



CSA850368



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

09-70741

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

OK
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

TITULO: FORMULACIONES DE DOSIS UNITARIA Y MÉTODOS PARA EL
TRATAMIENTO DE LA TROMBOSIS CON UN INHIBIDOR ORAL DEL FACTOR
XA

SOLICITANTE: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC

DIRECCIÓN: 40 Landsdowne Street, Cambridge, Massachusetts

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 07 de Julio de 2009

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-070741- -00000-0000

Fecha: 2009-07-08 17:01:56 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 245

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000128

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **MILLENNIUM**

PHARMACEUTICALS, INC

Dirección: 40 Landsdowne Street, Cambridge,
Massachusetts

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **CARLOS R. OLARTE**

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8ª-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **1) UMA SINHA 2) STANLEY J. HOLLENBACH 3) KEITH ABE**

Dirección: **1)808 Junipero Serra Boulevard, San Francisco, California 94127, USA**
2)450 Alta Vista Drive, South San Francisco California 94080, USA 3) 57 Sable
Pointe, Alameda, California 94502, USA

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/084887

Fecha

Noviembre 15, 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/073670

Fecha

Junio 19, 2008

6

Título (54) FORMULACIONES DE DOSIS UNITARIA Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA TROMBOSIS CON UN INHIBIDOR ORAL DEL FACTOR XA

Clasificación Internacional (51) A61K 31/40, A61P 7/02, A61K 31/4164, A61K 31/435, A61K 31/4409, A61K 31/4412, A61K 31/535

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Diciembre 8, 2006

Julio 2, 2007

(31) Número de Solicitud

60/873.792

60/947.629

9

Comprobante de pago No. 09-47.661

Fecha 01 de julio de 2009



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No.



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

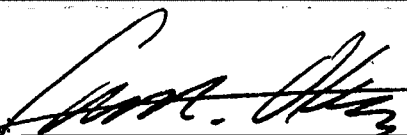


FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-070741- -00000-0000

Fecha: 2009-07-08 17:01:56 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 245

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 47,661
FECHA : JULIO 1 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	110378903	01/07/2009	7,760,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

MON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 June 2008 (19.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/073670 A2

(51) International Patent Classification:

A61K 31/40 (2006.01) A61K 31/4409 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01) A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01) A61K 31/535 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2007/084887

(22) International Filing Date:

15 November 2007 (15.11.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/873,792 8 December 2006 (08.12.2006) US
60/947,629 2 July 2007 (02.07.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US];
40 Landsdowne Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **SINHA, Uma** [US/US]; 808 Junipero Serra Boulevard, San Francisco, California 94127 (US). **HOLLENBACH, Stanley J.** [US/US]; 450 Alta Vista Drive, South San Francisco,

California 94080 (US). **ABE, Keith** [US/US]; 57 Sable Pointe, Alameda, California 94502 (US).

(74) Agent: **TANNER, Lorna L.**; FOLEY & LARDNER LLP, 975 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304-1013 (US).

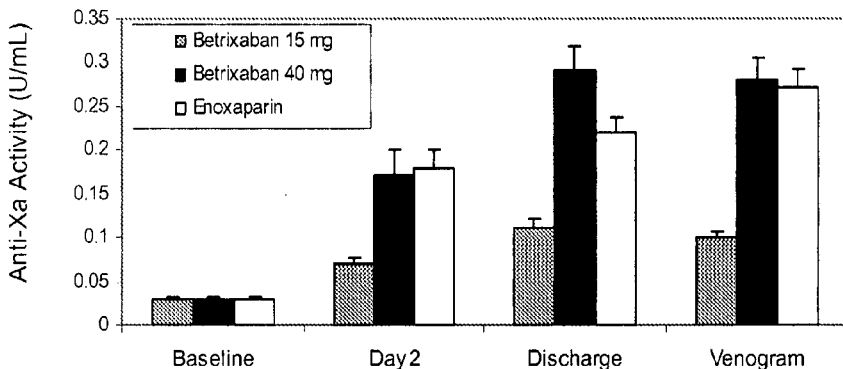
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(54) Title: UNIT DOSE FORMULATIONS AND METHODS OF TREATING THROMBOSIS WITH AN ORAL FACTOR XA INHIBITOR



(57) Abstract: Unit doses of factor Xa inhibitor compounds and methods of using these compounds for inhibiting blood coagulation in a human patient are taught herein. The unit dose of the factor Xa inhibitor compounds disclosed herein required to inhibit coagulation in a primate is lower than the unit dose required to obtain similar levels of coagulation inhibition in other animal models, such as rodents. Also taught are in vitro assays useful in predicting in vivo antithrombotic activity in humans.

WO 2008/073670 A2

UNIT DOSE FORMULATIONS AND METHODS OF TREATING THROMBOSIS WITH AN ORAL FACTOR XA INHIBITOR

5

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit under 35 U.S.C. § 119(e) of United States Provisional Patent Application Nos. 60/873,792 filed on December 8, 2006 and 60/947,629 filed on July 2, 2007, both of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10

Field of the Invention

This invention is directed to methods of inhibiting coagulation using a particular dose of a factor Xa inhibitor. The invention is also directed to an assay that measures thrombin generation in blood to assess the antithrombotic activity of a test compound.

15

State of the Art

Hemostasis, the control of bleeding, occurs by surgical means, or by the physiological properties of vasoconstriction and coagulation. Although platelets and blood coagulation are both involved in restoring hemostasis and in thrombotic diseases, certain components of the coagulation cascade are primarily responsible for the amplification and acceleration of the processes involved in platelet aggregation and fibrin deposition which are major events in thrombosis and hemostasis.

Clot formation involves the conversion of fibrinogen to fibrin which polymerizes into a network to restore hemostasis after injury. A similar process results in occluded blood vessels in thrombotic diseases. The conversion of fibrinogen to fibrin is catalyzed by thrombin, the end product of a series of reactions in the blood coagulation cascade. Thrombin is also a key player in activating platelets, thereby contributing to thrombosis under conditions of both arterial and venous blood flow. For these reasons, it has been postulated that efficient regulation of thrombin can lead to efficient regulation of thrombosis. Several classes of currently used anticoagulants directly or indirectly affect thrombin (i.e. unfractionated heparins, low-molecular weight heparins, heparin-like compounds, pentasaccharide and warfarin). Direct or indirect inhibition of thrombin

6

activity has also been the focus of a variety of anticoagulants in clinical development (reviewed by Eriksson and Quinlan, *Drugs* 11: 1411-1429, 2006).

Prothrombin, the precursor for thrombin, is converted to the active enzyme by factor Xa (fXa). Localized activation of tissue factor/factor VIIa mediated factor Xa generation is amplified by the factor IXa/factor VIIIa complex and leads to prothrombinase assembly on activated platelets. Factor Xa, as a part of the prothrombinase complex, is the sole enzyme responsible for sustained thrombin formation in the vasculature. Factor Xa is a serine protease, the activated form of its precursor Factor X, and a member of the calcium ion binding, gamma carboxyglutamic acid (GLA)-containing, vitamin K dependent, and blood coagulation factors. Unlike thrombin, which acts on a variety of protein substrates including fibrinogen and the PAR receptors (Protease activated receptors, Coughlin, *J. Thrombosis Haemostasis* 3: 1800-1814, 2005), factor Xa appears to have a single physiologic substrate, namely prothrombin. Since one molecule of factor Xa may be able to generate greater than 1000 molecules of thrombin (Mann, *et al.*, *J. Thrombosis Haemostasis* 1: 1504-1514, 2003), direct inhibition of factor Xa as a way of indirectly inhibiting the formation of thrombin may be an efficient anticoagulant strategy. This assertion is based on the key role of prothrombinase in thrombin synthesis and on the fact that inhibition of prothrombinase will have a pronounced effect on the overall platelet aggregation and clotting pathways.

Activated proteases such as factor VIIa, factor IXa or factor Xa have poor proteolytic activity on their own. However, their assembly into cofactor-dependent, membrane-bound complexes significantly enhances their catalytic efficiencies. This effect is most dramatic for factor Xa, where the efficiency is increased by a factor of 10^5 (Mann, *et al.*, *Blood* 76(1):1-16, 1990). Due to the higher concentration of the zymogens present in blood (1.4 μ M prothrombin versus 150 nM factor Xa) and the kinetics of activation, a smaller amount of factor Xa than thrombin needs to be inhibited to achieve an anticoagulant effect. Indirect proof of the hypothesis of superiority of factor Xa as a therapeutic target compared to thrombin can also be found in clinical trials for the prevention of deep vein thrombosis. Fondaparinux, an antithrombin III dependent factor Xa inhibitor, was proven to be superior to enoxaparin (a low molecular weight heparin that inhibits both thrombin and factor Xa) in four trials of orthopedic surgery (Turpie, *et al.*, *Archives Internal Medicine*

7

162(16): 1833-1840, 2002). Therefore, it has been suggested that compounds which selectively inhibit factor Xa may be useful as *in vitro* diagnostic agents, or for therapeutic administration in certain thrombotic disorders, see *e.g.*, WO 94/13693.

SUMMARY OF THE INVENTION

5 Comparative modeling of the extent of changes in prothrombinase activity to levels of antithrombotic efficacy has lead to the discovery of the therapeutic activity in humans of factor Xa inhibitors. This invention is directed to a method of inhibiting coagulation in a human patient using a coagulation inhibiting amount of a factor Xa inhibitor. Specifically, orally available direct inhibitors of factor Xa are effective to inhibit
10 coagulation in a human patient when administered to the patient in an aggregate daily amount of between about 0.01 and about 2.0 milligrams per kilogram based on the total weight of the patient ("mg/kg"). It is contemplated that this dose will be effective for any compound which specifically inhibits factor Xa and particularly effective for factor Xa inhibitors of Formula I, II, III, IV or V described below.

15 The invention is also directed to a method of assessing the coagulation status of the patient. It is contemplated that this method of assessing the coagulation status may be used to test a number of different classes of anticoagulants in addition to factor Xa inhibitors.

In one aspect of the invention, the method comprises administering to the
20 patient a coagulation inhibiting amount of a compound of Formula I:

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

I

wherein:

A is selected from:

- 25 (a) C₁-C₆-alkyl;
(b) C₃-C₈-cycloalkyl;
(c) -N(R¹,R²), N(R¹,R²)-C(=NR³)-, N(R¹,R²)-C(=NR³)-N(R⁴)-, R¹-C(=NR³)-, R¹-C(=NR³)-N(R⁴)-;
(d) phenyl, which is independently substituted with 0-2 R substituents;
30 (c) naphthyl, which is independently substituted with 0-2 R substituents; and

8

a monocyclic or fused bicyclic heterocyclic ring system having from 5 to 10 ring atoms, wherein 1-4 ring atoms of the ring system are selected from N, O and S, and wherein the ring system may be substituted with 0-2 R substituents;

5 R is selected from:

H, halo, -CN, -CO₂R¹, -C(=O)-N(R¹, R²), -(CH₂)_m-CO₂R¹, -(CH₂)_m-C(=O)-N(R¹, R²), -NO₂, -SO₂N(R¹, R²), -SO₂R¹, -(CH₂)_mNR¹R², -(CH₂)_m-C(=NR³)-R¹, -(CH₂)_m-C(=NR³)-N(R¹, R²), -(CH₂)_m-N(R⁴)-C(=NR³)-N(R¹, R²), -(CH₂)_mNR¹-group appended to a 3 to 6 membered heterocyclic ring containing from 1-4
 10 heteroatoms selected from N, O and S, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkyl-C₃₋₈cycloalkyl, -CF₃, -OR², and a 5-6 membered heterocyclic system containing from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₁₋₄alkyl-CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

15 m is an integer of 0-2;

R¹, R², R³ and R⁴ are independently selected from the group consisting of:

H, -OR⁵, -N(-R⁵, -R⁶), -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylphenyl and -C₀₋₄alkylnaphthyl, wherein from
 20 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂; or R¹ and R², or R² and R³ taken together can form a 3-8 membered cycloalkyl or a heterocyclic ring system, wherein the heterocyclic ring system may
 25 have from 3 to 10 ring atoms, with 1 to 2 rings being in the ring system and contain from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic ring system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, C₁₋₄alkyl, -CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

30 R⁵ and R⁶ are independently selected from the group consisting of:

9

H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylphenyl and -C₀₋₄alkylnaphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂; or R⁵ and R⁶ taken together can form a 3-8 membered cycloalkyl or a heterocyclic ring system, wherein the heterocyclic ring system may have from 3 to 10 ring atoms, with 1 to 2 rings being in the ring system and contain from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic ring system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

Q is a member selected from the group consisting of:

a direct link, -CH₂-, -C(=O)-, -O-, -N(R⁷)-, -N(R⁷)CH₂-, -CH₂N(R⁷)-, -C(=NR⁷)-, -C(=O)-N(R⁷)-, -N(R⁷)-C(=O)-, -S-, -SO-, -SO₂-, -SO₂-N(R⁷)- and -N(R⁷)-SO₂;

R⁷ is selected from:

H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylenphenyl and -C₀₋₄alkylenenaphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂;

D is a direct link or is a member selected from the group consisting of:

- (a) phenyl, which is independently substituted with 0-2 R^{1a} substituents;
- (b) naphthyl, which is independently substituted with 0-2 R^{1a} substituents; and
- (c) a monocyclic or fused bicyclic heterocyclic ring system having from 5 to 10 ring atoms, wherein 1-4 ring atoms of the ring system are selected from N, O and S, and wherein the ring system may be substituted from 0-2 R^{1a} substituents;

R^{1a} is selected from:

10

halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, -NO₂, -(CH₂)_nNR^{2a}R^{3a}, -(CH₂)_nCO₂R^{2a}, -(CH₂)_nCONR^{2a}R^{3a}, -SO₂NR^{2a}R^{3a}, -SO₂R^{2a}, -CF₃, -OR^{2a}, and a 5-6 membered aromatic heterocyclic system containing from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4

5 hydrogen atoms on the aromatic heterocyclic system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN and -NO₂;

R^{2a} and R^{3a} are independently selected from the group consisting of:

H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-phenyl and -C₀₋₄alkylene-naphthyl, wherein from 1-4

10 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN and -NO₂;

15 n is an integer of 0-2;

E is a direct link or a member selected from the group consisting of:

-C₁₋₂-alkylene-, -O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -C₀₋₁-alkylene-C(=O)-, -C₀₋₁-alkylene-C(=O)-N(-R⁸)-, -C₀₋₁-alkylene-, -C₀₋₁-alkylene-N(-R⁸)-C(=O)-C₀₋₁-alkylene-, -N(-R⁸)-C(=O)-N(-R⁸)- and -C₀₋₁-alkylene-N(-R⁸)-;

20 R⁸ is a member selected from the group consisting of:

H; -C₁₋₄-alkyl; -C₀₋₄-alkylenearyl; -C₀₋₄-alkylene-heteroaryl; -C₁₋₄-alkylene-C(=O)-OH, -C₁₋₄-alkylene-C(=O)-O-C₁₋₄-alkyl, and -C₁₋₄-alkylene-C(=O)-N(-R^{2b}, -R^{3b});

R^{2b} and R^{3b} are each a member independently selected from the group consisting of:

25 H, -C₁₋₄-alkyl, -C₀₋₄-alkylene-aryl; -C₀₋₄-alkylene-heterocyclic group, and R^{2b} and R^{3b} together with the N atom to which they are attached can form a 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein the heterocyclic ring may be substituted with 0-2 R^{1c} groups;

R^{1c} is a member selected from the group consisting of:

30 halo; -C₁₋₄-alkyl; -CN; -NO₂; -C(=O)-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -C(=O)-OR^{2c}; -(CH₂)_q-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -SO₂-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -SO₂R^{2c}; -CF₃; and -(CH₂)_q-OR^{2c};

R^{2c} and R^{3c} are each independently a member selected from the group consisting of:

H; $-C_{1-4}$ -alkyl; and $-C_{1-4}$ -alkylene-aryl;

q is an integer of 0-2;

G is a member selected from the group consisting of:

- 5 (a) C_2 -alkenyl or C_{3-8} -cycloalkenyl, wherein the alkenyl and cycloalkenyl attachment points are the alkenyl carbon atoms and wherein the $-C_2$ -alkenyl or $-C_{3-8}$ -cycloalkenyl are substituted with 0-4 R^{1d} groups;
- (b) a phenyl group wherein the ring carbon atoms of the phenylene group are substituted with 0-4 R^{1d} groups;
- 10 (c) a 3-8 membered heterocyclic ring system containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein 0-2 ring atoms of the heterocyclic ring may be substituted with 0-4 R^{1d} groups; and,
- (d) an 8-10 membered fused heterocyclic bicyclic ring system, containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein 0-2 ring atoms of the fused
- 15 bicyclic ring system may be substituted with 0-4 R^{1d} groups;

R^{1d} is a member selected from the group consisting of:

- H, halo; C_{1-6} -alkyl, aryl, $-CN$; $-NO_2$; $-(CH_2)_{0-6}-NR^{2d}R^{3d}$; $-SO_2NR^{2d}R^{3d}$; $-SO_2R^{2d}$; $-CF_3$; $-(CH_2)_{0-6}-OR^{2d}$; $-O-(CH_2)_{1-6}OR^{2d}$; $-O-(CH_2)_{1-6}-C(=O)-O-R^{2d}$; $-O-(CH_2)_{1-6}-C(=O)-N(R^{2d}, R^{3d})$; $-N(R^{5a})-(CH_2)_{1-6}-OR^{2d}$; $-N(R^{5a})-(CH_2)_{1-6}-N(R^{2d}, R^{3d})$; $-C(=O)-N(R^{2d}, R^{3d})$; $-N(R^{5a})-(CH_2)_{1-6}-C(=O)-N(R^{2d}, R^{3d})$; $-N(-(CH_2)_{1-6}-OR^{2d})_2$; $-N(R^{5a})-(CH_2)_{1-6}-OR^{2d}$; $-N(R^{5a})-C(=O)-R^{2d}$; $-N(R^{5a})-SO_2-R^{2d}$; $-(CH_2)_{0-6}-C(=O)-O-R^{2d}$; $-(CH_2)_{0-6}-C(=O)-N(R^{2d}, R^{3d})$; $-(CH_2)_{0-6}-C(=NR^{2d})-N(R^{3d}, R^{4d})$; $-(CH_2)_{0-6}-N(R^{5a})C(=NR^{2d})-N(R^{3d}, R^{4d})$; a $-(CH_2)_{0-6}-N(R^{3d})C_{5-6}$ membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, and a
- 20 $-(CH_2)_{0-6}-5-6$ membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S;

R^{5a} , R^{2d} , R^{3d} and R^{4d} are each independently a member selected from the group consisting of:

- H; C_{1-6} -alkyl; C_{1-6} -alkylaryl; $-CN$; $-NO_2$; carbocyclic aryl; $-CN$; $-NO_2$; or R^{2d} and R^{3d} taken together with the N atoms they are independently attached form a 5-7
- 30 membered heterocyclic ring; or R^{3d} and R^{4d} taken together with the N atom to

12

which they are attached form a 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S;

J is a direct link or is a member selected from the group consisting of:

-N(-R⁹)-C(=O)-; -C(=O)-N(-R⁹)-; -O-; -S-; -SO-; -SO₂-; -CH₂-; -N(-R⁹)-; and
5 -N(-R⁹)-SO₂-;

R⁹ is a member selected from the group consisting of:

H; -C₁₋₄-alkyl; -C₀₋₄-alkyl-carbocyclic aryl; -(CH₂)_{0.4-5-6} membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S; -(CH₂)₁₋₆-C(=O)-O-C₁₋₄-alkyl; and -(CH₂)₁₋₆-C(=O)-N(R^{6a}, R^{6b});

10 R^{6a} and R^{6b} are each a member independently selected from the group consisting of:

H and -C₁₋₆-alkyl;

X is a member selected from the group consisting of:

- (a) phenyl substituted with 0-3 R^{1c} groups;
- (b) naphthyl substituted with 0-3 R^{1c} groups and
- 15 (c) a 6-membered aromatic heterocyclic ring system containing 1-3 N atoms and having 0-3 ring atoms substituted with 0-3 R^{1c} groups; and
- (d) an 8-10 membered fused aromatic heterocyclic bicyclic ring system containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S and 0-3 ring atoms of the fused heterocyclic bicyclic ring system are substituted with 0-3 R^{1c}
20 groups;

R^{1c} is a member independently selected from the group consisting of:

Halo; CF₃; -C₁₋₄-alkyl; carbocyclic aryl; -C₀₋₂-alkylene-CN; -O-R^{2e};
-C₀₋₂-alkylene-C(=O)-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-NO₂;
-C₀₋₂-alkylene-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-SO₂-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-SO₂-R^{2e};
25 trihaloalkyl; -O-C₀₋₂-alkylene-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-O-R^{2e}; -O-C₁₋₄-alkylene-C(=O)-N(R^{2c}, R^{3c}); -O-C₁₋₄-alkylene-C(=O)-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-N(R^{2e})-C(=O)-R^{3e}; -C₀₋₂-alkylene-N(-R^{2e})-SO₂-R^{3e}; -CH₂-N(R^{2e})-C(=O)-R^{3e};
;-CH₂-N(R^{2e})-SO₂-R^{3e}; -(CH₂)₀₋₆-NR^{2e}R^{3e}; -C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e}); -N(-(CH₂)₁₋₆-OR^{2e})₂;
-N(R¹⁰)-(CH₂)₁₋₆-OR^{2e}; -N(R¹⁰)-C(=O)-R^{2e}; -N(R¹⁰)-SO₂-R^{2e};
30 -C(=N(R¹⁰))-N(R^{2e}, R^{3e}); and a -(CH₂)₀₋₆-5-6 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S;

3

R^{10} , R^{2c} and R^{3c} are each independently a member selected from the group consisting of:

H; $-C_{1-4}$ -alkyl; $-C_{0-2}$ -alkylene-O- R^{1g} ; $-C_{0-2}$ -alkylene-

N($-R^{1g}$, $-R^{2g}$); $-C_{1-4}$ -alkylene-carbocyclic aryl; $-C_{1-4}$ -alkylene-heterocyclic; and R^{10}

and R^{2c} , or R^{2c} and R^{3c} together with the N atom to which they are attached can form

5 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S which can be substituted with 0-2 R^{1g} groups;

R^{1g} and R^{2g} are independently a member selected from the group of:

H; halo; $-C_{1-4}$ -alkyl, a carbocyclic aryl group; a heterocyclic group; -CN;

$-C(=O)-N(R^{3g})R^{4g}$; $-C(=O)-OR^{3g}$; $-NO_2$; $-(CH_2)_p-NR^{3g}R^{4g}$; $-SO_2NR^{3g}R^{4g}$; $-SO_2R^{3g}$;

10 $-CF_3$; and $-(CH_2)_pOR^{3g}$;

p is an integer of 0-2; and

R^{3g} and R^{4g} are each independently selected from the group consisting of:

H; C_{1-4} -alkyl and $-C_{0-4}$ -alkylene-carbocyclic aryl;

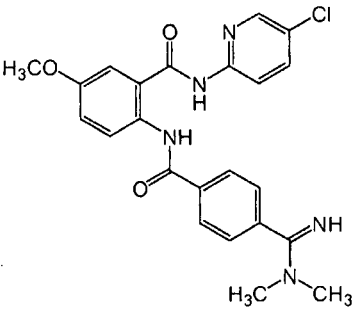
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15 In one embodiment, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between about 0.01 and about 2.0 mg/kg. In another embodiment, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.1 and 1.5 mg/kg. In yet another embodiment, the amount is between about 0.4 and about 1.2 mg/kg.

20 In one embodiment, the coagulation inhibiting amount is administered to the patient once a day. In another embodiment, the coagulation inhibiting amount is administered to the patient in one day but dosed several times a day, i.e., twice ("BID") or three times a day ("TID").

25 In one embodiment, the pharmaceutically acceptable salt of the factor Xa inhibitor compound is a malcate salt. In another embodiment, the compound of formula I is the compound of formula II:

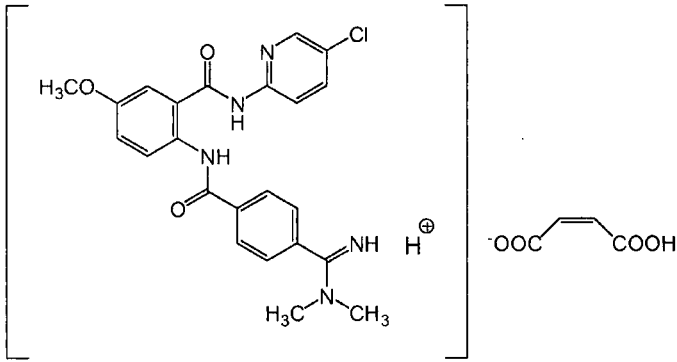
14



II

or pharmaceutically acceptable salt thereof. In some embodiments, the salt is a maleate salt. In one embodiment, the coagulation inhibiting amount is an aggregate daily
5 dose from between about 0.01 and about 2.0 mg/kg or between about 0.1 and about 1.5 mg/kg or between about 0.4 and about 1.2 mg/kg.

In another embodiment, the factor Xa inhibitor compound is the maleate salt having the structure of formula III:



III

10

This invention is also directed to a unit dose formulation comprising a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound of Formula I, II, IV, or V (as described below) or a pharmaceutically acceptable salt thereof, or the salt of Formula
15 III. In some embodiments, the coagulation inhibiting amount is between about 0.01 and about 2.0 mg/kg. In other embodiments, the dose is between about 0.1 and about 1.5 mg/kg or between about 0.4 and about 1.2 mg/kg.

S

The invention is also directed to an *in vitro* assay to determine the *in vivo* antithrombotic properties of a compound. The assay comprises the following steps:

- a) introducing a test compound into an *in vitro* sample of whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate to form a test sample;
- b) determining the level of thrombin activity in the test sample by monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the test sample as a function of time;
- c) determining the level of thrombin activity in a control sample by monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the control sample as a function of time, wherein the control sample comprises whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate;
- d) comparing the level of thrombin activity in the test sample and the control sample, wherein a lower level of thrombin activity in the test sample is an indication that the test compound has *in vivo* antithrombotic activity.

The blood and plasma may be anticoagulated or nonanticoagulated.

In certain embodiments of the invention, the detectably-labeled thrombin substrate is a Z-Gly-Gly-Arg-AMC.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1A shows the correlation of thrombin generation with the international normalized ratio (INR) in anticoagulated patients treated with warfarin. Thrombin generation was measured at 10 minutes in plasma samples from patients receiving stable warfarin therapy (n = 137). Data from patients receiving warfarin therapy is presented as quintiles of the INR results. Error bars show standard errors.

FIG. 1B shows the correlation of thrombin generation with activated partial thromboplastin time (aPTT) in anticoagulated patients treated with enoxaparin. Plasma thrombin generation was measured in 16 enoxaparin-treated patients. Anti-fXa units were measured by COATEST LMW assay according to the manufacturer's instructions. Groups were compared by Student's t-test.

FIG. 1C shows the correlation of thrombin generation with aPTT in anticoagulated patients treated with unfractionated heparin (UFH). Plasma thrombin

CB

generation was measured in 15 patients. Anti-fXa units were measured by COATEST LMW assay according to the manufacturer's instructions. Groups were compared by Student's t-test.

FIG. 2 shows the dose responsive inhibition of *in vivo* thrombosis in the baboon model and provides evidence that the *in vitro* assay is predictive of *in vivo* antithrombotic activity. Indium labeled platelet deposition in the chamber over time following infusion of vehicle or betrixaban. The number of labeled platelets in the chamber were normalized for pre-infusion platelet counts for individual animals. Data represent mean $\pm$ standard deviation. Platelet deposition at 140 minutes was analyzed by ANOVA followed by Dunnett's post-test. Dose 3 (26-38 ng/ml) had a significant decrease compared to control ($P < 0.05$) and dose 4 (54-88 ng/ml) had a significant decrease compared to control ($P \text{ value} < 0.01$).

FIG. 3 shows dose responsive inhibition of thrombin generation in whole blood from healthy human volunteers. Whole blood was treated with the stated concentration (in nM) of betrixaban prior to initiation of test. Relative fluorescence units resulting from cleavage of labeled thrombin substrate is shown.

FIGS. 4A and 4B shows dose responsive inhibition of thrombin generation in whole blood from healthy human volunteers. Whole blood was treated with the stated concentration of fondaparinux (in nM) prior to initiation of test. The range of fondaparinux concentration depicted in FIG. 4B corresponds to levels of therapeutic anticoagulation used in orthopedic surgery and acute coronary syndrome patients. Relative fluorescence units resulting from cleavage of labeled thrombin substrate is shown.

FIG. 5 shows data from *in vitro* assays performed with plasma from healthy human volunteers orally dosed with betrixaban. This is more thoroughly discussed in Example 8.

FIG. 6 shows the percentage of patients with venous thromboembolism (VTE) and 95% confidence intervals for betrixaban and enoxaparin as determined by the study in Example 9 with unilateral venography between Days 10 and 14 and for enoxaparin historical controls (B and C) from studies using bilateral venography performed between Days 10 and 14 post orthopedic surgery (total knee replacement). This is more thoroughly discussed in Example 9. The details of the study corresponding to Enox B are reported in

17

Blood **102** (11); 2003. The details of the study corresponding to Enox C are reported in the reference by Lassen et al. (*J Thromb Haemostasis* 2007, September 15).

FIG. 7 shows the reduction from baseline thrombin generation upon treatment with varying doses of betrixaban and enoxaparin at day 2, discharge and the venogram. Mean change from baseline relative fluorescence units ($\pm$ standard error of the mean) in plasma thrombin generation, by visit and treatment is shown. Patients discharged on Day 2 are also represented in the average value for that study day.

FIG. 8 shows the changes in anti-fXa activity of the varying doses of betrixaban and enoxaparin at day 2, discharge and the venogram. Mean ($\pm$ standard error of the mean) anti-fXa activity (U/mL), as measured by Coatest LMW heparin assay, by visit and treatment is shown. The detectable limit for anti fXa was 0.05 U/ml; values below the detectable limit were set to 0.025. Patients discharged on Day 2 are also represented in the average value for that study day.

FIG. 9 shows the betrixaban concentration in plasma (ng/mL) of the varying doses of betrixaban at day 2, discharge and the venogram.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before the compositions and methods are described, it is to be understood that the invention is not limited to the particular methodologies, protocols, cell lines, assays, and reagents described, as these may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is intended to describe particular embodiments of the present invention, and is in no way intended to limit the scope of the present invention as set forth in the appended claims.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods, devices, and materials are now described. All technical and patent publications cited herein are incorporated herein by reference in their entirety. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

d

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of tissue culture, immunology, molecular biology, microbiology, cell biology and recombinant DNA, which are within the skill of the art. See, e.g., Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd 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*, 5th 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*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)).

All numerical designations, e.g., pH, temperature, time, concentration, and molecular weight, including ranges, are approximations which are varied (+) or (-) by increments of 0.1. It is to be understood, although not always explicitly stated that all numerical designations are preceded by the term "about". It also is to be understood, although not always explicitly stated, that the reagents described herein are merely exemplary and that equivalents of such are known in the art.

1. Definitions

In accordance with the present invention and as used herein, the following terms are defined with the following meanings, unless explicitly stated otherwise.

As used in the specification and claims, the singular form "a", "an" and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise. For example, the term "a cell" includes a plurality of cells, including mixtures thereof.

19

As used herein, the term "comprising" or "comprises" is intended to mean that the compositions and methods include the recited elements, but not excluding others. "Consisting essentially of" when used to define compositions and methods, shall mean excluding other elements of any essential significance to the combination for the stated purpose. Thus, a composition consisting essentially of the elements as defined herein would not exclude trace contaminants from the isolation and purification method and pharmaceutically acceptable carriers, such as phosphate buffered saline, preservatives and the like. "Consisting of" shall mean excluding more than trace elements of other ingredients and substantial method steps for administering the compositions of this invention or process steps to produce a composition or achieve an intended result. Embodiments defined by each of these transition terms are within the scope of this invention.

The term "aggregate daily dose" refers to the amount of drug or compound administered in a 24 hour period.

The term "test sample" or "assay solution" comprises whole blood or blood plasma (either anticoagulated or nonanticoagulated), tissue factor ("TF"), a detectably-labeled thrombin substrate, and a test compound. The solution may also contain a number of suitable solvents, such as dimethylsulfoxide (DMSO). In one embodiment, the blood or plasma in the test sample or assay solution is not treated or titrated with enzymes, including reptile venom enzymes, such as Reptilase®. In another embodiment, the blood or plasma is not platelet-rich.

The term "tissue factor" or TF is present in subendothelial tissue, platelets, and leukocytes and is necessary for the initiation of thrombin formation from the zymogen prothrombin. TF is also referred to as thromboplastin, factor III, or CD142. The TF used in the methods of this invention are preferably human recombinant human TF which is commercially available from Dade Behring Pharmaceuticals or American Diagnostica, Inc. The TF used in the assays may also be endogenous or a combination of endogenous and exogenous.

The term "test compound" as used herein refers to a non-peptidic compound having a molecular weight of less than 1500 Daltons. This term also refers to small heparinoid and saccharide moieties having of molecular weight of less than 5000 Daltons.



The term "control sample" refers to the test sample or assay solution with the where the test compound is absent.

The term "nonanticoagulated whole blood" refers to blood collected from a patient which has not received anticoagulation therapy by an antithrombotic agent. This
5 also refers to blood from a patient that may have received anticoagulation therapy but any benefit or effect is no longer realized.

The term "anticoagulated whole blood" or "anticoagulated plasma" refers to blood or plasma taken from patients who recently or are currently undergoing anticoagulant therapy. This also refers to blood from human donors which is obtained by venipuncture
10 and collected in a medium containing exogenously added anticoagulant such as citrate, EDTA, or heparin.

The term "detectably-labeled thrombin substrate" refers to a thrombin substrate that is labeled by any number of well-known detectable labels. These labels include, but are not limited to, fluorescent labels, phosphorescent labels, chemiluminescent
15 labels, electrochemiluminescent labels, and radioactive labels. In one embodiment of the invention, the labeled substrate is Z-Gly-Gly-Arg-AMC, commercially available from Bachem.

The term "antithrombotic activity" refers to the compounds ability to inhibit thrombus formation with acceptable effects on classical measures of coagulation
20 parameters, platelets, and platelet function. Conditions characterized by undesired thrombosis include those involving the arterial and venous vasculature. With respect to the coronary arterial vasculature, abnormal thrombus formation characterizes the rupture of an established atherosclerotic plaque which is the major cause of acute myocardial infarction and unstable angina, as well as also characterizing the occlusive coronary thrombus
25 formation resulting from either thrombolytic therapy or percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA).

With respect to the venous vasculature, abnormal thrombus formation characterizes the condition observed in patients undergoing major surgery in the lower extremities or the abdominal area who often suffer from thrombus formation in the venous
30 vasculature resulting in reduced blood flow to the affected extremity and a predisposition to pulmonary embolism. Abnormal thrombus formation further characterizes disseminated

intravascular coagulopathy which commonly occurs within both vascular systems during septic shock, certain viral infections and cancer, a condition wherein there is rapid consumption of coagulation factors and systemic coagulation which results in the formation of life-threatening thrombi occurring throughout the microvasculature leading to widespread organ failure.

Evidence of antithrombotic activity will lend to usefulness in anticoagulant therapy for preventing coagulation of stored whole blood and to prevent coagulation in other biological samples for testing or storage.

The term "alkenyl" refers to a trivalent straight chain or branched chain unsaturated aliphatic radical. The term "alkinyl" (or "alkynyl") refers to a straight or branched chain aliphatic radical that includes at least two carbons joined by a triple bond. If no number of carbons is specified alkenyl and alkynyl each refer to radicals having from 2-12 carbon atoms.

The term "alkyl" refers to saturated aliphatic groups including straight-chain, branched-chain and cyclic groups having the number of carbon atoms specified, or if no number is specified, having up to 12 carbon atoms. The term "cycloalkyl" as used herein refers to a mono-, bi-, or tricyclic aliphatic ring having 3 to 14 carbon atoms and preferably 3 to 7 carbon atoms. The term "alkylene" refers to an alkyl group which is divalent, i.e., -CH₂-.

As used herein, the terms "carbocyclic ring structure" and "C₃₋₁₆ carbocyclic mono, bicyclic or tricyclic ring structure" or the like are each intended to mean stable ring structures having only carbon atoms as ring atoms wherein the ring structure is a substituted or unsubstituted member selected from the group consisting of a stable monocyclic ring which is aromatic ring ("aryl") having six ring atoms; a stable monocyclic non-aromatic ring having from 3 to 7 ring atoms in the ring; a stable bicyclic ring structure having a total of from 7 to 12 ring atoms in the two rings wherein the bicyclic ring structure is selected from the group consisting of ring structures in which both of the rings are aromatic, ring structures in which one of the rings is aromatic and ring structures in which both of the rings are non-aromatic; and a stable tricyclic ring structure having a total of from 10 to 16 atoms in the three rings wherein the tricyclic ring structure is selected from the group consisting of: ring structures in which three of the rings are aromatic, ring structures in which two of

the rings are aromatic and ring structures in which three of the rings are non-aromatic. In each case, the non-aromatic rings when present in the monocyclic, bicyclic or tricyclic ring structure may independently be saturated, partially saturated or fully saturated. Examples of such carbocyclic ring structures include, but are not limited to, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, adamantyl, cyclooctyl, [3.3.0]bicyclooctane, [4.3.0]bicyclononane, [4.4.0]bicyclodecane (decalin), [2.2.2]bicyclooctane, fluorenyl, phenyl, naphthyl, indanyl, adamantyl, or tetrahydronaphthyl (tetralin). Moreover, the ring structures described herein may be attached to one or more indicated pendant groups via any carbon atom which results in a stable structure. The term "substituted" as used in conjunction with carbocyclic ring structures means that hydrogen atoms attached to the ring carbon atoms of ring structures described herein may be substituted by one or more of the substituents indicated for that structure if such substitution(s) would result in a stable compound.

The term "aryl" which is included with the term "carbocyclic ring structure" refers to an unsubstituted or substituted aromatic ring, substituted with one, two or three substituents selected from loweralkoxy (-O-C₁₋₆ alkyl), loweralkyl (-C₁₋₆ alkyl), loweralkylamino (-NRR, where 1 or 2 of R is loweralkyl), hydroxy, halogen, cyano, hydroxyl, mercapto, nitro, thioalkoxy (-S-alkyl), carboxaldehyde (-OC(O)-H), carboxyl (-C(O)OH), carboalkoxy (-C(O)-O-alkyl) and carboxamide (-C(O)-NH₂), including but not limited to carbocyclic aryl, heterocyclic aryl, and biaryl groups and the like, all of which may be optionally substituted. Preferred aryl groups include phenyl, halophenyl, loweralkylphenyl, naphthyl, biphenyl, phenanthrenyl and naphthacenyl.

The term "arylalkyl" which is included with the term "carbocyclic aryl" refers to one, two, or three aryl groups having the number of carbon atoms designated, appended to an alkyl group having the number of carbon atoms designated. Suitable arylalkyl groups include, but are not limited to, benzyl, picolyl, naphthylmethyl, phenethyl, benzyldryl, trityl, and the like, all of which may be optionally substituted.

As used herein, the term "heterocyclic ring" or "heterocyclic ring system" is intended to mean a substituted or unsubstituted member selected from the group consisting of stable monocyclic ring having from 5-7 members in the ring itself and having from 1 to 4 hetero ring atoms selected from the group consisting of N, O and S; a stable bicyclic ring structure having a total of from 7 to 12 atoms in the two rings wherein at least one of the

two rings has from 1 to 4 hetero atoms selected from N, O and S, including bicyclic ring structures wherein any of the described stable monocyclic heterocyclic rings is fused to a hexane or benzene ring; and a stable tricyclic heterocyclic ring structure having a total of from 10 to 16 atoms in the three rings wherein at least one of the three rings has from 1 to 4 hetero atoms selected from the group consisting of N, O and S. Any nitrogen and sulfur atoms present in a heterocyclic ring of such a heterocyclic ring structure may be oxidized. Unless indicated otherwise the terms "heterocyclic ring" or "heterocyclic ring system" include aromatic rings, as well as non-aromatic rings which can be saturated, partially saturated or fully saturated non-aromatic rings. Also, unless indicated otherwise the term "heterocyclic ring system" includes ring structures wherein all of the rings contain at least one hetero atom as well as structures having less than all of the rings in the ring structure containing at least one heteroatom, for example bicyclic ring structures wherein one ring is a benzene ring and one of the rings has one or more hetero atoms are included within the term "heterocyclic ring systems" as well as bicyclic ring structures wherein each of the two rings has at least one hetero atom. Moreover, the ring structures described herein may be attached to one or more indicated pendant groups via any hetero atom or carbon atom which results in a stable structure. Further, the term "substituted" means that one or more of the hydrogen atoms on the ring carbon atom(s) or nitrogen atom(s) of the each of the rings in the ring structures described herein may be replaced by one or more of the indicated substituents if such replacement(s) would result in a stable compound. Nitrogen atoms in a ring structure may be quaternized, but such compounds are specifically indicated or are included within the term "a pharmaceutically acceptable salt" for a particular compound. When the total number of O and S atoms in a single heterocyclic ring is greater than 1, it is preferred that such atoms not be adjacent to one another. Preferably, there are no more than 1 O or S ring atoms in the same ring of a given heterocyclic ring structure.

