con agua. Las fracciones apropiadas fueron acumuladas y concentradas hasta un pequeño volumen, que posteriormente fue

pasado a través de una columna de Dowex Na⁺ HCRW2 eluida con agua. El eluido fue concentrado y redisuelto en 8,3 mL de ácido clorhídrico 0,2 N y se dejó reposar durante 16 horas a 4°C. La mezcla de reacción fue neutralizada con 8 mL de hidróxido de sodio 0,2 N y desalada en una columna Sephadex G-25 que fue eluida con agua. Las fracciones apropiadas fueron acumuladas y concentradas al vacío dando el compuesto 16 puro (840 mg).

Compuesto 17

Una suspensión de compuesto 16 (0,37 mmol) y Pd/C al 10% (820 mg) en *ter*-butanol (85 mL) y agua (79 mL) y unas pocas gotas de ácido acético, fue agitada bajo una corriente continua de hidrógeno. Después de 3 horas, el catalizador de Pd/C fue removido por filtración. y el filtrado fue concentrado y liofilizado, dando el compuesto 17 puro (675 mg).

éster bencílico del ácido 4-[[[4-[[[(1R)-1-[[4-(aminoiminometil)-fenil]metil]-2-oxo-2-(1-piperidinil)etil]amino]-3-[[[4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)sulfonil]amino]-1,4(S)-dioxobutil]amino]-butanoico. clorhidrato (18)

A una solución de ácido 4-[[[(1R)-1[[4-(aminoiminometil)fenil]metil]-2-oxo-2-(1-piperidinil)etil]-amino]-3-[[[4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)sulfonil]amino]-4-oxo-(3S) butanoico. clorhidrato (2,38 g, 3,96 mmoles) (Tetrahedron 51, 12047-12068, 1995) y ácido bencil-(4-amino-butírico). bencenosulfonato (1,52 g, 3,96 mmoles) (J. Am. Chem. Soc. 105, 5278-5284, 1983) en DMF (40 mL) bajo una atmósfera de nitrógeno, se agregó N,N-diisopropiletilamina (0,689 mL, 3,96 mmoles) y tetrafluoroborato de tetrametil-benzotriazolil uronio (1,91 g, 5,94 mmoles). El pH de la mezcla de reacción se mantuvo en 6,

usando N,N-diisopropiletilamina. La mezcla de reacción fue agitada por 4 días a temperatura ambiente, concentrada, disuelta en acetato de etilo, lavada con carbonato de sodio al 5% y ácido clorhídrico 0,1 N, secada sobre sulfato de magnesio y concentrada. El residuo fue disuelto en etanol seco (5 mL), precipitado con éter diisopropílico seco y filtrado, para dar 2,47 g del compuesto del título 18.

R_f = 0,8, acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua = 88/31/18/7, v/v/v/v; Masa (ESI⁺): 777,4 [M+H]⁺.

ácido 4-[[4-[[[(1R)-1-[[4-(aminoiminometil)fenil]metil]-2-oxo-2-(1-piperidinil)etil]amino]-3-[[4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)-sulfonil]amino]-1,4(S)-dioxobutil]amino]-butanoico. clorhidrato (19)

Una suspensión de 18 (2,42 g, 3,11 mmoles) y Pd/C al 10% (400 mg) en metanol/agua (40 mL, 3/1, v/v) fue agitada bajo una corriente continua de hidrógeno. Después de 8 horas, la mezcla de reacción fue filtrada, el filtrado fue concentrado y coevaporado tres veces con metanol/tolueno (1/10, v/v). El residuo fue disuelto en etanol seco (5mL), precipitado con éter dietílico seco, filtrado y secado. El residuo fue disuelto en agua y cargado directamente sobre una DeltaPak RP-C₁₈ para HPLC preparatoria, usando un sistema de elución con gradiente de 20% de A/60% de B/20% de C a 20% de A/14% de B/66% de C en 60 minutos, a un caudal de 40 mL/minuto (A: tampón de fosfato 0,5M, pH 2,1; B: agua; C: acetonitrilo/agua = 6/4). Rendimiento 598 mg.

R_t = 26,4 minutos. (3-10 minutos: 20-43% de C + 20% de A; 10-50 minutos: 43-66% de C + 20% de A), (A: tampón de fosfato de pH 2,1; B: agua; C: acetonitrilo/agua = 6/4, v/v), supelcosil LC-

18-DB para HPLC analítica; Masa (ESI^+): 687,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, (ESI^-): 685,2 $[\text{M}-\text{H}]$.

Compuesto 21 a partir de compuesto 17 y compuesto 19

A una solución de compuesto 19 (40 mg, 58,3 μmoles) en DMF (800 μL), se agregó N-hidroxisuccinimida (9,0 mg, 78,1 μmoles), DCC (18,5 mg, 89,7 μmoles) y 1-hidroxibenzotriazol (8,8 mg, 65,1 μmoles). La mezcla de reacción fue agitada por 40 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue filtrada sobre dicálice y el dicálice fue lavado cuatro veces con DMF (284 μL). Al filtrado se agregó tampón de Na_2HPO_4 0,1 M (1.936 μL , pH=7,5) y pentasacárido 17 (94,7 mg, 52,6 μmoles). Después de agitar por 30 minutos, la mezcla fue filtrada sobre dicálice, concentrada y aplicada sobre una columna Sephadex G-50, que fue eluida con acetonitrilo/agua (1/1, v/v). Las fracciones apropiadas fueron acumuladas, concentradas y desaladas dos veces por cromatografía en columna Sephadex G-50 (agua). Las fracciones apropiadas fueron acumuladas y liofilizadas dando el conjugado 21 como un sólido blanco (95,8 mg). Masa (ESI^+) = 2.469, HPLC: R_t = 8,3 minutos (20-80% de B en 15 minutos, A = agua/acetonitrilo 8/2; B = NaCl 2M/acetonitrilo 8/2, v/v), MonoQ HR 5 para HPLC analítica.

Compuesto 22

Una solución de (R)-N-Boc(4-cianofenil)alanina (25,0 g, 86,1 mmol), piperidina (21,3 mL, 215,3 mmol) y TBTU (41,5 g, 129,2 mmol) en CH_2Cl_2 seco (500 mL), fue agitada a temperatura ambiente bajo un flujo de nitrógeno por 2 horas. La mezcla de reacción fue lavada sucesivamente con ácido clorhídrico 0,2 N, agua, bicarbonato de sodio acuoso (saturado) y agua. La capa orgánica fue secada sobre MgSO_4 , filtrada y

concentrada al vacío. El producto fue disuelto en acetato de etilo caliente (35 mL), precipitado con heptano (190 mL) y filtrado para dar el compuesto **22** (27,75 g).

TLC: $R_f = 0,58$, heptano/acetato de etilo = 3/7, v/v.

Compuesto 23

Una solución de compuesto **22** (25,6 g, 71,7 mmoles), hidroxilamina. HCl (7,1 g, 101,8 mmoles) y trietilamina (16,8 mL, 120,5 mmoles) en etanol absoluto (307 mL), fue agitada a 80°C por 4 horas. Después de enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente, se formaron cristales. Los cristales fueron filtrados, lavados con etanol y éter y secados en una secadora para dar el compuesto **23** (24,5 g).

TLC: $R_f = 0,15$, heptano/acetato de etilo = 3/7, v/v.

Compuesto 24

Una solución de compuesto **23** (24,5 g, 62,7 mmoles) y cloroformiato de etilo (7,2 mL, 75,3 mmol) en piridina seca (245 mL), fue agitada a 115°C durante 2 horas. La mezcla de reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente y vertida en agua (1.250 mL) y extraída 3 veces con acetato de etilo (500 mL). El extracto orgánico combinado fue secado sobre $MgSO_4$, filtrado y concentrado al vacío para dar el compuesto **24** (24,3 g).

TLC: $R_f = 0,42$, $CH_2Cl_2/MeOH$ 95/5, v/v.

Compuesto 25

Una solución de compuesto **24** (24,3 g, 58,4 mmoles) en CH_2Cl_2 seco (122 mL) y TFA (122 mL) fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas, y concentrada al vacío en presencia de tolueno para dar el compuesto **25** (37,6 g).

TLC: $R_f = 0,35$, $CH_2Cl_2/MeOH$ 8/2, v/v.

Compuesto 26

Una suspensión de H-Asp-(OtBu)-OH (39 g, 206,35 mmoles), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenceno-sulfonil cloruro (62 g, 249,3 mmoles) y diisopropilamina (89 mL, 635 mmoles) en DMF (950 mL) y agua (450 mL), fue agitada a 0°C por 3 horas. La mezcla de reacción fue vertida en hielo/agua (5 L) y lavada dos veces con éter dietílico, acidificada con ácido clorhídrico acuoso (4N, 72 ml) y extraída 3 veces con acetato de etilo. Las capas de acetato de etilo combinadas fueron secadas en MgSO₄, filtradas y concentradas al vacío para dar el compuesto 26 (97,7 g).

TLC: R_f = 0,67, CH₂Cl₂/MeOH 8/2, v/v.

Compuesto 27

Una solución de compuesto 25 (33,5 g), compuesto 26 (24,7 g), TBTU (36,8 g, 114,6 mmoles) y diisopropilamina (27,2 mL, 194,1 mmoles) en DMF seca (670 mL), fue agitada durante 2 horas y concentrada al vacío. El residuo fue disuelto en acetato de etilo (750 mL), lavado con bicarbonato de sodio acuoso (al 5%, 1.250 mL) y ácido clorhídrico acuoso (0,1 N, 1.250 mL), secado sobre MgSO₄, filtrado y concentrado al vacío, para dar el compuesto 27 (33,8 g).

TLC: R_f = 0,88, CH₂Cl₂/MeOH 8/2, v/v.

Compuesto 28

Una solución de compuesto 27 (33,8 g, 48,3 mmoles) en CH₂Cl₂ seco (170 mL) y TFA (170 mL) fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas, y concentrada al vacío en presencia de tolueno, para dar el compuesto 28 (32,3 g).

TLC: R_f = 0,73, CH₂Cl₂/MeOH 8/2, v/v.

Compuesto 29

Una solución de compuesto **28** (32,3 g), H-GABA-OtBu.HCl (9,5 g, 48,4 mmoles), TBTU (29,0 g, 90,5 mmoles) y diisopropilamina (25,2 mL, 179,8 mmoles) en DMF seca (622 mL), fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas y concentrada al vacío. El residuo fue disuelto en acetato de etilo (840 mL), lavado con bicarbonato de sodio acuoso (al 5%, 1.400 mL) y ácido clorhídrico acuoso (0,1 N, 1.400 mL), secado sobre MgSO₄, filtrado y concentrado al vacío. El residuo fue disuelto en etanol (75 mL) y agregado lentamente a éter diisopropílico agitado (2.990 mL), dando el compuesto **29** como cristales blanquecinos (32,0 g).

TLC: R_f = 0,56, CH₂Cl₂/MeOH 9/1, v/v.

Compuesto 30

Una solución de compuesto **29** (3,0 g, 3,82 mmoles) en CH₂Cl₂ seco (15 mL) y TFA (15 mL) fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas, y concentrada al vacío en presencia de tolueno. El residuo fue purificado en sílica gel usando CH₂Cl₂/MeOH (0%-6% de MeOH) dando el compuesto **30** puro (1,98 g).

TLC: R_f = 0,56, CH₂Cl₂/MeOH 8/2, v/v.

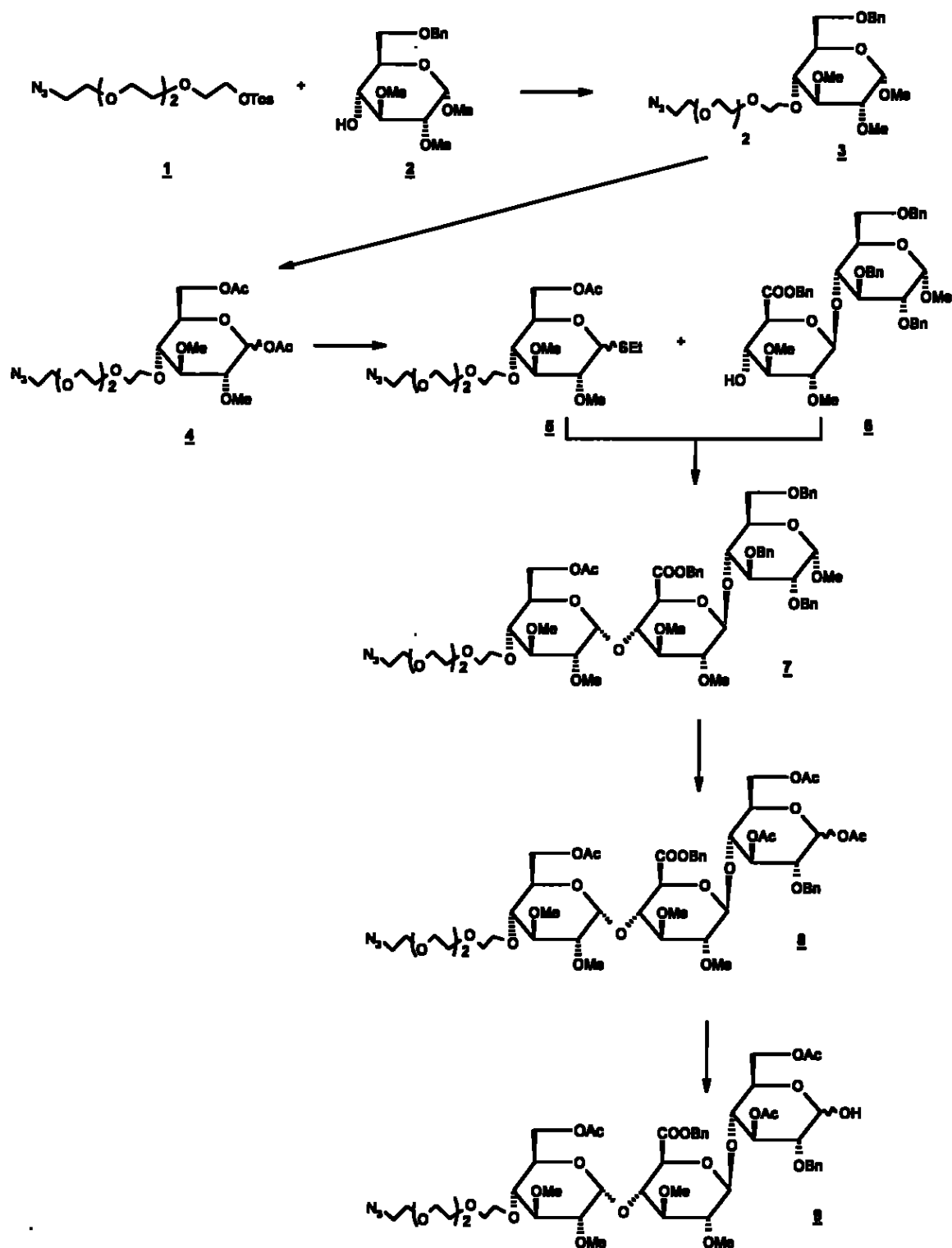
Compuesto 31

Una solución de compuesto **30** (900 mg, 1,23 mmol), TBTU (396 mg, 1,23 mmol) y diisopropilamina (215 µL, 1,53 mmol) en DMF (45 mL), fue agitada por 2 horas a temperatura ambiente. Se agregó compuesto **17** (2,0 g, 1,11 mmol) y después de agitar por 4 horas, la mezcla fue concentrada al vacío dando el compuesto **31** (4,17 g).