Examples of monocyclic and bicyclic heterocyclic ring systems, in alphabetical order, are acridinyl, azocinyl, benzimidazolyl, benzofuranyl, benzothiofuranyl, benzothiophenyl, benzoxazolyl, benzthiazolyl, benztriazolyl, benztetrazolyl, benzisoxazolyl, benzisothiazolyl, benzimidazalinyl, carbazolyl, 4 α H-carbazolyl, carbolinyl, chromanyl, chromenyl, cinnolinyl, decahydroquinolinyl, 2H,6H-1,5,2-dithiazinyl, dihydrofuro[2,3- β]tetrahydrofuran, furanyl, furazanyl, imidazolidinyl, imidazolyl, imidazolyl,

JH

1H-indazolyl, indolinyl, indoliziny, indolyl, 3H-indolyl, isobenzofuranyl, isochromanyl, isoindazolyl, isoindolinyl, isoindolyl, isoquinolinyl (benzimidazolyl), isothiazolyl, isoxazolyl, morpholinyl, naphthyridinyl, octahydroisoquinolinyl, oxadiazolyl, 1,2,3-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazolyl, 1,2,5-oxadiazolyl, 1,3,4-oxadiazolyl, oxazolidinyl, oxazolyl, oxazolidinyl, pyrimidinyl, phenanthridinyl, phenanthrolinyl, phenazinyl, phenoctiazinyl, phenoxathiinyl, phenoxazinyl, phthalazinyl, piperazinyl, piperidinyl, pteridinyl, purinyl, pyranyl, pyrazinyl, pyroazolidinyl, pyrazolinyl, pyrazolyl, pyridazinyl, pyridoxazole, pyridoimidazole, pyridothiazole, pyridinyl, pyridyl, pyrimidinyl, pyrrolidinyl, pyrrolinyl, 2H-pyrrolyl, pyrrolyl, quinazolinyl, quinolinyl, 4H-quinoliziny, quinoxalinyl, quinuclidinyl, tetrahydrofuran, tetrahydroisoquinolinyl, tetrahydroquinolinyl, 6H-1,2,5-thiadiazinyl, 1,2,3-thiadiazolyl, 1,2,4-thiadiazolyl, 1,2,5-thiadiazolyl, 1,3,4-thiadiazolyl, thianthrenyl, thiazolyl, thienyl, thienothiazolyl, thienooxazolyl, thienoimidazolyl, thiophenyl, triazinyl, 1,2,3-triazolyl, 1,2,4-triazolyl, 1,2,5-triazolyl, 1,3,4-triazolyl and xanthenyl. Preferred heterocyclic ring structures include, but are not limited to, pyridinyl, furanyl, thienyl, pyrrolyl, pyrazolyl, pyrrolidinyl, imidazolyl, indolyl, benzimidazolyl, 1H-indazolyl, oxazolinyl, or isatinoyl. Also included are fused ring and spiro compounds containing, for example, the above heterocyclic ring structures.

As used herein the term "aromatic heterocyclic ring system" has essentially the same definition as for the monocyclic and bicyclic ring systems except that at least one ring of the ring system is an aromatic heterocyclic ring or the bicyclic ring has an aromatic or non-aromatic heterocyclic ring fused to an aromatic carbocyclic ring structure.

The terms "halo" or "halogen" as used herein refer to Cl, Br, F or I substituents. The term "haloalkyl", and the like, refer to an aliphatic carbon radicals having at least one hydrogen atom replaced by a Cl, Br, F or I atom, including mixtures of different halo atoms. Trihaloalkyl includes trifluoromethyl and the like, for example.

The term "methylene" refers to -CH₂-.

The term "pharmaceutically acceptable salts" includes salts of compounds derived from the combination of a compound and an organic or inorganic acid. These compounds are useful in both free base and salt form. In practice, the use of the salt form

amounts to use of the base form; both acid and base addition salts are within the scope of the present invention.

“Pharmaceutically acceptable acid addition salts” refers to salts retaining the biological effectiveness and properties of the free bases and which are not biologically or otherwise undesirable, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid and the like, and organic acids such as acetic acid, propionic acid, glycolic acid, pyruvic acid, oxalic acid, maleic acid, malonic acid, succinic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, mandelic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, salicylic acid and the like.

“Pharmaceutically acceptable base addition salts” include those derived from inorganic bases such as sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium, magnesium, iron, zinc, copper, manganese, aluminum salts and the like. Particularly preferred are the ammonium, potassium, sodium, calcium and magnesium salts. Salts derived from pharmaceutically acceptable organic nontoxic bases include salts of primary, secondary, and tertiary amines, substituted amines including naturally occurring substituted amines, cyclic amines and basic ion exchange resins, such as isopropylamine, trimethylamine, diethylamine, triethylamine, tripropylamine, ethanolamine, 2-diethylaminoethanol, trimethamine, dicyclohexylamine, lysine, arginine, histidine, caffeine, procaine, hydrabamine, choline, betaine, ethylenediamine, glucosamine, methylglucamine, theobromine, purines, piperazine, piperidine, N-ethylpiperidine, polyamine resins and the like. Particularly preferred organic nontoxic bases are isopropylamine, diethylamine, ethanolamine, trimethamine, dicyclohexylamine, choline, and caffeine.

“Biological property” for the purposes herein means an *in vivo* effector or antigenic function or activity that is directly or indirectly performed by a compound of this invention that are often shown by *in vitro* assays. Effector functions include receptor or ligand binding, any enzyme activity or enzyme modulatory activity, any carrier binding activity, any hormonal activity, any activity in promoting or inhibiting adhesion of cells to an extracellular matrix or cell surface molecules, or any structural role. Antigenic functions include possession of an epitope or antigenic site that is capable of reacting with antibodies raised against it.

In the compounds of this invention, carbon atoms bonded to four non-identical substituents are asymmetric. Accordingly, the compounds may exist as diastereoisomers, enantiomers or mixtures thereof. The syntheses described herein may employ racemates, enantiomers or diastereomers as starting materials or intermediates.

5 Diastereomeric products resulting from such syntheses may be separated by chromatographic or crystallization methods, or by other methods known in the art. Likewise, enantiomeric product mixtures may be separated using the same techniques or by other methods known in the art. Each of the asymmetric carbon atoms, when present in the compounds of this invention, may be in one of two configurations (R or S) and both are
10 within the scope of the present invention.

2. Methods of Inhibiting Blood Coagulation and Unit Dose Formulations

One aspect of the invention provides methods of inhibiting blood coagulation in a human patient by administering to the patient a coagulation inhibiting amount of a factor Xa inhibitor compound. This aspect relates to the surprising discovery that the unit
15 dose of the factor Xa inhibitor compounds disclosed herein required to inhibit coagulation in a primate is lower than the dose unit required to obtain similar levels of coagulation inhibition in other animal models, such as rodents. As described further in the Examples and Figures, this species specificity was demonstrated in *in vivo* assays and by *in vitro* extensions of prothrombin time (PT) in rat, rabbit, baboon and human plasma. A two-fold
20 increase of PT was attained at concentrations of 8.9 μ M in rat and 1.6 μ M in rabbit as compared to the primates where the two-fold change in PT was observed at 1 μ M in baboon and 0.4 μ M in humans.

The factor Xa inhibitor compounds are useful in treating disease states in mammals which have disorders of coagulation such as in the treatment or prevention of
25 unstable angina, refractory angina, myocardial infarction, transient ischemic attacks, thrombotic stroke, embolic stroke, disseminated intravascular coagulation including the treatment of septic shock, deep venous thrombosis in the prevention of pulmonary embolism or the treatment of reocclusion or restenosis of reperfused coronary arteries. Further, these compounds are useful for the treatment or prophylaxis of those diseases
30 which involve the production and/or action of factor Xa/prothrombinase complex. This includes a number of thrombotic and prothrombotic states in which the coagulation cascade

is activated which include but are not limited to, deep venous thrombosis, pulmonary embolism, myocardial infarction, stroke, thromboembolic complications of surgery and peripheral arterial occlusion. Other diseases treatable or preventable by the administration of compounds of this invention include, without limitation, occlusive coronary thrombus formation resulting from either thrombolytic therapy or percutaneous transluminal coronary angioplasty, thrombus formation in the venous vasculature, disseminated intravascular coagulopathy, a condition wherein there is rapid consumption of coagulation factors and systemic coagulation which results in the formation of life-threatening thrombi occurring throughout the microvasculature leading to widespread organ failure, hemorrhagic stroke, renal dialysis, blood oxygenation, and cardiac catheterization.

Accordingly, one aspect of the invention provides for a method of inhibiting coagulation in a human patient in need thereof, comprising administering to the patient a coagulation inhibiting amount of a factor Xa inhibitor compound or pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.01 and 2.0 mg/kg. Specific embodiments of factor Xa inhibitor compounds are shown in Formula I, II, IV, V and salts thereof (such as Formula III) as set forth below. Further embodiments provide for methods of inhibiting coagulation in a human patient in need thereof, comprising administering to the patient a coagulation inhibiting amount of a factor Xa inhibitor compound, or pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.05 and 2.0 mg/kg; alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.1 and 2.0 mg/kg; or alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.1 or 0.2 and 1.5 mg/kg; or alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.4 and 1.2 mg/kg; or alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.43 and 1.15 mg/kg; or alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.45 and 0.55 mg/kg. In still another embodiment of the invention, the amount of

the factor Xa inhibitor compound administered to a human is such that the serum level is about 1 μ M or less.

Another aspect of the invention provides for the unit dose formulations comprising a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a coagulation inhibition amount of the factor Xa inhibitor compound, or pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose between 0.01 to 2.0 mg/kg; alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.05 and 2.0 mg/kg; alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.1 and 2.0 mg/kg; or alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.2 and 1.5 mg/kg; or alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.4 and 1.2 mg/kg; or alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between 0.43 and 1.15 mg/kg; or alternatively, the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between about 0.45 and about 0.55 mg/kg.

The formulations are further described in the section titled "formulations."

3. Thrombin Generation Assay

Current measures for monitoring coagulation status (activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), international normalized ratio (INR), activated clotting time (ACT), anti fXa units) have been developed for existing anticoagulants (i.e., heparins and warfarin). The available tests are not sensitive enough to evaluate therapeutic concentrations of direct fXa inhibitors.

Since the true target of fXa inhibitors is the membrane associated prothrombinase complex, an assay measuring thrombin generation would be a superior measure of the level of anticoagulation achieved in patients dosed with direct fXa inhibitors. Betrixaban, an orally bioavailable fXa inhibitor in advanced stages of clinical development (Phase II), was used to validate this hypothesis. Betrixaban is an active site directed, competitive inhibitor of human fXa ($K_i=117$ pM) and exhibits a greater than 86,000 fold

29

specificity against related proteases such as thrombin, factor VIIa, factor IXa, activated protein C, tissue plasminogen activator, plasmin and trypsin. Betrixaban is a potent inhibitor of the prothrombinase complex ($K_i=801$ pM).

Assays known in the art, such as those described in Sinha et al., *ATVB* 2003, 23: 1098-1104, incorporated by reference in its entirety herein, are distinguishable from those described herein in that extra steps, such as treating the blood with snake venom or materials are required or different measurements are being taken. For example, the assays described in Sinha et al. required that the blood plasma be treated with Reptilase® to remove fibrinogen or that platelet-rich plasma be used or that thrombin be measured indirectly with markers such as thrombin antithrombin III complexes.

An aspect of the invention provides *in vitro* assays that are predictive of whether a compound has *in vivo* antithrombotic activity. The antithrombotic activity can be determined using whole blood measuring the thrombin activity. The amount of thrombin is correlated with anticoagulation activity in FIG. 1A, 1B, and 1C. This assay is further correlated with *in vivo* anticoagulation activity and discussed more thoroughly in FIG. 2 and the Examples.

The assays involve determining thrombin activity in the presence and absence of a test compound. In one embodiment, an assay solution is prepared. The assay solution is comprised of nonanticoagulated whole blood, tissue factor (TF), and a detectably-labeled thrombin substrate, such as Z-Gly-Gly-Arg AMC. A test compound of interest is added to the assay solution and the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate is measured as a function of time. The order of introduction of the components into the assay solution can be varied.

A control assay is also performed with the assay solution in the absence of a test compound. A reduction in thrombin activity, as indicated by a decrease in thrombin substrate cleavage, in the assay with the test compound relative to the control assay indicates that the test compound has antithrombotic activity *in vivo*.

In an alternative embodiment, the assay does not include exogenously added TF. Instead the assay solution is stirred to activate the TF endogenously present in the cells in whole blood.

In other embodiments of the assay, the assay solution is comprised of anticoagulated whole blood or anticoagulated plasma instead of nonanticoagulated whole blood.

Accordingly, one aspect of the invention provides for an *in vitro* assay to
5 determine whether a compound has *in vivo* antithrombotic activity comprising:

- a) introducing a test compound into an *in vitro* sample of nonanticoagulated whole blood comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate to form a test sample;
- b) determining the level of thrombin activity in the test sample by
10 monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the test sample as a function of time;
- c) determining the level of thrombin activity in a control sample by monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the control sample as a function of time, wherein the control sample comprises
15 nonanticoagulated whole blood comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate;
- d) comparing the level of thrombin activity in the test sample and the control sample, wherein a lower level of thrombin activity in the test sample is an indication that the test compound has *in vivo* antithrombotic activity.

20 In other specific embodiments, the anticoagulated whole blood of a) is replaced with either nonanticoagulated whole blood, anticoagulated plasma, or nonanticoagulated plasma.

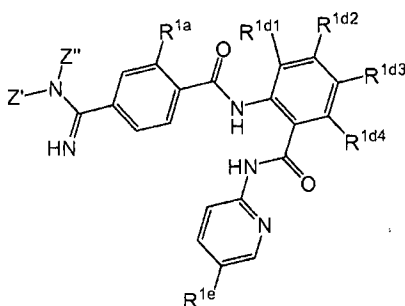
2. Factor Xa Inhibitor Compounds

Several factor Xa inhibitors have been reported as polypeptides derived from
25 hematophagous organisms, as well as compounds which are not large polypeptide-type inhibitors. Additional factor Xa inhibitors include small molecule organic compounds, such as nitrogen containing heterocyclic compounds which have amidino substituent groups, wherein two functional groups of the compounds can bind to factor Xa at two of its active sites. For example, WO 98/28269 describes pyrazole compounds having a terminal
30 amidino (-C(=NH)-NH₂) group; WO 97/21437 describes benzimidazole compounds substituted by a basic radical which are connected to a naphthyl group via a straight or

91

branched chain alkylene, -C(=O)- or -S(=O)₂- bridging group; WO 99/10316 describes compounds having a 4-phenyl-N-alkylamidino-piperidine and 4-phenoxy-N-alkylamidino-piperidine group connected to a 3-amidinophenyl group via a carboxamidealkyleneamino bridge; and EP 798295 describes compounds having a 4-phenoxy-N-alkylamidino-piperidine group connected to an amidinonaphthyl group via a substituted or unsubstituted sulfonamide or carboxamide bridging group. Additional reported factor Xa inhibitors include those having a structure comprising a phenyl-amidino, phenyl, and halo-phenyl connected via amide linkages (U.S. Patent No. and 6,376,515 and 6,844,367). Other factor Xa inhibitors have replaced the halo-phenyl with a halo-pyridyl (see U.S. Patent Nos. 6,376,515 B2 and 6,835,739). In specific embodiments of this invention, the factor Xa inhibitors are compounds of the Formula I described above. Compounds of Formula I are disclosed in U.S. Patent No. 6,844,367 and 6,376,515, incorporated by reference in its entirety herein.

In some embodiments of the invention, the factor Xa inhibitor is a compound of Formula IV:



IV

wherein:

Z' and Z'' are each independently a C₁-C₆ alkyl which is optionally substituted with a hydroxyl, carboxylic acid or carboxylic acid ester group;

R^{1a} is selected from the group consisting of:

H, -F, -Cl, and Br;

R^{1d2} and R^{1d4} are each H;

R^{1d1} and R^{1d3} are each independently a member selected from the group consisting of:

H, -Cl, -F, -Br, -OH and -OCH₃; and

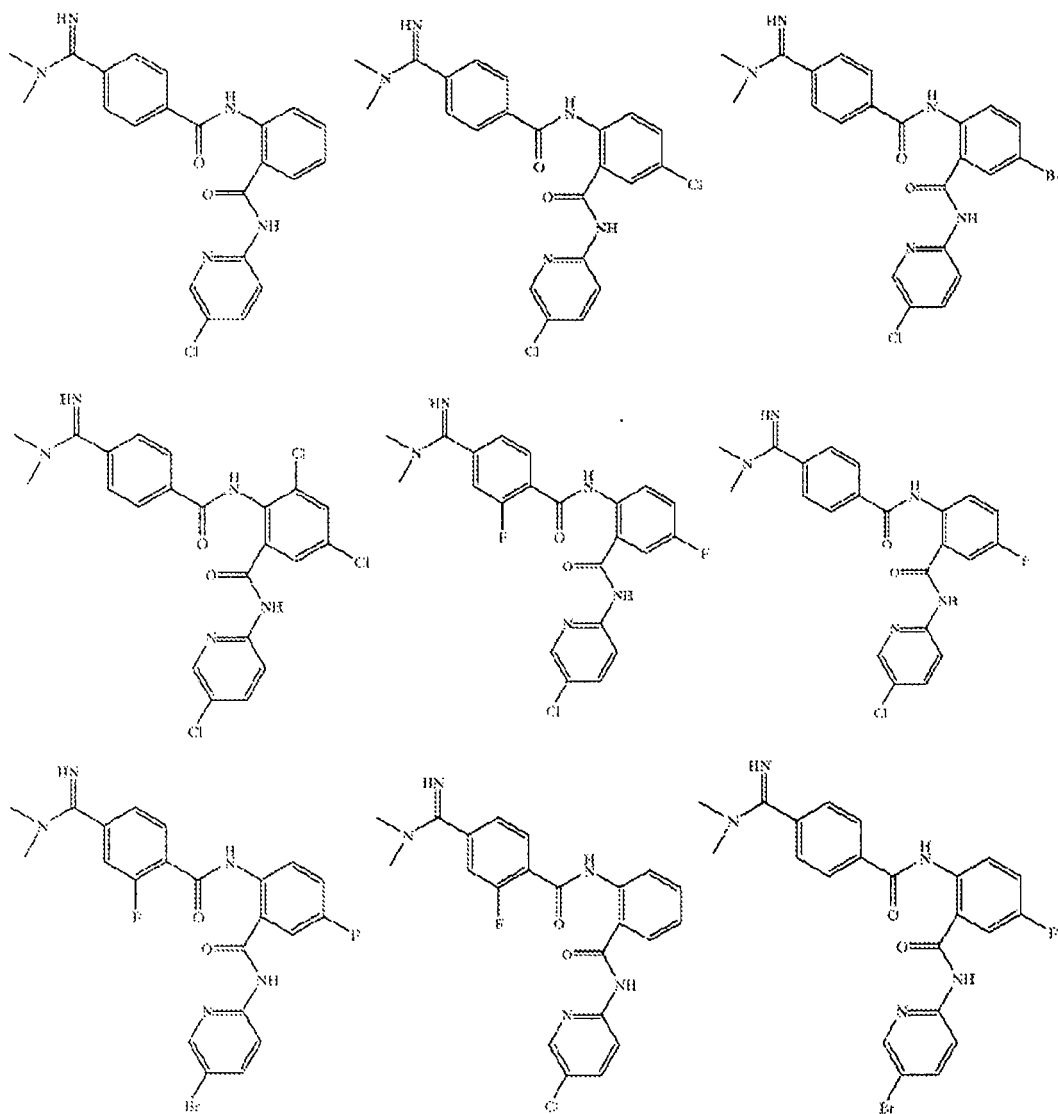
R^{1c} is a member selected from the group consisting of:

-F, -Cl, -Br, -OH, -CH₃, and -OCH₃,

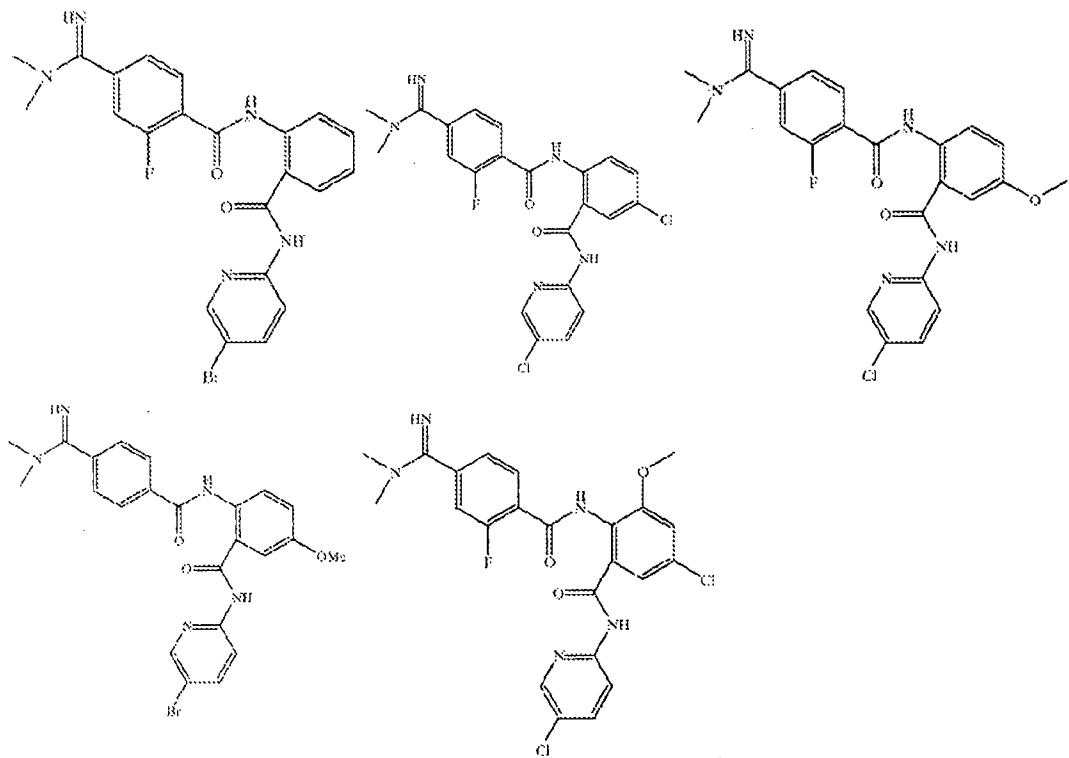
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5

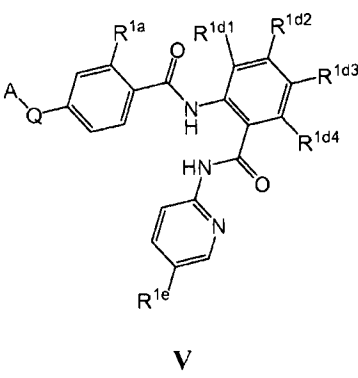
Exemplary compounds of Formula IV are selected from the following:



33



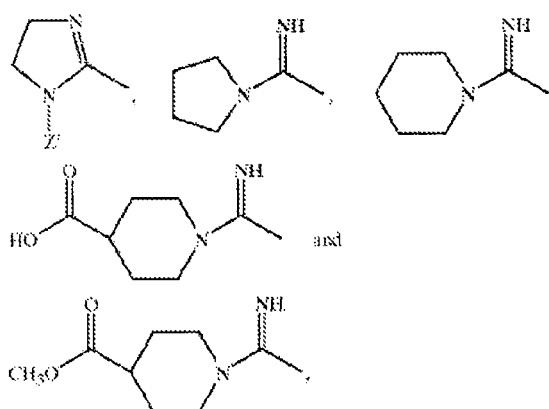
In another embodiment of the invention, the factor Xa inhibitor is a compound of formula V:



5

wherein:
A-Q is a member selected from the group consisting of:

34



where Z' is a C₁₋₆ alkyl which is optionally substituted with a hydroxyl, carboxylic acid or carboxylic acid ester group;

R^{1a} is selected from the group consisting of:

H, -F, -Cl, and Br;

R^{1d2} and R^{1d4} are each H;

R^{1d1} and R^{1d3} are each independently a member selected from the group consisting of:

H, -Cl, -F, -Br, -OH and -OCH₃;

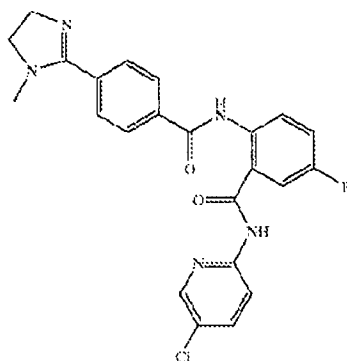
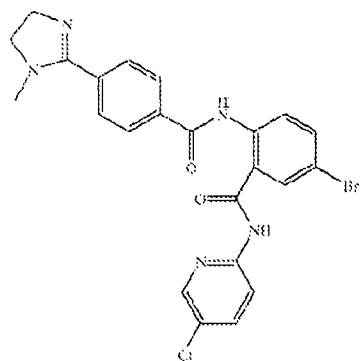
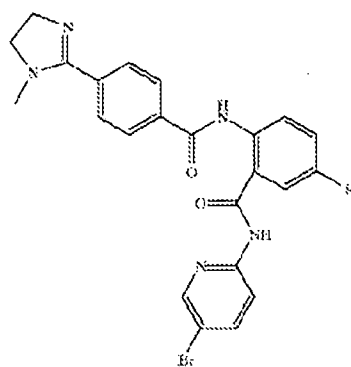
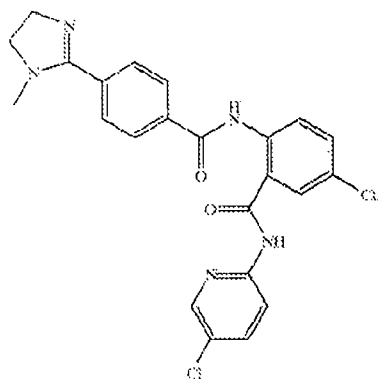
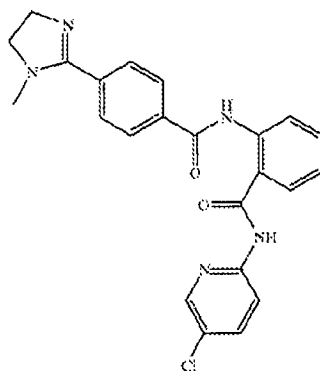
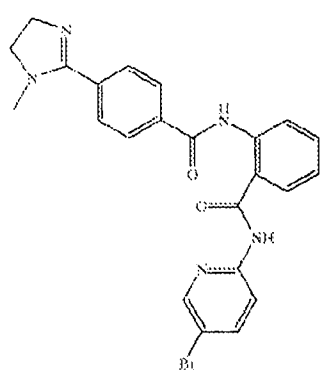
R^{1e} is a member selected from the group consisting of:

-F, -Cl, -Br, -OH, -CH₃, and -OCH₃,

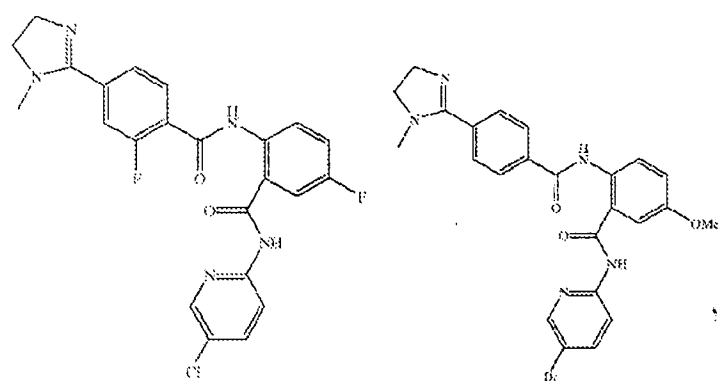
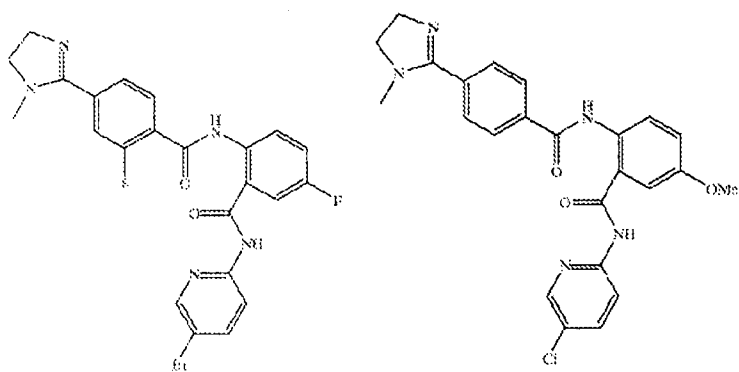
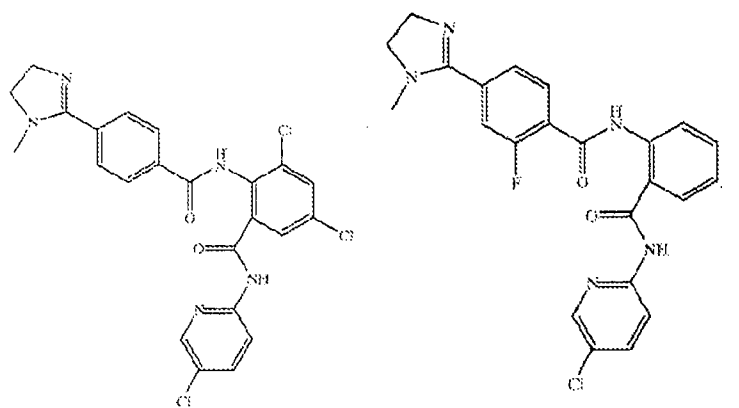
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Exemplary compounds of Formula V include, but are not limited to:

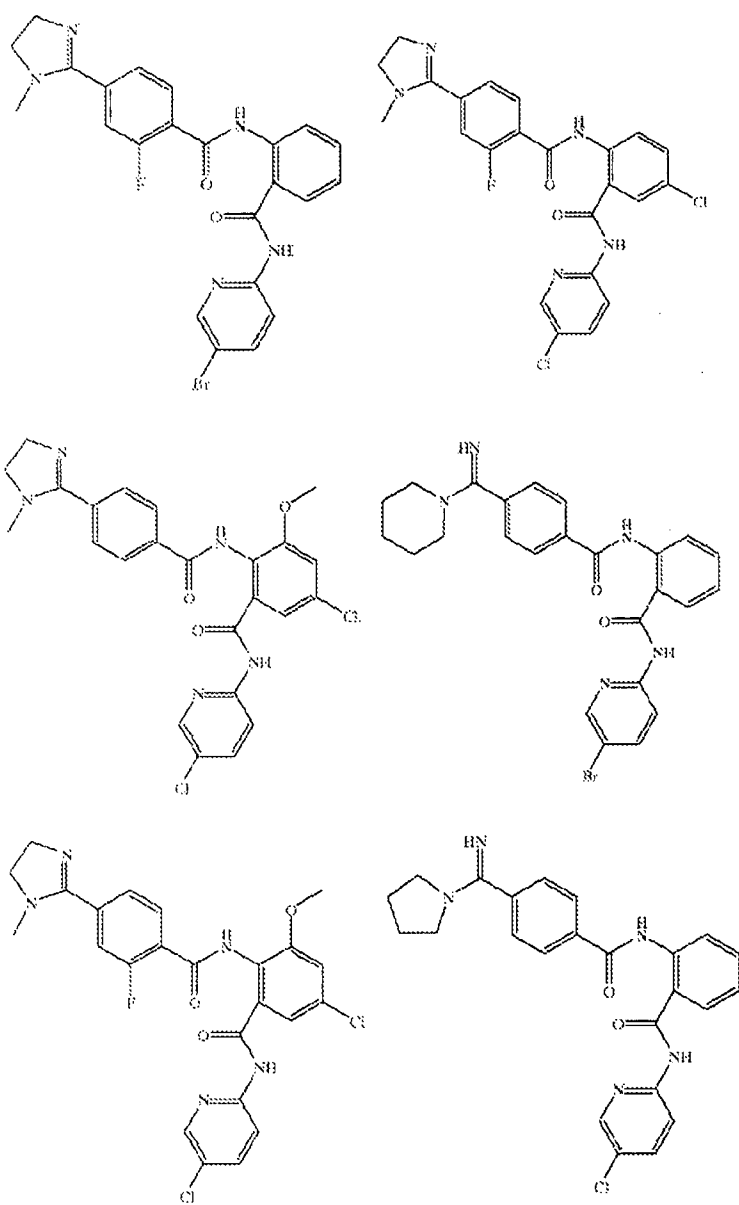
35



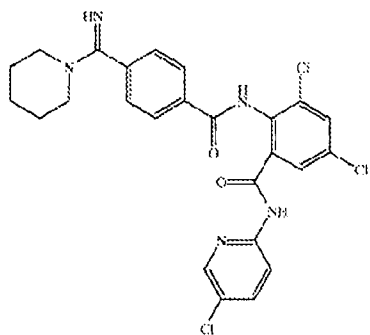
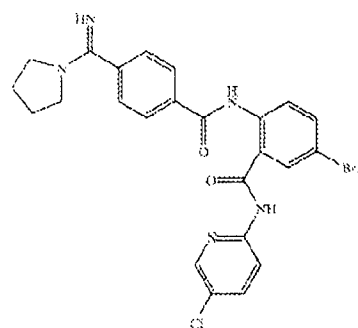
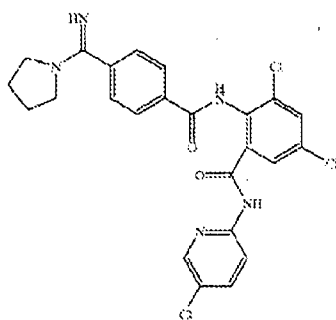
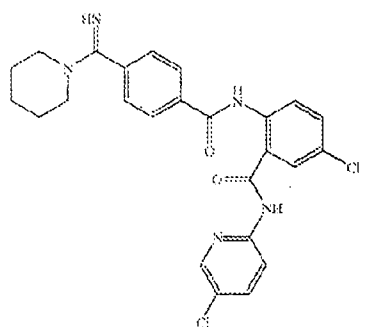
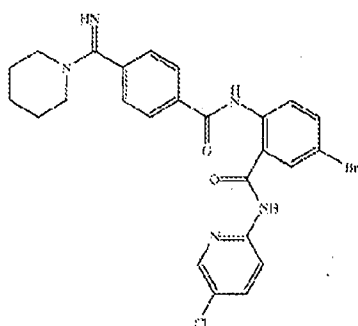
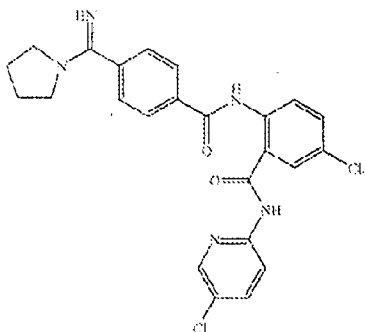
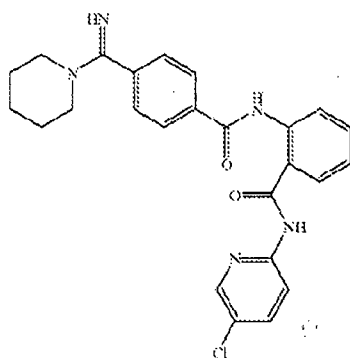
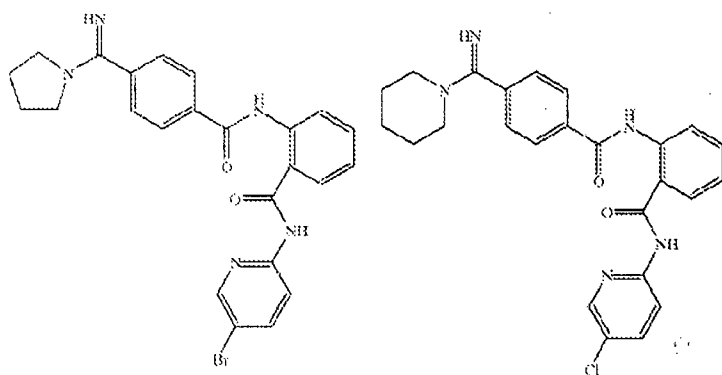
36



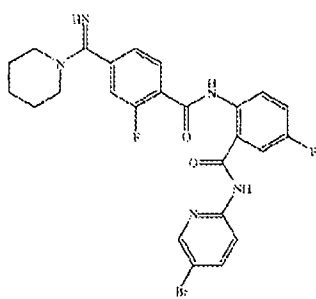
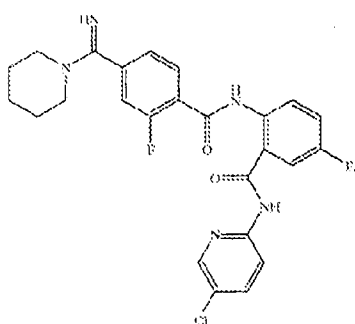
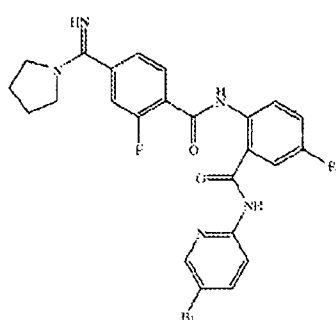
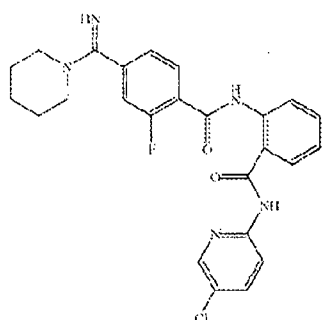
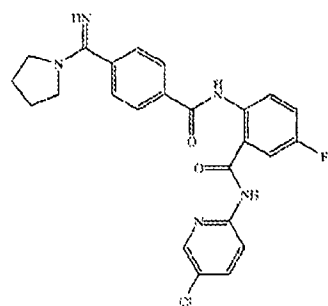
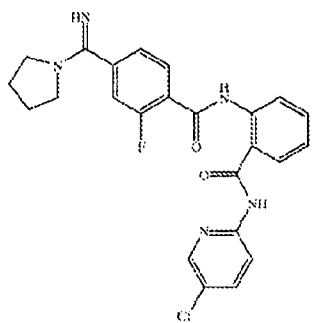
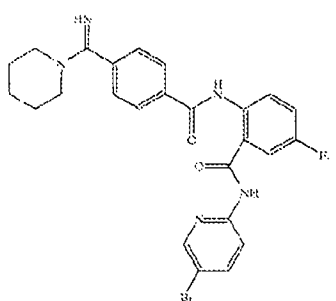
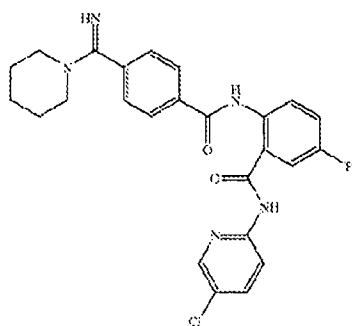
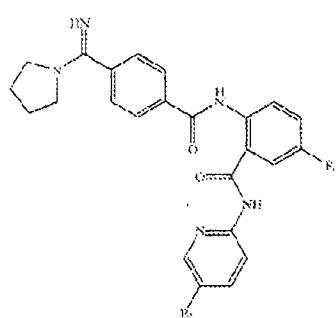
37