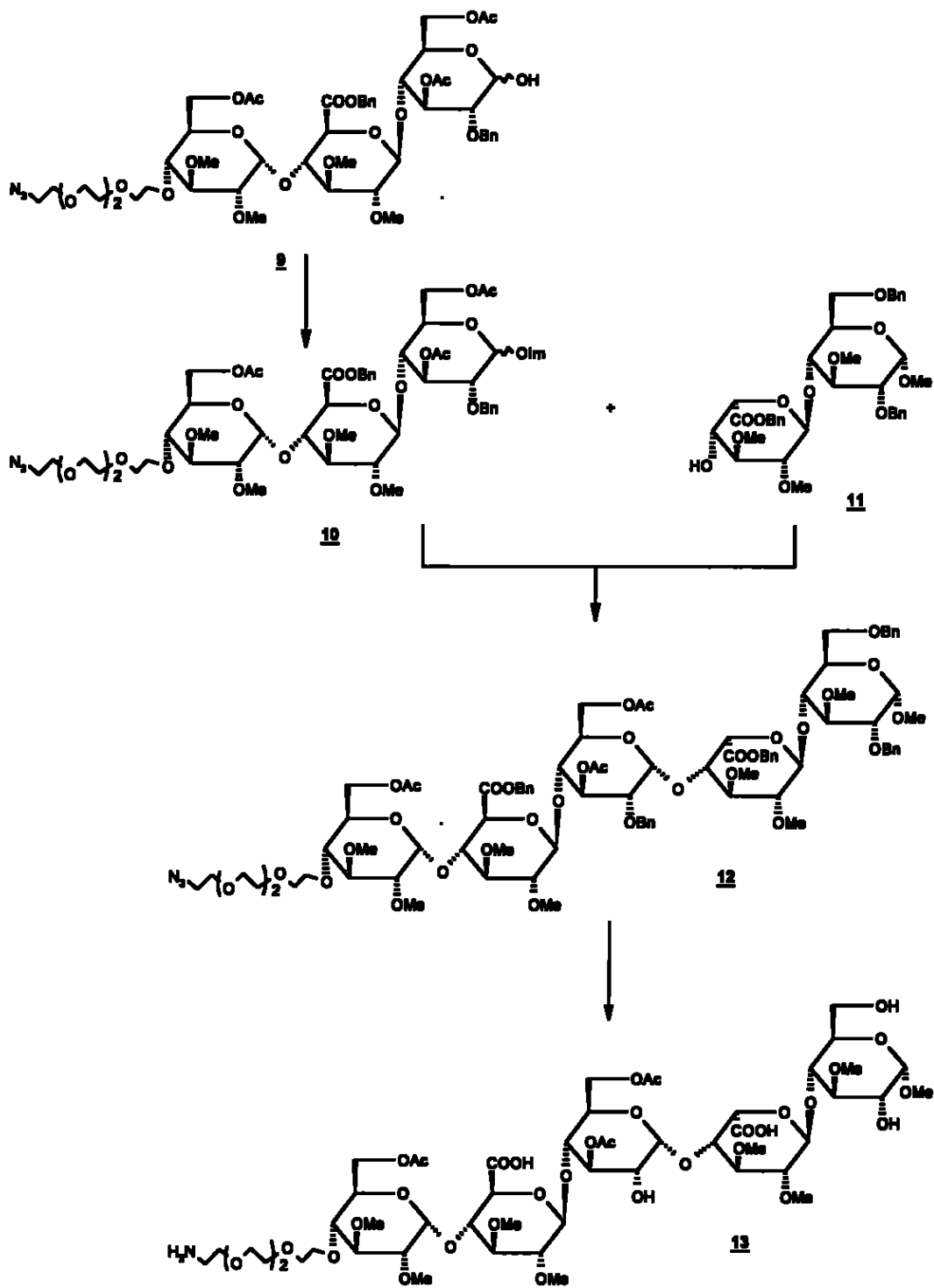
Compuesto 21 a partir del compuesto 31

Una suspensión de compuesto 31 (4,17 g) y Pd/C al 10% (2,8 g) en *alcohol ter-butílico* (28 mL) y agua (56 mL) fue agitada durante la noche bajo una corriente continua de hidrógeno. El catalizador de Pd/C fue removido por filtración y el filtrado fue concentrado al vacío. El residuo fue disuelto en agua y purificado en una columna Q-sepharose. Las fracciones apropiadas fueron acumuladas, concentradas y desaladas por cromatografía en columna Sephadex G-25 (agua). Las fracciones apropiadas fueron acumuladas y liofilizadas dando el conjugado 21 como un sólido blanco (1,74 g).

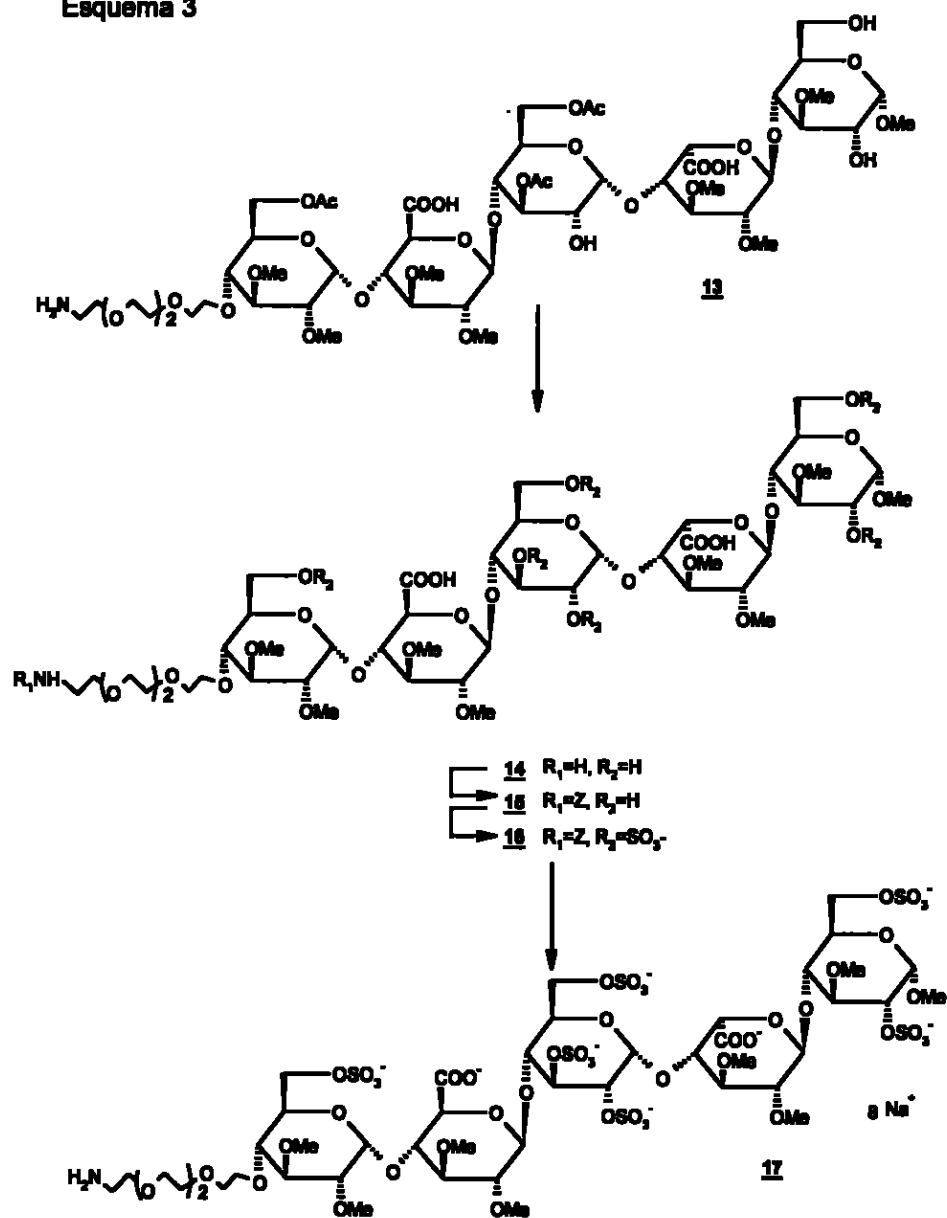
Esquema 1



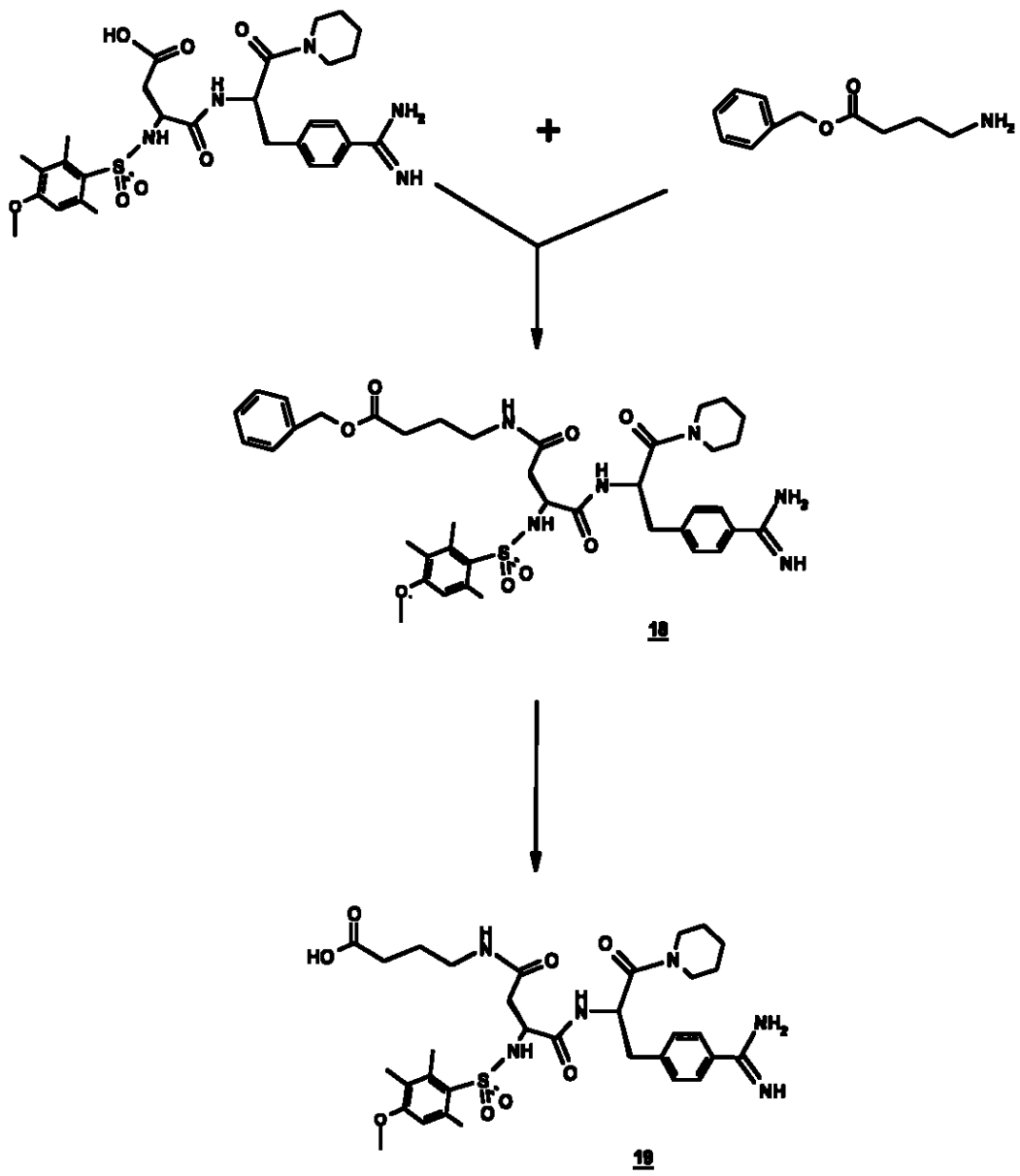
Esquema 2



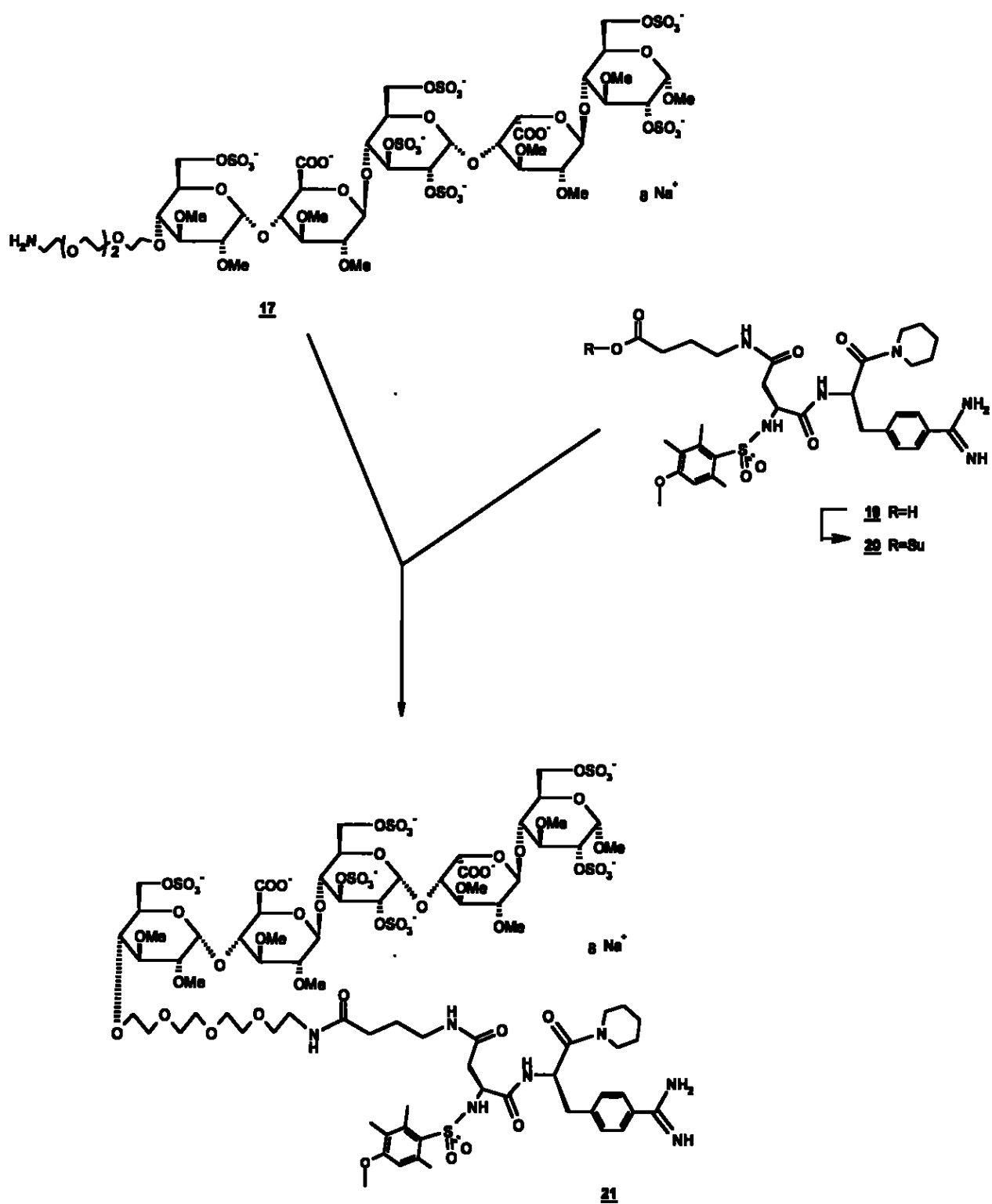
Esquema 3



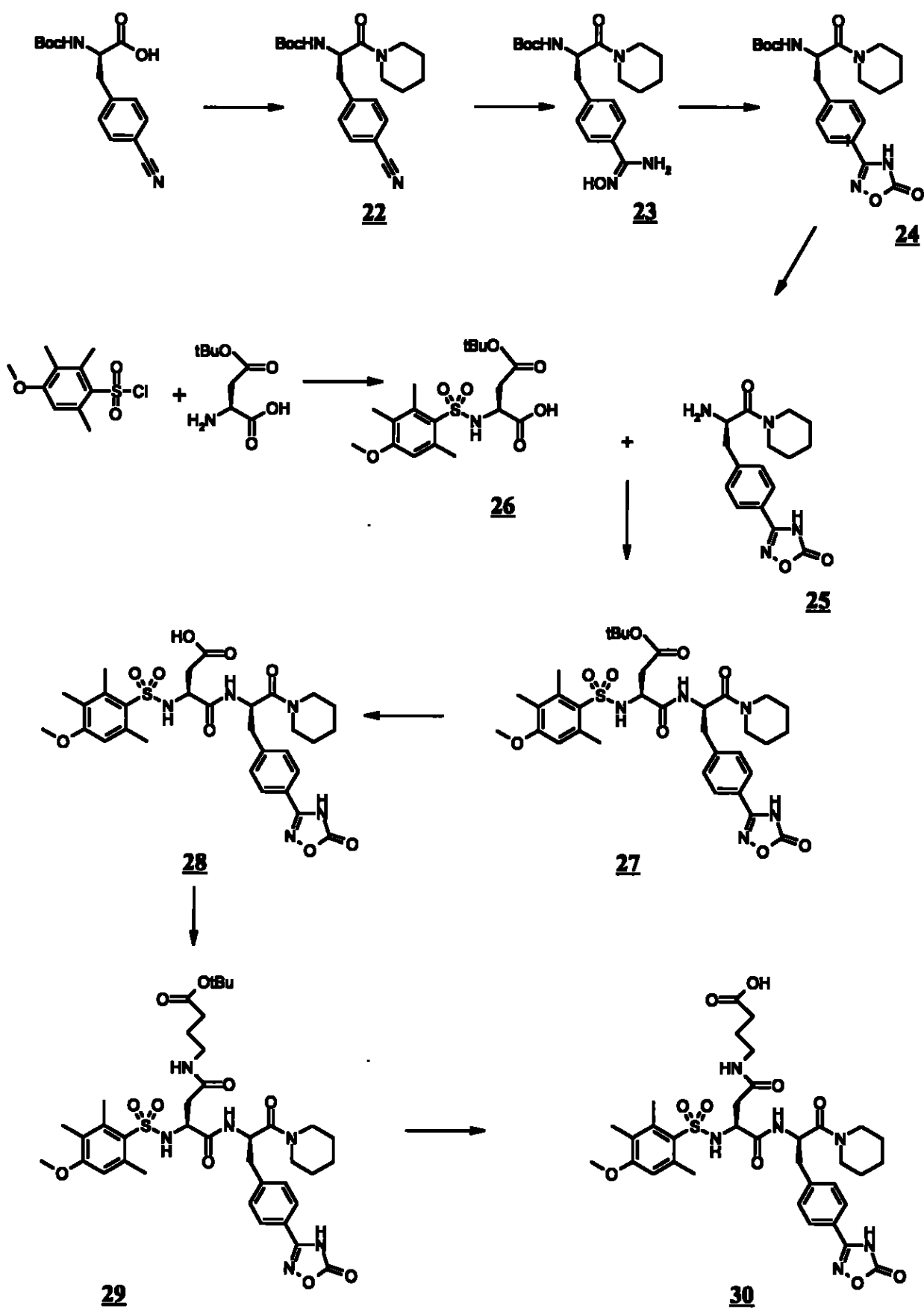
Esquema 4



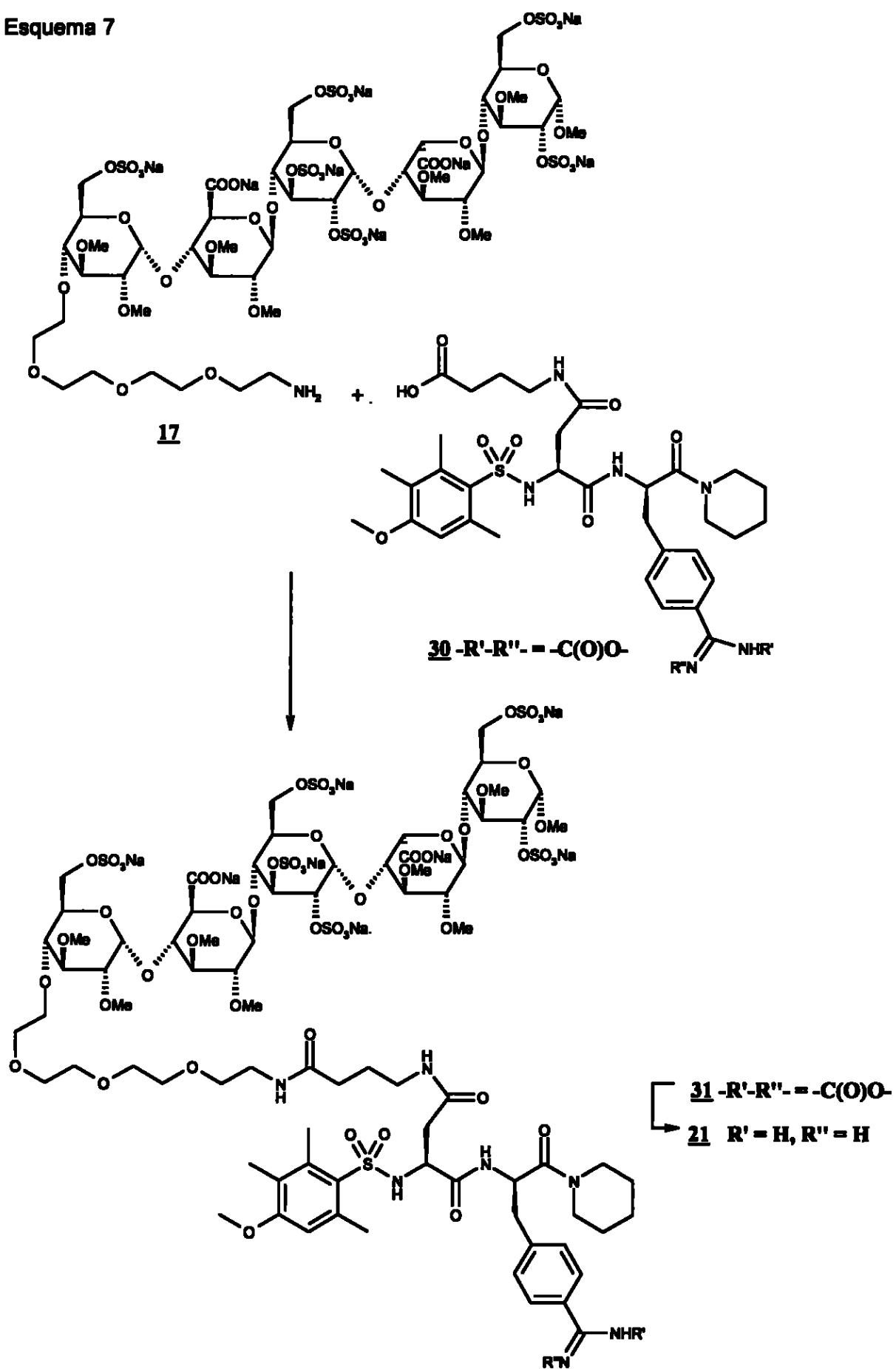
Esquema 5



Esquema 6



Esquema 7



EJEMPLO 2

Las actividades biológicas de los compuestos de la presente invención se determinan por los métodos de prueba siguientes.

I. Ensayo antitrombina

La trombina (Factor IIa) es un factor en la cascada de coagulación.

La actividad antitrombina de los compuestos de la presente invención fue evaluada midiendo espectrofotométricamente la velocidad de hidrólisis del sustrato cromogénico s-2238 efectuada por la trombina. Este ensayo para la actividad antitrombina en un sistema de tampón, fue usado para determinar el valor IC₅₀ de un compuesto de prueba.

Medio de prueba: Tampón de trometamina - NaCl - polietilenglicol 6000 (TNP)

Compuesto de referencia: I2581 (Kabi)

Vehículo: Tampón TNP.

La solubilización puede ser ayudada con dimetilsulfóxido, metanol, etanol, acetonitrilo o alcohol terbutílico, que no tienen efectos adversos a concentraciones de hasta 2,5% en la mezcla de reacción final.

Técnica

Reactivos*

1. Tampón de trometamina-NaCl (TN); composición del tampón: Trometamina (Tris) 6,057 g (50 mmoles), NaCl 5,844 g (100 mmoles), agua hasta 1 litro. El pH de la solución se ajusta a 7,4 a 37°C con HCl (10 mmoles.l⁻¹).

2. Tampón TNP: Polietilenglicol 6000 se disuelve en tampón TN para dar una concentración de 3 g.l⁻¹.

3. Solución de S-2238: Un frasco de S-2238 (25 mg; Chromogenix; Suecia) se disuelve en 20 ml de tampón TN para dar una concentración de $1,25 \text{ mg.ml}^{-1}$ (2 mmoles.l^{-1}).

4. Solución de trombina: Trombina humana (1.000 unidades NIH/frasco; Enzyme Res. Lab. Inc., EE.UU.) se disuelve en tampón TNP para dar una solución stock de 50 unidades NIH.ml^{-1} . Inmediatamente antes del uso, esta solución se diluye con tampón TNP para dar una concentración de $30,2$ unidades NIH.ml^{-1} .

* - Todos los ingredientes usados son de grado analítico.

- Para las soluciones acuosas, se usa agua ultrapura (calidad Milli-Q).

Preparación de soluciones de compuestos de prueba y de referencia