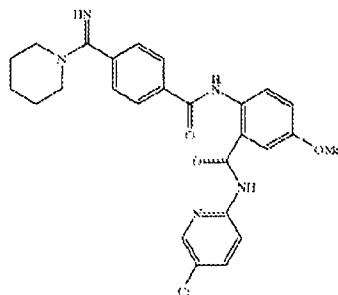
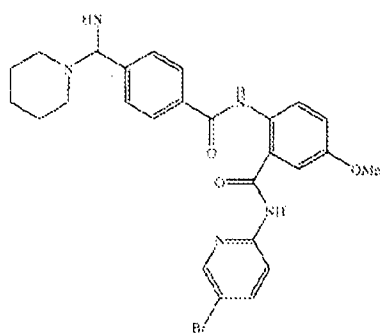
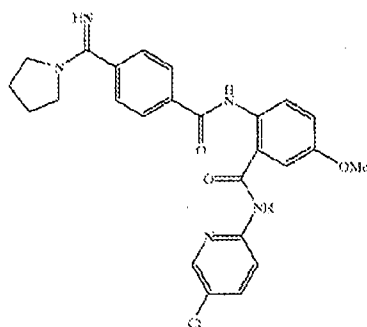
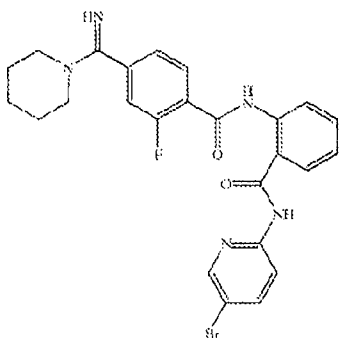
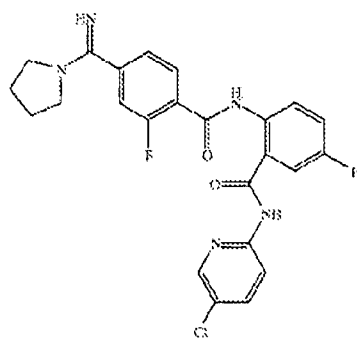
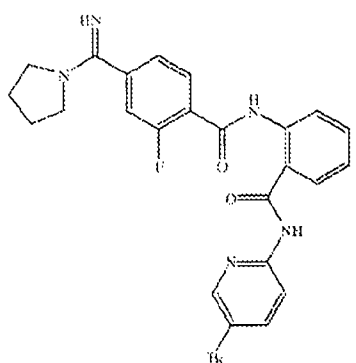
38



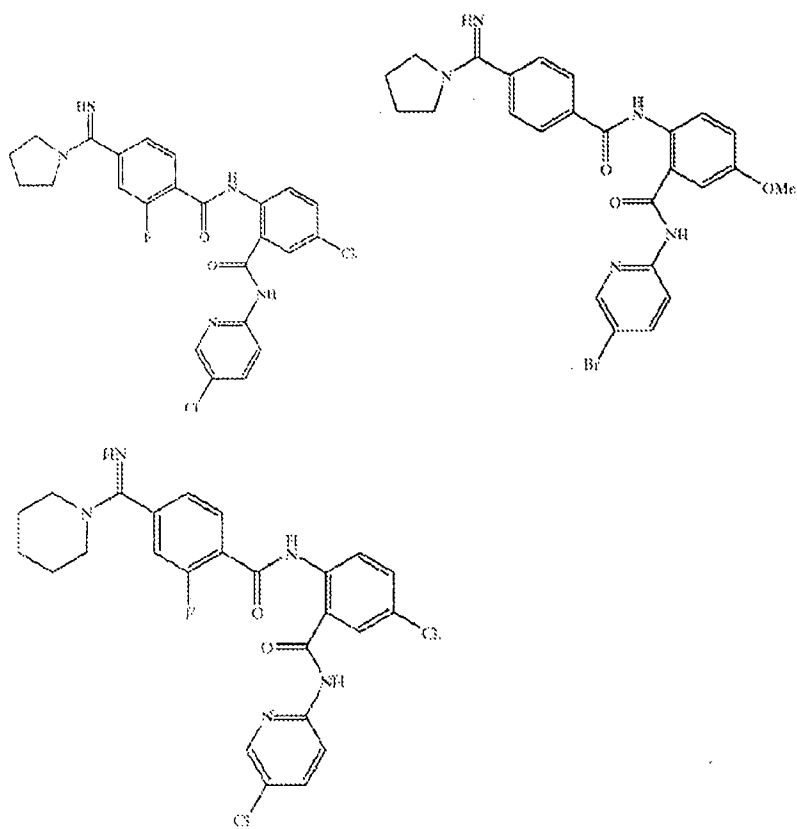
39



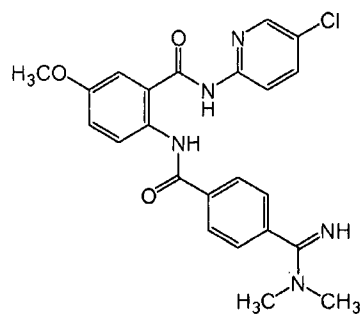
20



21



In further embodiments of the invention, the factor Xa inhibitors are compounds of Formula II:

**II**

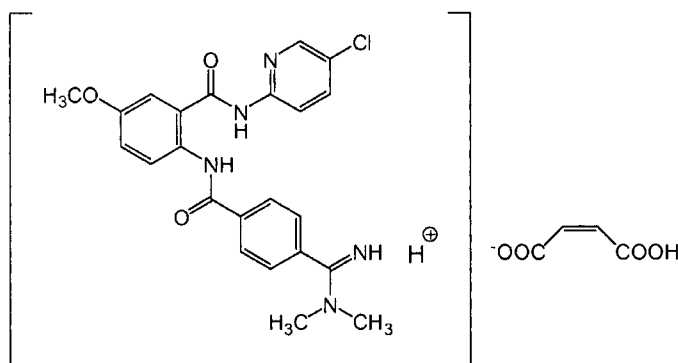
as well as all pharmaceutically acceptable isomers, salts, hydrates, solvates and prodrug derivatives thereof. Compounds of Formula II are disclosed as Example 206 in U.S. Patent Nos. 6,376,515 and 6,835,739, both of which are incorporated by reference in their entirety

42

hercin. The compound of formula II has the generic name of betrixaban and is sometimes referred to this throughout.

In a specific embodiment, the salt of a compound of Formula II is a maleate salt. The maleate salt be formed by protonating one or more nitrogen atoms of the
5 compound of Formula II. In one embodiment, the amidino nitrogen (=NH) of Formula II is protonated ($=\text{NH}_2^+$) to form the salt.

In one embodiment, the maleate salt of the compound of Formula II is represented by Formula III:



III

This is also referred to hercin as betrixaban maleate.

In another embodiment, the present invention provides a salt of Formula III having a crystalline polymorph form. In preferred embodiments, the crystalline polymorph form exhibits a powder X-ray diffraction pattern having at least four and more preferably
15 eight of the following approximate characteristic peak locations: 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 degrees 2θ . In still another embodiment, the powder X-ray diffraction pattern has approximate characteristic peak locations of 4.9, 9.7, 11.8, 13.8, 14.1, 15.2, 17.6, 18.5, 19.9, 20.8, 21.6, 22.7, 24.1, 25.0, 26.3, 26.8 degrees 2θ .
20 The invention contemplates that the approximate characteristic peaks will have a deviation of up to about ± 0.2 degrees 2θ . See PCT/US2006/43635, filed November 7, 2006, incorporated by reference in its entirety herein, for further disclosure of salts and polymorphs of salts of the compound of Formula II.

43

4. Formulations

One embodiment of this invention is directed to a unit dose formulation. The unit dose formulation comprises a pharmaceutical composition comprising a factor Xa inhibitor as described above and a pharmaceutically acceptable carrier. The factor Xa inhibitor is present in an effective coagulation-inhibition amount which is typically between about 0.1 mg/kg and about 2.0 mg/kg. In certain embodiments, the dose is formulated to administered once or twice daily, such that the total amount per day is the coagulation-effective amount. In some embodiments, the unit dose formulation is for oral delivery.

In the management of thrombotic disorders the compounds and/or salts of this invention may be utilized in compositions such as tablets, capsules, lozenges or elixirs for oral administration, suppositories, sterile solutions or suspensions or injectable administration, and the like, or incorporated into shaped articles. The method of administration will vary from subject to subject and be dependent upon such factors as the type of mammal being treated, its sex, weight, diet, concurrent medication, overall clinical condition, the particular compounds and/or salts employed, the specific use for which these compounds and/or salts are employed, and other factors which those skilled in the medical arts will recognize.

Capsules useful in the present invention can be prepared using conventional and known encapsulation techniques, such as that described in Stroud et al., U.S. Patent No. 5,735,105. The capsule is typically a hollow shell of generally cylindrical shape having a diameter and length sufficient so that the pharmaceutical solution compositions containing the appropriate dose of the active agent fits inside the capsule. The exterior of the capsules can include plasticizer, water, gelatin, modified starches, gums, carrageenans, and mixtures thereof. Those skilled in the art will appreciate what compositions are suitable.

In addition to the active agent, tablets useful in the present invention can comprise fillers, binders, compression agents, lubricants, disintegrants, colorants, water, talc and other elements recognized by one of skill in the art. The tablets can be homogeneous with a single layer at the core, or have multiple layers in order to realize preferred release profiles. In some instances, the tablets of the instant invention may be coated, such as with an enteric coating. One of skill in the art will appreciate that other excipients are useful in the tablets of the present invention.

44

Lozenges useful in the present invention include an appropriate amount of the active agent as well as any fillers, binders, disintegrants, solvents, solubilizing agents, sweeteners, coloring agents and any other ingredients that one of skill in the art would appreciate is necessary. Lozenges of the present invention are designed to dissolve and
5 release the active agent on contact with the mouth of the patient. One of skill in the art will appreciate that other delivery methods are useful in the present invention.

Formulations of the compounds and/or salts of this invention are prepared for storage or administration by mixing the salt having a desired degree of purity with physiologically acceptable carriers, excipients, stabilizers etc., and may be provided in
10 sustained release or timed release formulations. Acceptable carriers or diluents for therapeutic use are well known in the pharmaceutical field, and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (A.R. Gennaro Ed. 1985). Such materials are nontoxic to the recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, acetate and other organic acid compounds
15 and/or salts, antioxidants such as ascorbic acid, low molecular weight (less than about ten residues) peptides such as polyarginine, proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins, hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidinone, amino acids such as glycine, glutamic acid, aspartic acid, or arginine, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including cellulose or its derivatives, glucose, mannose or dextrans,
20 chelating agents such as EDTA, sugar alcohols such as mannitol or sorbitol, counterions such as sodium, and/or nonionic surfactants such as Tween, Pluronic or polyethyleneglycol.

Dosage formulations of the compounds and/or salts of this invention to be used for therapeutic administration must be sterile. Sterility is readily accomplished by
25 filtration through sterile membranes such as 0.2 micron membranes, or by other conventional methods. Formulations typically will be stored in lyophilized form or as an aqueous solution. The pH of the preparations of this invention typically will be between 3 and 11, more preferably from 5 to 9 and most preferably from 7 to 8. It will be understood that use of certain of the foregoing excipients, carriers, or stabilizers will result in the
30 formation of cyclic polypeptide compounds and/or salts. While the preferred route of administration is by injection, other methods of administration are also anticipated such as

intravenously (bolus and/or infusion), subcutaneously, intramuscularly, colonically, rectally, nasally or intraperitoneally, employing a variety of dosage forms such as suppositories, implanted pellets or small cylinders, aerosols, oral dosage formulations (such as tablets, capsules and lozenges) and topical formulations such as ointments, drops and dermal patches. The sterile membranes of this invention are desirably incorporated into shaped articles such as implants which may employ inert materials such as biodegradable polymers or synthetic silicones, for example, Silastic, silicone rubber or other polymers commercially available.

The compounds and/or salts of the invention may also be administered in the form of liposome delivery systems, such as small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles and multilamellar vesicles. Liposomes can be formed from a variety of lipids, such as cholesterol, stearylamine or phosphatidylcholines.

The compounds and/or salts of this invention may also be delivered by the use of antibodies, antibody fragments, growth factors, hormones, or other targeting moieties, to which the salt molecules are coupled. The compounds and/or salts of this invention may also be coupled with suitable polymers as targetable drug carriers. Such polymers can include polyvinylpyrrolidinone, pyran copolymer, polyhydroxy-propyl-methacrylamide-phenol, polyhydroxyethyl-aspartamide-phenol, or polyethyleneoxide-polylysine substituted with palmitoyl residues. Furthermore, compounds and/or salts of the invention may be coupled to a class of biodegradable polymers useful in achieving controlled release of a drug, for example polylactic acid, polyglycolic acid, copolymers of polylactic and polyglycolic acid, polyepsilon caprolactone, polyhydroxy butyric acid, polyorthoesters, polyacetals, polydihydropyrans, polycyanoacrylates and cross linked or amphipathic block copolymers of hydrogels. Polymers and semipermeable polymer matrices may be formed into shaped articles, such as valves, stents, tubing, prostheses and the like.

5. Compound Preparation

a. Salts of the Compound of Formula II

The compound of Formula II can be converted to salts of various inorganic and organic acids including, but not limited to, HCl salt, lactate, maleate, phenoxyacetate, propionate, succinate, adipate, ascorbate, camphorate, gluconate, phosphate, tartrate, citrate,

yf

mesylate, fumarate, glycolate, naphthalene-1,5-disulfonate, gentisate and benzene sulfonate. One of skill in the art will recognize that other acids can be used to make salts comprising the compound of Formula I that are useful in the present invention. It is also contemplated that salts of the invention can be readily converted to other salts of the invention.

5 A number of methods are useful for the preparation of the salts described above and are known to those skilled in the art. For example, reaction of the compound of Formula II with one or more molar equivalents of the desired acid in a solvent or solvent mixture in which the salt is insoluble, or in a solvent like water after which the solvent is removed by evaporation, distillation or freeze drying. Alternatively, the compound of
10 Formula II may be passed over an ion exchange resin to form the desired salt or one salt form of the product may be converted to another using the same general process.

The compound of Formula II was prepared according to the procedure set forth below. The malcate salt of the compound of Formula II was chosen for its excellent crystallinity, thermal and hydrolytic stability, and high purity.

15 **b. Betrixaban**

The compound of Formula II or betrixaban can be prepared according to any of several different methodologies, either on a gram scale (< 1 kg) or a kilogram scale (> 1 kg). A gram-scale method is set forth below in Example 2. Another gram-scale method is set forth in U.S. Patent No. 6,844,367B1, see Example 266, which is hereby incorporated by
20 reference in its entirety.

Alternatively, the compound of Formula II can be prepared on a kilogram scale using the procedure set forth in Example 2. The formation of the dimethyl amidine of Formula II involves nucleophilic attack on a cyano group by a deprotonated amine, with the deprotonated amine formed from a secondary amine and an alkyl lithium. As used herein,
25 the term "alkyl" refers to a hydrocarbyl radical of from 1 to 8 carbon atoms. One of skill in the art will recognize that the deprotonated amine can be formed via other methods, and formation of the amidine functionality of Formula II can be prepared by a variety of other methods.

A useful solvent for the method of the present invention as described above
30 is a aprotic solvent such as tetrahydrofuran (THF), diethyl ether, dimethoxymethane, dioxane, hexane, methyl tert-butyl ether, heptane, and cyclohexane. In addition, the

formation of the deprotonated amine can be carried at temperatures below 10 °C. The nucleophilic addition of the amine to form the compound of Formula I can also be carried out at temperatures below 10 °C. One of skill in the art will recognize that the methods of the present invention can be practiced using various other solvents, reagents, and reaction temperatures.

In addition while the method of the present invention for preparing the compound of Formula II on a gram-scale is similar to the procedure used on the kilogram-scale, there is an increase in the scale of the reaction of more than 3400%. Moreover, in several steps increased yields are obtained using reduced amounts of the excess reagents.

One of skill in the art will recognize that the compound of Formula I can be prepared via other chemical methodologies on both a gram and kilogram scale.

EXAMPLES

Unless stated otherwise, the abbreviations used throughout the specification have the following meanings:

Å	=	Angstrom
A%	=	total percent area
aq.	=	aqueous
cm	=	centimeter
d	=	doublet
DSC	=	differential scanning calorimetry
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
eq.	=	equivalent
EtOH	=	ethanol
g	=	gram
HPLC	=	high performance liquid chromatography
hr	=	hour
Hz	=	Hertz
IR	=	infrared
J	=	coupling constant
kg	=	kilogram
kV	=	killivolts
L	=	liter
LOD	=	limit of detection
M	=	molar
m	=	multiplet
mA	=	milliampere
Me	=	methyl
McO	=	methoxy
McOH	=	methanol

mg	=	milligram
min.	=	minute
mL	=	milliliter
mm	=	millimeter
MTBE	=	methyl tert-butyl ether
N	=	normal
nM	=	nanomolar
NMR	=	nuclear magnetic resonance
s	=	singlet
TDS	=	total dissolved solids
TGA	=	thermal gravimetric analysis
THF	=	tetrahydrofuran
μ M	=	micromolar
BID	=	twice daily

Example 1

Preparation of a crystalline polymorph salt of Formula III

a. Gram scale preparation

5 In a 3-necked 1500 mL round bottomed flash equipped with a condenser, free base compound of Formula I (25 g; 1 eq.) was charged and 9:1 EtOH/ Water (500 mL) was added while stirring. The resulting slurry was heated to 70 °C. Maleic acid (12.77 g; 2 eq.) was added dropwise as a solution (100 mL of 9:1 EtOH/ Water) and after 50 mL had been added, the solution became noticeably clearer. On complete addition of the maleic
10 acid solution the temperature was held at 80 °C for 5 minutes. The vessel was allowed to cool slowly to 45 °C and 400 mL of MTBE was then added. The solution was stirred for another 12 hr. The resulting precipitate was filtered and dried under vacuum. The maleate salt of the compound of Formula I was recovered in a 45% yield (14.2 g).

b. Kilogram scale preparation

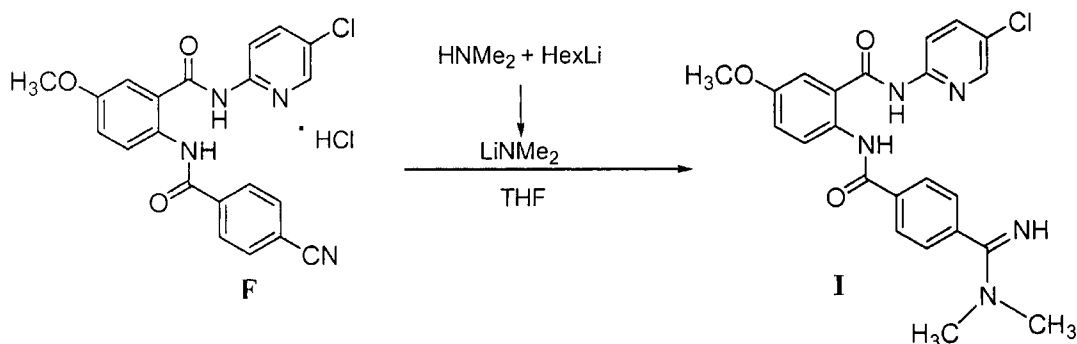
15 The compound of Formula I (24.6 kg) was charged into a 760 L GLMS reactor (Reactor A). Maleic acid (12.7 kg, 2.0 eq), ethanol (445 kg, 18.1 parts), and high purity water (140 kg, 5.7 parts) were added. The reaction mixture was adjusted to 22 °C (19-25 °C) and agitated at that temperature for ca. 1 hr, then transferred through a polishing filter into a conditioned 780 L Hastelloy reactor (Reactor B). The Reactor A pump and
20 lines were rinsed forward into Reactor B with additional ethanol (ca. 45 kg) via polishing

29

filter. The filtrate was concentrated under vacuum with a maximum temperature of warm glycol bath (to heat reactor jacket) of 45 °C, until ca. 140 L (5.7 parts volume) remained. The Reactor B contents were sampled for in-process NMR, which showed that the mole ratio of ethanol : the maleate salt of the compound of Formula I was 26. High purity water (49 kg, 2.0 parts) was charged to Reactor B and concentration under vacuum resumed until a pot volume of ca. 140 L (5.7 parts volume) was achieved. In-process NMR indicated that the mole ratio of ethanol : the maleate salt of the compound of Formula I was 14. High purity water (49 kg, 2.0 parts) was again charged and concentration under vacuum resumed to obtain a pot volume of ca. 140 L. In-process NMR showed that the mole ratio of ethanol : the maleate salt of the compound of Formula I was 5. The temperature of the Reactor B contents were adjusted to 22 °C (19-25 °C) and formation of a slurry was visually confirmed. The reaction mixture was agitated at 22 °C (19-25 °C) for ca. 2 hrs, and then filtered onto a 30" centrifuge fitted with a filter cloth. The Reactor B pump and lines were rinsed forward to the 30" centrifuge via polishing filter with two portions of high purity water (ca. 30 kg each). The filter cake was sampled for in-process HPLC, which showed that the purity of the product was 99.1 A%, the largest impurity was 0.26 A%, and therefore recrystallization was unnecessary. The filter cake (33.1 kg) was dried under vacuum with a maximum temperature of warm glycol bath (to heat dryer jacket) of 40 °C. After ca. 30.5 hrs, in-process LOD analysis indicated a solvent content of 0%. The dry product was discharged (26.4 kg) and stored at 2-8 °C. The yield for the final product was slightly higher than expected at 85% (expected 50-80%). Purity of the maleate salt was measured by the presence of hydrolyzed amidine content as measured by HPLC, and the purity was found to be >99%.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.0 (s, 3H), 3.2 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 7.2 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.68 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.95 – 8.15 (m, 2H), 8.12 (m), 8.18 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 9.0 (s, 1H), 11.0 (s, 1H), 11.2 (s, 1H); IR (KBr, cm⁻¹): 3300, 1685, 1600, 1515, 1380, 1270, 1200, 1100, 1050, 880, 800, 710.

50

Example 2**Preparation of the compound of Formula II****a. Gram scale preparation**

- 5 A slurry of the compound of Formula F (455 g, 1.0 eq.) in THF (4.67 kg, 10.3 parts) was prepared and adjusted to <10 °C. Lithium dimethyl amide was prepared as follows: hexyllithium (2.3 N/hexane, 2.45 L, 5.5 eq.) was added to dimethylamine solution (2 N/THF, 2.8 L, 5.5 eq.) maintaining <10 °C. The lithium dimethyl amide solution was charged into the slurry containing the compound of Formula F keeping the pot temperature
- 10 of <10 °C. The reaction progress was monitored by in-process HPLC which confirmed that the amount of Formula F was <1.0 A%. A buffer solution of NaHCO₃ (490 g, 1.1 parts, 5.7 eq.) and Na₂CO₃ (490 g, 1.1 parts, 4.5 eq.) in deionized water (6.6 kg, 14.51 parts) was prepared, and the above reaction mixture was transferred to this aqueous solution maintaining < 5 °C. The product precipitated out and the resulting slurry was adjusted to
- 15 20 °C over a period of 12 hr. The solid was filtered, and the resulting wet cake was washed with 3.5 kg (7.7 parts) of deionized water. The solid was filtered off using a coarse frit glass bench filter, and rinsed forward with cold (0-5 °C) absolute ethanol (628 g, 1.4 parts). The product was dried at 30-35 °C. Dry product was obtained in 458 g (73% yield).

b. Kilogram scale preparation

- 20 A slurry of the compound of Formula F (31.5 kg, 1.0 eq.) in THF (251 kg, 8.0 parts) was prepared in a 780 L Hastelloy reactor (Reactor A) and adjusted to 0 °C (-3 to 3 °C). 2 M Dimethylamine in THF (161.0 kg, 5.0 eq.) and THF (63 kg, 2 parts) were charged into a 1900 L GLMS reactor (Reactor B) and adjusted to 0 °C (-3 to 3 °C) with

51

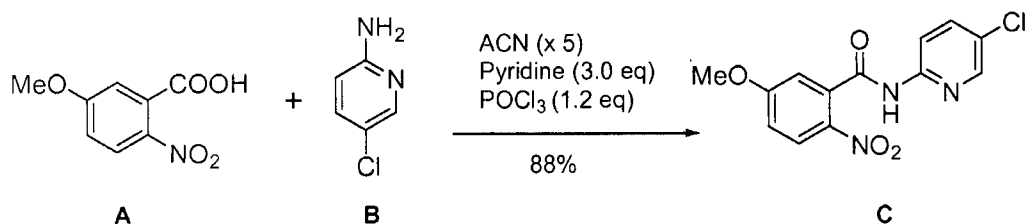
maximum agitation. Hexyllithium (2.3 M, 97.2 kg, 4.5 eq.) was slowly charged to Reactor B while maintaining a max temperature of 10 °C. The pump and lines were rinsed forward to Reactor B with THF (3.2 kg). The Reactor B contents were adjusted to 0 °C (-3 to 3 °C), then transferred to Reactor A while keeping Reactor A temperature ≤ 10 °C. The Reactor B pump and lines were rinsed forward with THF (31.4 kg, 1.0 part). The Reactor A contents were adjusted to 0 °C (-3 to 3 °C), and agitated at this temperature until the reaction was complete as verified by HPLC (1-2 hrs). After about 1 hr of agitation, in-process HPLC analysis indicated that 0 A% starting material remained (in-process criteria: max 1 A%). Reactor A contents were adjusted to -5 °C (-8 to -3 °C). In-process cleaning of Reactor B with water was performed. Two previously prepared aqueous solutions (NaHCO₃ (35.0 kg, 1.1 parts) in water (236 kg, 7.5 parts), and Na₂CO₃ (35.0 kg 1.1 parts) in water (236 kg, 7.5 parts)) were charged to Reactor B and adjusted to -3 °C (0 to 6 °C). Reactor A contents were transferred to Reactor B through an insulated line, maintaining the temperature of Reactor B at -8 °C to a maximum of 5 °C. The Reactor A pump and lines were rinsed forward with cold [-5 °C (-8 to -3 °C)] THF (31.4 kg, 1.0 part). Reactor B contents were adjusted to 22 °C (19-25 °C) and agitated for ca. 3 hrs. Slurry formation was visually confirmed, and Reactor B contents were filtered onto a 30" centrifuge fitted with a filter cloth. The Reactor B pump and lines were rinsed forward onto the 30" centrifuge fitted with a filter cloth with drinking water (63 kg, 2 parts). The wet filter cake (66.5 kg) was transferred back to Reactor B and submitted to a slurry wash in drinking water (1005 kg, 32 parts) at 22 °C (19-25) °C for ca. 1 hr. The product was filtered onto the 30" centrifuge (after in-process cleaning and fitting with a filter cloth), and the Reactor B lines and pump were rinsed forward with drinking water (63 kg, 2 parts). The water rinse was sampled for test by TDS, which was found to be 0.46%. The Reactor B pump, lines and wet filter cake were further rinsed with cold [0 °C (-3 to 3 °C)] ethanol (44 kg, 1.39 parts). The wet filter cake was dried under vacuum with a maximum temperature of water bath (to heat dryer jacket) of 35 °C. In-process LOD was 0% after ca. 24 hrs of drying, and the product was discharged (24.8 kg) in 76.7% yield. HPLC showed 98 % purity, with dechlorinated impurity at 1.14 %.

52

Example 3

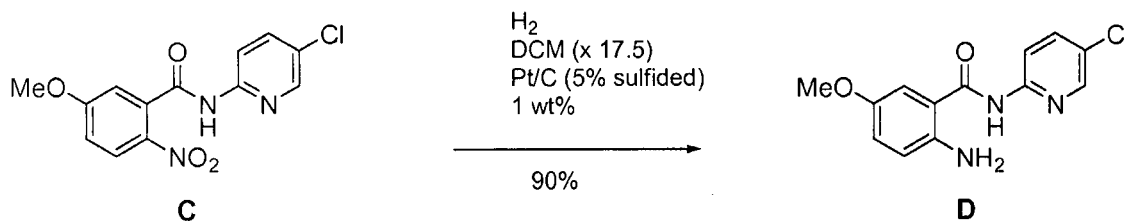
Preparation of the compound of Formula F

Step 1. Synthesis of 2-nitro-N-(5-chloro-pyridin-2-yl)-5-methoxy-benzamide (C)



5 5-Methoxy-2-nitrobenzoic acid (A) (25.0 kg, 1.0 eq.), 2-amino-5-chloropyridine (B) (16.3 kg, 1.0 eq.), and acetonitrile (87.5 kg, 3.5 parts) were charged to a 380 L GLMS reactor. The reaction mixture was adjusted to 22 °C (19-25 °C) and anhydrous pyridine (30.0 kg, 3.0 eq.) was added. The pump and lines were rinsed forward with acetonitrile (22.5 kg, 0.9 parts), and the reactor contents were adjusted to a temperature of 19-22 °C. Phosphorous oxychloride (23.3 kg, 1.20 eq.) was charged to the contents of the reactor via a metering pump, while maintaining a temperature of 25 °C (22-28 °C). The metering pump and lines were rinsed forward with acetonitrile (12.5 kg, 0.5 parts), while keeping the temperature at 25 °C (22-28 °C). The reaction mixture normally turned from a slurry to a clear solution after the addition of about 1/3 of the POCl₃. At the end of the addition, it became turbid. After complete addition, the reaction mixture was agitated at 25 °C (22-28 °C) for ca. 1 hr, at which time HPLC analysis confirmed reaction completion. The solution was cooled to 15 °C (12-18 °C) and drinking water (156.3 kg, 6.25 parts) was charged slowly while keeping reaction temperature of between 12 and 30 °C. The reaction mixture was then adjusted to 22 °C (19-25 °C) and agitated for ca. 5 hrs until exotherm ceased. Formation of a slurry was visually confirmed and the contents of the reactor were filtered onto a pressure nutsche fitted with a filter cloth. The reactor, pump, and lines were washed forward onto the pressure nutsche with two portions of drinking water (62.5 kg, 2.5 parts each). The filtrate had a pH value of 7. The product (41.8 kg) was dried under vacuum with a maximum temperature of water bath (to heat dryer jacket) of 50 °C. After ca. 12 hrs, in-process LOD analysis indicated a solvent content of 0.72%. The dry product (C) was discharged (34.4 kg) with 88.2% yield and 99.1 % purity by HPLC.

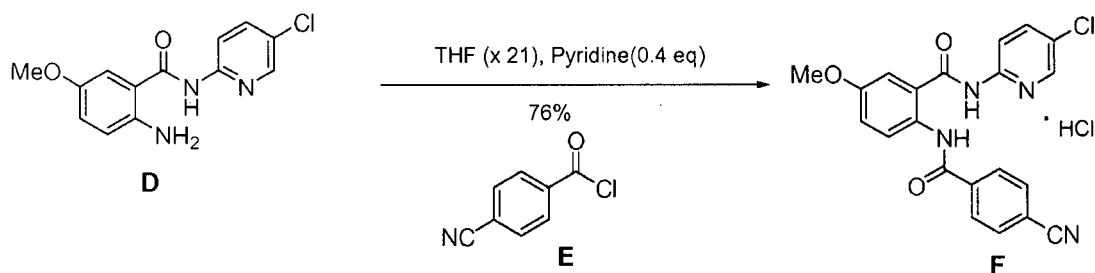
53

Step 2. Synthesis of 2-amino-N-(5-chloro-pyridin-2-yl)-5-methoxy-benzamide (D)

To a 780 L Hastelloy reactor, compound **C** (33 kg, 1.0 eq.), 5% platinum
5 carbon (sulfided, 0.33 kg, 0.010 parts) and dichloromethane (578 kg, 17.5 parts) were
charged. Agitation was started and reactor contents were adjusted to 22 °C (19-25 °C). The
reactor was pressurized with ca. 30 psi hydrogen and the reaction mixture gently heated to
28 °C (25-31 °C). Hydrogenation of the reactor contents was performed under ca. 30 psi at
28 °C (25 to 31 °C; maximum 31 °C) until the reaction was complete by HPLC. After
10 16.5 hrs, the reaction was deemed complete after confirming the disappearance of starting
material (0.472 A%). The contents of the reactor were circulated through a conditioned
celite pad (0.2-0.5 kg celite conditioned with 20-55 kg dichloromethane) prepared in a
8" sparkler filter to remove the platinum catalyst. The reactor and celite bed were rinsed
forward with two portions of dichloromethane (83 kg, 2.5 parts each). The filtrate was
15 transferred to and concentrated in a 570 L GLMS reactor under a atmospheric pressure to
ca. 132 L (4 parts volume). Ethanol (69 kg, 2.1 parts) was charged and concentration
continued under atmospheric pressure to ca. 99 L (3 parts volume). In-process NMR
indicated that the dichloromethane content was 39%. Ethanol (69 kg, 2.1 parts) was
charged again and concentration continued again to ca. 99 L (3 parts volume). In-process
20 NMR indicated that the dichloromethane content was 5%. The reaction mixture was then
adjusted to 3 °C (0 to 6 °C), agitated for ca. 1 hr, and the resulting slurry filtered onto a
jacketed pressure nutsche fitted with a filter cloth. The reactor, pump, and lines were rinsed
forward with cold [3 °C (0-6 °C)] ethanol (26 kg, 0.8 parts). The wet filter cake (36.6 kg)
was dried under vacuum at 40-50 °C with a maximum temperature of water bath (to heat
dryer jacket) of 50 °C. LOD analysis after 12.5 hrs indicated solvent content was at 0.1%.
25 The dry product (**D**) was discharged (26.4 kg) in 89.5% yield. HPLC showed 98.4 A%
purity, with dechlorinated impurity at 0.083 %.

54

Step 3. Synthesis of N-(5-chloro-pyridin-2-yl)-2-(4-cyano-benzoyl-amino)-5-methoxy-benzamide Hydrochloride (F)



- 5 To a 780 L Hastelloy reactor, was charged 4-cyanobenzoyl chloride (E) (17.2 kg, 1.1 eq.) and THF (92 kg, 3.5 parts). Reactor contents were agitated at 22 °C (19-25 °C) until all of the solids had dissolved. The resulting solution was transferred to a lower receiver and the reactor was rinsed forward with THF (26 kg, 1 part). Compound D (26.4 kg, 1 eq.), THF (396 kg, 15 parts) and pyridine (2.90 kg, 0.4 eq.) were charged to a
- 10 clean reactor. The pump and lines were rinsed forward with THF (34 kg, 1.3 parts). Via a metering pump, the 4-cyanobenzoyl chloride/THF solution was charged to the reactor, keeping the temperature at ≤ 30 °C and rinsing forward with THF (ca. 10 kg). The resulting yellow-colored slurry was agitated at 22 °C (19-25 °C) for ca 2 hrs. In-process HPLC taken after 2 hrs showed a compound of Formula D content of 0%, indicating completion of the
- 15 reaction. The slurry was filtered onto a pressure nutsche fitted with a filter cloth. The reactor, pump, lines and wet cake were rinsed with three portions of ethanol (ca. 15 kg each). The wet filter cake was discharged (65.4 kg) and transferred back to the reactor for slurry wash in ethanol (317 kg, 12 parts) at 22 °C (19-25 °C) for ca. 1 hr. The slurry was filtered onto the pressure nutsche and the reactor, pump, lines, and wet filter cake were
- 20 rinsed with two portions of ethanol (ca. 15 kg each) and two portions of THF (ca. 15 kg each). The wet filter cake was dried under vacuum with a maximum temperature of warm glycol bath (to heat the dryer jacket) of 40 °C. After 14.5 hrs of drying, LOD was 0.75%. The dried material was milled (screen 0.125") to give 31.8 kg of product, which was dried under vacuum for another 10.5 hrs. LOD after drying was 1.8%, and the product was
- 25 discharged (31.5 kg) in 74.8% yield (expected 60-90%). HPLC showed 100 % purity.

Example 4

Bioassay to Determine Antithrombotic Activity

This example describes an *in vitro* assay to determine antithrombotic activity *in vivo*. The predictive value of the assay has been verified using an established *in vivo* baboon model described below. The compound used in the assay corresponds to a compound of Formula II, or salt thereof.

Materials and Methods

For the *in vitro* studies, a plasma pool was generated from blood collected via venipuncture into 3.2 % (1:9 v/v) tri-sodium citrate from a minimum of ten donors. The specific thrombin substrate used was Z-GGR-AMC (Bachem). Tissue factor (Innovin, "TF") was purchased from Dade Behring. Rabbit anti-human TF IgG and purified recombinant human TF were from American Diagnostica. COATEST LMW Heparin/Heparin Kits were from Chomogenix. Source of anticoagulants tested were as follows: enoxaparin sodium (Aventis Pharmaceuticals), fondaparinux sodium (Glaxo Smith Kline), bivalirudin (The Medicines Company), fXa inhibitor C921-78 (Betz, A. et al. *Biochem.*, 1999; 38-14582-14591); rivaroxaban and razaxaban.

Thrombin generation in the plasma pool in the absence and presence of various anticoagulants and in warfarin treated patients was initiated by the addition of Innovin and calcium. Thrombin generation was measured by the continuous signal generated by cleavage of thrombin substrate over a 10 min period in a FlexStation fluorescence reader (Molecular Probes). The fluorescence signal (Max-Min relative fluorescence units) is presented as units (RFU) or arbitrary units (AU) of thrombin generation and anti-fXa units were measured by Coatest. Quantitation of TF concentration in Innovin was carried out by immunoblotting with rabbit anti-human TF IgG, followed by densitometry and comparison with purified human TF (residues 1-263, expressed in baculovirus).

For the *ex vivo* validation of the assay, plasma was collected from 168 patients receiving anticoagulation therapy. Subjects comprised medically stable hospital inpatients or those attending an outpatient's clinic and who were receiving warfarin (no change to warfarin dose for approximately 7 days). Blood was only collected if venesection

86

and the routine measurement of traditional anti-coagulations tests (INR, aPTT etc.) was already intended and no additional needle-sticks were performed for this study. An additional 5 mL of blood was collected and placed in sodium citrate-anticoagulated tubes. Samples were then twice centrifuged to collect the plasma fraction, and this plasma was
5 then promptly stored at -80°C.

Results

The assay was sensitive to anticoagulants with varying mechanisms of action. Addition of unfractionated heparin (UFH) or low molecular weight heparin (LMWH) to healthy donor plasma produces a dose-dependent inhibition in the assay.
10 Similarly, direct thrombin or fXa inhibitors also elicit a dose proportional inhibitory activity. The effect of specific inhibitors of thrombin or factor Xa on TF-induced plasma thrombin generation is shown in the Table 1.

Table 1

Drug	IC ₅₀
Fondaparinux	160 nM
Thrombin inhibitor Bivalirudin	2.4 µg/mL
fXa inhibitor C921-78	17 nM
fXa inhibitor Rivaroxaban	80 nM
fXa inhibitor Razaxaban	125 nM

15 This assay is also useful for measuring anticoagulation in both acute and chronically anticoagulated patients. aPTT Measurements from patients treated with UFH or LMWH correlated with inhibition of thrombin generation. Relative to traditional markers of thrombin generation (TAT and F1.2 as measured by ELISA), this bioassay provided a superior correlation to INR measurements. The results of which is shown in FIGS. 1A, 1B
20 and 1C. The extent of thrombin generation (AU) at 10 minutes was measured in plasma samples from (a) warfarin treated patients and plotted against INR values from 137 patients (FIG. 1A), (b) Enoxaparin-treated patients plotted against aPTT values from 16 patients (FIG. 1B) and (c) unfractionated heparin (UFH)-treated patients plotted against aPTT values from 15 patients (FIG. 1C).

Example 5

Comparison of Betrixaban to Fondaparinux

Evaluation in a whole blood prothrombinase assay was carried out to compare betrixaban to fondaparinux, an indirect inhibitor of fXa. Like fondaparinux,
5 betrixaban dose-dependently inhibited platelet mediated prothrombinase activity in this test system.