Los compuestos de prueba y de referencia se disuelven en agua Milli-Q para dar concentraciones stock de $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$. Cada concentración es diluida por etapas con el vehículo para dar concentraciones de 10^{-3} , 10^{-4} y $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$. Las diluciones, incluyendo la solución stock, son usadas en el ensayo (concentraciones finales en la mezcla de reacción: $3 \cdot 10^{-4}$; 10^{-4} ; $3 \cdot 10^{-5}$; 10^{-5} ; $3 \cdot 10^{-6}$; 10^{-6} ; $3 \cdot 10^{-7}$ y $10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, respectivamente).

Procedimiento

A temperatura ambiente, $0,075 \text{ ml}$ y $0,025 \text{ ml}$ de las soluciones de compuesto de prueba o compuesto de referencia o de vehículo, son pipeteadas alternadamente en los receptáculos de una placa de microtitulación, y estas soluciones se diluyen con $0,115 \text{ ml}$ y $0,0165 \text{ ml}$ de tampón TNP, respectivamente. Se agrega una alícuota de $0,030 \text{ ml}$ de solución de S-2238 a cada

receptáculo y la placa es precalentada y preincubada con agitación en una incubadora (Amersham) por 10 minutos a 37°C. Después de la preincubación, la hidrólisis de S-2238 se inicia por adición de 0,030 ml de solución de trombina a cada receptáculo. La placa es incubada (con agitación por 30 s) a 37°C. Comenzando después de 1 minuto de incubación, se mide la absorbancia de cada muestra a 405 nm, cada 2 minutos, por un período de 90 minutos, usando una lectora de placas de microtitulación cinética (Twinreader plus, Flow Laboratories).

Todos los datos son recogidos en un computador personal usando un programa de procesamiento de datos (Biolise). Para cada concentración del compuesto (expresada en moles.l⁻¹ de la mezcla de reacción) y para el blanco, se grafica absorbancia versus tiempo de reacción en minutos.

Evaluación de las respuestas: Para cada concentración final, se calculó la absorbancia máxima a partir del gráfico del ensayo. El valor IC₅₀ (concentración final, expresada en µmoles.l⁻¹, que causa el 50% de inhibición de la absorbancia máxima del blanco) se calculó usando el análisis de transformación logit de acuerdo con Hafner y colaboradores, (Arzneim.-Forsch./Drug Res. 1977; 27(II): 1871-3).

Actividad antitrombina del compuesto del EJEMPLO 1: valor IC₅₀: 17 nM.

II. Ensayo anti-factor Xa

El Factor X activado (Xa) es un factor en la cascada de coagulación. La actividad anti-Xa de los compuestos de la presente invención fue evaluada midiendo espectrofotométricamente la velocidad de hidrólisis del sustrato cromogénico

s-2222 efectuada por Xa. Este ensayo para la actividad anti-Xa en un sistema de tampón fue usado para determinar el valor IC₅₀ del compuesto de prueba.

Compuesto de referencia: pentasacárido Org 31540

Vehículo: Tampón TNP.

La solubilización puede ser ayudada con dimetilsulfóxido, metanol, etanol, acetonitrilo o alcohol ter-butílico, que no tienen efectos adversos a concentraciones de hasta 1% (para DMSO) y 2,5% (para los otros solventes) en la mezcla de reacción final.

Técnica

Reactivos*

1. Tampón de trometamina-NaCl (TN); composición del tampón: Trometamina (Tris) 6,11 g (50,4 mmoles), NaCl 10,17 g (174 mmoles), polietilenglicol 6000 3 g.l⁻¹, agua hasta 1 litro. El pH de la solución se ajusta a 7,4 a 37°C con HCl (10 mmoles .l⁻¹).

3. Solución de S-2222: Un frasco de S-2222 (25 mg; Chromogenix; Suecia) se disuelve en agua para dar una concentración de 0,375 mg.ml⁻¹ (0,5 mmol.l⁻¹).

4. Solución de Xa: Factor Xa de bovino humano (71 nKat.frasco⁻¹; Chromogenix) se disuelve en 10 ml de tampón TNP, y luego se diluye nuevamente con tampón TNP para dar una concentración de 0,75 nKat (1,5 U).ml⁻¹. La dilución debe ser recién preparada.

5. Solución de ATIII: ATIII humano (Chromogenix) se disuelve en agua para dar una concentración de 1 U.ml⁻¹, después de lo cual la solución se diluye nuevamente con 3 volúmenes de tampón TNP hasta una concentración de 0,25 U.ml⁻¹.

Solución estándar: una solución stock de 5,7 U anti-Xa .ml⁻¹ de Org 31540 se diluye en tampón TNP hasta 0,05 U.ml⁻¹.

Muestras de prueba: Cada preparación se disuelve en agua y se diluye con tampón TNP hasta una concentración de 0,05 nmol.ml⁻¹. De cada preparación, se efectúa una gama de 9 diluciones (factor de dilución 1,5).

Determinación de la actividad de Xa

Cada muestra de prueba (0,05 ml) es pipeteada dentro de un receptáculo de una placa de microtitulación a temperatura ambiente. Se agrega solución de AT-III (0,05 ml) a cada muestra, y la placa se agita usando un agitador Vari-shaker. Una alícuota de solución de Xa (0,05 ml) es pipeteada dentro de cada receptáculo 10 minutos después de la adición de AT-III, y la placa se agita nuevamente. Exactamente 2 minutos después de la adición de la solución de Xa, se pipetea 0,1 ml de solución de S-2222 dentro de cada receptáculo, y la placa se agita nuevamente. Para todas las adiciones, se usa una pipeta de 12 canales. La cantidad restante de Xa cataliza la hidrólisis de S-2222, cuya velocidad se mide fotométricamente después de períodos de incubación de 2 y 22 minutos, respectivamente, a temperatura ambiente. La absorbancia de cada muestra se mide a 405 nm, usando una lectora Microelisa, modelo 310C (Organon Teknika, Oss, Holanda) y se calcula el aumento de absorbancia (ΔOD). Cada muestra de prueba es analizada en duplicado. Con cada 10 muestras, se incluye un blanco (0,05 ml de tampón TNP).

Curva de calibración

A partir de una alícuota de la solución estándar de la muestra de calibración, se prepara una gama de diluciones (factor de dilución 1,4 para las muestras de Org 31540). Las

muestras estándar resultantes (aproximadamente 12 muestras) deben contener entre 0,01 y 0,05 U anti-Xa/ml. Dentro de cada corrida, 0,05 ml de cada muestra estándar se analiza al menos 3 veces, como se describe en "Determinación de la actividad de Xa". Se obtiene una curva de calibración ajustando una línea recta a

$$\log \frac{\Delta OD \text{ media (blanco)} - \Delta OD \text{ media (muestra estándar)}}{\Delta OD \text{ media (muestra estándar)}}$$

contra log anti-Xa

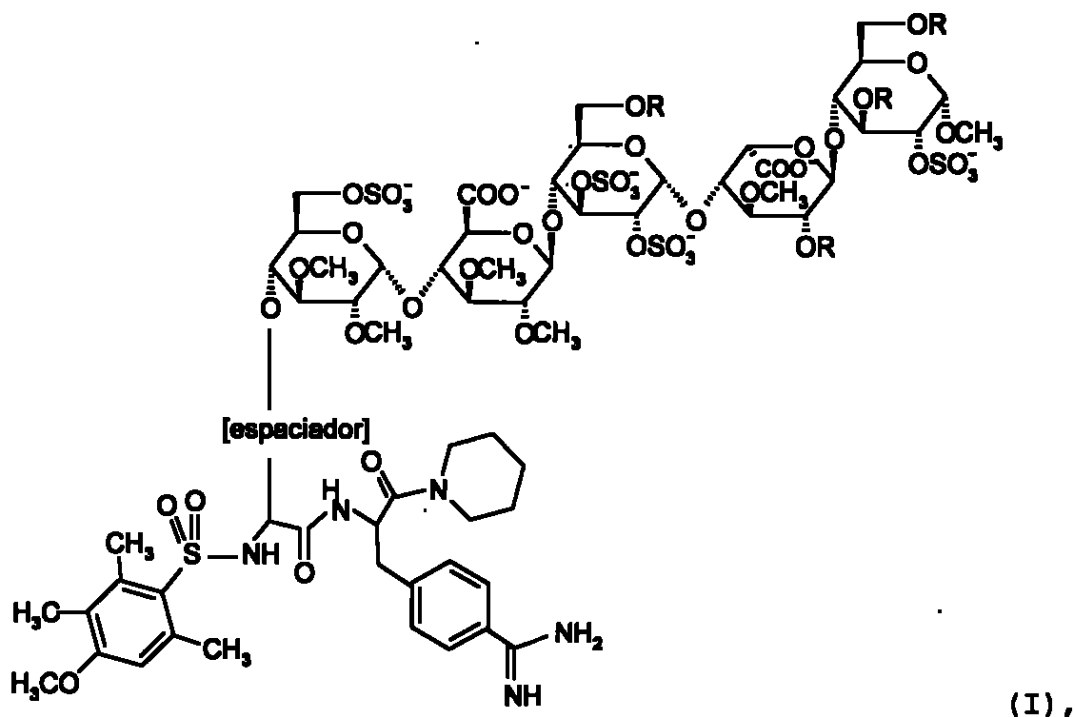
valores en U/ml, usando el método de mínimos cuadrados.

Evaluación de las respuestas: Para cada muestra, se determina la actividad anti-Xa media en U/ml, usando la curva de calibración.

Actividad anti-factor Xa del compuesto del EJEMPLO 1: 1.012 U/ μ mol.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto CARACTERIZADO porque tiene la fórmula (I)



donde R es independientemente SO_3^- ó CH_3 ;

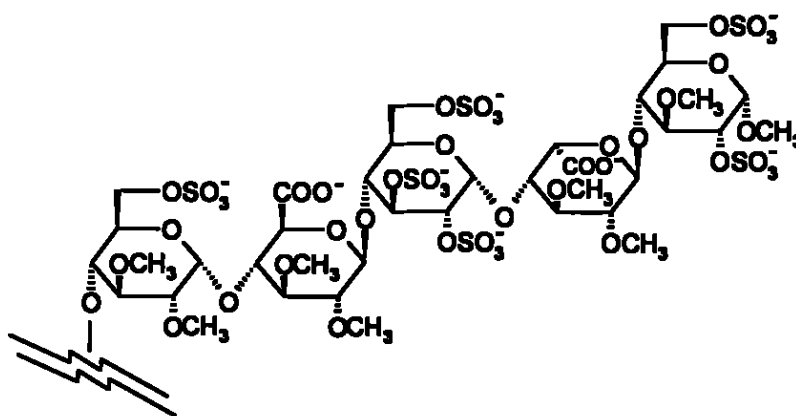
el espaciador es un espaciador flexible de una longitud de 13-25 átomos;

la carga del residuo de pentasacárido es compensada por contraiones cargados positivamente;

y el número total de grupos sulfato en el residuo de pentasacárido es 4, 5 ó 6;

o una sal farmacéuticamente aceptable, un profármaco o un solvato del mismo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el residuo de pentasacárido tiene la estructura