Materials and Methods

Amidolytic assays for inhibition of purified human fXa and related proteases were carried out as reported previously (Sinha, U et al. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 114:2313-
10 6). For determination of prothrombinase inhibitory activity, human plasma prethrombin-2 was purchased from Haematologic Technologies and the thrombin substrate Boc-Asp (OBzl)-Pro-Arg-AMC. HCl was obtained from Bachem. Data analysis for deriving kinetic parameters were carried out using the Dynafit software (Biokin). Betrixaban exhibited a K_i of 0.117 (nM) and a prothrombinase K_i of 0.801 (nM)

15 The assay described in Example 4 was employed. Betrixaban was tested in a model of thrombogenic device incorporation in an arteriovenous shunt in baboons (Hanson SR et al. *J. Clin. Invest.* 1993; 92:2003-12). The two component thrombogenic device measures thrombus growth on a dacron graft and an expansion chamber using ^{111}In labeled platelets and ^{125}I labeled fibrinogen. This model has been previously used to study a wide
20 variety of anticoagulants (unfractionated and low molecular weight heparins, thrombin and fXa inhibitors).

Results

Dose-dependent inhibition of venous thrombosis was observed at four doses (0.05, 0.12, 0.21 and 0.49 mg/kg) of betrixaban. *Ex vivo* measurements of plasma thrombin
25 generation, aPTT, PT, activated clotting time ("ACT"), and anti fXa units were performed during the time course. In contrast to the observed antithrombotic activity (30 to 89% inhibition of platelet deposition, 0 to 87% inhibition of fibrin deposition), there were minimal extension of clotting parameters upon betrixaban treatment. The results of this are presented in the Table 2 below.

58

Table 2

Agent	Fold Change from Control Mean ± SD		
	ACT	PT	aPTT
Control	0.87± 0.09	1.00± 0.04	1.02± 0.03
betrixaban 0.05 mg/kg	1.14± 0.06	1.02± 0.03	1.07± 0.03
betrixaban 0.12 mg/kg	1.14± 0.15	1.05± 0.06	1.07± 0.03
betrixaban 0.21 mg/kg	1.11± 0.04	1.07± 0.03	1.09± 0.08
betrixaban 0.49 mg/kg	1.28± 0.06	1.17± 0.11	1.29± 0.21

Anti fXa units were below the limit of quantitation for the three lower doses and 0.31 Units/ml at the highest dose. Template bleeding times were not perturbed for any of the betrixaban treated animals. The *ex vivo* parameter that correlated to the antithrombotic activity was the dose proportional inhibition (correlation coefficient $R^2=0.99$) of plasma thrombin generation; which ranged from 13% inhibition at the lowest dose to 72% at the highest dose. Thus, this new prothrombinase bioassay predicts *in vivo* antithrombotic activity.

Table 3 below provides dose responsive inhibition of *in vivo* thrombosis in the baboon model. Table 3 also provides the anti-fXa activity in baboon plasma samples during infusion of the control or the test compound.

Table 3

Dosed Group	Plasma Concentration Range of Betrixaban (ng/ml)	% Inhibition of Platelet Deposition	% Inhibition of Fibrin Formation
Control	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

FIG. 2 provides further evidence that the *in vitro* assay is predictive of *in vivo* anti-thrombotic activity. Specifically, FIG. 2 shows the dose responsive inhibition of *in vitro* thrombosis in the baboon model. Deposition of ^{111}In labeled platelets over time in the venous chamber during infusion of betrixaban (n=3 at each dose). Control animals were infused with vehicle (n=4).

59

FIGS. 3, 4A, and 4B show the inhibition of tissue factor initiated thrombin generation in human whole blood by betrixaban compared with fondaparinux. Thrombin activity was quantitated by cleavage of the fluorogenic substrate. Dose response of inhibition of thrombin generation was measured by addition of varying amounts of betrixaban and fondaparinux to whole blood from eleven healthy donors. Relative fluorescence unit (RFU) measurements of representative donor is shown.

This study showed that *in vitro* and *in vivo* characteristics of betrixaban as a potent inhibitor of purified human fXa and the prothrombinase complex. Specifically, there was greater than 86,000 fold specificity against related human proteases such as thrombin and activated Protein C. There was also a dose-dependent inhibition of tissue factor initiated thrombin generation in human whole blood and a dose-dependent inhibition of on-going thrombosis in a primate model of arteriovenous thrombosis without extending clotting parameters or bleeding time. Thus, compared to standard measures of coagulation, this assay was more predictive of *in vivo* efficacy in the animal model.

Example 6

Inhibition of Prothrombinase and Not Soluble Factor Xa Predicts Efficacy of fXa Inhibitors in an *in vivo* Model of Deep Vein Thrombosis (DVT)

This example was designed to test the hypothesis that the potency of fXa inhibitors against fXa incorporated into the prothrombinase complex would predict *in vivo* antithrombotic efficacy. Eight fXa inhibitors from four structurally distinct chemical series with a range of activities against fXa were tested for their ability to inhibit the prothrombinase enzyme complex in human plasma. Thrombin generation and subsequent cleavage of a specific thrombin substrate was used as a measure of prothrombinase activity, inhibitory activity being defined by the concentration of inhibitor required to produce a 2-fold extension in the time to maximal thrombin production (2x lag). *In vitro* rabbit PT times were also determined. *In vitro* rabbit prothrombin times (PT) were determined by addition of thromboplastin to rabbit plasma. Inhibition in the rabbit DVT model was assessed as previously described (Hollenbach et al., *Thromb. Haemost.* 1994; 71:357) and related to plasma concentrations of drug.



Table 4

No.	Cmpd Class	fXa IC ₅₀ (nM)	Prothrombinase 2x lag (μM)	Plasma Concentration in DVT (μM)	Thrombosis Inhibition (%)	Rabbit PT 2x change (μM)
1	Ketothiazole	0.5	0.18	0.06	94	7
2	Anthranilamide	1.3	0.22	1.14	37	2.7
3	Anthranilamide	0.7	0.24	1.65	47	1.7
4	Anthranilamide	0.4	0.25	1.04	47	1.0
5	Anthranilamide	0.8	0.34	3.39	41	1.5
6	naphthalenepyrazole	4.4	0.92	5.2	11	4.7
7	1,2-Benzenediaine	3.5	1.35	4.6	19	8.8
8	Isoxazole	8.2	1.66	9.2	0	64

There was also poor correlation between the 2x lag value for prothrombinase inhibition and the concentration required to achieve a 2x change in rabbit PT ($R^2 = 0.57$).

5 Neither the activities of fXa inhibition nor the change in rabbit PT predicted activity in the *in vivo* deep vein thrombosis (DVT) model. In contrast, compounds could be broadly divided into 3 levels of efficacy for inhibition of *in vivo* thrombus growth depending on their potency in the *in vitro* prothrombinase assay. Compound 1 had the lowest 2x lag value of 0.18 μM and was the most potent inhibitor of *in vivo* thrombosis with 94 % inhibition at
10 a plasma concentration of 65 nM. The second group of compounds, with 2x lag values in the prothrombinase assay ranging from 0.22 to 0.34 μM, inhibited *in vivo* thrombus formation by 37 to 47 % at plasma concentrations ranging from 1.04 to 3.39 μM. Compounds in the third category were the least potent prothrombinase inhibitors (2x lag values greater than 0.92 μM) and were unable to significantly inhibit *in vivo* thrombosis
15 even at plasma concentrations of 9.2 μM. These data show that the 2x lag value obtained in the prothrombinase assay, and not inhibition of soluble fXa or extension of rabbit PT time, is most predictive of fXa inhibitor efficacy in the *in vivo* rabbit DVT model.

Given the limitations of current anti-coagulants, the position of factor Xa (fXa) at the convergence of both the extrinsic and intrinsic pathways of blood coagulation
20 has made it an attractive target for the development of new therapies. With respect to investigating the structural-activity-relationship (SAR) of potential fXa inhibitors, assays measuring inhibition of solution phase fXa protease activity are an obvious starting point. However, the ability of compounds to inhibit soluble, purified fXa is not a true reflection of

61.

the interaction between inhibitor and enzyme *in vivo*. This is because the greatest contribution of fXa to the coagulation process occurs when it is combined with factor Va as part of the prothrombinase complex whereupon protease activity is increased 300,000 fold relative to solution-phase fXa. This increased activity of fXa in the prothrombinase complex is much harder to inhibit, thus any assessment of compound anti-fXa potency should include an evaluation of prothrombinase inhibition. Prothrombinase activity can be measured in platelet poor plasma (PPP) and, under these conditions, also takes into account the effect of plasma protein binding on compound potency. Another more direct way of assessing the effect of compounds on the anti-coagulation process is through the use of *in vitro* clotting assays such as prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT).

Example 7

Evaluation of Bioassay in Multiple Ascending Dose Study

FIG 5. shows data from *in vitro* assays performed with plasma from healthy human volunteers orally dosed with betrixaban. Nine subjects each received 40, 80 or 120 mg drug capsules every 12 hours for ten consecutive days. Control subjects (12) were treated with placebo or non-anticoagulant drug control. Plasma samples obtained from the subjects were evaluated in the *in vitro* biological assay of tissue factor initiated thrombin generation. Plasma samples were also analyzed for drug concentration using high-performance-liquid-chromatography with tandem mass spectrometry. Results show dose responsive correlation between plasma drug concentration of betrixaban and inhibition of thrombin generation in the biological assay.

Example 8

Human Therapeutic Concentrations of Betrixaban

Thrombin generation assays were performed as described in Example 4, with compounds added *ex vivo* to human whole blood. PT and aPTT values in various species determined from compounds added to platelet poor plasma. Samples were run on an ACL 3000plus (Coulter), PT determined using Dade® Thromboplastin C plus and aPTT determined using Dade® Actin® FS Activated PTT reagent.

Betrixaban and fondaparinux, an indirect fXa inhibitor, both significantly inhibited TAT and F1.2 generation in human whole blood. Compared to a therapeutic level of fondaparinux (200 nM), betrixaban (200 nM) was more potent in suppressing both markers of thrombin generation.

5

Materials and Methods

Multiple doses of betrixaban were evaluated in three animal models. The first model, which measured clot accretion on cotton threads placed in rabbit abdominal vena cava, compared inhibition of thrombus mass by betrixaban to that of supratherapeutic doses of enoxaparin (a LMW heparin).

10

The second model compared the ability of betrixaban to maintain vessel patency under arterial flow conditions in FeCl₃ induced thrombosis in rat carotid artery to that achieved by enoxaparin or clopidogrel (an antiplatelet agent).

The third model investigated inhibition of ¹¹¹In labeled platelet deposition on dacron grafts and expansion chambers placed in femoral arteriovenous shunts in baboons.

15

In all models tested, betrixaban and enoxaparin were administered as IV infusions and clopidogrel was dosed orally for three days. *Ex vivo* PT and aPTT were measured in all models. The models encompass stringent criteria of arterial and venous thrombosis and betrixaban produced dose-responsive antithrombotic activity in each of the three models. The efficacy of betrixaban compared favorably to supratherapeutic levels of enoxaparin and clopidogrel.

20

Efficacy in rabbit venous thrombosis was determined by measuring the thrombus accretion on cotton threads placed in the vena cava by means of a catheter inserted into the left femoral vein, as described by Hollenbach et al., *Thromb. Haemost.* 1994; 71:357-362, incorporated by reference in its entirety herein. The decrease in thrombus weight following a two hour infusion of compound was expressed relative to vehicle control. See also Sinha, et al., *Eur. J. Pharmacology*. 395:51-59 (2000), incorporated by reference in its entirety herein.

25

Rat FeCl₃ model adapted from Kurz, K.D. et al. *Thromb. Res.* 1990; 60(4):269-280, incorporated by reference in its entirety herein, utilizing the left carotid artery. A stenosis of the artery was applied with a silk ligature reducing blood flow by 50% with a light crush injury followed by application of 50% FeCl₃ for the duration of the

30



experiment. Blood flow was monitored via pulsed Doppler flow probe and recorded for 90 minutes post-FeCl₃ application. Enoxaparin and Betrixaban administered IV. Clopidogrel administered orally Q.D. for 3 days.

The baboon model was performed at Oregon Health & Science University following procedures described by Hanson, S.R. et al. *J. Clin. Invest.* 1993; 92:2003-2012, incorporated by reference in its entirety herein. Briefly, thrombosis is induced by two different thrombogenic devices incorporated within an excorporeal femoral artery-vein (A-V) shunt. Arterial model utilizes a high shear stress environment to promote thrombus formation on a dacron graft. Venous model utilizes a low-shear stress environment to promote thrombus formation in an expansion chamber. Platelets and fibrin are pre-labeled with ¹¹¹In and ¹²⁵I fibrinogen to measure platelet deposition and fibrin accumulation, respectively.

Results

Surprisingly, unlike in the rodent models, efficacy in primates was attained at a much lower dose with minimal prolongation of PT. Species specificity was also demonstrated by *in vitro* extensions of PT and aPTT in rat, rabbit, baboon and human plasma. A 2X change of PT was attained at concentrations of 8.9, 1.6, 1 and 0.4 μM respectively. The data indicate that doses of betrixaban that inhibit thrombin generation in human blood and that provide anticoagulation similar to baboon dosed at 0.05-0.49 mg/kg may be sufficient to prevent venous thrombosis in humans. Comparative modeling of extents of change in PT to levels of antithrombotic efficacy also leads us to predict that human therapeutic activity for betrixaban may be attained without concurrent changes in *ex vivo* clotting parameters. The data is presented in Table 5.

64

Table 5

Model of Thrombosis	Agent, Dose	Antithrombotic Activity	APTT fold change	PT fold change
Rabbit Vena Cava	betrixaban, 3 mg/kg	76% inhibition	2.22	2.34
	Enoxaparin, 2.2 mg/kg	96% inhibition	2.06	1.01
Rat Carotid	betrixaban, 19.1 mg/kg	90% patency	1.69	2.20
	Enoxaparin, 7.6 mg/kg	70% patency	3.49	1.19
	Clopidogrel, 3 mg/kg/day	80% patency	1.03	1.01
Baboon Arteriovenous	betrixaban, 0.49 mg/kg	90% inhibition (venous) 32% inhibition (arterial)	1.29	1.17

Example 9

Comparison of Betrixaban with Enoxaparin in a Randomized Trial for the Prevention of Venous Thromboembolic Events after Total Knee Replacements

This study included 215 patients undergoing total knee replacement (TKR) were randomized in a 2:2:1 ratio to either betrixaban 15 mg or 40 mg dose orally twice a day or enoxaparin (Enox) 30 mg dosed subcutaneously twice a day for 10 to 14 days. The study was blinded to the 15 versus 40 mg dose, but not to betrixaban vs. Enox. The primary efficacy endpoint was the incidence of venous thromboembolism ("VTE") (symptomatic or asymptomatic deep vein thrombosis on a mandatory unilateral venogram or symptomatic pulmonary embolism) through Day 10 to 14. Safety endpoints included the incidence of major and clinically significant nonmajor bleeds through the day after venography. All efficacy and bleeding endpoints were adjudicated by a blinded, independent central adjudication committee.

Materials and Methods

Betrixaban in this study was administered in gelatin capsules. The capsules contained betrixaban malcate, dextrose monohydrate, and magnesium stearate.

The initial dose of betrixaban was taken 6 to 8 hours after surgery and twice daily (BID) thereafter. Enoxaparin was administered subcutaneously 12 to 24 hours after surgery and every 12 hours (q 12h) thereafter. Treatment continued for 10 to 14 days unless a protocol-specified stopping criterion had been met. After discharge from the hospital, patients self-administered study medication. The last dose of study medication was administered the morning of the scheduled mandatory venography of the operated leg (Day 10 to 14).

Blood samples for assessment of plasma drug concentrations and pharmacodynamic measurements were obtained at screening, 1 to 4 hours after administration of the morning dose of study medication on Day 2, on the day of discharge and prior to the mandatory venogram on Day 10 to 14. Plasma samples were analyzed for betrixaban using high-performance-liquid-chromatography with tandem mass spectrometry. The method was validated for a range from 0.100-50.0 ng/mL, based on the analysis of 0.2 mL plasma. Quantitation was performed using a calibration standard curve generated from weighted least square regression analysis.

Anticoagulation was measured by a thrombin generation inhibition assay as discussed in Example 4 and anti-Xa activity in addition to activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT) and international normalized ratio (INR). The anti-Xa unit assay was adapted from the Coatest LMW heparin kit (Diapharma) and modified to a 96-well plate format. In this assay, standards and patient samples were assayed in duplicate and the limit of quantification was 0.05 anti-Xa U/mL. Thrombin generation was initiated by the addition of tissue factor (Innovin, Dade Behring) and calcium to citrate anticoagulated patient plasma (0.1 mL). Formation of thrombin was measured by cleavage of a specific thrombin substrate (Z-GGR-AMC, Bachem) over a 10 minute period. Relative fluorescence units were measured in a FlexStation fluorescence reader (Molecular Devices) and used for quantitation of thrombin generation. All patient plasma samples were assayed in triplicate and inhibition of thrombin generation reported as change from baseline relative fluorescent unit for each individual.

66

Results

A dose- and concentration-dependent effect of betrixaban on inhibition of thrombin generation and anti-fXa levels was observed. 175 Patients (81.4%) had an efficacy and safety assessment as shown in Table 6.

5

Table 6

Primary efficacy and safety outcomes	betrixaban 15mg BID	betrixaban 40 mg BID	Enox 30 mg BID
VTE % (95%CI)	20 (12-32)	15 (8-27)	10 (3-23)
Major Bleeds % (95%CI)	0 (0-4)	0 (0-4)	2 (0-12)
Clinical signif. nonmajor bleeds	0 (0-4)	2 (0-8)	5 (1-16)

FIG. 6 shows the VTE rates and 95% confidence intervals for betrixaban and enoxaparin as determined in this study with unilateral venography between Days 8 and 10 and for enoxaparin historical controls from studies using vilateral venography performed between Days 10 and 14 post-TKR. FIG. 9 depicts plasma betrixaban concentrations after the second dose (Day 2), on discharge and at the time of venography. As expected given the long half-life of betrixaban, mean drug concentrations increased after the first few doses and appeared to reach steady-state by discharge (median Day 4) for both betrixaban dose groups. Betrixaban exhibited a dose-dependent and concentration-dependent effect on inhibition of thrombin generation and anti-Xa levels (FIG. 7 and 8). The effect of betrixaban 15 mg on the inhibition of thrombin generation was similar to that observed with enoxaparin whereas the effect seen with betrixaban 40 mg was more pronounced. Conversely, the effect seen on anti-Xa activity was similar for betrixaban 40 mg and enoxaparin and less with betrixaban 15 mg. Treatment with betrixaban did not appreciably affect other coagulation parameters (i.e. aPTT, PT and INR).

Betrixaban was effective in preventing VTE after TKR and was safe and well tolerated.

It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the above embodiments, that the foregoing description and examples are



intended to illustrate and not limit the scope of the invention. Other aspects, advantages and modifications within the scope of the invention will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains.

CLAIMS

1. A method of inhibiting coagulation in a human patient in need thereof, comprising administering to the patient a coagulation inhibiting amount of a factor Xa inhibitor compound of the Formula I:

5

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

I

wherein:

A is selected from:

- (a) C₁-C₆-alkyl;
- 10 (b) C₃-C₈-cycloalkyl;
- (c) -N(R¹,R²), N(R¹,R²)-C(=NR³)-, N(R¹,R²)-C(=NR³)-N(R⁴)-, R¹-C(=NR³)-, R¹-C(=NR³)-N(R⁴)-;
- (d) phenyl, which is independently substituted with 0-2 R substituents;
- (e) naphthyl, which is independently substituted with 0-2 R substituents; and
- 15 a monocyclic or fused bicyclic heterocyclic ring system having from 5 to 10 ring atoms, wherein 1-4 ring atoms of the ring system are selected from N, O and S, and wherein the ring system may be substituted with 0-2 R substituents;

R is selected from:

- 20 H, halo, -CN, -CO₂R¹, -C(=O)-N(R¹, R²), -(CH₂)_m-CO₂R¹, -(CH₂)_m-C(=O)-N(R¹, R²), -NO₂, -SO₂N(R¹, R²), -SO₂R¹, -(CH₂)_mNR¹R², -(CH₂)_m-C(=NR³)-R¹, -(CH₂)_m-C(=NR³)-N(R¹,R²), -(CH₂)_m-N(R⁴)-C(=NR³)-N(R¹,R²), -(CH₂)_mNR¹-
- group appended to a 3 to 6 membered heterocyclic ring containing from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CF₃, -OR², and a 5-6 membered
- 25 heterocyclic system containing from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁-C₄-alkyl, -C₁₋₄alkyl-CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-
- 30 C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

m is an integer of 0-2;

69

R^1 , R^2 , R^3 and R^4 are independently selected from the group consisting of:

H, -OR⁵, -N(-R⁵, -R⁶), -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylphenyl and -C₀₋₄alkylnaphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂; or R^1 and R^2 , or R^2 and R^3 taken together can form a 3-8 membered cycloalkyl or a heterocyclic ring system, wherein the heterocyclic ring system may have from 3 to 10 ring atoms, with 1 to 2 rings being in the ring system and contain from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic ring system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, C₁₋₄-alkyl, -CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

R^5 and R^6 are independently selected from the group consisting of:

H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-phenyl and -C₀₋₄alkylene-naphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂; or R^5 and R^6 taken together can form a 3-8 membered cycloalkyl or a heterocyclic ring system, wherein the heterocyclic ring system may have from 3 to 10 ring atoms, with 1 to 2 rings being in the ring system and contain from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic ring system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄-alkyl, -CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

Q is a member selected from the group consisting of:

a direct link, -CH₂-, -C(=O)-, -O-, -N(R⁷)-, -N(R⁷)CH₂-, -CH₂N(R⁷)-, -C(=NR⁷)-, -C(=O)-N(R⁷)-, -N(R⁷)-C(=O)-, -S-, -SO-, -SO₂-, -SO₂-N(R⁷)- and -N(R⁷)-SO₂-;

R^7 is selected from:

H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-phenyl and -C₀₋₄alkylene-naphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂;

D is a direct link or is a member selected from the group consisting of:

- (a) phenyl, which is independently substituted with 0-2 R^{1a} substituents;
- (b) naphthyl, which is independently substituted with 0-2 R^{1a} substituents; and
- (c) a monocyclic or fused bicyclic heterocyclic ring system having from 5 to 10 ring atoms, wherein 1-4 ring atoms of the ring system are selected from N, O and S, and wherein the ring system may be substituted from 0-2 R^{1a} substituents;

R^{1a} is selected from:

halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, -NO₂, -(CH₂)_nNR^{2a}R^{3a}, -(CH₂)_nCO₂R^{2a}, -(CH₂)_nCONR^{2a}R^{3a}, -SO₂NR^{2a}R^{3a}, -SO₂R^{2a}, -CF₃, -OR^{2a}, and a 5-6 membered aromatic heterocyclic system containing from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the aromatic heterocyclic system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN and -NO₂;

R^{2a} and R^{3a} are independently selected from the group consisting of:

H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-phenyl and -C₀₋₄alkylene-naphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN and -NO₂;

n is an integer of 0-2;

E is a direct link or a member selected from the group consisting of:

-C₁₋₂-alkylene-, -O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -C₀₋₁-alkylene-C(=O), -C₀₋₁-alkylene-C(=O)-N(-R⁸)-C₀₋₁-alkylene-, -C₀₋₁-alkylene-N(-R⁸)-C(=O)-C₀₋₁-alkylene-, -N(-R⁸)-C(=O)-N(-R⁸)- and -C₀₋₁-alkylene-N(-R⁸)-;

R⁸ is a member selected from the group consisting of:

- 5 H; -C₁₋₄-alkyl; -C₀₋₄-alkylene-aryl; -C₀₋₄-alkylene-heteroaryl; -C₁₋₄-alkylenc-C(=O)-OH, -C₁₋₄-alkylenc-C(=O)-O-C₁₋₄-alkyl, and -C₁₋₄-alkylene-C(=O)-N(-R^{2b}, -R^{3b});

R^{2b} and R^{3b} are each a member independently selected from the group consisting of:

- 10 H, -C₁₋₄-alkyl, -C₀₋₄-alkylene-aryl; -C₀₋₄-alkylene-heterocyclic group, and R^{2b} and R^{3b} together with the N atom to which they are attached can form a 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein the heterocyclic ring may be substituted with 0-2 R^{1c} groups;

R^{1c} is a member selected from the group consisting of:

- 15 Halo; -C₁₋₄-alkyl; -CN; -NO₂; -C(=O)-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -C(=O)-OR^{2c}; -(CH₂)_q-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -SO₂-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -SO₂R^{2c}; -CF₃; and -(CH₂)_q-OR^{2c};

R^{2c} and R^{3c} are each independently a member selected from the group consisting of:

H; -C₁₋₄-alkyl; and -C₁₋₄-alkylene-aryl;

q is an integer of 0-2;

G is a member selected from the group consisting of:

- 20 (a) C₂-alkenyl or C₃₋₈-cycloalkenyl, wherein the alkenyl and cycloalkenyl attachment points are the alkenyl carbon atoms and wherein the -C₂-alkenyl or -C₃₋₈-cycloalkenyl are substituted with 0-4 R^{1d} groups;
- (b) a phenyl group wherein the ring carbon atoms of the phenylene group are substituted with 0-4 R^{1d} groups;
- 25 (c) a 3-8 membered heterocyclic ring system containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein 0-2 ring atoms of the heterocyclic ring may be substituted with 0-4 R^{1d} groups; and,
- (d) an 8-10 membered fused heterocyclic bicyclic ring system, containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein 0-2 ring atoms of the fused
- 30 bicyclic ring system may be substituted with 0-4 R^{1d} groups;

R^{1d} is a member selected from the group consisting of:

H, halo; C₁₋₆-alkyl, aryl, -CN; -NO₂; -(CH₂)₀₋₆-NR^{2d}R^{3d}; -SO₂NR^{2d}R^{3d}; -SO₂R^{2d};
 -CF₃; -(CH₂)₀₋₆-OR^{2d}; -O-(CH₂)₁₋₆OR^{2d}; -O-(CH₂)₁₋₆-C(=O)-O-R^{2d};
 -O-(CH₂)₁₋₆-C(=O)-N(R^{2d},R^{3d}); -N(R^{5a})-(CH₂)₁₋₆-OR^{2d}; -N(R^{5a})-(CH₂)₁₋₆-N(R^{2d},R^{3d});
 -C(=O)-N(R^{2d},R^{3d}); -N(R^{5a})-(CH₂)₁₋₆-C(=O)-N(R^{2d},R^{3d}); -N(-(CH₂)₁₋₆-OR^{2d})₂;
 5 -N(R^{5a})-(CH₂)₁₋₆-OR^{2d}; -N(R^{5a})-C(=O)-R^{2d}; -N(R^{5a})-SO₂-R^{2d}; -(CH₂)₀₋₆-C(=O)-O-R^{2d};
 -(CH₂)₀₋₆-C(=O)-N(R^{2d},R^{3d}); -(CH₂)₀₋₆-C(=NR^{2d})-N(R^{3d},R^{4d});
 -(CH₂)₀₋₆-N(R^{5a})C(=NR^{2d})-N(R^{3d},R^{4d}); a -(CH₂)₀₋₆-N(R^{3d})C₅₋₆ membered
 heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, and a
 -(CH₂)₀₋₆-5-6 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from
 10 N, O and S;

R^{5a}, R^{2d}, R^{3d} and R^{4d} are each independently a member selected from the group consisting
 of:

H, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-alkylaryl, -CN; -NO₂; carbocyclic aryl, -CN; -NO₂; or R^{2d} and R^{3d}
 taken together with the N atoms they are independently attached form a 5-7
 15 membered heterocyclic ring; or R^{3d} and R^{4d} taken together with the N atom to
 which they are attached form a 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4
 heteroatoms selected from N, O and S;

J is a direct link or is a member selected from the group consisting of:

-N(-R⁹)-C(=O)-; -C(=O)-N(-R⁹)-; -O-; -S-; -SO-; -SO₂-; -CH₂-; -N(-R⁹)-; and
 20 -N(-R⁹)-SO₂-;

R⁹ is a member selected from the group consisting of:

H; -C₁₋₄-alkyl; -C₀₋₄-alkyl-carbocyclic aryl; -(CH₂)₀₋₄-5-6 membered heterocyclic
 ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S; -(CH₂)₁₋₆-C(=O)-O-C₁₋₄-
 4-alkyl; and -(CH₂)₁₋₆-C(=O)-N(R^{6a},R^{6b});

25 R^{6a} and R^{6b} are each a member independently selected from the group consisting of:

H and -C₁₋₆-alkyl;

X is a member selected from the group consisting of:

- (a) phenyl substituted with 0-3 R^{1e} groups;
- (b) naphthyl substituted with 0-3 R^{1e} groups and
- 30 (c) a 6-membered aromatic heterocyclic ring system containing 1-3 N atoms and
 having 0-3 ring atoms substituted with 0-3 R^{1e} groups; and

- (d) an 8-10 membered fused aromatic heterocyclic bicyclic ring system containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S and 0-3 ring atoms of the fused heterocyclic bicyclic ring system are substituted with 0-3 R^{1e} groups;

5 R^{1e} is a member independently selected from the group consisting of:

Halo; CF₃; -C₁₋₄-alkyl; carbocyclic aryl; -C₀₋₂-alkylene-CN; -O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-C(=O)-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-NO₂; -C₀₋₂-alkylene-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-SO₂-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-SO₂-R^{2e}; trihaloalkyl; -O-C₀₋₂-alkylene-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-O-R^{2e}; -O-C₁₋₄-alkylene-C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e}); -O-C₁₋₄-alkylene-C(=O)-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-N(R^{2e})-C(=O)-R^{3e}; -C₀₋₂-alkylene-N(-R^{2e})-SO₂-R^{3e}; -CH₂-N(R^{2e})-C(=O)-R^{3e}; -CH₂-N(R^{2e})-SO₂-R^{3e}; -(CH₂)₀₋₆-NR^{2e}R^{3e}; -C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e}); -N(-(CH₂)₁₋₆-OR^{2e})₂; -N(R¹⁰)-(CH₂)₁₋₆-OR^{2e}; -N(R¹⁰)-C(=O)-R^{2e}; -N(R¹⁰)-SO₂-R^{2e}; -C(=N(R¹⁰))-N(R^{2e}, R^{3e}); and a -(CH₂)₀₋₆-5-6 membered heterocyclic ring containing

15 1-4 heteroatoms selected from N, O and S;

R¹⁰, R^{2e} and R^{3e} are each independently a member selected from the group consisting of:

H; -C₁₋₄-alkyl; -C₀₋₂-alkylene-O-R^{1g}; -C₀₋₂-alkylene-N(-R^{1g}, -R^{2g}); -C₁₋₄-alkylene-carbocyclic aryl; -C₁₋₄-alkylene-heterocyclic; and R¹⁰ and R^{2e}, or R^{2e} and R^{3e} together with the N atom to which they are attached can form 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S which can be substituted with 0-2 R^{1g} groups;

R^{1g} and R^{2g} are independently a member selected from the group of:

H; halo; -C₁₋₄-alkyl, a carbocyclic aryl group; a heterocyclic group; -CN; -C(=O)-N(R^{3g})R^{4g}; -C(=O)-OR^{3g}; -NO₂; -(CH₂)_p-NR^{3g}R^{4g}; -SO₂NR^{3g}R^{4g}; -SO₂R^{3g}; -CF₃; and -(CH₂)_pOR^{3g};

25 p is an integer of 0-2; and

R^{3g} and R^{4g} are each independently selected from the group consisting of:

H; C₁₋₄-alkyl and -C₀₋₄-alkylene-carbocyclic aryl; or a pharmaceutically acceptable salt thereof;

30 wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between about 0.01 and about 2.0 mg/kg.

2. The method of claim 1, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between about 0.1 and about 1.5 mg/kg.

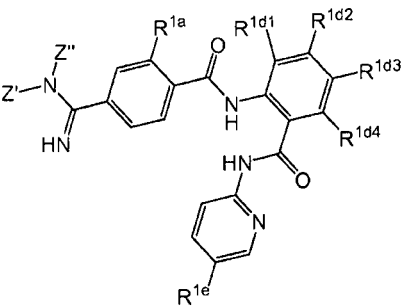
3. The method of claim 1, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between about 0.4 and about 1.2 mg/kg.

4. The method of claim 1, wherein the pharmaceutically acceptable salt of the factor Xa inhibitor compound is a maleate salt.

5. The method of claim 1, wherein the factor Xa inhibitor compound is administered to the patient once daily.

6. The method of claim 1, wherein the factor Xa inhibitor compound is administered to the patient twice daily or three times daily.

7. The method of claim 1, wherein the factor Xa inhibitor compound is of formula IV:



IV

wherein:

Z' and Z'' are each independently a C₁-C₆ alkyl which is optionally substituted with a hydroxyl, carboxylic acid or carboxylic acid ester group;

R^{1a} is selected from the group consisting of:

H, -F, -Cl, and Br;

R^{1d2} and R^{1d4} are each H ;

R^{Id1} and R^{Id3} are each independently a member selected from the group consisting of:

H, -Cl, -F, -Br, -OH and -OCH₃; and

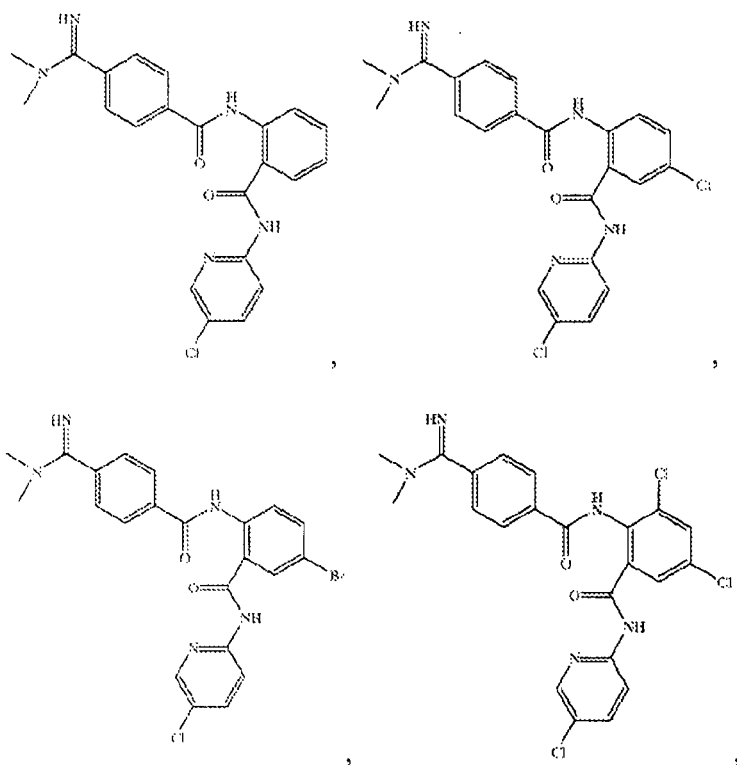
R^{1c} is a member selected from the group consisting of:

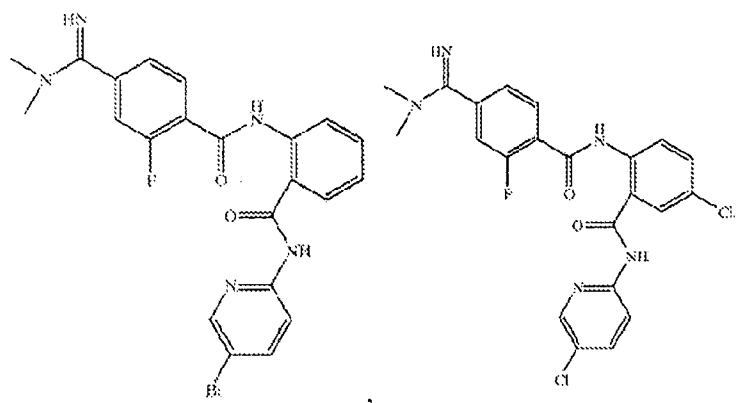
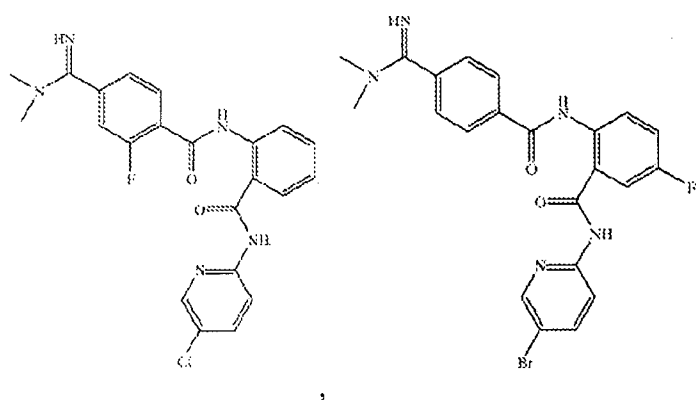
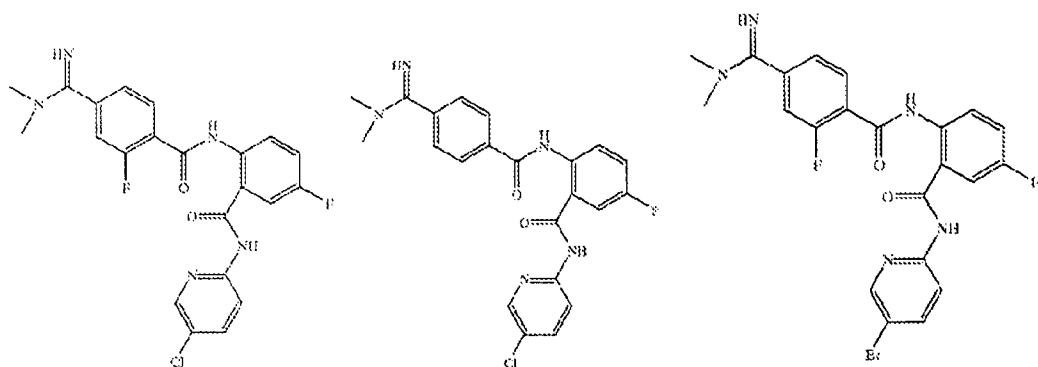
-F, -Cl, -Br, -OH, -CH₃, and -OCH₃,

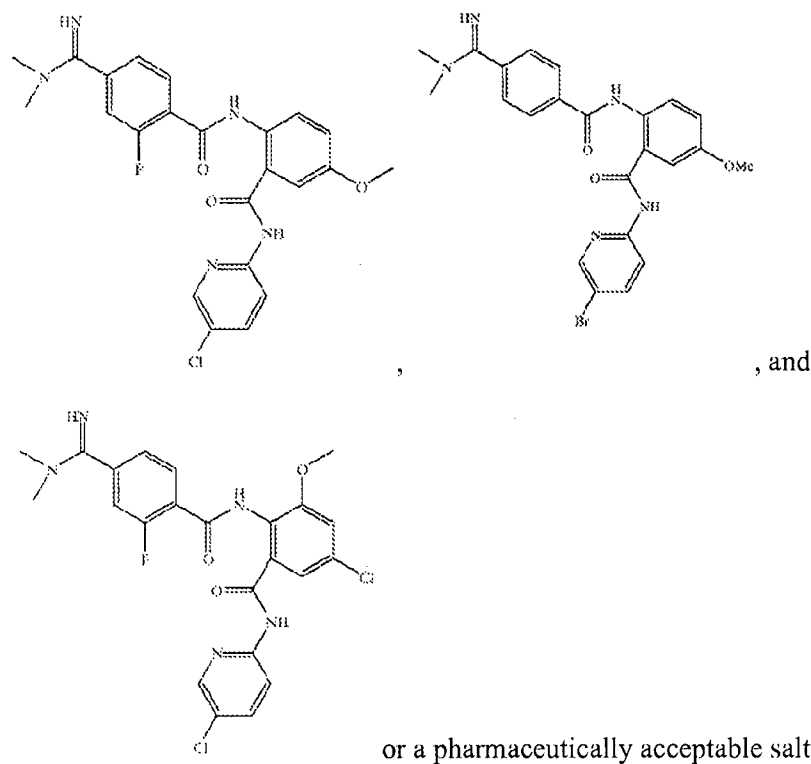
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

10

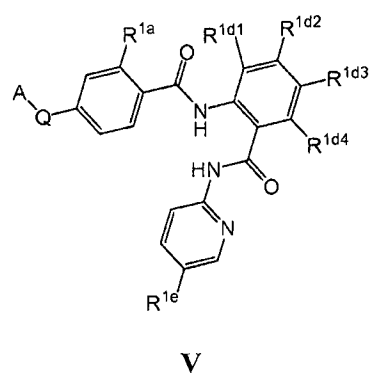
8. The method of claim 1, wherein the compound is selected from the group consisting of:



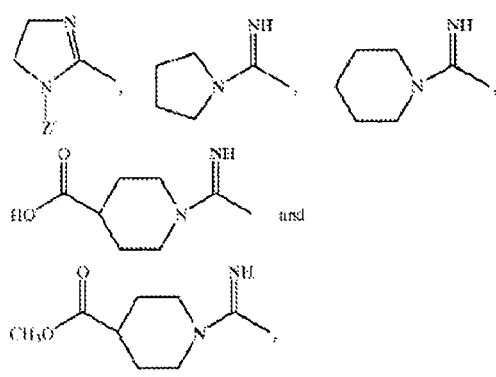




9. The method of claim 1, wherein the factor Xa inhibitor compound is of
5 Formula V:



wherein:
A-Q is a member selected from the group consisting of:



where Z' is a C₁₋₆ alkyl which is optionally substituted with a hydroxyl, carboxylic acid or carboxylic acid ester group;

R^{1a} is selected from the group consisting of:

H, -F, -Cl, and Br;

R^{1d2} and R^{1d4} are each H;

R^{1d1} and R^{1d3} are each independently a member selected from the group consisting of:

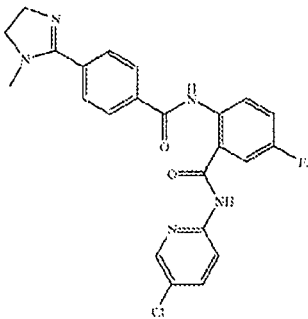
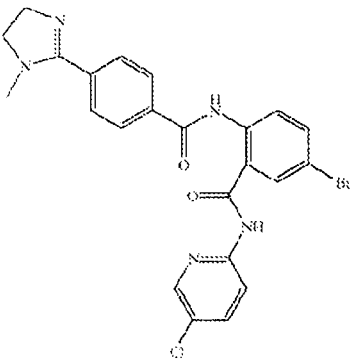
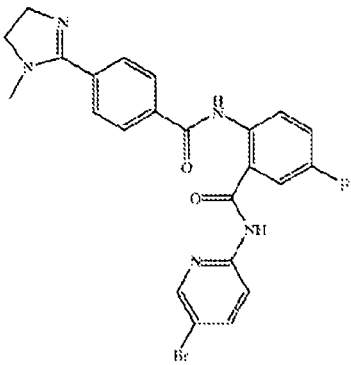
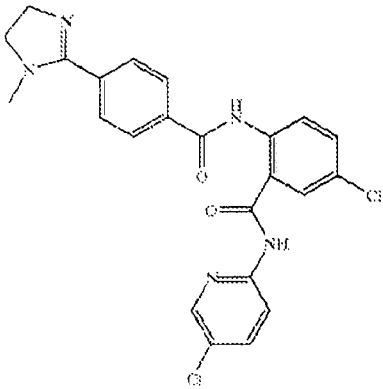
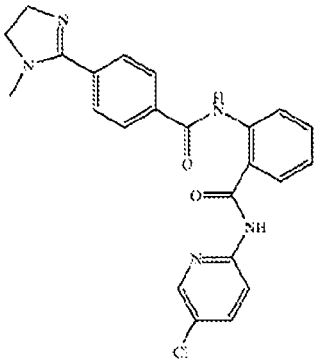
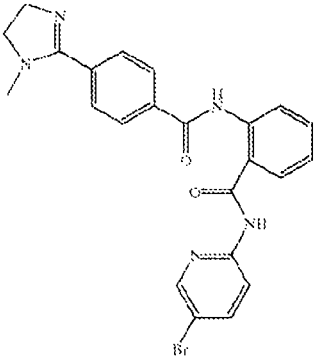
H, -Cl, -F, -Br, -OH and -OCH₃; and

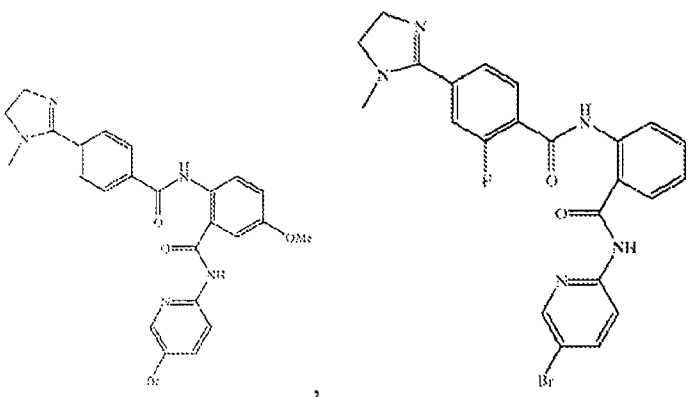
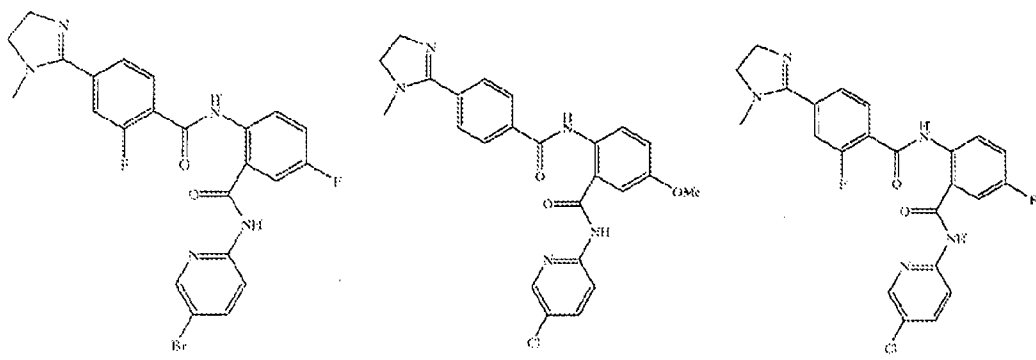
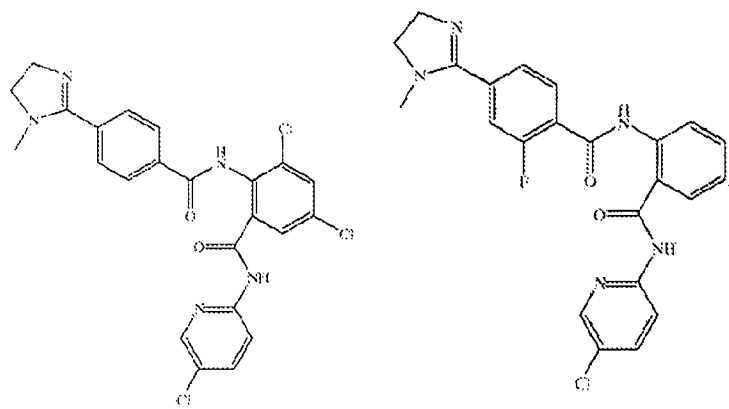
R^{1e} is a member selected from the group consisting of:

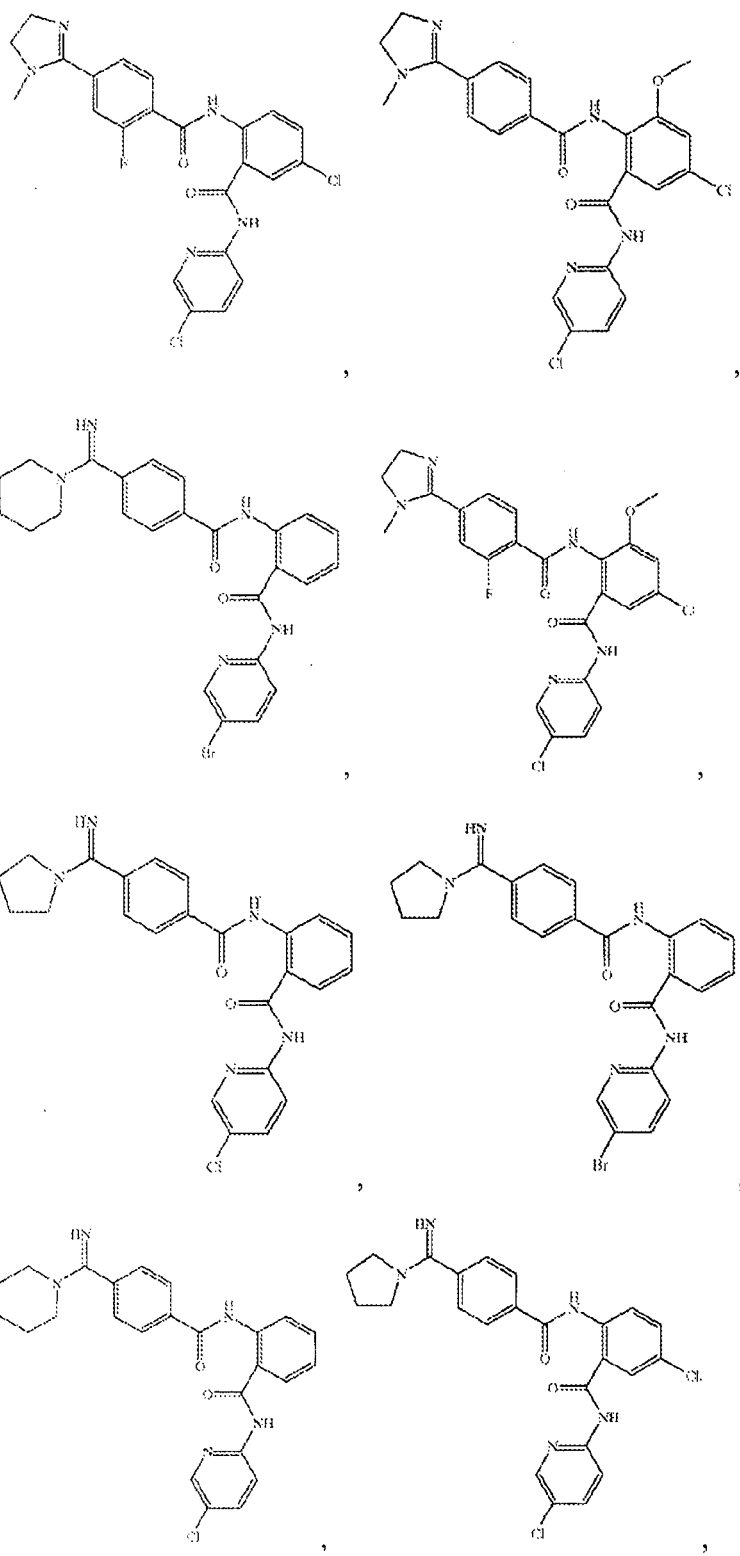
-F, -Cl, -Br, -OH, -CH₃, and -OCH₃,

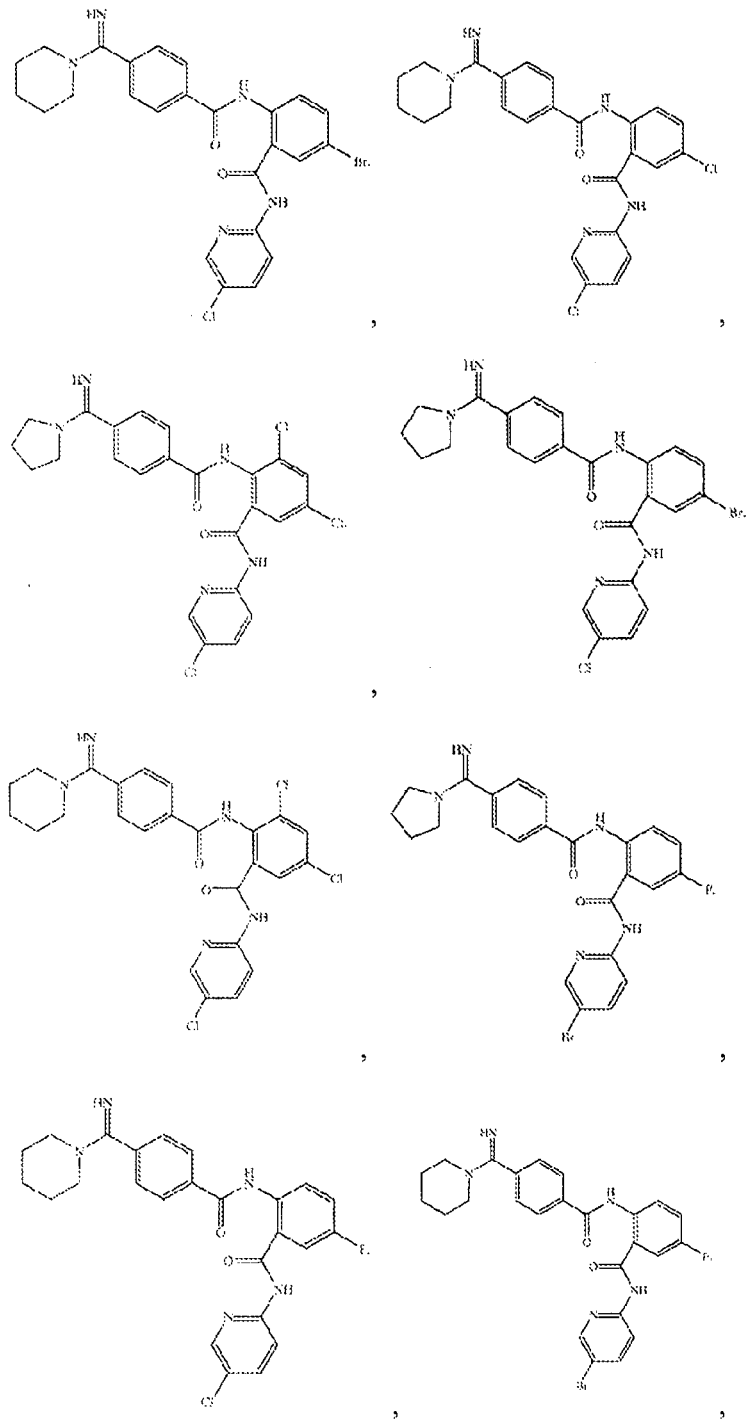
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

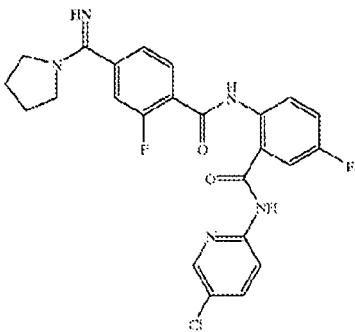
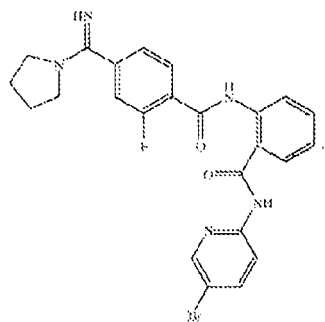
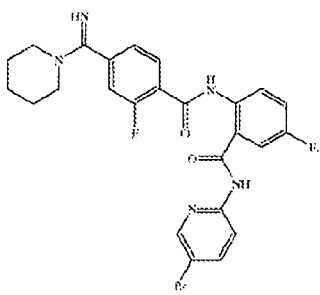
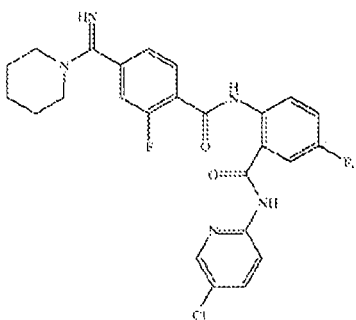
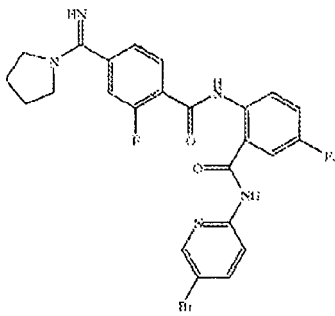
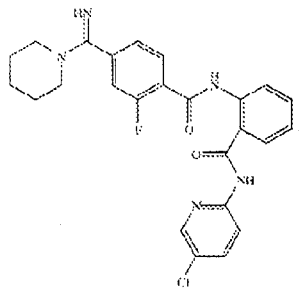
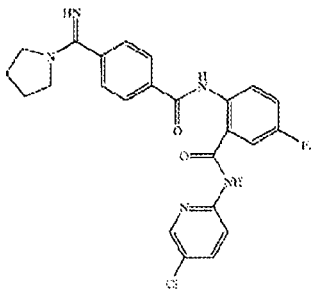
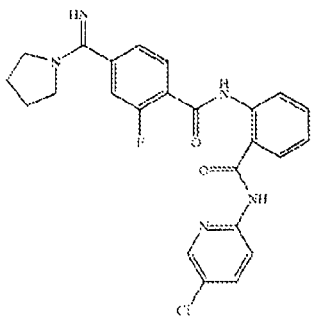
10. The compound of claim 9, wherein the compound is selected from the group consisting of:

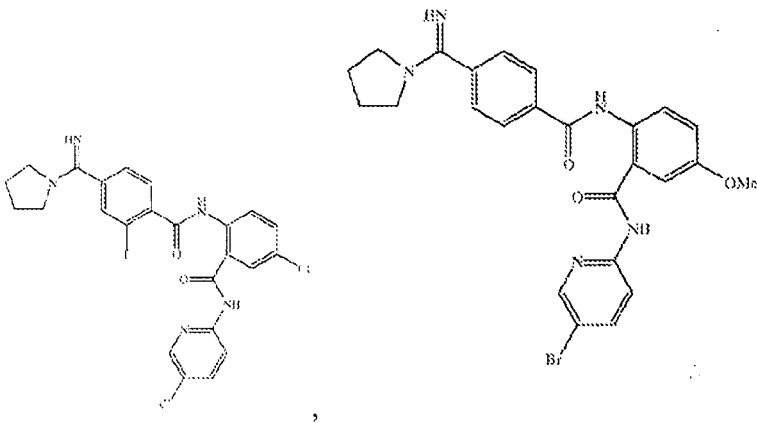
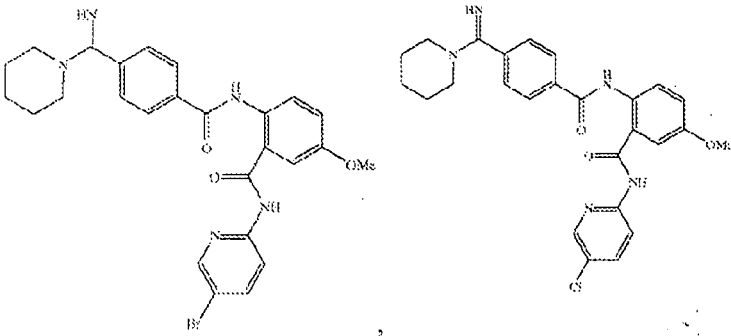
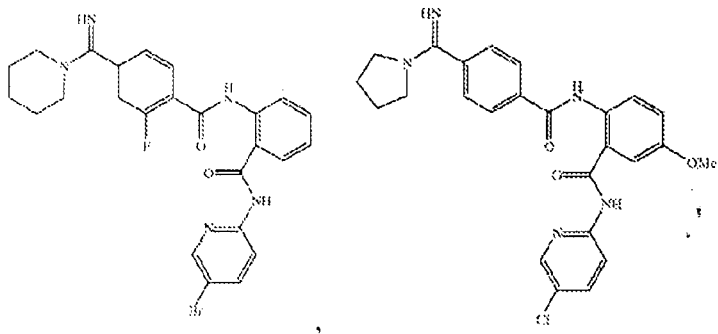




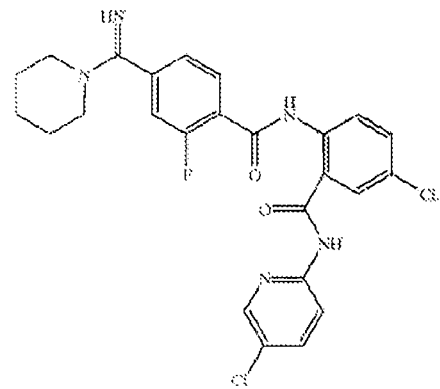








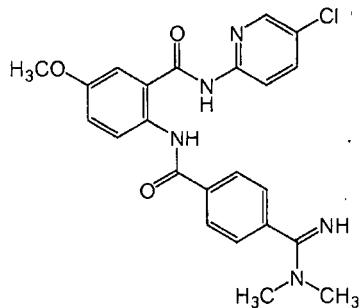
, and



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.



11. A method of inhibiting coagulation in a human patient in need thereof, comprising administering to the patient a coagulation inhibiting amount of a factor Xa inhibitor compound of the Formula II :



5 or pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between about 0.01 and about 2.0 mg/kg.

12. The method of claim 11, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between about 0.1 and about 10 1.5 mg/kg.

13. The method of claim 12, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose from between about 0.4 and about 1.2 mg/kg.

14. The method of claim 12, wherein the pharmaceutically acceptable salt of the 15 factor Xa inhibitor compound is a maleate salt.

15. A unit dose formulation comprising a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound of Formula I :



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

I

wherein:

A is selected from:

- 5 (a) C₁-C₆-alkyl;
- (b) C₃-C₈-cycloalkyl;
- (c) -N(R¹,R²), N(R¹,R²)-C(=NR³)-, N(R¹,R²)-C(=NR³)-N(R⁴)-, R¹-C(=NR³)-, R¹-C(=NR³)-N(R⁴)-;
- (d) phenyl, which is independently substituted with 0-2 R substituents;
- 10 (e) naphthyl, which is independently substituted with 0-2 R substituents; and a monocyclic or fused bicyclic heterocyclic ring system having from 5 to 10 ring atoms, wherein 1-4 ring atoms of the ring system are selected from N, O and S, and wherein the ring system may be substituted with 0-2 R substituents;

15 R is selected from:

- H, halo, -CN, -CO₂R¹, -C(=O)-N(R¹, R²), -(CH₂)_m-CO₂R¹, -(CH₂)_m-C(=O)-N(R¹, R²), -NO₂, -SO₂N(R¹, R²), -SO₂R¹, -(CH₂)_mNR¹R², -(CH₂)_m-C(=NR³)-R¹, -(CH₂)_m-C(=NR³)-N(R¹,R²), -(CH₂)_m-N(R⁴)-C(=NR³)-N(R¹,R²), -(CH₂)_mNR¹-group appended to a 3 to 6 membered heterocyclic ring containing from 1-4
- 20 heteroatoms selected from N, O and S, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CF₃, -OR², and a 5-6 membered heterocyclic system containing from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁-C₄-alkyl,
- 25 -C₁₋₄alkyl-CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

m is an integer of 0-2;

R¹, R², R³ and R⁴ are independently selected from the group consisting of:

- H, -OR⁵, -N(-R⁵, -R⁶), -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl,
- 30 -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylphenyl and -C₀₋₄alkylnaphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be

independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂; or R¹ and R², or R² and R³ taken together can form a 3-8 membered cycloalkyl or a heterocyclic ring system, wherein the heterocyclic ring system may have from 3 to 10 ring atoms, with 1 to 2 rings being in the ring system and contain from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic ring system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, C₁-C₄-alkyl, -CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

10 R⁵ and R⁶ are independently selected from the group consisting of:

H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-phenyl and -C₀₋₄alkylene-naphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂; or R⁵ and R⁶ taken together can form a 3-8 membered cycloalkyl or a heterocyclic ring system, wherein the heterocyclic ring system may have from 3 to 10 ring atoms, with 1 to 2 rings being in the ring system and contain from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the heterocyclic ring system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁-C₄-alkyl, -CN, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl and -NO₂;

Q is a member selected from the group consisting of:

a direct link, -CH₂-, -C(=O)-, -O-, -N(R⁷)-, -N(R⁷)CH₂-, -CH₂N(R⁷)-, -C(=NR⁷)-, -C(=O)-N(R⁷)-, -N(R⁷)-C(=O)-, -S-, -SO-, -SO₂-, -SO₂-N(R⁷)- and -N(R⁷)-SO₂;

R⁷ is selected from:

H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-phenyl and -C₀₋₄alkylene-naphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo,

-C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, and -NO₂;

D is a direct link or is a member selected from the group consisting of:

- (a) phenyl, which is independently substituted with 0-2 R^{1a} substituents;
- 5 (b) naphthyl, which is independently substituted with 0-2 R^{1a} substituents; and
- (c) a monocyclic or fused bicyclic heterocyclic ring system having from 5 to 10 ring atoms, wherein 1-4 ring atoms of the ring system are selected from N, O and S, and wherein the ring system may be substituted from 0-2 R^{1a} substituents;

10 R^{1a} is selected from:

halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN, -NO₂, -(CH₂)_nNR^{2a}R^{3a}, -(CH₂)_nCO₂R^{2a}, -(CH₂)_nCONR^{2a}R^{3a}, -SO₂NR^{2a}R^{3a}, -SO₂R^{2a}, -CF₃, -OR^{2a}, and a 5-6 membered aromatic heterocyclic system containing from 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein from 1-4

15 hydrogen atoms on the aromatic heterocyclic system may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN and -NO₂;

R^{2a} and R^{3a} are independently selected from the group consisting of:

- 20 H, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-phenyl and -C₀₋₄alkylene-naphthyl, wherein from 1-4 hydrogen atoms on the ring atoms of the phenyl and naphthyl moieties may be independently replaced with a member selected from the group consisting of halo, -C₁₋₄alkyl, -C₂₋₆alkenyl, -C₂₋₆alkynyl, -C₃₋₈cycloalkyl, -C₀₋₄alkylene-C₃₋₈cycloalkyl, -CN and -NO₂;

25 n is an integer of 0-2;

E is a direct link or a member selected from the group consisting of:

-C₁₋₂-alkylene-, -O-, -S-, -SO-, -SO₂-, -C₀₋₁-alkylene-C(=O), -C₀₋₁-alkylene-C(=O)-N(-R⁸)-C₀₋₁-alkylene-, -C₀₋₁-alkylene-N(-R⁸)-C(=O)-C₀₋₁-alkylene-, -N(-R⁸)-C(=O)-N(-R⁸)- and -C₀₋₁-alkylene-N(-R⁸)-;

30 R⁸ is a member selected from the group consisting of:

H; -C₁₋₄-alkyl; -C₀₋₄-alkylene-aryl; -C₀₋₄-alkylene-heteroaryl; -C₁₋₄-alkylene-C(=O)-OH, -C₁₋₄-alkylene-C(=O)-O-C₁₋₄-alkyl, and -C₁₋₄-alkylene-C(=O)-N(-R^{2b}, -R^{3b});

R^{2b} and R^{3b} are each a member independently selected from the group consisting of:

- 5 H, -C₁₋₄-alkyl, -C₀₋₄-alkylene-aryl; -C₀₋₄-alkylene-heterocyclic group, and R^{2b} and R^{3b} together with the N atom to which they are attached can form a 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein the heterocyclic ring may be substituted with 0-2 R^{1c} groups;

R^{1c} is a member selected from the group consisting of:

- 10 Halo; -C₁₋₄-alkyl; -CN; -NO₂; -C(=O)-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -C(=O)-OR^{2c}; -(CH₂)_q-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -SO₂-N(-R^{2c}, -R^{3c}); -SO₂R^{2c}; -CF₃; and -(CH₂)_q-OR^{2c};

R^{2c} and R^{3c} are each independently a member selected from the group consisting of:

H; -C₁₋₄-alkyl; and -C₁₋₄-alkylene-aryl;

q is an integer of 0-2;

- 15 G is a member selected from the group consisting of:

- (a) C₂-alkenyl or C₃₋₈-cycloalkenyl, wherein the alkenyl and cycloalkenyl attachment points are the alkenyl carbon atoms and wherein the -C₂-alkenyl or -C₃₋₈-cycloalkenyl are substituted with 0-4 R^{1d} groups;
- (b) a phenyl group wherein the ring carbon atoms of the phenylene group are substituted with 0-4 R^{1d} groups;
- 20 (c) a 3-8 membered heterocyclic ring system containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein 0-2 ring atoms of the heterocyclic ring may be substituted with 0-4 R^{1d} groups; and,
- (d) an 8-10 membered fused heterocyclic bicyclic ring system, containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, wherein 0-2 ring atoms of the fused bicyclic ring system may be substituted with 0-4 R^{1d} groups;
- 25

R^{1d} is a member selected from the group consisting of:

- 30 H, halo; C₁₋₆-alkyl, aryl, -CN; -NO₂; -(CH₂)₀₋₆-NR^{2d}R^{3d}; -SO₂NR^{2d}R^{3d}; -SO₂R^{2d}; -CF₃; -(CH₂)₀₋₆-OR^{2d}; -O-(CH₂)₁₋₆OR^{2d}; -O-(CH₂)₁₋₆-C(=O)-O-R^{2d}; -O-(CH₂)₁₋₆-C(=O)-N(R^{2d}, R^{3d}); -N(R^{5a})-(CH₂)₁₋₆-OR^{2d}; -N(R^{5a})-(CH₂)₁₋₆-N(R^{2d}, R^{3d}); -C(=O)-N(R^{2d}, R^{3d}); -N(R^{5a})-(CH₂)₁₋₆-C(=O)-N(R^{2d}, R^{3d}); -N(-(CH₂)₁₋₆-OR^{2d})₂;

$-\text{N}(\text{R}^{5a})-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{OR}^{2d}$; $-\text{N}(\text{R}^{5a})-\text{C}(=\text{O})-\text{R}^{2d}$; $-\text{N}(\text{R}^{5a})-\text{SO}_2-\text{R}^{2d}$; $-(\text{CH}_2)_0$ -
 $6-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}^{2d}$; $-(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^{2d}, \text{R}^{3d})$; $-(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{C}(=\text{NR}^{2d})-\text{N}(\text{R}^{3d}, \text{R}^{4d})$;
 $-(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{N}(\text{R}^{5a})\text{C}(=\text{NR}^{2d})-\text{N}(\text{R}^{3d}, \text{R}^{4d})$; a $-(\text{CH}_2)_{0-6}-\text{N}(\text{R}^{3d})\text{C}_{5-6}$ membered
 heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S, and a
 5 $-(\text{CH}_2)_{0-6}-5-6$ membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from
 N, O and S;

R^{5a} , R^{2d} , R^{3d} and R^{4d} are each independently a member selected from the group consisting
 of:

10 H, C_{1-6} -alkyl, C_{1-6} -alkylaryl, -CN; -NO₂; carbocyclic aryl, -CN; -NO₂; or R^{2d} and R^{3d}
 taken together with the N atoms they are independently attached form a 5-7
 membered heterocyclic ring; or R^{3d} and R^{4d} taken together with the N atom to
 which they are attached form a 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4
 heteroatoms selected from N, O and S;

J is a direct link or is a member selected from the group consisting of:

15 $-\text{N}(\text{R}^9)-\text{C}(=\text{O})-$; $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^9)-$; -O-; -S-; -SO-; -SO₂-; -CH₂-; $-\text{N}(\text{R}^9)-$; and
 $-\text{N}(\text{R}^9)-\text{SO}_2-$;

R^9 is a member selected from the group consisting of:

20 H; $-\text{C}_{1-4}$ -alkyl; $-\text{C}_{0-4}$ -alkyl-carbocyclic aryl; $-(\text{CH}_2)_{0-4}-5-6$ membered heterocyclic
 ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_{1-}$
 4 -alkyl; and $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^{6a}, \text{R}^{6b})$;

R^{6a} and R^{6b} are each a member independently selected from the group consisting of:

H and $-\text{C}_{1-6}$ -alkyl;

X is a member selected from the group consisting of:

- 25 (a) phenyl substituted with 0-3 R^{1e} groups;
 (b) naphthyl substituted with 0-3 R^{1e} groups and
 (c) a 6-membered aromatic heterocyclic ring system containing 1-3 N atoms and
 having 0-3 ring atoms substituted with 0-3 R^{1e} groups; and
 (d) an 8-10 membered fused aromatic heterocyclic bicyclic ring system
 containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and S and 0-3 ring atoms of
 30 the fused heterocyclic bicyclic ring system are substituted with 0-3 R^{1e}
 groups;

91

R^{1c} is a member independently selected from the group consisting of:

- Halo; CF₃; -C₁₋₄-alkyl; carbocyclic aryl; -C₀₋₂-alkylene-CN; -O-R^{2e};
 -C₀₋₂-alkylene-C(=O)-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-NO₂;
 -C₀₋₂-alkylene-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-SO₂-N(R^{2e}, R^{3e}); -C₀₋₂-alkylene-SO₂-R^{2e};
 5 trihaloalkyl; -O-C₀₋₂-alkylene-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-O-R^{2e}; -O-C₁₋₄-alkylene-
 C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e}); -O-C₁₋₄-alkylene-C(=O)-O-R^{2e}; -C₀₋₂-alkylene-
 N(R^{2e})-C(=O)-R^{3e}; -C₀₋₂-alkylene-N(R^{2e})-SO₂-R^{3e}; -CH₂-N(R^{2e})-C(=O)-R^{3e}
 ; -CH₂-N(R^{2e})-SO₂-R^{3e}; -(CH₂)₀₋₆-NR^{2e}R^{3e}; -C(=O)-N(R^{2e}, R^{3e}); -N(-(CH₂)₁₋₆-OR^{2e})₂;
 -N(R¹⁰)-(CH₂)₁₋₆-OR^{2e}; -N(R¹⁰)-C(=O)-R^{2e}; -N(R¹⁰)-SO₂-R^{2e};
 10 -C(=N(R¹⁰))-N(R^{2e}, R^{3e}); and a -(CH₂)₀₋₆-5-6 membered heterocyclic ring containing
 1-4 heteroatoms selected from N, O and S;

R¹⁰, R^{2e} and R^{3e} are each independently a member selected from the group consisting of:

- H; -C₁₋₄-alkyl; -C₀₋₂-alkylene-O-R^{1g}; -C₀₋₂-alkylene-
 N(R^{1g}, R^{2g}); -C₁₋₄-alkylene-carbocyclic aryl; -C₁₋₄-alkylene-heterocyclic; and R¹⁰
 15 and R^{2e}, or R^{2e} and R^{3e} together with the N atom to which they are attached can form
 5-8 membered heterocyclic ring containing 1-4 heteroatoms selected from N, O and
 S which can be substituted with 0-2 R^{1g} groups;

R^{1g} and R^{2g} are independently a member selected from the group of:

- H; halo; -C₁₋₄-alkyl, a carbocyclic aryl group; a heterocyclic group; -CN;
 20 -C(=O)-N(R^{3g})R^{4g}; -C(=O)-OR^{3g}; -NO₂; -(CH₂)_p-NR^{3g}R^{4g}; -SO₂NR^{3g}R^{4g}; -SO₂R^{3g};
 -CF₃; and -(CH₂)_pOR^{3g};

p is an integer of 0-2; and

R^{3g} and R^{4g} are each independently selected from the group consisting of:

- H; C₁₋₄-alkyl and -C₀₋₄-alkylene-carbocyclic aryl;
 25 or a pharmaceutically acceptable salt thereof;

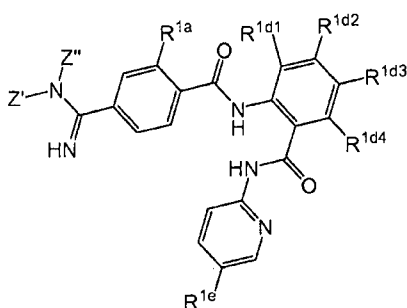
wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an
 aggregate daily dose from between about 0.01 and about 2.0 mg/kg.

16. The unit dose formulation of claim 15, wherein the coagulation inhibiting
 amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose between about 0.1
 30 and about 1.5 mg/kg.

17. The unit dose formulation of claim 15, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose between about 0.4 and about 1.2 mg/kg.

18. The unit dose formulation of claim 15, wherein the pharmaceutically acceptable salt of the factor Xa inhibitor compound is a malcate salt.

19. The unit dose formulation of claim 15, wherein the factor Xa inhibitor compound is of formula IV:



IV

10 wherein:

Z' and Z'' are each independently a C₁-C₆ alkyl which is optionally substituted with a hydroxyl, carboxylic acid or carboxylic acid ester group;

R^{1a} is selected from the group consisting of:

H, -F, -Cl, and Br;

15 R^{1d2} and R^{1d4} are each H;

R^{1d1} and R^{1d3} are each independently a member selected from the group consisting of:

H, -Cl, -F, -Br, -OH and -OCH₃; and

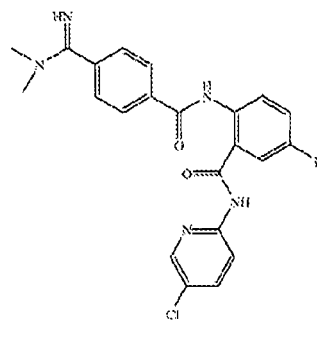
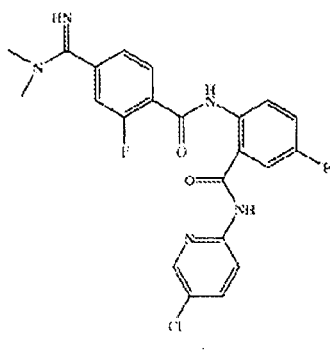
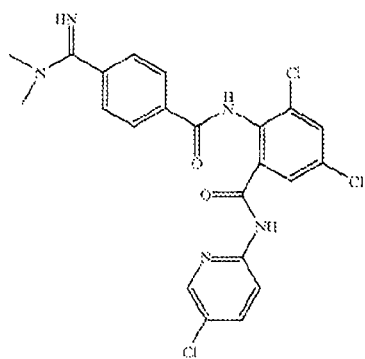
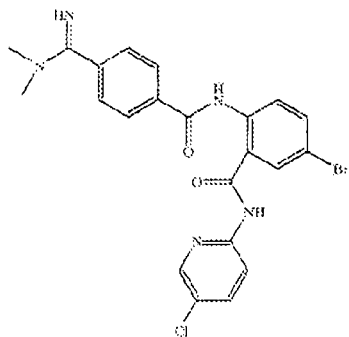
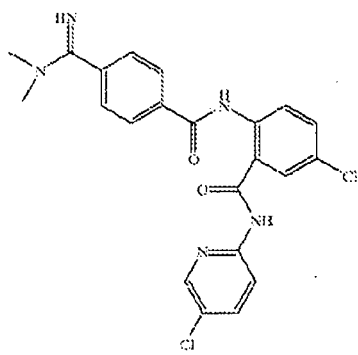
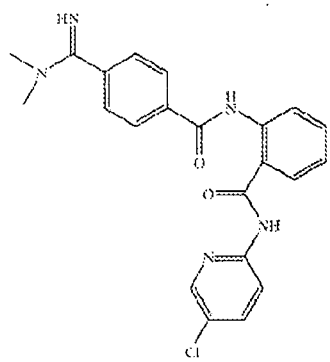
R^{1e} is a member selected from the group consisting of:

20 -F, -Cl, -Br, -OH, -CH₃, and -OCH₃,

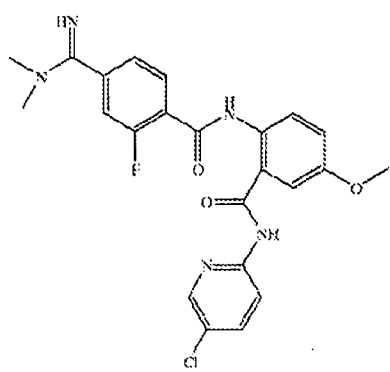
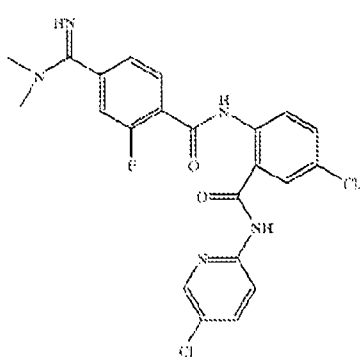
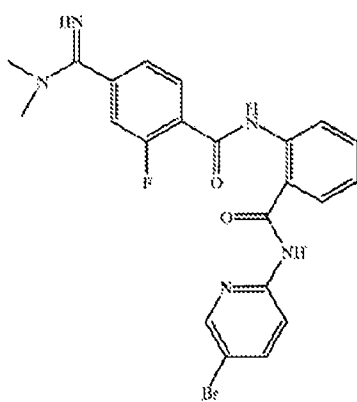
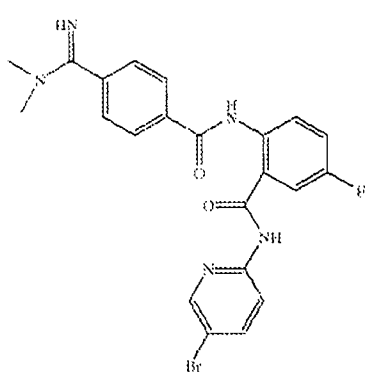
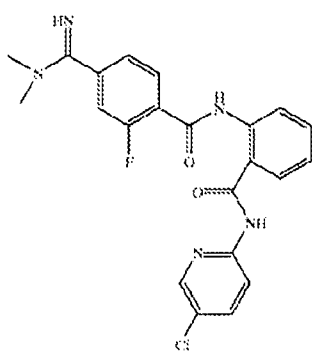
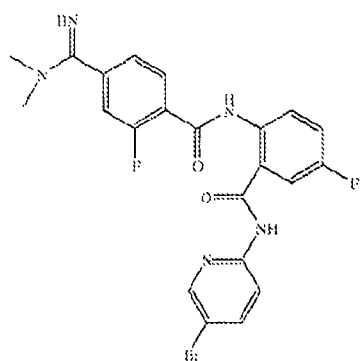
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

20. The unit dose formulation of claim 19, wherein the compound is selected from the group consisting of:

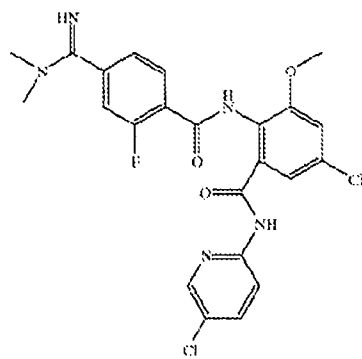
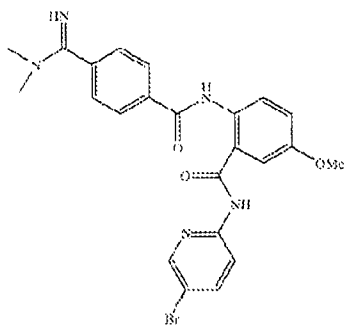
AB



gm

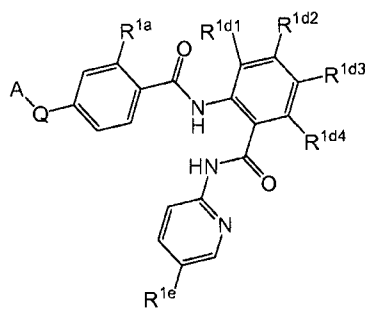


as



, and or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

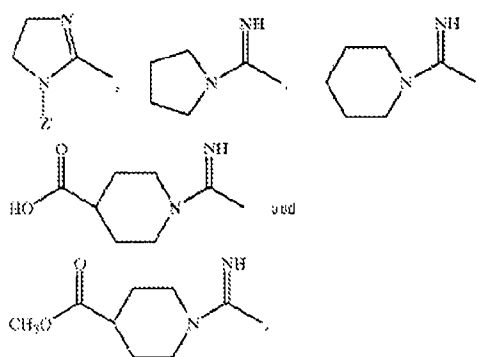
21. The unit dose formulation of claim 15, wherein the factor Xa inhibitor
5 compound is of formula V:



V

wherein:
A-Q is a member selected from the group consisting of:

cjb



where Z' is a C₁₋₆ alkyl which is optionally substituted with a hydroxyl, carboxylic acid or carboxylic acid ester group;

R^{1a} is selected from the group consisting of:

H, -F, -Cl, and Br;

R^{1d2} and R^{1d4} are each H;

R^{1d1} and R^{1d3} are each independently a member selected from the group consisting of:

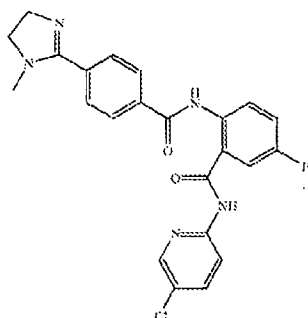
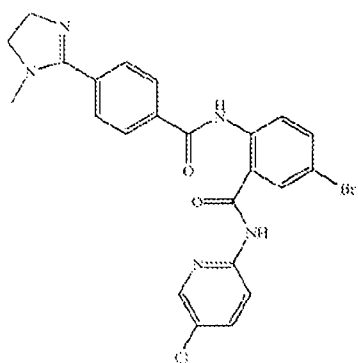
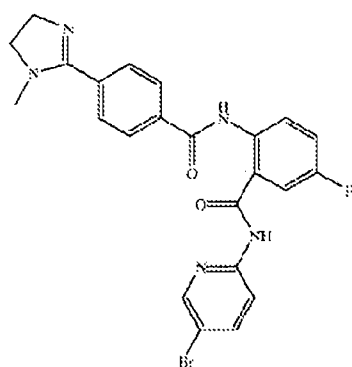
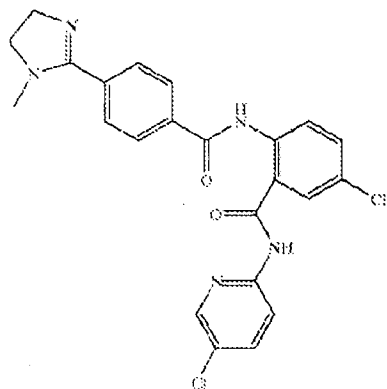
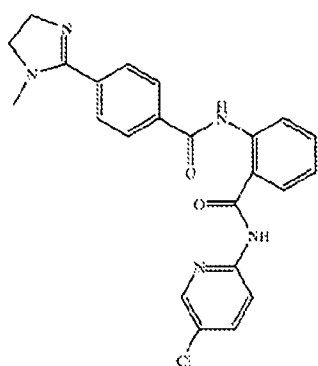
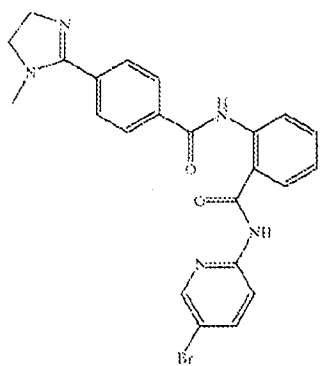
H, -Cl, -F, -Br, -OH and -OCH₃; and

R^{1e} is a member selected from the group consisting of:

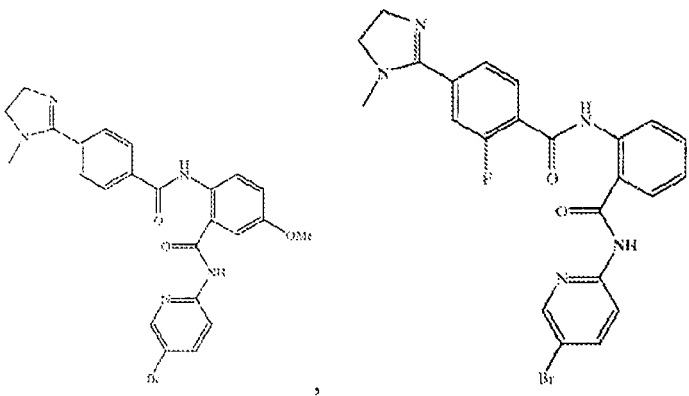
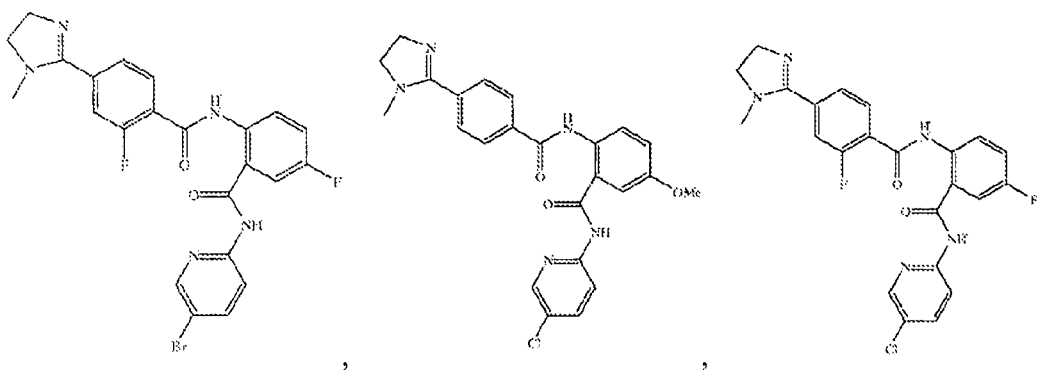
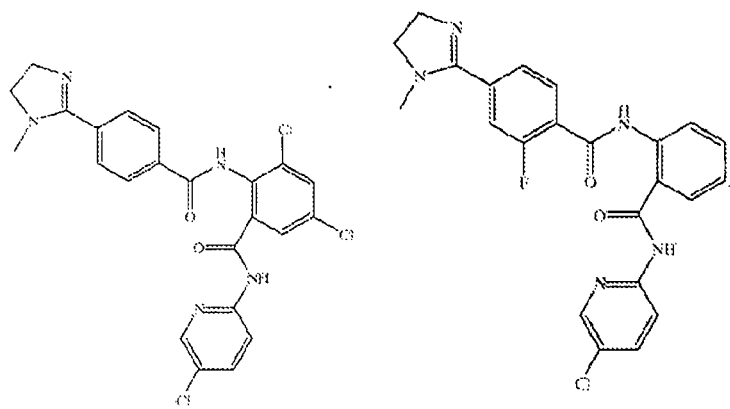
-F, -Cl, -Br, -OH, -CH₃, and -OCH₃,

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

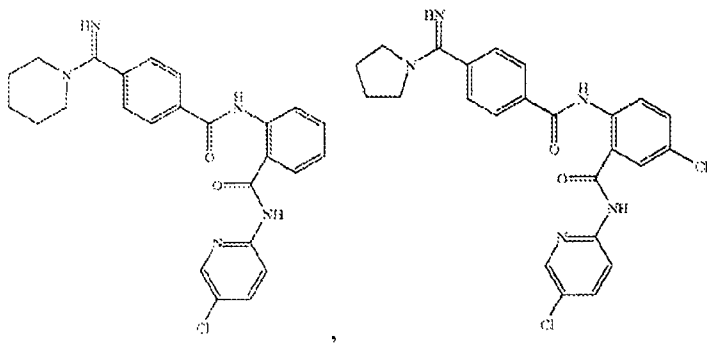
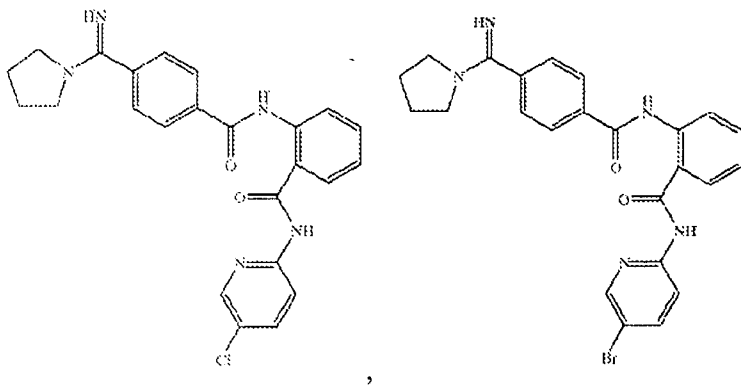
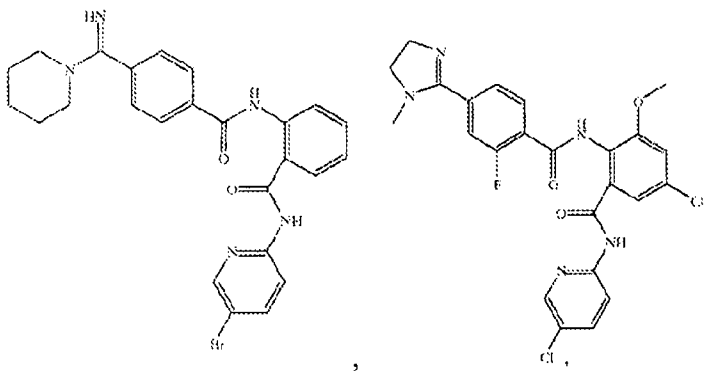
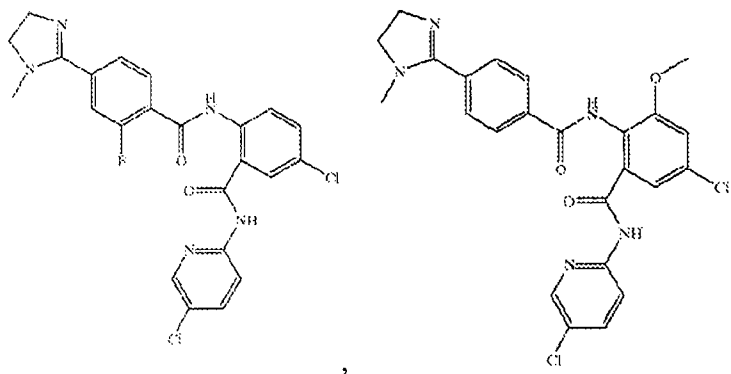
22. The unit dose formulation of claim 21, wherein the compound is selected from the group consisting of:



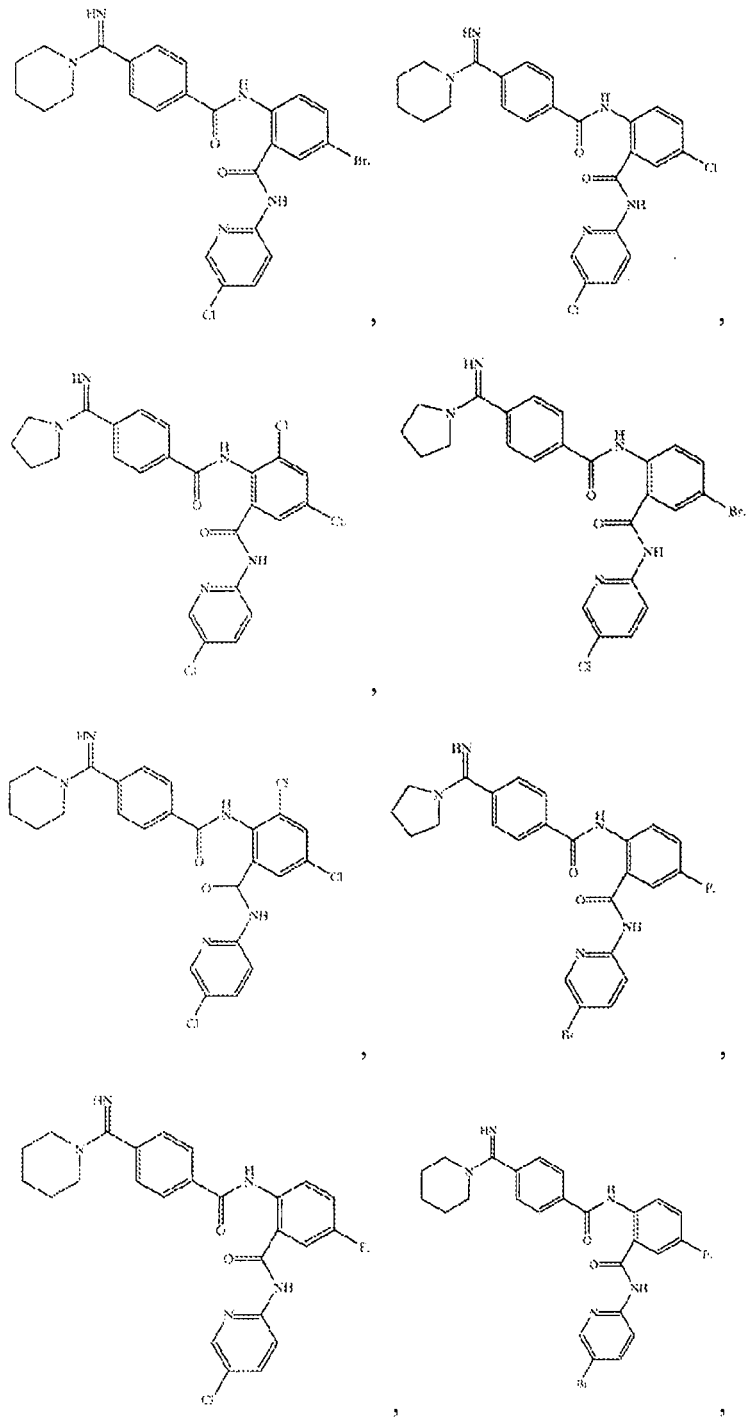
Handwritten signature or initials.



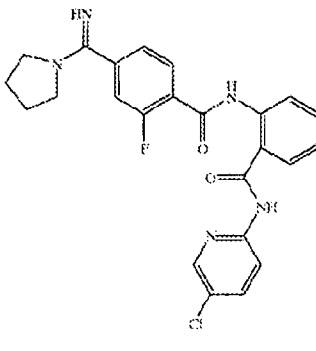
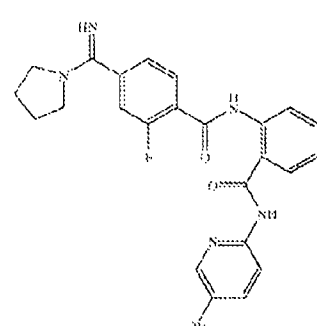
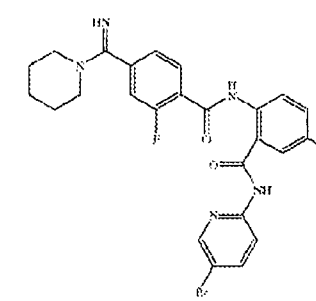
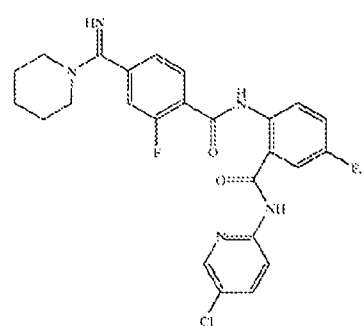
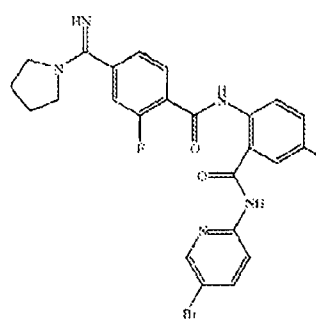
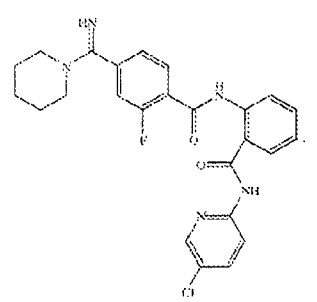
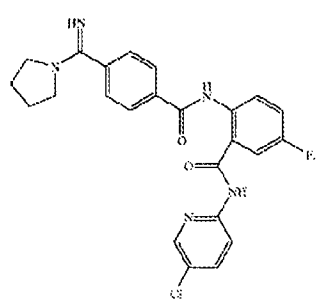
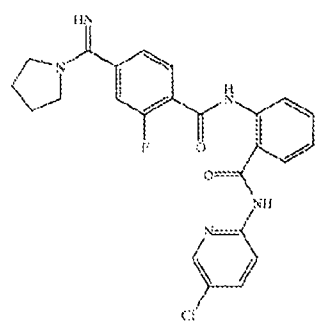
gg



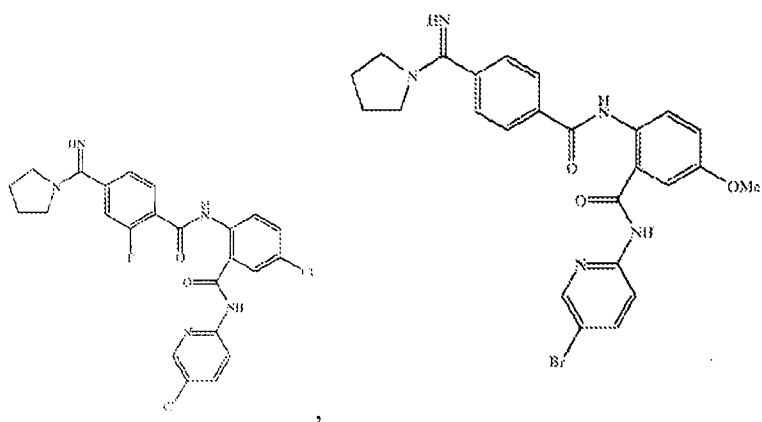
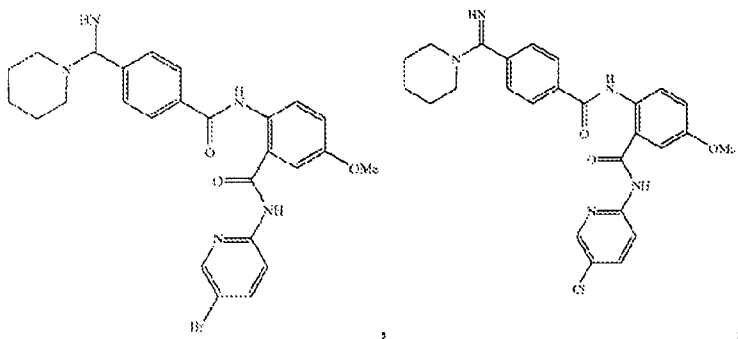
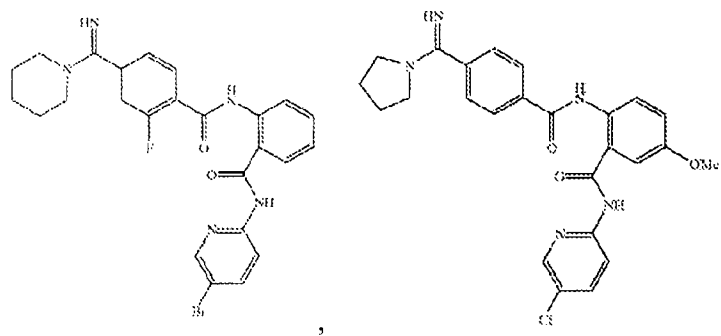
100



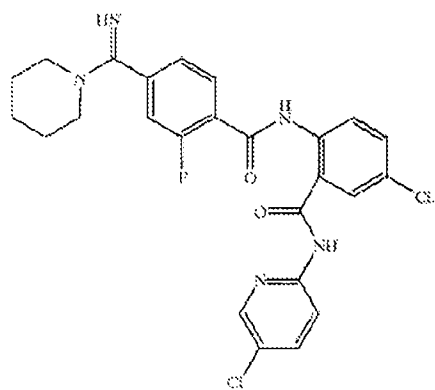
[Handwritten signature]



102



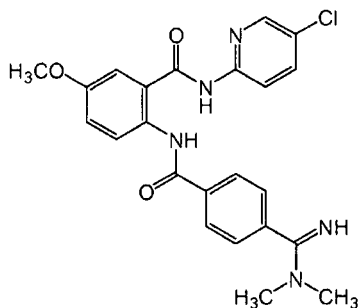
, and



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

103

23. A unit dose formulation comprising a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound II :

**II**

or pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose of from between about 0.01 and about 2.0 mg/kg.

24. The unit dose formulation of claim 23, wherein the coagulation inhibiting amount of the factor Xa inhibitor compound is an aggregate daily dose of from between about 0.1 and about 1.5 mg/kg.

25. The method of claim 10, wherein the pharmaceutically acceptable salt of the factor Xa inhibitor compound is a maleate salt.

26. An *in vitro* assay to determine whether a compound has *in vivo* antithrombotic activity comprising:

a) introducing a test compound into an *in vitro* sample of whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate to form a test sample;

101

b) determining the level of thrombin activity in the test sample by monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the test sample as a function of time;

5 c) determining the level of thrombin activity in a control sample by monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the control sample as a function of time, wherein the control sample comprises whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate;

10 d) comparing the level of thrombin activity in the test sample and the control sample, wherein a lower level of thrombin activity in the test sample is an indication that the test compound has *in vivo* antithrombotic activity.

27. The assay of claim 26, wherein the test sample and the control sample comprise whole blood.

28. The assay of claim 27, wherein the whole blood is anticoagulated.

29. The assay of claim 27, wherein the whole blood is nonanticoagulated.

15 30. The assay of claim 26, wherein the test sample and the control sample comprise plasma.

31. The assay of claim 30, wherein the plasma is anticoagulated.

32. The assay of claim 30, wherein the plasma is nonanticoagulated.

20 33. The assay of claim 26, wherein detectably-labeled thrombin substrate is a Z-Gly-Gly-Arg-AMC.

10

FIG. 1A

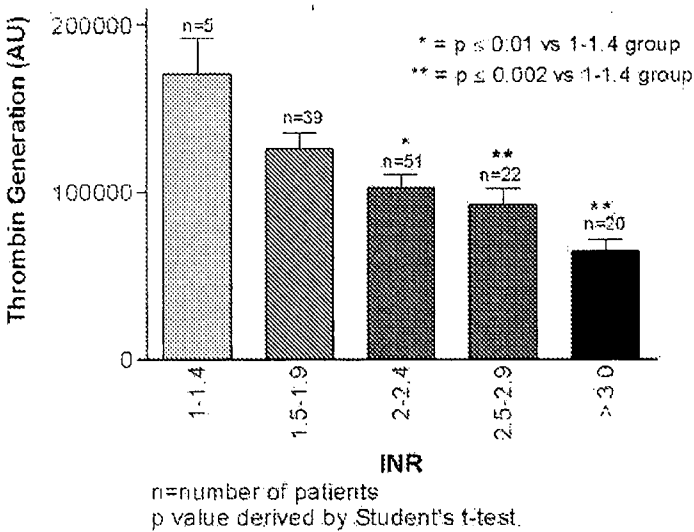
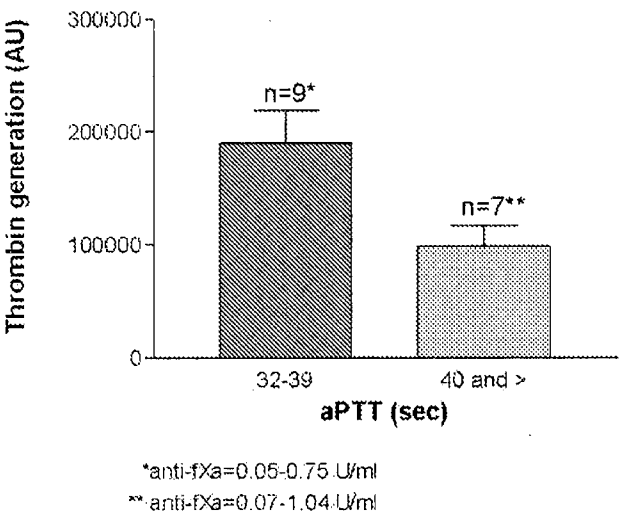


FIG. 1B



106

FIG. 1C

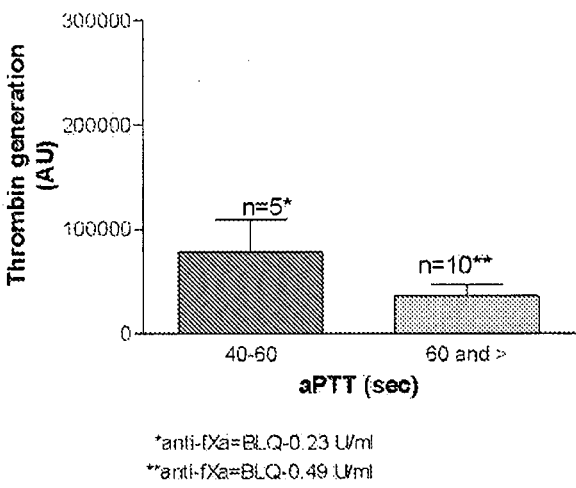
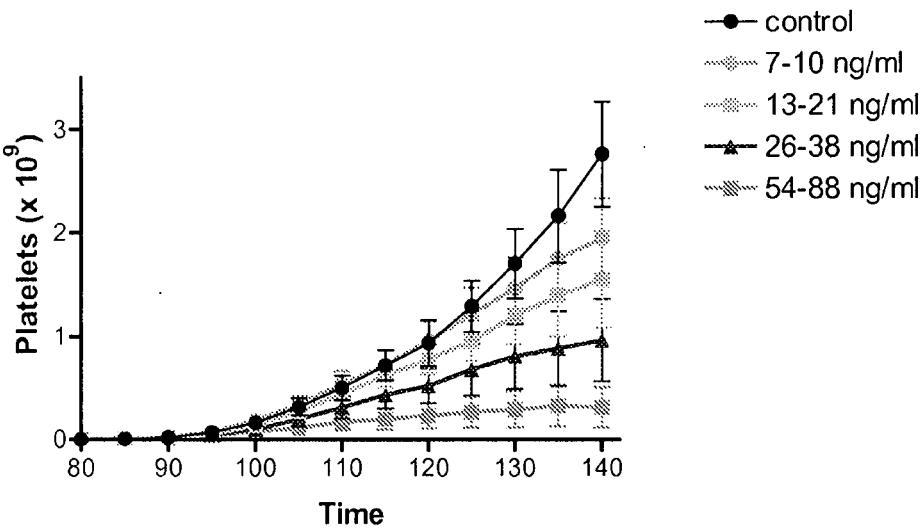


FIG. 2



[Handwritten signature]

FIG. 3

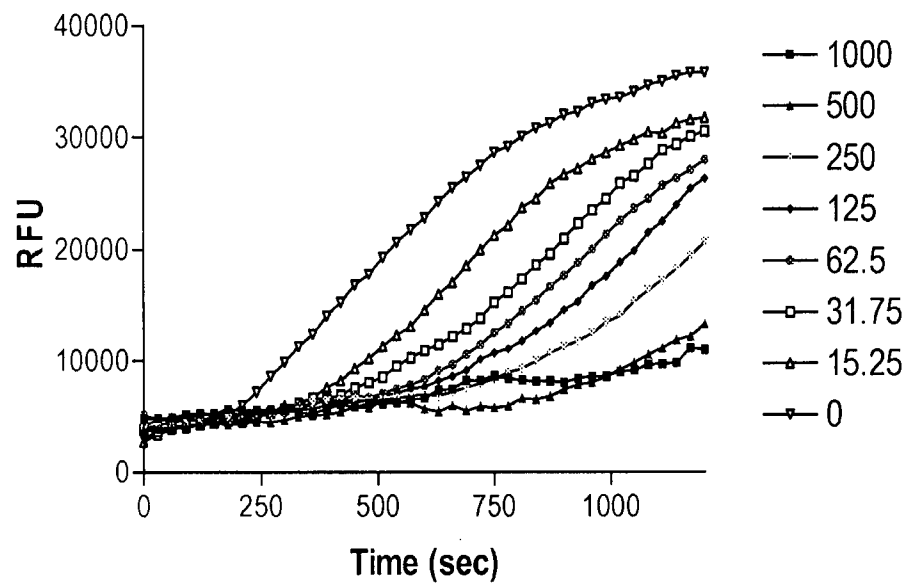
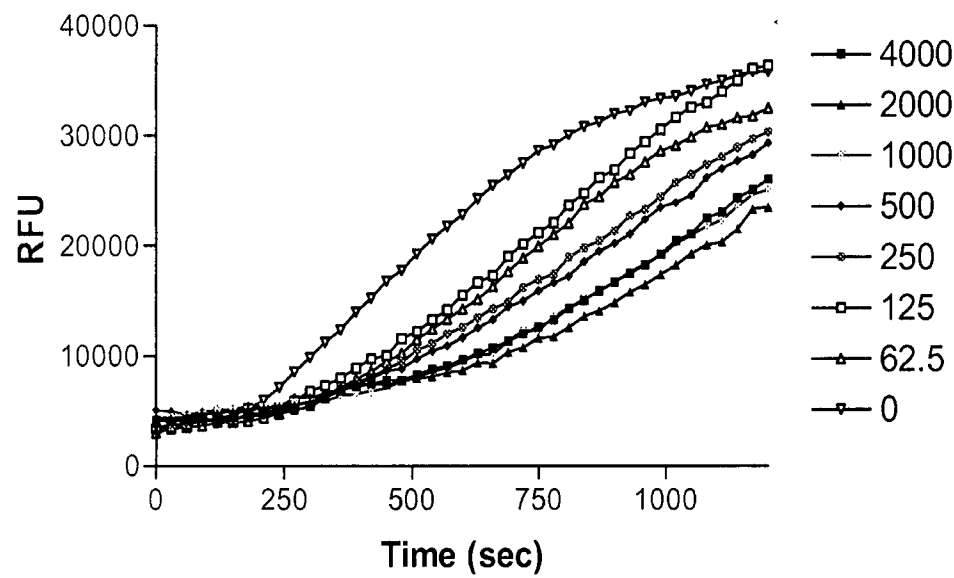


FIG. 4A



[Handwritten signature]

FIG. 4B

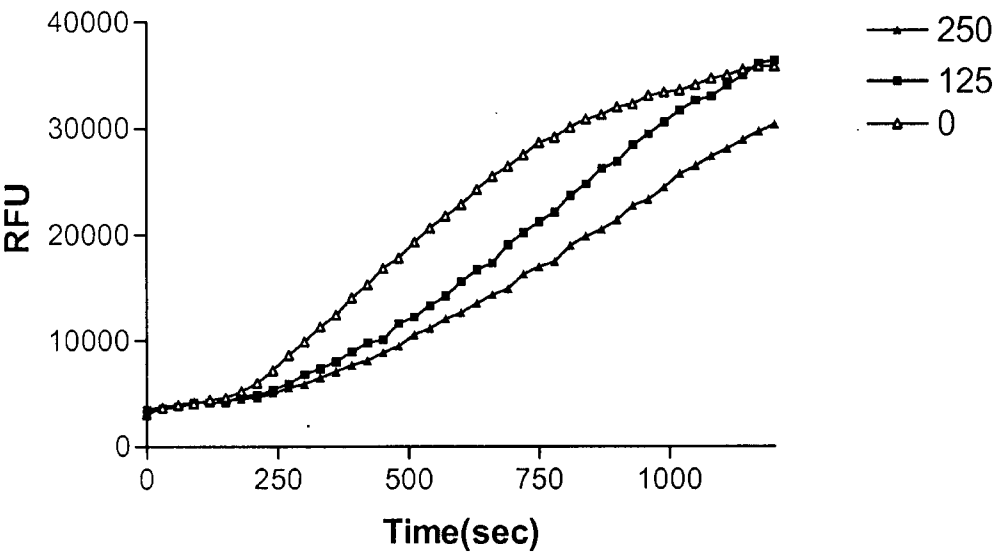
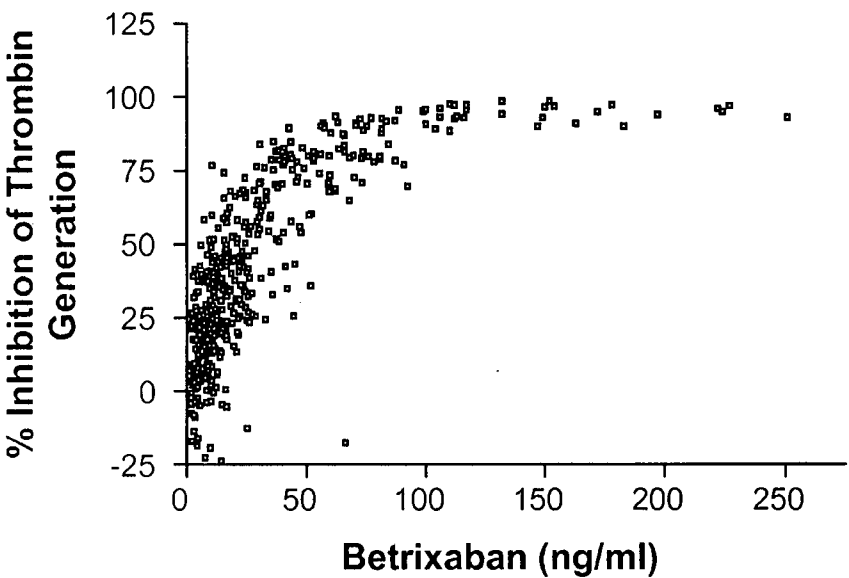


FIG. 5



[Handwritten signature]

FIG. 6

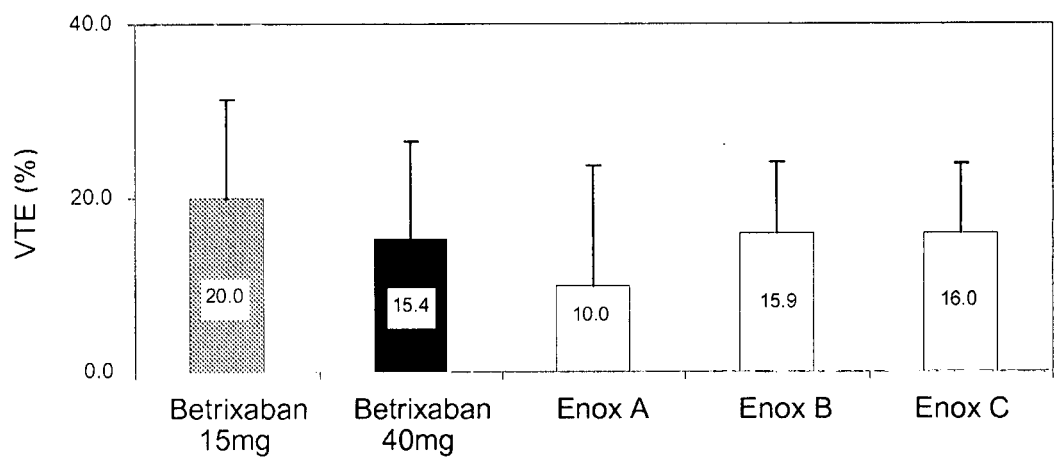
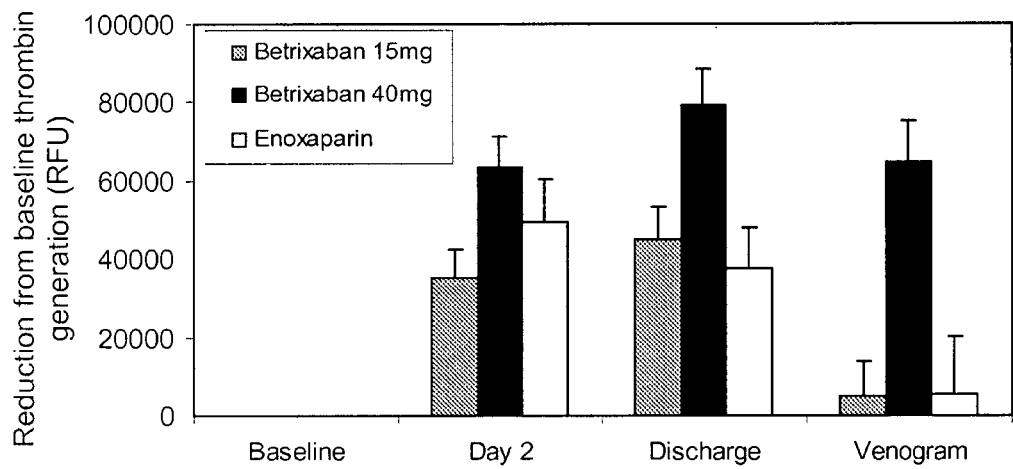


FIG. 7



110

FIG. 8

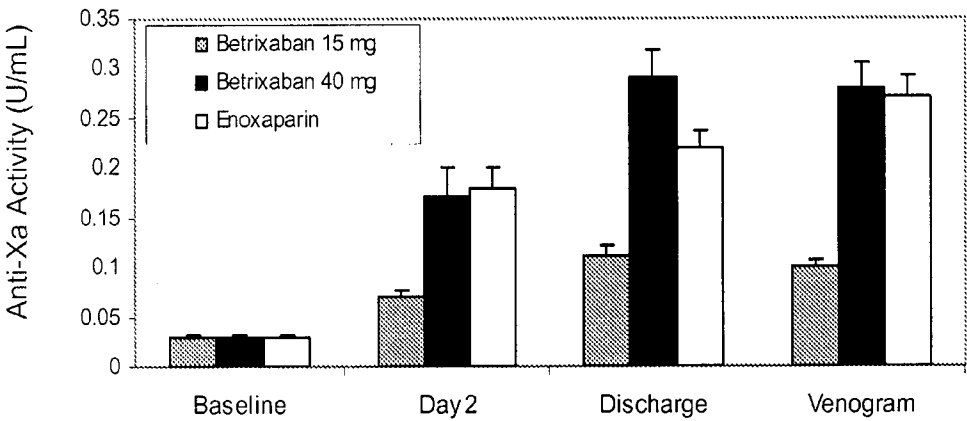
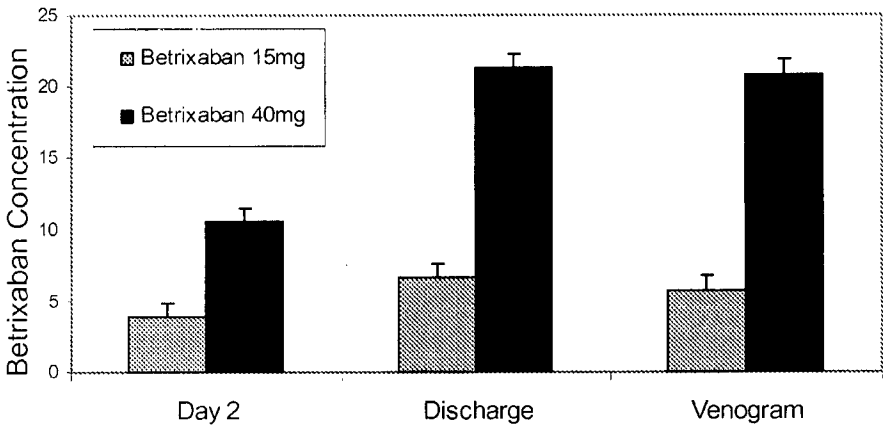


FIG. 9



FORMULACIONES DE DOSIS UNITARIA Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO
DE LA TROMBOSIS CON UN INHIBIDOR ORAL DEL FACTOR XA

REFERENCIA RECÍPROCA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S. C. § 119(e) de la Solicitud de Patente Provisional estadounidense No. 60/873,792 presentada el 8 de diciembre de 2006 y la 60/947,629 presentada el 2 de julio de 2007, ambas incorporadas en la presente como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

Campo del invento

Este invento está dirigido a métodos para inhibir la coagulación utilizando una dosis particular de un inhibidor de factor Xa. El invento también está dirigido a un ensayo que mide la generación de trombina en la sangre para evaluar la actividad antitrombótica de un compuesto de prueba.