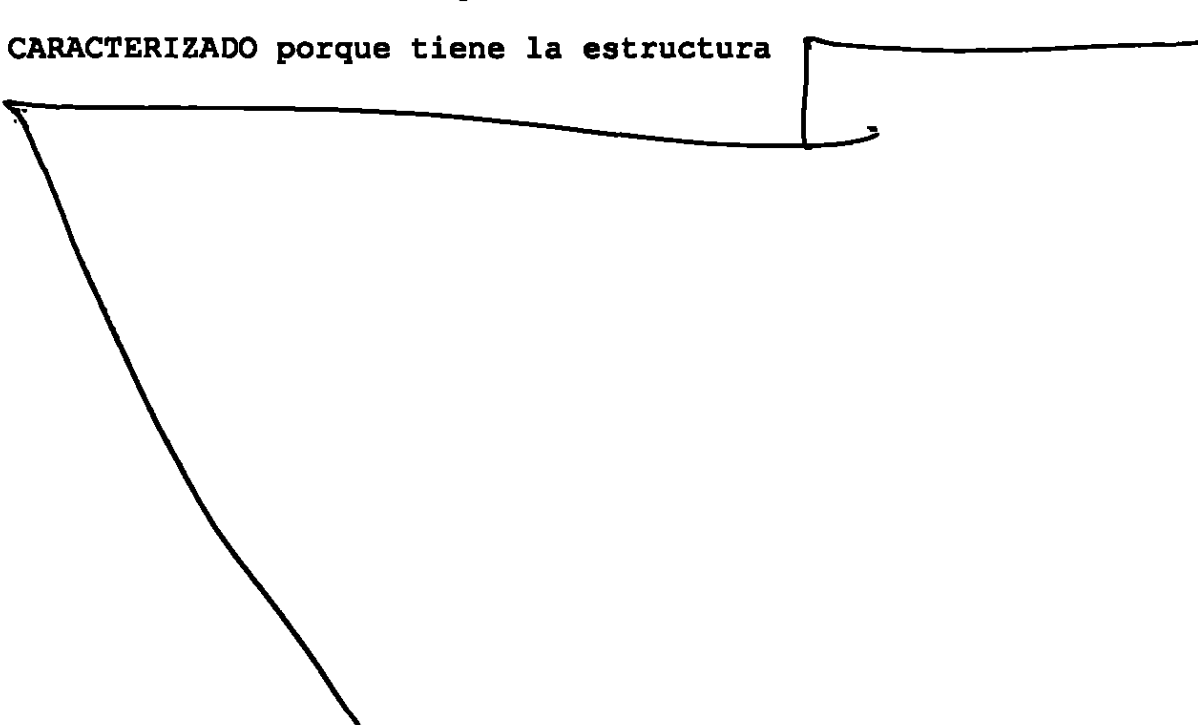


3. El compuesto de la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque el espaciador tiene una longitud de 16-22 átomos.

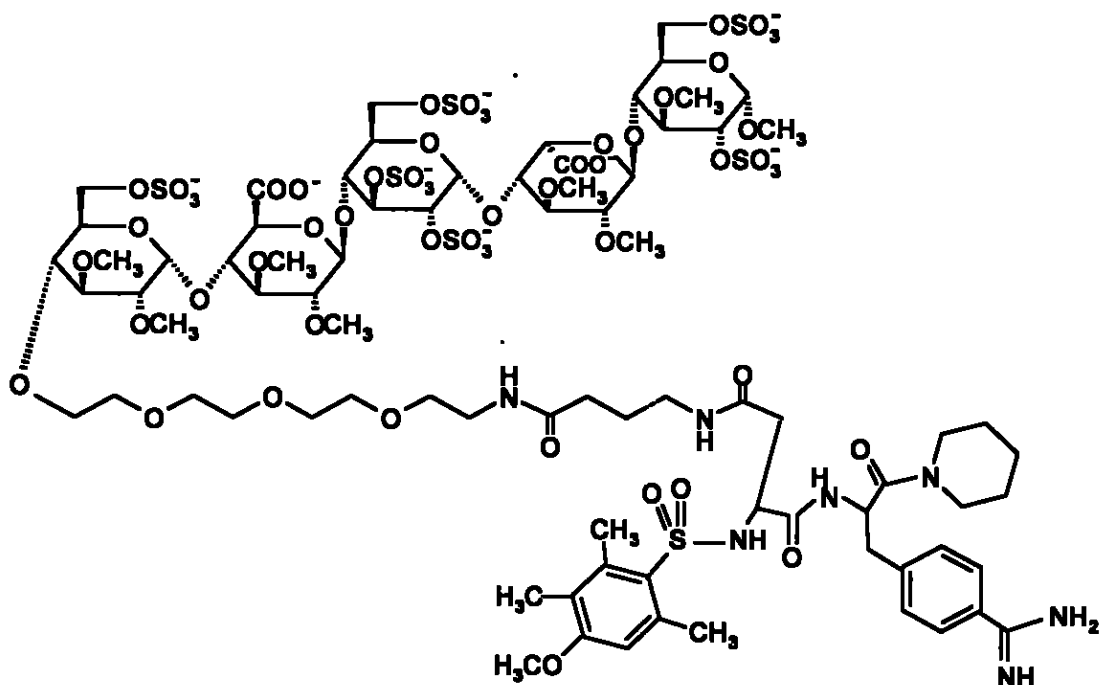
4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, CARACTERIZADO porque el espaciador tiene una longitud de 19 átomos.

5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, CARACTERIZADO porque el espaciador es $^{*}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$, estando el extremo indicado con * unido al residuo de pentasacárido.

6. El compuesto de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque tiene la estructura



40



7. Un procedimiento para la preparación del compuesto de fórmula I, CARACTERIZADO porque comprende una etapa en que la porción benzamidina está en la forma de un precursor, que es el grupo 1,2,4-oxadiazolin-5-ona.

8. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA porque comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y auxiliares farmacéuticamente adecuados.

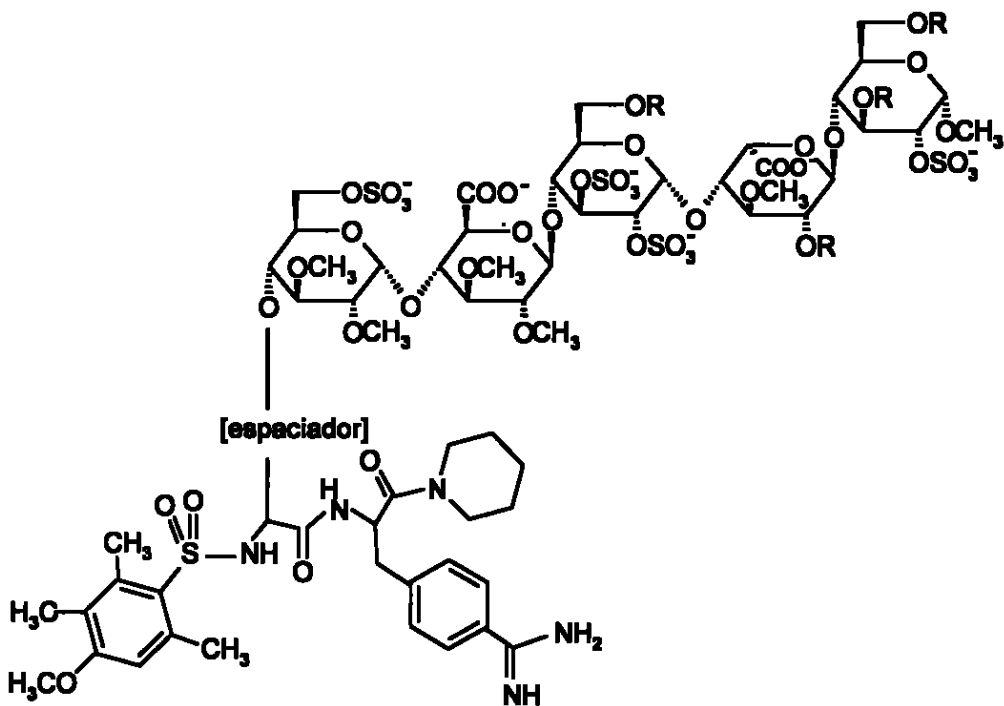
9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADO/ porque se usa en terapia.

10. Uso del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADO porque sirve para preparar un medicamento para tratar o prevenir la trombosis u otras enfermedades relacionadas con la trombina.

802.386

Resumen

La presente invención se refiere a compuestos de la fórmula (I)



(I),

donde R es independientemente SO₃⁻ ó CH₃;

el espaciador es un espaciador flexible de una longitud de 13-25 átomos;

la carga del residuo de pentasacárido es compensada por contraiones cargados positivamente;

y el número total de grupos sulfato en el residuo de pentasacárido es 4, 5 ó 6;

o sales farmacéuticamente aceptables, profármacos o solvatos de los mismos.

Los compuestos de la invención tienen actividad antitrombótica y pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con la trombina.

Título

Nuevos compuestos antitrombóticos y composiciones farmacéuticas que los contienen.

CAVELIER

ABOGADOS

DE

BOGOTÁ, D. C.

BOGOTÁ, D. C.

0197301 CO

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

12

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

1538

I (we), the undersigned / Yo (nosotros), abajo firmado (s)

AKZO NOBEL N.V.

of/domiciliado (s) en Velperweg 76, 6824

BM Arnhem, THE NETHERLANDS

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primer o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection of the consumer, oppositions or observations, administrative and judicial nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this, Day y Month of 6 AUG 1998

F.G.M. Hermans

in/en

Director Patents Pharma

Signature

AKZO NOBEL N.V.