Estado de la Técnica

La hemostasia, el control del flujo de la sangre, ocurre por medios quirúrgicos, o mediante las propiedades fisiológicas de vasoconstricción y coagulación. Aunque las plaquetas y coagulación de la sangre están ambas involucradas en la restauración de hemostasia y en enfermedades tromboticas, ciertos componentes de la cascada de la coagulación son principalmente responsables de la amplificación y aceleración de los procesos involucrados en agregación de plaquetas y deposición de fibrina los cuales son eventos principales en trombosis y hemostasia.

La formación de coágulos involucra la conversión de fibrinógeno en fibrina la cual se polimeriza en una red para restaurar hemostasia después de la lesión. Un proceso similar resulta en vasos sanguíneos ocluidos en enfermedades tromboticas. La conversión de fibrinógeno a fibrina es catalizada por trombina, el producto final de una serie de reacciones en la coagulación de la cascada de sangre. La trombina también es un actor clave en la activación de plaquetas, contribuyendo así a trombosis bajo condiciones de flujo sanguíneo arterial y venoso. Por estas razones, se ha postulado que la regulación eficiente de trombina puede llevar a regulación

eficiente de trombosis. Varias clases de anticoagulantes actualmente utilizados afectan directa o indirectamente la trombina (es decir, heparinas no fraccionadas, heparinas de bajo peso molecular, compuestos tipo heparina, pentasacarido y warfarina) . La inhibición directa o indirecta de actividad de trombina también ha sido el foco de una variedad de anticoagulantes en desarrollo clínico (estudiados por Eriksson y Quinlan, *Fármacos* 11: 1411- 1429, 2006) .

La protrombina, el precursor para trombina, es convertida en la enzima activa mediante el factor Xa (fXa) . La activación localizada de generación de factor Xa mediada por factor tisular/factor VIIa es amplificada por el complejo factor IXa/factor VIIIa y lleva a ensamble de protomina sobre plaquetas activadas. Factor Xa, como una parte del complejo de protomina, es la única enzima responsable de la formación sostenida de trombina en la vasculatura. El factor Xa es una proteasa de serina, la forma activada de su Factor X precursor, y un miembro de los factores de la coagulación sanguínea fijadores de calcio, que contienen ácido gamma carboxiglutámico (GLA) y dependientes de la vitamina K y factores de la coagulación de la sangre. Diferente a la trombina, la cual actúa sobre una variedad de sustratos proteicos incluyendo fibrinógeno y los receptores PAR (Receptores activados por proteasa, Coughlin, *J. Thrombosis Haemostasis* 3: 1800- 1814, 2005) , el factor Xa parece tener un único sustrato fisiológico, llamado protrombina. Puesto que una molécula de factor Xa puede generar más de 1000 moléculas de trombina (Mann, *et al.*, *J. Hemostasis de Trombosis* 1: 1504- 1514, 2003) , la inhibición directa del factor Xa como una forma de inhibir indirectamente la formación de trombina puede ser una estrategia anticoagulante eficiente. Esta afirmación se basa en el papel clave de la protomina en síntesis de trombina y en el hecho que la inhibición de protomina tendrá un efecto pronunciado sobre la agregación general de plaquetas y rutas de la coagulación.

Las proteasas activadas tales como factor VIIa, factor IXa o factor Xa tienen actividad proteolítica pobre por cuenta propia. Sin embargo, su ensamble en complejos dependientes de cofactores, unidos por membranas, aumenta significativamente sus eficiencias catalíticas. Este efecto es más dramático para factor Xa, donde la eficiencia es aumentada por un factor de 10^5 (Mann, *et al.*, *Blood* 76(1) : 1- 16, 1990) . Debido a la mayor concentración de los zimógenos presentes en la sangre (1.4 μ M protrombina versus 150 nM factor Xa) y la cinética de la activación, una cantidad más pequeña de factor Xa que la trombina necesita ser inhibida para lograr un efecto anticoagulante. La prueba indirecta de la hipótesis de superioridad de factor Xa como un objetivo terapéutico comparado con trombina también se puede encontrar en ensayos

clínicos para la prevención de trombosis de vena profunda. Fondaparinux, un inhibidor de factor Xa dependiente de antitrombina III, probó ser superior a enoxaparina (una heparina de bajo peso molecular que inhibe tanto la trombina como el factor Xa) en cuatro ensayos de cirugía ortopédica (Turpie, et al, *Archives Internal Medicine* 162(16) : 1833- 1840, 2002) . Por lo tanto, se ha indicado que los compuestos que selectivamente inhiben el factor Xa pueden ser útiles como agentes diagnósticos in vitro, o para administración terapéutica en ciertos trastornos trombóticos, ver *ej.*, WO 94/13693.

RESUMEN DEL INVENTO

La modelación comparativa de la medida de cambios en actividad de protomina a niveles de eficacia antitrombótica ha llevado al descubrimiento de la actividad terapéutica en humanos de inhibidores de factor Xa. Este invento está dirigido a un método para inhibir coagulación en un paciente humano utilizando una cantidad inhibitoria cantidad inhibidora de la coagulación de un inhibidor de factor Xa. Específicamente, inhibidores directos oralmente disponibles de factor Xa son efectivos para inhibir coagulación en un paciente humano cuando se administran al paciente en una cantidad diaria agregada de entre 0.01 y 2.0 miligramos por kilogramo aproximadamente con base en el peso total del paciente ("mg/kg") . Se contempla que esta dosis será efectiva para cualquier compuesto el cual específicamente inhibe factor Xa y particularmente efectiva para inhibidores de factor Xa de las Fórmula I, II, III, IV o V descritas a continuación.

El invento también está dirigido a un método de evaluar el estado de la coagulación del paciente. Se contempla que este método de evaluar el estado de la coagulación se puede utilizar para probar un número de clases diferentes de anticoagulantes además de inhibidores de factor Xa.

En un aspecto del invento, el método comprende administrar al paciente una cantidad inhibitoria de la coagulación de un compuesto de la Fórmula I:

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

I

en donde:

A se selecciona a partir de:

MM

(a) C1- C6- alquilo;

(b) C3- C8- cicloalquilo;

(c) - $N(R^1R^2)$, $N(R^1,R^2) - C(=NR^3) -$, $N(R^1,R^2) - C(=NR^3) - N(R^4) -$, $R^1 - C(=NR^3) -$, $R^1 - C(=NR^3) - N(R^4) -$;

5 (d) fenilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R;

(e) naftilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R; y

un sistema anular monocíclico o heterocíclico bicíclico fusionado que tiene entre 5 y 10 átomos cíclicos, en donde 1- 4 átomos cíclicos del sistema anular son seleccionados a partir de N, O y S, y en donde el sistema anular se puede sustituir con 0- 2 sustituyentes R;

10 R se selecciona a partir de:

grupo H, halo, - CN, - CO_2R^1 , - $C(=O) - N(R^1, R^2)$, - $(CH_2)_m - CO_2R^1$, - $(CH_2)_m - C(=O) - N(R^1, R^2)$, - NO_2 , - $SO_2N(R^1, R^2)$, - SO_2R^1 , - $(CH_2)_mNR^1R^2$, - $(CH_2)_m - C(=NR^3) - R^1$, - $(CH_2)_m - C(=NR^3) - N(R^1,R^2)$, - $(CH_2)_m - N(R^4) - C(=NR^3) - N(R^1,R^2)$, - (CH_2NR^1) anexado a un anillo heterocíclico de 3 a 6 miembros conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N,

15 O y S, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8cicloalquilo, - C0- 4alquilC3- 8cicloalquilo, - CF_3 , - O, y un sistema heterocíclico de 5- 6 miembros conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- C4- alquilo, - C1- 4alquil- CN, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8cicloalquilo y - NO_2 ;

m es un entero de 0- 2;

R^1 , R^2 , R^3 y R^4 son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de:

H, - OR^5 , - $N(-R^5, -R^6)$, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8cicloalquilo, - C0- 4alquilfenilo y - C0- 4alquilnaftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden independientemente reemplazar con un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8Cicloalquilo, - CN, y - NO_2 ; o R_1 y R_2 , o R_2 y R_3 tomados juntos pueden formar un

25 cicloalquilo de 3- 8 miembros o un sistema anular heterocíclico, en donde el sistema anular heterocíclico puede tener entre 3 y 10 átomos cíclicos, con 1 a 2 anillos en el sistema anular y contienen entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4

115
átomos de hidrógeno sobre el sistema anular heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, C1- C4- alquilo, - CN, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8Cicloalquilo y - NO₂; R⁵ y R⁶ son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de:

- 5 H, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8cicloalquilo, - C0- 4alquilfenilo y - C0- 4alquilnaftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8Cicloalquilo, - CN, y - NO₂; o R⁵ y R⁶ tomados juntos pueden formar un cicloalquilo de 3- 8 miembros o un sistema anular heterocíclico, en donde el sistema anular heterocíclico puede tener entre 3 y 10 átomos cíclicos, con 1 a 2 anillos en el sistema anular y conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema anular heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- C4- alquilo, - CN, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8cicloalquilo y - NO₂;
- 10
- 15

Q es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

un enlace directo, - CH₂- , - C(=O) - , - O- , - N(R⁷) - , - N(R⁷) CH₂- , - CH₂N(R⁷) - , - C(=NR⁷) - , - C(=O) - N(R⁷) - , - N(R⁷) - C(=O) - , - S- , - SO- , - SO₂- , - SO₂- N(R⁷) - y - N(R⁷) - SO₂- ;

- 20 R⁷ se selecciona a partir de:

H, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8cicloalquilo, - C0- 4alquilenofenilo y - C0- 4alquilenonaftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos- C3- 8Cicloalquilo, - CN, y - NO₂;

25

D es un enlace directo o es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

(a) fenilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R_{1a};

(b) naftilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R_{1a}; y

- 30 (c) un sistema anular monocíclico o heterocíclico bicíclico fusionado que tiene entre 5 y 10 átomos cíclicos, en donde 1- 4 átomos cíclicos del sistema anular son seleccionados a partir de

116
N, O y S, y en donde el sistema anular se puede sustituir a partir de 0- 2 sustituyentes R^{1a};

R^{1a} se selecciona a partir de:

halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CN, - NO₂, - (CH₂)_nNR^{2a}R^{3a}, - (CH₂)_nC0₂R^{2a}, - (CH₂)

5 _nCONR^{2a}R^{3a}, - SO₂NR^{2a}R^{3a}, - SO₂R^{2a}, - CF₃, - OR^{2a}, y un sistema heterocíclico aromático de 5- 6 miembros conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema heterocíclico aromático se pueden

independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de

halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CN y - NO₂;

R^{2a} y R^{3a} son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de:

H, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3-

8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- fenilo y - C0- 4alquilenilo- naftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden

15 independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de

halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CN y - NO₂;

n es un entero de 0- 2;

E es un enlace directo o un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

20 - C1- 2- alquilenilo- , - O- , - S- , - SO- , - SO₂- , - C₀₋₁- alquilenilo- C(=O) , - C₀₋₁- alquilenilo- C(=O) - N(- R⁸) - C₀₋₁- alquilenilo- , - C₀₋₁- alquilenilo- N(- R⁸) - C(=O) - C₀₋₁- alquilenilo- , - N(- R⁸) - C(=O) - N(- R⁸) - y - C₀₋₁- alquilenilo- N(- R⁸) - ;

R⁸ es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

25 H; - C1- 4- alquilo; - C0- 4- alquilenarilo; - C0- 4- alquilenilo- heteroarilo; - C1- 4- alquilenilo- C(=O) - OH, - C1- 4- alquilenilo- C(=O) - O- C1- 4- alquilo, y - C1- 4- alquilenilo- C(=O) - N(- R^{2b}, - R^{3b}) ;

R^{2b} y R^{3b} son cada uno un miembro independientemente seleccionado a partir del grupo que consta de: H, - C1- 4- alquilo, - C0- 4- alquilenilo- arilo; grupo - C0- 4- alquilenilo-

heterocíclico, y R^{2b} y R^{3b} junto con el átomo N al cual están fijados pueden formar un anillo

30 heterocíclico de 5- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde el anillo heterocíclico se puede sustituir con 0- 2 grupos R^{1c};

119

R^{1c} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: halo; - C1- 4- alquilo; - CN; - NO₂; - C(=O) - N(- R^{2c} , - R^{3c}); - C(=O) - OR^{2c}; - (CH₂)_q - N(- R^{2c} , - R^{3c}); - SO₂ - N(- R^{2c} , - R^{3c}); - SO₂R^{2c}; - CF₃; y - (CH₂)_q - OR^{2c};

R^{2c} y R^{3c} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; - C1- 4- alquilo; y - C1- 4- alquilenilo- arilo;

q es un entero de 0- 2;

G es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

(a) C₂- alquilenilo o C₃- 8- cicloalquilenilo, en donde los puntos de fijación de alquilenilo y cicloalquilenilo son los átomos de carbono de alquilenilo y en donde el - C₂- alquilenilo o - C₃- 8-

Cicloalquilenilo son sustituidos con grupos 0- 4 R^{1d} ;

(b) un grupo fenilo en donde los átomos de carbono cíclico del grupo fenileno son sustituidos con grupos 0- 4 R^{1d} ;

(c) un sistema anular heterocíclico de 3- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde 0- 2 átomos cíclicos del anillo heterocíclico se pueden sustituir con 0- 4 grupos R^{1d} ; y,

(d) un sistema anular bicíclico heterocíclico fusionado de 8- 10 miembros, conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde 0- 2 átomos cíclicos del sistema anular bicíclico fusionado se puede sustituir con 0- 4 grupos R^{1d} ;

R^{1d} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

H, halo; C1- 6- alquilo, arilo, - CN; - NO₂; - (CH₂)₀₋₆ - NR^{2d}R^{3d}; - SO₂NR^{2d}R^{3d}; - SO₂R^{2d}; - CF₃; - (CH₂)₀₋₆ - OR^{2d}; - O- (CH₂)₁₋₆OR^{2d}; - O- (CH₂)₁₋₆ - C(=O) - O- R^{2d}; - O- (CH₂)₁₋₆ - C(=O) - N(R^{2d} , R^{3d}); - N(R^{5a}) - (CH₂)₁₋₆ - OR^{2d}; - N(R^{5a}) - (CH₂)₁₋₆ - N(R^{2d} , R^{3d}); - C(=O) - N(R^{2d} , R^{3d}); - N(R^{5a}) - (CH₂)₁₋₆ - C(=O) - N(R^{2d} , R^{3d}); - N(- (CH₂)₁₋₆ - OR^{2d})₂; - N(R^{5a}) - (CH₂)₁₋₆ - OR^{2d}; - N(R^{5a}) - C(=O) - R^{2d}; - N(R^{5a}) - SO₂ - R^{2d}; - (CH₂)₀₋₆ - C(=O) - O- R^{2d}; - (CH₂)₀₋₆ - C(=O) - N(R^{2d} , R^{3d}); - (CH₂)₀₋₆ - C(=NR^{2d}) - N(R^{3d} , R^{4d}); - (CH₂)₀₋₆ - N(R^{5a}) C(=NR^{2d}) - N(R^{3d} , R^{4d}); un anillo heterocíclico - (CH₂)₀₋₆ - N(R^{3d}) C de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, y un anillo heterocíclico - (CH₂)₀₋₆ de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

R^{5a} , R^{2d} , R^{3d} y R^{4d} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; C1- 6- alquilo; C1- 6- alquilarilo; - CN; - NO₂; arilo carbocíclico; - CN; - NO₂; o R^{2d} y R^{3d} tomado junto con los átomos N a los cuales están independientemente fijados

forman un anillo heterocíclico de 5- 7 miembros; o R^{3d} y R^{4d} tomados junto con el átomo N al cual están fijados forman un anillo heterocíclico de 5- 8 miembros que contiene 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

J es un enlace directo o es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

- 5 - N(- R^9) - C(=O) - ; - C(=O) - N(- R^9) - ; - O- ; - S- ; - SO- ; - SO₂- ; - CH₂- ; - N(- R^9) - ; y
- N(- R^9) - SO₂- ;

R^9 es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; - C1- 4- alquilo; - C0- 4- alquil- arilo carbocíclico; - (CH₂) o anillo heterocíclico de - 4- 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S; - (CH₂) 1- 6- C(=O) - O- C1- 4- alquilo; y -
10 (CH₂) 1- 6- C(=O) - N(R^{6a} , R^{6b}) ;

R^{6a} y R^{6b} son cada uno un miembro independientemente seleccionado a partir del grupo que consta de:

H y - C1- 6- alquilo;

X es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

- 15 (a) fenilo sustituido con 0- 3 grupos R^{1e} ;
(b) naftilo sustituido con 0- 3 grupos R^{1e} y
(c) un sistema anular heterocíclico aromático de 6 miembros conteniendo 1- 3 átomos N y con 0- 3 átomos cíclicos sustituidos por 0- 3 grupos R^{1e} ; y

(d) un sistema anular bicíclico heterocíclico aromático fusionado de 8- 10 miembros
20 conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S y 0- 3 átomos cíclicos del sistema anular bicíclico heterocíclico fusionado son sustituidos con 0- 3 grupos R^{1e} ;

R^{1e} es un miembro independientemente seleccionado a partir del grupo que consta de:

- halo; CF₃; - C₁₋₄- alquilo; arilo carbocíclico; - C₀₋₂- alquilenos - CN; - O- R^{2e} ; - C₀₋₂- alquilenos - C(=O) - O- R^{2e} ; - C₀₋₂- alquilenos - C(=O) - N(R^{2e} , R^{3e}) ; - C₀₋₂- alquilenos - NO₂; - C₀₋₂- alquilenos - N(R^{2e} , R^{3e}) ; - C₀₋₂- alquilenos - SO₂- N(R^{2e} , R^{3e}) ; - C₀₋₂- alquilenos - SO₂- R^{2e} ; trihaloalquilo; - O- C₀₋₂- alquilenos - O- R^{2e} ; - C₀₋₂- alquilenos - O- R^{2e} ; - O- C₁₋₄- alquilenos - C(=O) - N(R^{2e} , R^{3e}) ; - O- C₁₋₄- alquilenos - C(=O) - O- R^{2e} ; - C₀₋₂- alquilenos - N(R^{2e}) - C(=O) - R^{3e} ; - C₀₋₂- alquilenos - N(- R^{2e}) - SO₂- R^{3e} ; - CH₂- N(R^{2e}) - C(=O) - R^{3e} ; - CH₂- N(R^{2e}) - SO₂- R^{3e} ; - (CH₂)₀₋₆- NR^{2e}R^{3e}; - C(=O) - N(R^{2e} , R^{3e}) ; - N(- (CH₂)₁₋₆- OR^{2e})₂; - N(R^{10}) - (CH₂)₁₋₆- OR^{2e}; - N(R^{10}) - C(=O) - R^{2e} ;
25 - N(R^{10}) - SO₂- R^{2e} ; - C(=N(R^{10})) - N(R^{2e} , R^{3e}) ; y un anillo heterocíclico - (CH₂)₀₋₆- de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

119

R^{10} , R^{2c} y R^{3c} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; - C1- 4- alquilo; - C0- 2- alquilenos - R^{1g} ; - C0- 2- alquilenos - $N(-R^{1g}, -R^{2g})$; - C1- 4- alquilenos - arilo carbocíclico; - C1- 4- alquilenos - heterocíclico; y R^{10} y R^{2e} , o R^{2e} y R^{3e} junto con el átomo N al cual están fijados pueden formar el anillo heterocíclico de 5- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S los cuales pueden ser sustituidos por 0- 2 grupos R^{1g} ;

R^{1g} y R^{2g} son independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo de: H; halo; - C1- 4- alquilo, un grupo arilo carbocíclico; un grupo heterocíclico; - CN; - C(=O) - $N(R^{3g}, R^{4g})$; - C(=O) - OR^{3g} ; - NO₂; - $(CH_2)_p - NR^{3g}R^{4g}$; - $SO_2NR^{3g}R^{4g}$; - SO_2R^{3g} ; - CF_3 ; y - $(CH_2)_pOR^{3g}$;

p es un entero de 0- 2; y

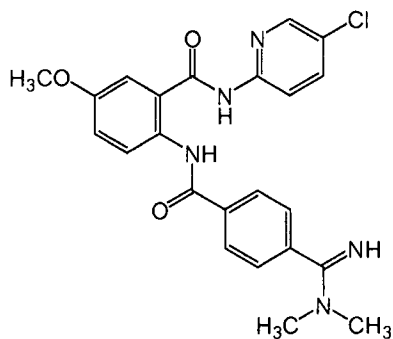
R^{3g} y R^{4g} son cada uno independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de: H; C1- 4- alquilo y - C0- 4- alquilenos - arilo carbocíclico; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada de entre 0.01 y 2.0 mg/kg aproximadamente. En otra realización, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.1 y 1.5 mg/kg. En aún otra realización, la cantidad está entre 0.4 y 1.2 mg/kg aproximadamente.

En una realización, la cantidad inhibitoria de la coagulación se administra al paciente una vez al día. En otra realización, la cantidad inhibitoria de la coagulación se administra al paciente en un día pero dosificada varias veces al día, es decir, dos veces ("BID") o tres veces al día ("TID").

En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto inhibidor del factor Xa es una sal de maleato. En otra realización, el compuesto de la Fórmula I es el compuesto de la Fórmula II:

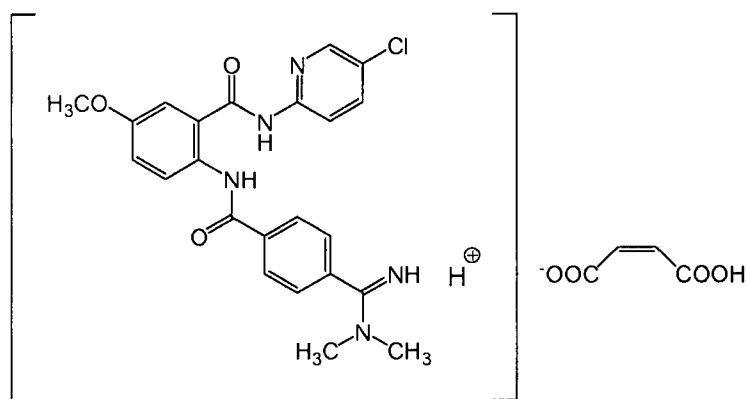
120



II

o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la sal es una sal de maleato. En una realización, la cantidad inhibitoria de la coagulación es una dosis diaria agregada entre 0.01 y 2.0 mg/kg aproximadamente o entre 0.1 y 1.5 mg/kg aproximadamente o entre 0.4 y 1.2 mg/kg aproximadamente.

En otra realización, el compuesto inhibidor del factor Xa es la sal de maleato que tiene la estructura de la Fórmula III:



III

Este invento también está dirigido a una formulación de dosis unitaria que comprende una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa de las Fórmulas I, II, IV, o V (como se describe a continuación) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la sal de la Fórmula III. En algunas realizaciones, la cantidad inhibitoria de la coagulación está entre 0.01 y 2.0 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis está entre 0.1 y 1.5 mg/kg aproximadamente o entre 0.4 y 1.2 mg/kg aproximadamente.

El invento también está dirigido a un ensayo en vitro para determinar las propiedades antitrombóticas en vivo de un compuesto. El ensayo comprende los siguientes pasos:

a) introducir un compuesto de prueba en una muestra en vitro de sangre entera o plasma que comprende factor tisular (TF) y un sustrato de trombina detectablemente rotulado para formar una muestra de prueba;

b) determinar el nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba al monitorear la escisión del sustrato de trombina detectablemente rotulado en la muestra de prueba como una función de tiempo;

c) determinar el nivel de actividad de trombina en una muestra de control al monitorear la escisión del sustrato de trombina detectablemente rotulado en la muestra de control como una función de tiempo, en donde la muestra de control comprende sangre entera o plasma que comprende factor tisular (TF) y un sustrato de trombina detectablemente rotulado;

d) comparar el nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba y la muestra de control, en donde un nivel inferior de actividad de trombina en la muestra de prueba es una indicación que el compuesto de prueba tiene actividad antitrombótica en vivo.

La sangre y plasma pueden ser anticoagulados o no anticoagulados. En ciertas realizaciones del invento, el sustrato de trombina detectablemente rotulado es un Z- Gly- Gly- Arg- AMC.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

La FIG. 1A muestra la correlación de generación de trombina con la proporción normalizada internacional (INR) en pacientes anticoagulados tratados con warfarina. La generación de trombina se midió a 10 minutos en muestras de plasma desde pacientes recibiendo terapia de warfarina estable (n = 137). Los datos de pacientes que reciben terapia de warfarina se presentan como quintiles de los resultados INR. Las barras de error muestran errores estándares.

FIG. 1B muestra la correlación de la generación de trombina con tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) en pacientes anticoagulados tratados con enoxaparina. La generación de trombina de plasma se midió en 16 pacientes tratados con enoxaparina. Las unidades anti- fXa se midieron mediante ensayo COATEST LMW según las instrucciones del fabricante. Los grupos se compararon mediante la prueba t de Student.

La FIG. 1C muestra la correlación de la generación de trombina con aPTT en pacientes

22

anticoagulados tratados con heparina no fraccionada (UFH) . La generación de trombina de plasma se midió en 15 pacientes. Las unidades Anti- fXa se midieron mediante ensayo COATEST LMW según las instrucciones del fabricante. Los grupos se compararon mediante La prueba t de Student.

La FIG. 2 muestra la inhibición en respuesta a la dosis de trombosis *en vivo* en el modelo de mandril y proporciona evidencia que el ensayo *in vitro* es predictivo de actividad antitrombótica *en vivo*. La deposición de plaquetas indio- rotuladas en la cámara en el tiempo después de infusión de vehículo o betrixaban. El número de plaquetas rotuladas en la cámara fueron normalizadas para conteos de plaquetas de pre- infusión para animales individuales. Los datos representan desviación estándar promedio $\pm$. La deposición de plaquetas a 140 minutos fue analizada mediante ANOVA post prueba de Dunnett. La dosis 3 (26- 38 ng/ml) tuvo una disminución significativa en comparación con el control ($P < 0.05$) y dosis 4 (54- 88 ng/ml) tuvo una disminución significativa en comparación con el control (Valor $P < 0.01$) .

La FIG. 3 muestra inhibición en respuesta a la dosis de generación de trombina en sangre entera de voluntarios humanos saludables. La sangre entera fue tratada con la concentración declarada (en nM) de betrixaban antes de la iniciación de la prueba. Las unidades de fluorescencia relativa que resultan a partir de escisión de sustrato de trombina rotulada son mostradas.

Las FIGS. 4A y 4B muestran inhibición en respuesta a la dosis de generación de trombina en sangre entera a partir de voluntarios humanos saludables. La sangre entera fue tratada con la concentración declarada de fondaparinux (en nM) antes de la iniciación de prueba. El rango de concentración de fondaparinux ilustrado en la FIG. 4B corresponde a niveles de anticoagulación terapéutica utilizada en pacientes de cirugía ortopédica y síndrome coronario agudo. Las unidades de fluorescencia relativa que resultan a partir de escisión de sustrato de trombina rotulada son mostradas.

La FIG. 5 muestra datos a partir de ensayos *in vitro* realizados con plasma a partir de voluntarios humanos saludables dosificados de manera oral con betrixaban. Esto es discutido más completamente en el Ejemplo 8.

La FIG. 6 muestra el porcentaje de pacientes con tromboembolismo venoso (VTE) e intervalos de confianza de 95% para betrixaban y enoxaparina como se determinó mediante el estudio en el Ejemplo 9 con flebografía unilateral entre los Días 10 y 14 y para controles

103

históricos de enoxaparina (B y C) a partir de estudios utilizando flebografía realizada entre los Días 10 y 14 después de cirugía ortopédica (reemplazo total de rodilla) . Esto es discutido más completamente en Ejemplo 9. Los detalles del estudio correspondiente a Enox B son reportados en *Blood* **102** (11) ; 2003. Los detalles del estudio correspondiente a Enox C son reportados en la referencia por Lassen et al. (*J Thromb Haemostasis* 2007, Septiembre 15) .

La FIG. 7 muestra la reducción desde la generación base de trombina ante tratamiento con dosis variables de betrixaban y enoxaparina el día 2, descarga y el flebograma. Se muestra el cambio medio desde unidades de fluorescencia relativa de base ($\pm$ error estándar de la media) en generación de trombina de plasma, mediante visita y tratamiento. Los pacientes descargados el Día 2 también son representados en el valor promedio para ese día de estudio.

La FIG. 8 muestra los cambios en actividad anti- fXa de las dosis variables de betrixaban y enoxaparina el día 2, descarga y el flebograma. La actividad anti- fXa ($\pm$ error estándar de la media) (U/mL) , como se midió mediante el ensayo de heparina Coatest LMW, mediante visita y tratamiento es mostrada. El límite detectable para anti fXa fue 0.05 U/ml; los valores por debajo del límite detectable fueron establecidos a 0.025. Los pacientes descargados el Día 2 también son representados en el valor promedio para ese día de estudio.

La FIG. 9 muestra la concentración de betrixaban en plasma (ng/mL) de las dosis variables de betrixaban el día 2, descarga y el flebograma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

Antes que las composiciones y métodos sean descritos, se debe entender que el invento no está limitado a las metodologías, protocolos, líneas celulares, ensayos, y reactivos particulares descritos, como estos pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente pretende describir realizaciones particulares del presente invento, y en ninguna forma pretende limitar el alcance del presente invento como establece en las reivindicaciones anexas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como comúnmente lo entiende alguien con experiencia en el estado de la técnica a la cual este invento pertenece. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente se pueden utilizar en la práctica o prueba del presente invento, los métodos, dispositivos, y materiales preferidos son ahora descritos. Todas las publicaciones técnicas y de patentes citadas en la presente son

incorporadas en la presente como referencia en su totalidad. Nada en la presente se debe considerar como una admisión que el invento no esté autorizado a adelantar tal divulgación en virtud del anterior invento.

La práctica del presente invento empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo de tejidos, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, las cuales están dentro del alcance del estado de la técnica. Ver, ej., Sambrook y Russell eds. (2001) Clonación Molecular: Un manual de laboratorio, 3^{ra} edición; la serie Ausubel et al. eds. (2007) Protocolos actuales en Biología molecular; la serie Métodos en Enzimología (Academic Press, Inc., N.Y.) ; MacPherson . (1991) PCR 1: Un enfoque práctico (IRL Press a Oxford University Press) ; MacPherson . (1995) PCR 2: Un enfoque práctico; Harlow y Lane eds. (1999) Anticuerpos, Un manual de laboratorio; Freshney (2005) Cultivo de Células animales: Un manual de Técnica Básica, 5 edición; Gait ed. (1984) Síntesis Oligonucleotida; Patente Americana No. 4,683,195; Hames y Higgins eds. (1984) Hibridización de ácido nucleico; Anderson (1999) Hibridización de ácido nucleico; Hames y Higgins eds. (1984) Transcripción y Traducción; Células Inmovilizadas y Enzimas (IRL Press (1986)) ; Perbal (1984) Una Guía Práctica a Clonación molecular; Miller y Calos eds. (1987) Vectores de Transferencia Genética para Células Mamíferas (Cold Spring Harbor Laboratory) ; Makrides ed. (2003) Transferencia Genética y Expresión en Células Mamíferas; Mayer y Walker eds. (1987) Métodos Inmunoquímicos en Biología celular y molecular (Academic Press, London) ; Herzenberg . eds (1996) Manual de Weir de Inmunología Experimental; Manipulación de Embriones de Ratón: Un manual de laboratorio, 3^{ra} edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)) .

Todas las designaciones numéricas, ej., pH, temperatura, tiempo, concentración, y peso molecular, incluyendo rangos, son aproximaciones las cuales son variadas (+) o (-) por incrementos de 0.1. Se debe entender, aunque no se afirme explícitamente que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También se debe entender, aunque no se afirme explícitamente, que los reactivos descritos en la presente son meramente de ejemplo y que equivalentes de estos son conocidos en el estado de la técnica.

1. Definiciones

Según el presente invento y como se utiliza en la presente, los siguientes términos son

definidos con los siguientes significados, a menos que explícitamente se indique lo contrario.

Como se utiliza en la especificación y reivindicaciones, la forma singular "un", "una" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Como utilizada en la presente, el término "que comprende" o "comprende" se utiliza para significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no se excluyen otros. "Que consta esencialmente de" cuando se utiliza para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de cualquier significado esencial a la combinación para el propósito declarado. Así, una composición que consta esencialmente de los elementos como se definen en la presente no excluiría contaminantes traza desde el método de aislamiento y purificación y vehículos farmacéuticamente aceptables, tal como solución salina con buffer con fosfato, preservativos y similares. "Que consta de" significa excluir más que los elementos traza de otros ingredientes y pasos de método sustancial para administrar las composiciones de este invento o pasos de proceso para producir una composición o lograr el resultado esperado. Realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de este invento.

El término "dosis diaria agregada" se refiere a la cantidad de fármaco o compuesto administrado en un periodo de 24 horas.

El término "muestra de prueba" o "solución de ensayo" comprende sangre entera o plasma sanguíneo (ya sea anticoagulados o no anticoagulados), factor tisular ("TF"), un sustrato de trombina detectablemente rotulado, y un compuesto de prueba. La solución también puede contener un número de solventes apropiados, tal como dimetilsulfoxido (DMSO). En una realización, la sangre o plasma en la muestra de prueba o solución de ensayo no es tratada o titulada con enzimas, incluyendo enzimas de veneno de reptiles, tal como Reptilase®. En otra realización, la sangre o plasma no es rica en plaquetas.

El término "factor tisular" o TF está presente en tejido subendotelial, plaquetas, y leucocitos y es necesario para la iniciación de formación de trombina a partir de la protrombina zimógeno. TF también es conocido como tromboplastina, factor III, o CD 142. El TF utilizado en los métodos de este invento es preferiblemente TF humano recombinante humano el cual es comercialmente disponible en Dade Behring Pharmaceuticals o American Diagnostica, Inc. El TF

utilizado en los ensayos también puede ser endógeno o una combinación de endógeno y exógeno.

El término "compuesto de prueba" como se utiliza en la presente se refiere a un compuesto no peptídico que tiene un peso molecular menor que 1500 Daltons. Este término también se refiere a fracciones heparinoides y sacáridas pequeñas con peso molecular menor de 5000

5 Daltons.

El término "muestra de control" se refiere a la muestra de prueba o solución de ensayo donde el compuesto de prueba está ausente.

El término "sangre entera no anticoagulada" se refiere a sangre recolectada desde un paciente el cual no ha recibido terapia de anticoagulación mediante un agente antitrombótico.

10 Este también se refiere a sangre de un paciente que puede haber recibido terapia de anticoagulación pero cualquier beneficio o efecto ya no es efectuado.

El término "sangre entera anticoagulada" o "plasma anticoagulado" se refiere a sangre o plasma tomado de pacientes quienes recientemente o actualmente se sometieron a terapia anticoagulante. Este también se refiere a sangre de donantes humanos la cual es obtenida

15 mediante venipuntura y recolectada en un medio conteniendo anticoagulante agregado de manera exógena tal como citrato, EDTA, o heparina.

El término "sustrato de trombina detectablemente rotulado" se refiere a un sustrato de trombina que es rotulado mediante cualquier número de rótulos detectables bien conocidos. Estos rótulos incluyen, pero no están limitados a rótulos fluorescentes, rótulos fosforescentes, rótulos quimioluminiscentes, rótulos electroquimioluminiscientes, y rótulos radioactivos. En una

20 realización del invento, el sustrato rotulado es Z- Gly- Gly- Arg- AMC, comercialmente disponible en Bachem.

El término "actividad antitrombótica" se refiere a la capacidad de los compuestos para inhibir la formación de trombos con efectos aceptables sobre medidas clásicas de parámetros de la coagulación, plaquetas, y función de plaquetas. Las condiciones caracterizadas por trombosis

indeseada incluyen aquellas que involucran la vasculatura arterial y venosa. Con respecto a la vasculatura arterial coronaria, la formación anormal de trombos caracteriza la ruptura de una

30 placa aterosclerótica establecida la cual es la causa principal de infarto del miocardio agudo y angina inestable, así como también caracterizando la formación de trombos coronarios oclusivos que resulta a partir de ya sea terapia trombolítica o angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA).

129

Con respecto a la vasculatura venosa, la formación anormal de trombos caracteriza la condición observada en pacientes sometidos a cirugía principal en las extremidades inferiores o el área abdominal quienes a menudo sufren de formación de trombos en la vasculatura venosa resultando en flujo sanguíneo reducido hacia la extremidad afectada y una predisposición a embolismo pulmonar. La formación anormal de trombos además caracteriza coagulopatía intravascular diseminada la cual comúnmente ocurre dentro de ambos sistemas vasculares durante choque séptico, ciertas infecciones virales y cáncer, una condición en donde existe consumo rápido de los factores de la coagulación y coagulación sistémica lo cual resulta en la formación de trombos que amenazan la vida ocurriendo en toda la microvasculatura llevando a falla general de órganos.

La evidencia de actividad antitrombótica será útil en terapia anticoagulante para evitar coagulación de sangre entera almacenada y evitar coagulación en otras muestras biológicas para prueba o almacenamiento.

El término "alquenilo" se refiere a un radical alifático no saturado trivalente de cadena lineal o ramificada. El término "alquinilo" se refiere a un radical alifático de cadena lineal o ramificada que incluye al menos dos carbonos unidos mediante un enlace triple. Si no se especifica el número de carbonos, alquenilo y alquinilo cada uno se refiere a radicales con entre 2- 12 átomos de carbono.

El término "alquilo" se refiere a grupos alifáticos saturados incluyendo grupos de cadena lineal, cadena ramificada y cíclicos con el número de átomos de carbono especificado, o si no se especifica un número, con hasta 12 átomos de carbono. El término "cicloalquilo" como se utiliza en la presente se refiere a un anillo alifático mono-, bi-, o tricíclico que tiene entre 3 y 14 átomos de carbono y preferiblemente 3 a 7 átomos de carbono. El término "alquilenilo" se refiere a un grupo alquilo el cual es divalente, es decir, $-CH_2-$.