E.H. Reerink

Deputy Director

Legal Affairs

CAVELIER ABOGADOS
WPPODERE-179 (MINUTA N° 12.1.12.5)

TRADUCCION No. 18.11.98
MARIA ELVIRA MAFIELLO
Traductora e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 28/9 Min. Justicia

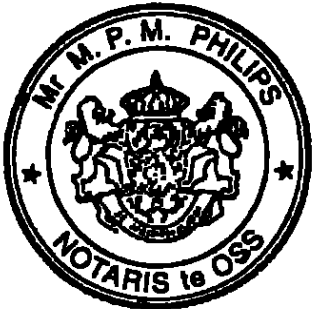
LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un certificado consular sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a consular certificate, on (1) the legal existence of the company, (2) that it is in actual exercise of its Power-of-Authority, (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).

Seen for legalization of the signatures of Mr. F.G.M. Hermans and Mr. E.H. Reerink by me, Mr. Martinus Petrus Maria Philips, notary public at Oss, the Netherlands, on this 26th day of August 1998.



15499

TRADUCCION No.: 18.11/98
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia



CHAMBER OF COMMERCE AND INDUSTRY
FOR GOOST-BRABANT (NETHERLAND)

EXCLUSIVE FOR LEGALIZATION OF
THE ABOVE MENTIONED SIGNATURE(S)

27 AUG 1998

KAMER VAN KOOP-
GOOST-BRABANT
's-HERTOGENBOSCH

J. Schellekens

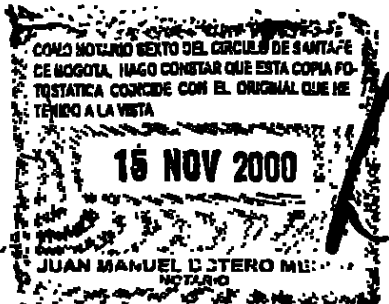
Gazien voor legalisatie van de handtekening
van de heer J. Schellekens

's-Gravenhage, 09 SEP 1998



De Minister van
Buitenlandse Zaken
voor deze,

Leges f 20,- H.H. van POORTEN



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.



CONSULADO DE COLOMBIA

2010 11 15 10:00:00

43

El suscrito Cónsul de Colombia en La Haya, Holanda,
vistos los documentos presentados por los interesados,

CERTIFICA:

Que el Señor Martinus Petrus Maria PHILIPS, quien como Notario Público de Oss , Países Bajos, autenticó las firmas de los signatarios del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas, y su firma corresponde a la registrada en este Consulado.

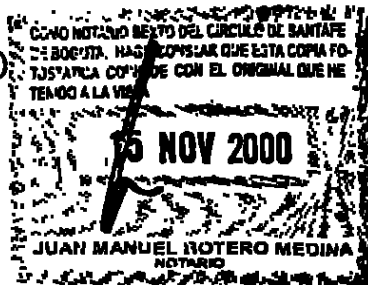
Que la Compañía AKZO NOBEL N.V. es una Sociedad constituida de acuerdo con las leyes de los Países Bajos, cumple su objeto conforme a las mismas y se halla registrada en la Cámara de Comercio y Fábricas de Centraal Gelderland, Arnhem, bajo el número 09007809;

Que los Señores Franciscus Guilielmus Maria HERMANS y Engbert Harmen REERINK, signatarios del presente documento, quienes en su carácter de Apoderados de la Empresa AKZO NOBEL N.V., conjuntamente tienen facultad para ello, y cuyas firmas fueron autenticadas ante el Notario Público de Oss , Señor Martinus Petrus Maria PHILIPS, son los representantes legales de la citada Empresa en este País.

El Cónsul de Colombia en La Haya, Países Bajos, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Esta certificación se expide en La Haya, Países Bajos, a los seis (06) días del mes de Noviembre de mil novecientos noventa y ocho (1998)

Impuesto de Timbre	US\$	6.00.
Derechos Consulares	US\$.	100.00
Costo Total Pagado	US\$.	106.00



Certificación No. 206


JOSE IGNACIO VILLEGAS CORTES
CONSUL DE COLOMBIA
LA HAYA

TRADUCCION No: 18.11/98
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

Spans on the
inside of the
who execute the
effect. Please
facts (1), (2)

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

95:11:11:56

300803

COMUNICACIONES
DE BOGOTÁ
TUSCÁNIA
TENIDO A

JUAN MANUEL

15 NOV 2000

JUAN MANUEL GUTIERREZ

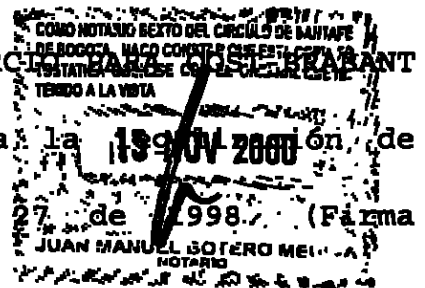
✓

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 18.11/98 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial debidamente aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia por Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

(A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual AKZO NOBEL N.V. otorga poder a EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER). Dado y firmado el 6 de agosto de 1998. (Firma ilegible) F.G.M. Hermans, Director de Patentes Farmacéuticas. (Firma ilegible) E.H. Reerink, Subdirector de Asuntos Jurídicos. (Sello Corporativo) AKZO NOBEL N.V.

(Al dorso) Visto por mí, Sr. Martinus Petrus Maria Philips, notario público en Oss, Países Bajos, hoy 26 de agosto de 1998, para legalización de las firmas de F.G.M. Hermans y E.H. Reerink. (Firma ilegible).

(Legalización) CAMARA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DE LA HAYA (PAÍSES BAJOS). Visto exclusivamente para la la(s) firma(s) que antecede(n). Agosto 27 de 1998. (Firma ilegible) J. Schellenkens.



(Sello en holandés).

(En español) Certificación de las firmas que anteceden y de la existencia legal de AKZO NOBEL N.V. expedida por el Consulado de Colombia en La Haya el día 6 de noviembre de 1998, bajo el No.

206. Firmado JOSE IGNACIO VILLEGAS CORTES, Cónsul de Colombia, La Haya. Pagado impuesto de timbre.

(Al dorso) Legalización de la firma que antecede expedida por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 300803 del 19 de NOVIEMBRE de 1998, firmado por el Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

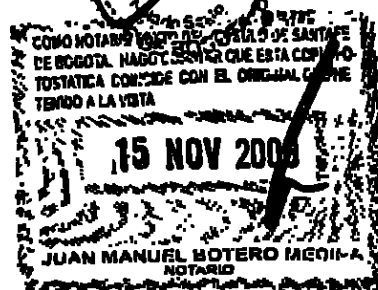
COLO 11214-801-001-3

Id. 6

Nov. 20/98

Maria E. Martelo
TRADUCCION No. 18.11.98
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTE AMERICANO(S) FIRMAS FUE(S) POR *[Signature]* IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s) *[Signature]* ES(SON) AUTENTICAS(S) SANTA FE DE BOGOTA. 23 NOV. 1998



198457
Maria E. Martelo
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 NOV 24 PM 12: 06
JEFES DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

Folios 46 y 47
torjetas
C

Nota:
Se retira folio 48 Extrado de publicación y
dies 12 x 12 para publicación

Expediente No		No de Folios
Item	No de unidades	
1	CD	
2	DVD	
3	REVISTA	
4	LIBRO	
5	PERIODICO	
6	DISQUETES	
7	SOBRE DE MANILA X	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO	
10	OTROS:	
Observaciones: un sobre 9' no contiene Informacion.		

FO 47

SUPERINTENDENCIA Y OFICINA	
Indicacion : 6030231 CANCELACION	Folio: 58
Fecha CRE: 2003-12-05 11:09:53	
Tramite : CDR PATENTES D I NEGOTIO/ 411 PRESENTE	
Dependencia: 3003 DIVISION DE RECURSOS FINANCIEROS	

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 70,302
FECHA : NOVIEMBRE 14 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	Nº. PAGO	Nr. PAGO
CANELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	030-00110-6	2025229	40,023,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. MONETARIO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	600,000.00
	TOTAL :	600,000.00

SUM: SEISCIENTOS CERO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

660 14714-801-022-9

AKZO NOBEL N.V
COE: 11214.00/ 022-9

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION [☒]MODELO DE UTILIDAD [☐]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☐]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☐]
- Descripción de la invención [☐]
- Dibujos de ser estos pertinentes [☐]
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas [☐]

COMPLETA [☒]INCOMPLETA [☐]DISEÑO INDUSTRIAL [☐]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. [☐]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [☐]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. [☐]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. [☐]

COMPLETA [☐]INCOMPLETA [☐]ESQUEMA DE TRAZADO [☐]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. [☐]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [☐]
- Representación gráfica del esquema de trazado [☐]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. [☐]

COMPLETA [☐]INCOMPLETA [☐]

 Firma Responsable

Fecha: _____