Como se utiliza en la presente, los términos "estructura cíclica carbocíclica" y "estructura cíclica mono carbocíclica C3- 16, bicíclica o tricíclica" o similares cada uno se refiere a estructuras cíclicas estables que tienen solamente átomos de carbono como átomos cíclicos en donde la estructura cíclica es un miembro sustituido o no sustituido seleccionados a partir del grupo que consta de un anillo monocíclico estable el cual es un anillo aromático ("arilo") con seis átomos cíclicos; un anillo no aromático monocíclico estable con entre 3 y 7 átomos cíclicos en el anillo; una estructura cíclica bicíclica estable que tiene un total de entre 7 y 12 átomos

28

cíclicos en los dos anillos en donde la estructura de anillo bicíclico se selecciona a partir del grupo que consta de estructuras cíclicas en las cuales ambos anillos son aromáticos, estructuras cíclicas en las cuales uno de los anillos es aromático y estructuras cíclicas en las cuales ambos anillos son no aromáticos; y una estructura cíclica tricíclica estable que tiene un total de entre 10 y 16 átomos en los tres anillos en donde la estructura cíclica tricíclica se selecciona a partir del grupo que consta de: estructuras cíclicas en las cuales tres de los anillos son aromáticos, estructuras cíclicas en las cuales dos de los anillos son aromáticos y estructuras cíclicas en las cuales tres de los anillos son no aromáticos. En cada caso, los anillos no aromáticos cuando están presentes en la estructura de anillo monocíclica, bicíclica o tricíclica pueden independientemente ser saturados, parcialmente saturados o completamente saturados. Ejemplos de tales estructuras de anillo carbocíclicas incluyen, pero no están limitados a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, adamantilo, ciclooctilo, [3.3.0]bicyclooctano, [4.3.0]bicyclononano, [4.4.0]bicyclodecano (decalina) , [2.2.2]bicyclooctano, fluorenilo, fenilo, naftilo, indanilo, adamantilo, o tetrahidronaftilo (tetralina) . Además, la estructura cíclica descrita en la presente se puede fijar a uno o más grupos colgantes indicados vía cualquier átomo de carbono lo cual resulta en una estructura estable. El término "sustituido" como se utiliza en conjunción con estructura de anillo carbocíclicas significa que los átomos de hidrógeno fijados a los átomos de carbono cíclico de estructuras cíclicas descritas en la presente se pueden sustituir mediante uno o más de los sustituyentes indicados para esa estructura si tal sustitución resulta en un compuesto estable.

El término "arilo" el cual es incluido con el término "estructura cíclica carbocíclica" se refiere a un anillo aromático no sustituido o sustituido, sustituido por uno, dos o tres sustituyentes seleccionados a partir de alcoxilo inferior (- O- C1- 6 alquilo) , alquilo inferior (- C1- 6 alquilo) , alquilamino inferior (- NRR, donde 1 o 2 de R es alquilo inferior) , hidroxilo, halógeno, ciano, hidroxilo, mercapto, nitro, tioalcoxilo (- S- alquilo) , carboxaldehído (- OC(O) - H) , carboxilo (- C(O) OH) , carboalcoxilo (- C(O) - O- alquilo) y carboxamida (- C(O) - NH₂) , incluyendo pero sin limitar a arilo carbocíclico, arilo heterocíclico, y grupos biarilo y similares, todos pueden ser opcionalmente sustituidos. Grupos arilo preferidos incluyen fenilo, halofenilo, alquilfenilo inferior, naftilo, bifenilo, fenantrenilo y naftacenilo.

El término "arilalquilo" el cual es incluido con el término "arilo carbocíclico" se refiere a uno, dos, o tres grupos arilo que tienen el número de átomos de carbono designados, anexados a un grupo alquilo con el número de átomos de carbono designados. Grupos arilalquilo apropiados

incluyen, pero no están limitados a, bencilo, picolilo, naftilmetilo, fenetilo, benziihidrido, tritilo, y similares, todos pueden ser opcionalmente sustituidos.

Como se utiliza en la presente, el término "anillo heterocíclico" o "sistema anular heterocíclico" se refiere a un miembro sustituido o no sustituido seleccionado a partir del grupo que consta de anillo monocíclico estable con entre 5 y 7 miembros en el anillo mismo y con entre 1 y 4 heteroátomos cíclicos seleccionados a partir del grupo que consta de N, O y S; una estructura de anillo bicíclica estable que tiene un total de entre 7 y 12 átomos en los dos anillos en donde al menos uno de los dos anillos tiene entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, incluyendo estructuras de anillo bicíclicas en donde cualquiera de los anillos heterocíclicos monocíclicos estables descritos es fusionado a un anillo de hexano o benceno; y una estructura de anillo heterocíclica tricíclica estable que tiene un total de entre 10 y 16 átomos en los tres anillos en donde al menos uno de los tres anillos tiene entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir del grupo que consta de N, O y S. Cualquiera de los átomos de nitrógeno y azufre presentes en un anillo heterocíclico de tal estructura de anillo heterocíclica se puede oxidar. A menos que se indique lo contrario los términos "anillo heterocíclico" o "sistema anular heterocíclico" incluyen anillos aromáticos, así como también anillos no aromáticos los cuales pueden ser anillos no aromáticos saturados, parcialmente saturados o completamente saturados no aromáticos. También, a menos que se indique lo contrario el término "sistema anular heterocíclico" incluye estructuras cíclicas en donde todos los anillos contienen al menos un heteroátomo así como también estructuras con menos de todos los anillos en la estructura cíclica conteniendo al menos un heteroátomo, por ejemplo estructuras de anillo bicíclicas en donde un anillo es un anillo de benceno y uno de los anillos tiene uno o más heteroátomos están incluidos dentro del término "sistema anular heterocíclico" así como también estructuras de anillo bicíclicas en donde cada uno de los dos anillos tiene al menos un heteroátomo. Además, la estructura cíclica descrita en la presente se puede fijar a uno o más grupos colgantes indicados vía cualquier heteroátomo o átomo de carbono lo cual resulta en una estructura estable. Además, el término "sustituido" significa que uno o más de los átomos de hidrógeno sobre los átomos de carbono o átomos de nitrógeno cíclicos de cada uno de los anillos en las estructuras cíclicas descritas en la presente se pueden reemplazar mediante uno o más de los sustituyentes indicados si tales reemplazos resultan en un compuesto estable. Los átomos de nitrógeno en una estructura de anillo se pueden cuaternizar, pero tales compuestos están específicamente indicados o están incluidos dentro del

130

término "una sal farmacéuticamente aceptable" para un compuesto particular. Cuando el número total de átomos de O y S en un único anillo heterocíclico es más de 1, se prefiere que tales átomos no sean adyacentes entre sí. Preferiblemente, no hay más de 1 átomo cíclico de O o S en el mismo anillo de una estructura de anillo heterocíclica.

5 Ejemplos de sistemas de anillo heterocíclicos monocíclicos o bicíclicos, en orden alfabético, son acridinilo, azocinilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benztiazolilo, benztriazolilo, benztetrazolilo, benzisoxazolilo, benzisotiazolilo, benzimidazalinilo, carbazolilo, 4aH- carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H- 1,5,2- ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-
10 β tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H- indazolilo, indolinilo, indolizinilo, indolilo, 3H- indolilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo (bencimidazolilo), isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3- oxadiazolilo, 1,2,4- oxadiazolilo, 1,2,5- oxadiazolilo, 1,3,4- oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, pirimidinilo,
15 fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatiinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, piroazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H- pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H- quinolizinilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo,
20 6H- 1,2,5- tiadazinilo, 1,2,3- tiadiazolilo, 1,2,4- tiadiazolilo, 1,2,5- tiadiazolilo, 1,3,4- tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo, triazinilo, 1,2,3- triazolilo, 1,2,4- triazolilo, 1,2,5- triazolilo, 1,3,4- triazolilo y xantenilo. Estructuras de anillo heterocíclicas preferidas incluyen, pero no están limitadas a piridinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, pirrolidinilo, imidazolilo, indolilo, bencimidazolilo, 1H- indazolilo,
25 oxazolinilo, o isatinoilo. También incluidos están los compuestos cíclicos y espiro fusionados conteniendo, por ejemplo, las anteriores estructuras de anillo cíclicas.

Como se utiliza en la presente el término "sistema anular heterocíclico aromático" tiene esencialmente la misma definición que para los sistema anular monocíclicos y bicíclicos excepto que al menos un anillo del sistema anular es un anillo heterocíclico aromático o el anillo bicíclico
30 tiene un anillo heterocíclico aromático o no aromático fusionado a estructura de anillo carbocíclica no aromática.

13

Los términos "halo" o "halógeno" como se utilizan en la presente se refieren a sustituyentes de Cl, Br, F o I. El término "haloalquilo", y similares, se refieren a un radical de carbono alifático que tiene al menos un átomo de hidrógeno reemplazado por un átomo de Cl, Br, F o I, incluyendo mezclas de átomos halo diferentes. Trihaloalquilo incluye trifluorometilo y similares, por ejemplo.

El término "metileno" se refiere a -CH₂-.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" incluye sales de compuestos derivados de la combinación de un compuesto y un ácido orgánico o inorgánico. Estos compuestos son útiles en tanto en forma de sal como de base libre. En la práctica, la forma de sal se traduce en el uso de la forma alcalina; ambas sales de adición ácida y alcalina están dentro del alcance del presente invento.

"Sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales que retienen la efectividad biológica y propiedades de las bases libres y los cuales no son biológicamente o de otra manera indeseables, formados con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido meléico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, Ácido cítrico, ácido benzóico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p- toluensulfónico, ácido salicílico y similares.

"Las sales de adición alcalina farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Particularmente preferidas son las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas naturales sustituidas, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básico, tales como resinas de isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2- dietilaminoetanol, trimetamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaina, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperizina, piperidina, N- etilpiperidina, poliamina y similares. Bases no tóxicas orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitclohexilamina, colina, y cafeína.

92

"Propiedad biológica" para los propósitos en la presente significa un efector *in vivo* o función o actividad antigénica que es directa o indirectamente realizada por un compuesto de este invento que a menudo se muestran por ensayos *in vitro*. Funciones efectoras incluyen unión de receptores o ligandos, cualquier actividad enzimática o actividad moduladora enzimática, cualquier actividad de unión de vehículos, cualquier actividad hormonal, cualquier actividad para promover o inhibir adhesión de células a una matriz extracelular o moléculas de superficie celular, o cualquier rol estructural. Funciones antigénicas incluyen posesión de un epítipo o sitio antigénico que es capaz de reaccionar con anticuerpos creados contra éste.

En los compuestos de este invento, los átomos de carbono unidos a cuatro sustituyentes no idénticos son asimétricos. Por consiguiente, los compuestos pueden existir como diastereoisómeros, enantiómeros o mezclas de los mismos. Las síntesis descritas en la presente pueden emplear racematos, enantiómeros o diastereómeros como materiales de inicio o intermedios. Los productos diastereoméricos que resultan de tales síntesis se pueden separar mediante métodos cromatográficos o de cristalización, o mediante otros métodos conocidos en el estado de la técnica. Igualmente, las mezclas de productos enantioméricos se pueden separar utilizando las mismas técnicas o mediante otros métodos conocidos en el estado de la técnica. Cada uno de los átomos de carbono asimétricos, cuando están presentes en los compuestos de este invento, pueden estar en una de dos configuraciones (R o S) y ambas están dentro del alcance del presente invento.

2. Métodos de Inhibir Coagulación de la sangre y Formulaciones de dosis unitarias

Un aspecto del invento proporciona métodos de inhibir coagulación de la sangre en un paciente humano al administrar al paciente una cantidad inhibitoria de la coagulación de un compuesto inhibidor del factor Xa. Este aspecto se relaciona con el descubrimiento sorprendente que la dosis unitaria de los compuestos de inhibidor del factor Xa divulgados en la presente, requerida para inhibir coagulación en un primate es menor que la unidad de dosis requerida para obtener niveles similares de inhibición de la coagulación en otros modelos animales, tal como roedores. Como se describió adicionalmente en los Ejemplos y Figuras, esta especificidad de especies se demostró en ensayos *in vivo* y mediante extensiones *in vitro* de tiempo de protrombina (PT) en plasma de rata, conejo, mandril y humano. Un aumento doble de PT fue

logrado a concentraciones de 8.9 μM en rata y 1.6 μM en conejo en comparación con los primates donde el cambio doble en PT fue observado a 1 μM en mandril y 0.4 μM en humanos.

Los compuestos inhibidores del factor Xa son útiles para tratar estados patológicos en mamíferos con trastornos de la coagulación tal como en el tratamiento o prevención de angina inestable, angina refractaria, infarto del miocardio, ataques isquémicos temporales, ataque trombótico, ataque embólico, coagulación intravascular diseminada incluyendo el tratamiento de choque séptico, trombosis venosa profunda en la prevención de embolismo pulmonar o el tratamiento de reoclusión o restenosis de arterias coronarias reperfusionadas. Además, estos compuestos son útiles para el tratamiento o profilaxis de aquellas enfermedades las cuales involucran la producción y/o acción del complejo factor Xa/protomina. Esto incluye un número de estados trombóticos y protrombóticos en los cuales la cascada de la coagulación es activada los cuales incluyen pero no están limitados a trombosis venosa profunda, embolismo pulmonar, infarto del miocardio, apoplejía, complicaciones tromboembólicas de cirugía y oclusión arterial periférica. Otras enfermedades tratables o prevenibles mediante la administración de compuestos de este invento incluyen, sin limitación, formación coronaria oclusiva de trombos que resulta a partir de ya sea terapia trombolítica o angioplastia coronaria transluminal percutánea, formación de trombos en la vasculatura venosa, coagulopatía intravascular diseminada, una condición en donde existe consumo rápido de los factores de la coagulación y coagulación sistémica la cual resulta en la formación de trombos que amenazan la vida ocurriendo en toda la microvasculatura llevando a falla general de órganos, ataque hemorrágico, diálisis renal, oxigenación sanguínea, y cateterización cardíaca.

Por consiguiente, un aspecto del invento proporciona un método de inhibir coagulación en un paciente humano en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad inhibitoria de la coagulación de un compuesto inhibidor del factor Xa o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.01 y 2.0 mg/kg. Realizaciones específicas de compuestos inhibidores del factor Xa se muestran en las Fórmulas I, II, IV, V y sales de los mismos (tal como la Fórmula III) como se establece a continuación. Además las realizaciones soportan métodos de inhibir coagulación en un paciente humano en necesidad de lo mismo, que comprenden administrar al paciente una cantidad inhibitoria de la coagulación de un compuesto inhibidor del factor Xa, o sal farmacéuticamente aceptable del

BY

mismo, en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.05 y 2.0 mg/kg; alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.1 y 2.0 mg/kg; o alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.1 o 0.2 y 1.5 mg/kg; o alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.4 y 1.2 mg/kg; o alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.43 y 1.15 mg/kg; o alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.45 y 0.55 mg/kg. En aún otra realización del invento, la cantidad del compuesto inhibidor del factor Xa administrado a un humano es tal que el nivel de suero es aproximadamente 1 μ M o menos.

Otro aspecto del invento soporta las formulaciones de dosis unitarias que comprenden una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.01 y 2.0 mg/kg; alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.05 y 2.0 mg/kg; alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.1 y 2.0 mg/kg; o alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.2 y 1.5 mg/kg; o alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.4 y 1.2 mg/kg; o alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.43 y 1.15 mg/kg; o alternatively, la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre aproximadamente 0.45 y aproximadamente 0.55 mg/kg.

Las formulaciones son adicionalmente descritas en la sección titulada "formulaciones."

3. Ensayo de Generación de Trombina

Las medidas actuales para monitorear el estado de la coagulación (tiempo de

135

tromboplastina parcial activado (aPTT) , tiempo de protrombina (PT) , proporción normalizada internacional (INR) , tiempo de la coagulación activado (ACT) , unidades anti fXa) se han desarrollado para anticoagulantes existentes (es decir, heparinas y warfarina) . Las pruebas disponibles no son suficientemente sensibles para evaluar las concentraciones terapéuticas de inhibidores de fXa directos.

Desde que el blanco verdadero de inhibidores fXa es la membrana asociada con el complejo de protrombinasa, un ensayo que mide la generación de trombina será una medida superior del nivel de anticoagulación logrado en pacientes dosificados con inhibidores de fXa directos. Betrixaban, un inhibidor de fXa biodisponible oral en etapas avanzadas de desarrollo clínico (Fase II) , se utilizó para validar esta hipótesis. Betrixaban es un sitio activo dirigido, inhibidor competitivo de fXa humano ($K_i=17 \text{ pM}$) y exhibe una especificidad mayor que 86,000 veces contra proteasas relacionadas tales como trombina, factor VIIa, factor IXa, proteína C activada, activador de plasminógeno tisular, plasmina y tripsina. Betrixaban es un inhibidor potente del complejo de protrombinasa ($K_i=801 \text{ pM}$) .

Los ensayos conocidos en el estado de la técnica, tales como aquellos descritos en Sinha , *ATVB* 2003, 23: 1098- 1104, incorporados por referencia en su totalidad en la presente, se distinguen de aquellos descritos en la presente en aquellos pasos extra, tales como tratar la sangre la sangre con veneno de serpiente o se requieren materiales o se están tomando diferentes medidas. Por ejemplo, los ensayos descritos en Sinha . requieren que el plasma sanguíneo se trate con Reptilasa® para remover fibrinógeno o que plasma rico en plaquetas se utilice o que trombina se mida indirectamente con marcadores tales como complejos III de trombina antitrombina.

Un aspecto del invento proporciona ensayos *in vitro* que son predictivos de si un compuesto tiene actividad antitrombótica en vivo. La actividad antitrombótica se puede determinar utilizando sangre entera midiendo la actividad de trombina. La cantidad de trombina se correlacionó con actividad de anticoagulación en las FIG. 1A, IB, y 1C. Este ensayo se correlacionó además con actividad de anticoagulación *en vivo* y se discute más completamente en la FIG. 2 y los Ejemplos.

Los ensayos involucran determinar la actividad de trombina en la presencia y ausencia de un compuesto de prueba. En una realización, una solución de ensayo se prepara. La solución de ensayo se comprende de sangre entera no anticoagulada, factor tisular (TF) , y un sustrato de

136

trombina detectablemente rotulado, tal como Z- Gly- Gly- Arg AMC. Un compuesto de prueba de interés se agrega a la solución de ensayo y la escisión del sustrato de trombina detectablemente rotulado se mide como una función de tiempo. El orden de introducción de los componentes en la solución de ensayo puede variar.

5 Un ensayo de control se realiza también con la solución de ensayo en la ausencia de un compuesto de prueba. Una reducción en actividad de trombina, como se indica mediante una disminución en escisión de sustrato de trombina, en el ensayo con los compuestos de prueba relativa al ensayo de control indica que el compuesto de prueba tiene actividad antitrombótica *en vivo*.

10 En una realización alternativa, el ensayo no incluye TF agregado de manera exógena. En cambio la solución de ensayo se agita para activar el TF presente de manera exógena en las células en sangre entera.

En otras realizaciones del ensayo, la solución de ensayo se comprende de sangre entera anticoagulada o anticoagulado plasma en cambio de sangre entera no anticoagulada.

15 Por consiguiente, un aspecto del invento proporciona para un ensayo *in vitro* para determinar si un compuesto tiene actividad antitrombótica *in vivo* que comprende:

a) introducir un compuesto de prueba en una muestra *in vitro* de sangre entera no anticoagulada que comprende factor tisular (TF) y un sustrato de trombina detectablemente rotulado para formar una muestra de prueba;

20 b) determinar el nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba al monitorear la escisión del sustrato de trombina detectablemente rotulado en la muestra de prueba como una función de tiempo;

c) determinar el nivel de actividad de trombina en una muestra de control al monitorear la escisión del sustrato de trombina detectablemente rotulado en la muestra de control como una función de tiempo, en donde la muestra de control comprende sangre entera no anticoagulada que comprende factor tisular (TF) y un sustrato de trombina detectablemente rotulado;

25 d) comparar el nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba y la muestra de control, en donde un nivel inferior de actividad de trombina en la muestra de prueba es una indicación que el compuesto de prueba tiene actividad antitrombótica *in vivo*.

30 En otras realizaciones específicas, la sangre entera anticoagulada de a) se reemplaza ya

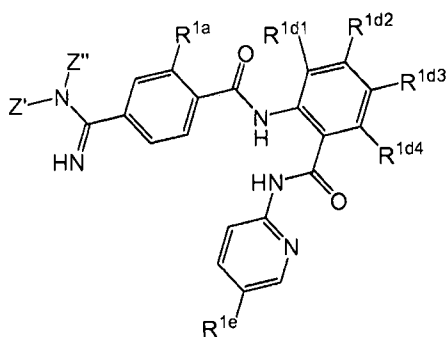
sea con sangre entera no anticoagulada, plasma anticoagulado, o plasma no anticoagulado.

BA

2. Compuestos Inhibidores del factor Xa

Varios inhibidores del factor Xa han sido reportados como polipéptidos derivados de organismos hematófagos, así como también compuestos los cuales no son inhibidores tipo polipéptidos grandes. Inhibidores adicionales del factor Xa incluyen compuestos orgánicos de moléculas pequeñas, tal como nitrógeno conteniendo compuestos heterocíclicos los cuales tienen grupos sustituyentes de amidino, en donde dos grupos funcionales de los compuestos pueden fijarse al factor Xa en dos de sus sitios activos. Por ejemplo, WO 98/28269 describe compuestos de pirazol que tienen un grupo amidino terminal ($-C(=NH)-NH_2$); WO 97/21437 describe compuestos de benzimidazol sustituidos por un radical básico los cuales son conectados a un grupo naftilo vía un alquileo de cadena lineal o ramificada, $-C(=O)-$ o grupo de puenteo- $S(=O)_2-$; WO 99/10316 describe compuestos que tienen un grupo 4- fenil- N- alquilamidino- piperidina y 4- fenoxi- N- alquilamidino- piperidina conectado a un grupo 3- amidinofenilo vía un puente de carboxamidaalquilenamino; y EP 798295 describe compuestos que tienen un grupo 4- fenoxi- N- alquilamidino- piperidina conectado a un grupo amidinonaftilo vía un grupo de puenteo sustituido o no sustituido de sulfonamida o carboxamida. Inhibidores adicionales reportados del factor Xa incluyen aquellos que tienen una estructura que comprende un fenil- amidino, fenilo, y halo- fenilo conectado vía enlaces de amida (Patente Americana No. y 6,376,515 y 6,844,367). Otros inhibidores del factor Xa han reemplazo el halo- fenilo con un halo- piridilo (ver Patente Americana No. 6,376,515 B2 y 6,835,739). En realizaciones específicas de este invento, los inhibidores del factor Xa son compuestos de la Fórmula I descritos anteriormente. Los compuestos de la Fórmula I son divulgados en la Patente Americana No. 6,844,367 y 6,376,515, incorporados en la presente como referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones del invento, el inhibidor del factor Xa es un compuesto de la Fórmula IV:



IV

en donde:

Z' y Z'' son cada uno independientemente un C1- C6 alquilo el cual es opcionalmente sustituido por un grupo hidroxilo, ácido carboxílico o éster de ácido carboxílico;

R^{1a} se selecciona a partir del grupo que consta de: H, - F, - Cl, y Br;

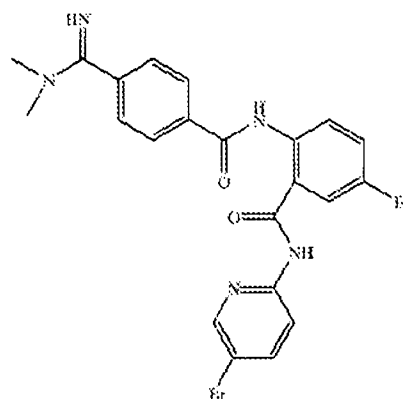
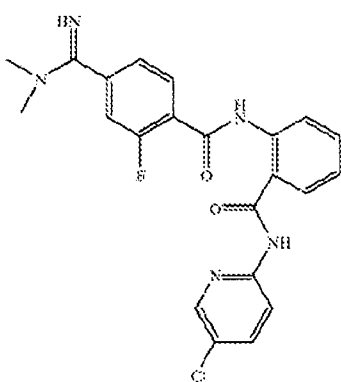
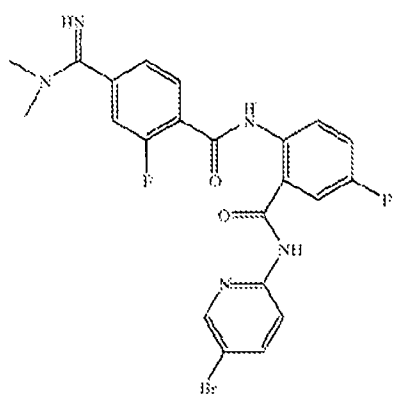
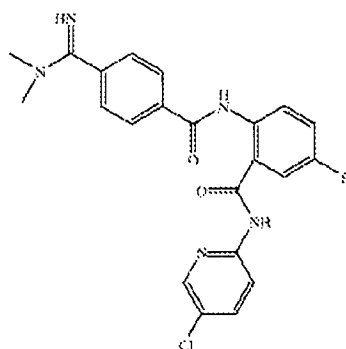
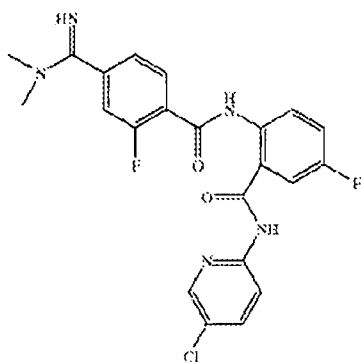
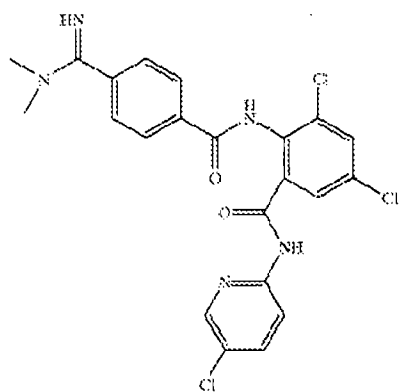
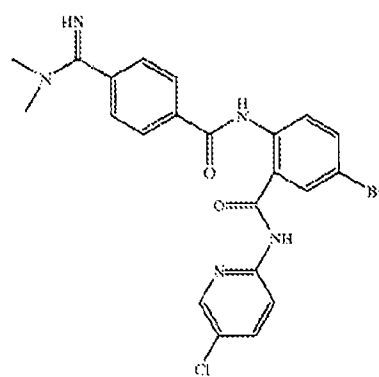
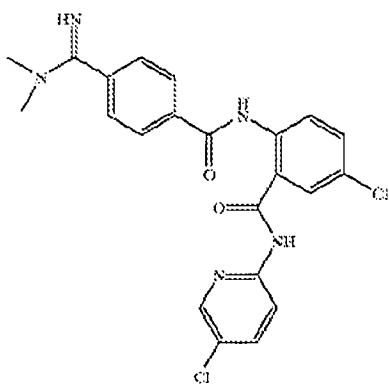
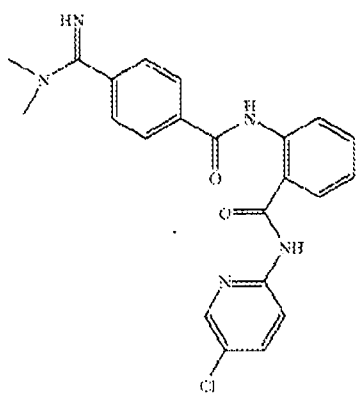
R^{1d2} y R^{1d4} son cada uno H;

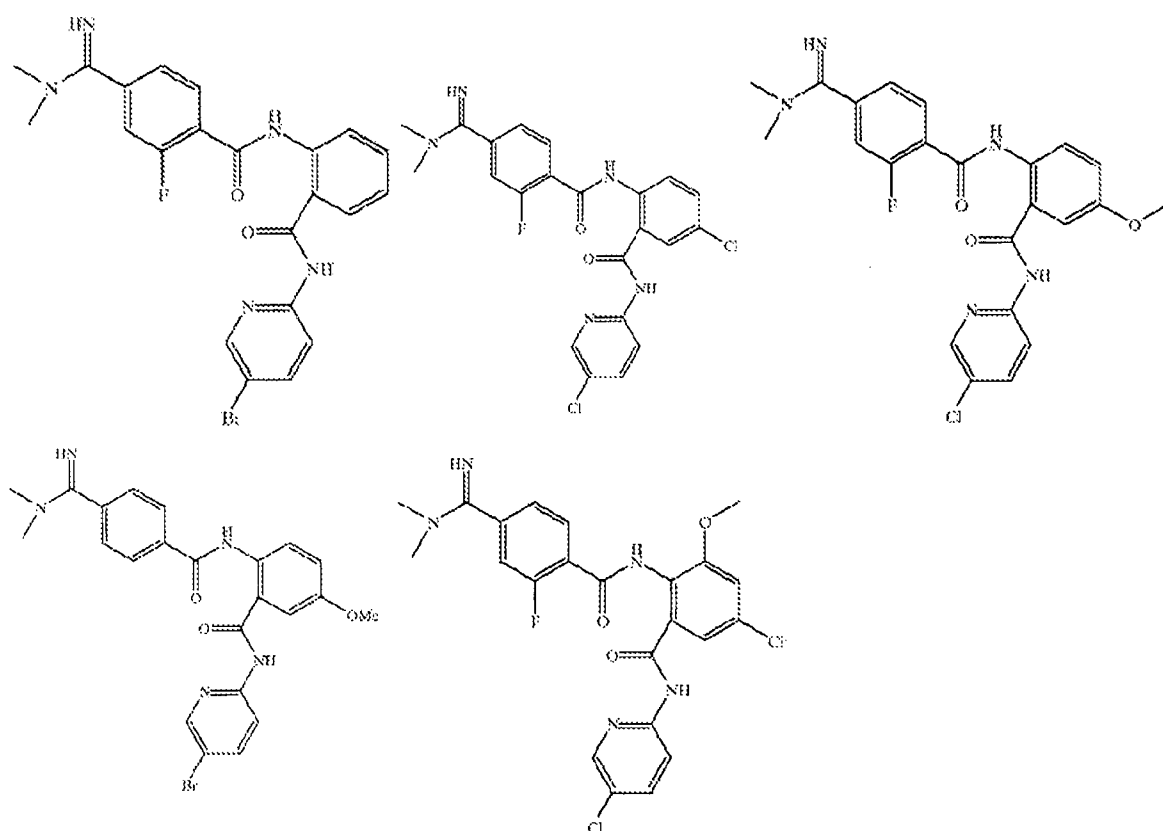
R^{1d1} y R^{1d3} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H, - Cl, - F, - Br, - OH y - OCH₃; y

R^{1e} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: - F, - Cl, - Br, - OH, - CH₃, y - OCH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Compuestos de ejemplo de la Fórmula IV son seleccionados a partir de los siguientes:

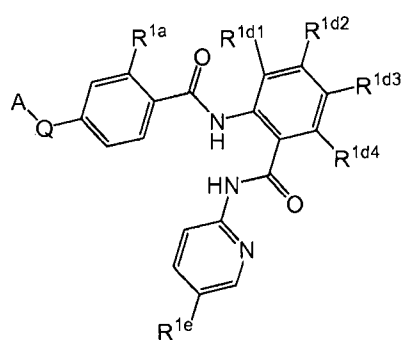
189





En otra realización del invento, el inhibidor del factor Xa es un compuesto de la Fórmula

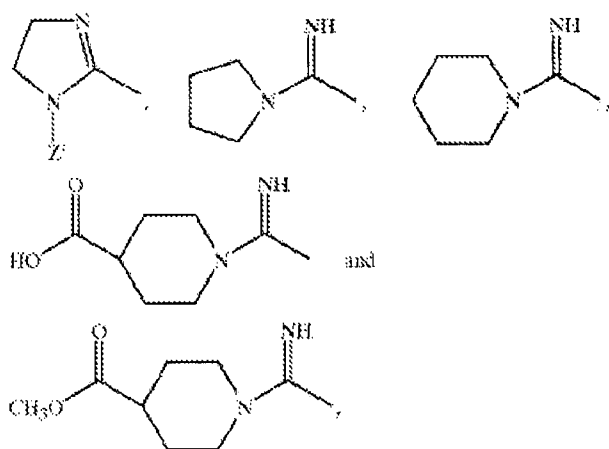
V:



V

5 en donde:

A- Q es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:



donde Z' es un C1- 6 alquilo el cual es opcionalmente sustituido por un grupo hidroxilo, ácido carboxílico, éster del ácido carboxílico;

R^{1a} se selecciona a partir del grupo que consta de: H, - F, - Cl, y Br;

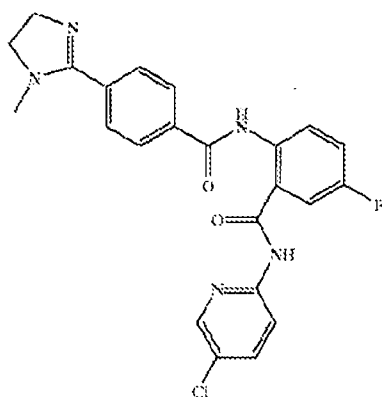
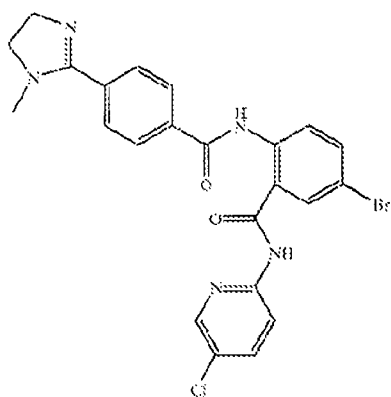
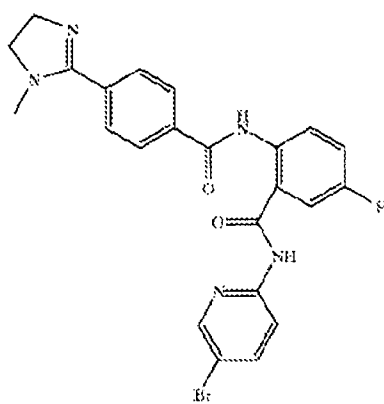
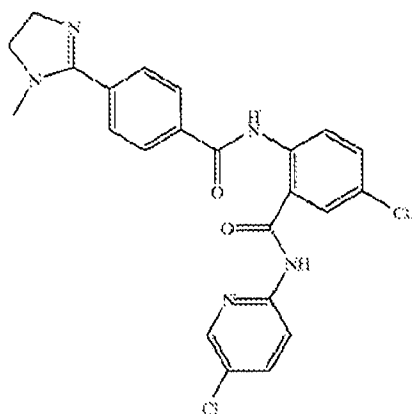
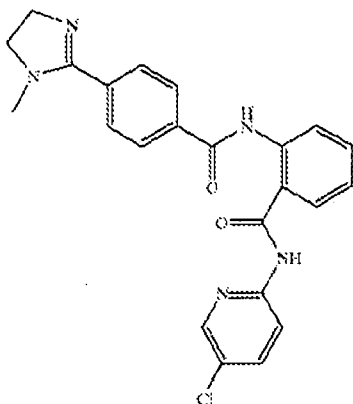
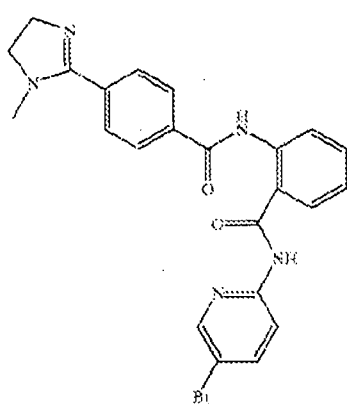
R^{1d2} y R^{1d4} son cada uno H;

R^{1d1} y R^{1d3} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H, - Cl, - F, - Br, - OH y - OCH_3 ;

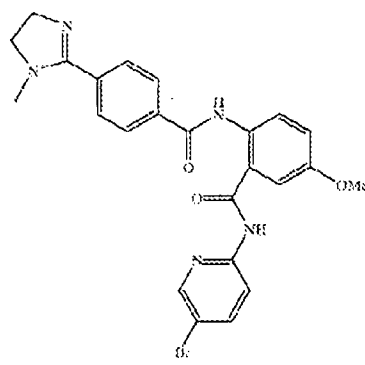
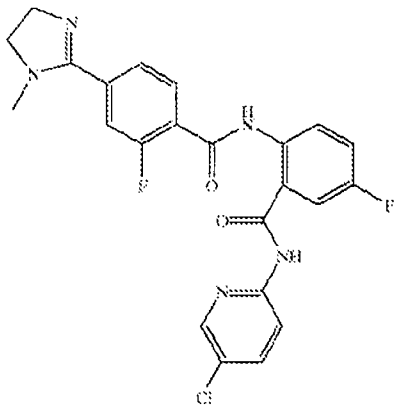
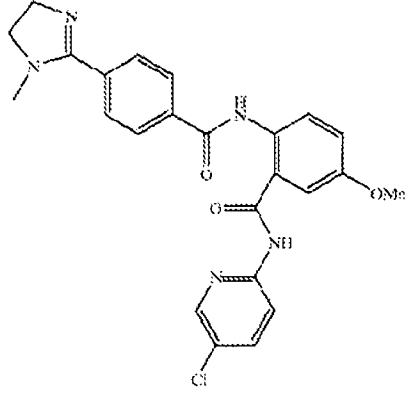
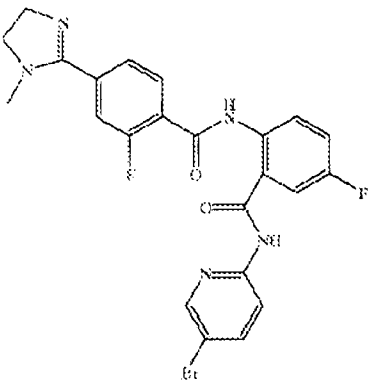
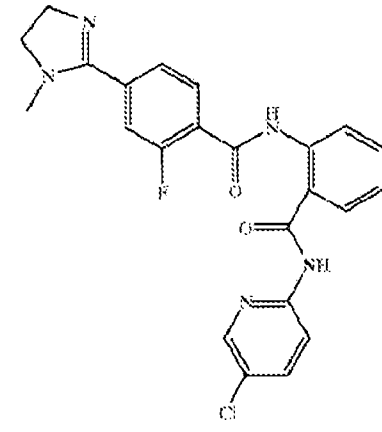
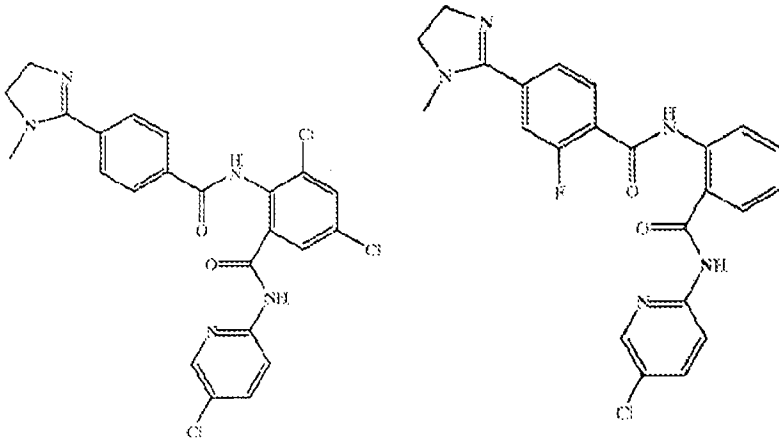
R^{1e} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: - F, - Cl, - Br, - OH, - CH_3 , y - OCH_3 , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Compuestos de ejemplo de la Fórmula V incluyen, pero no están limitados a:

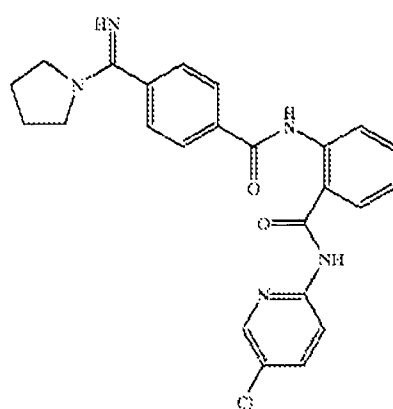
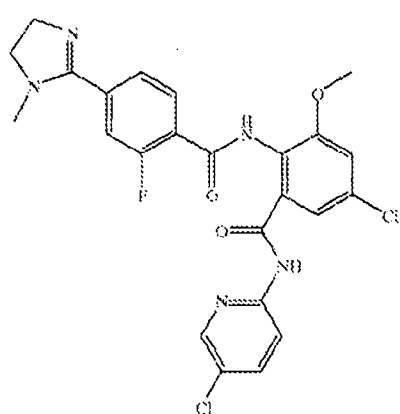
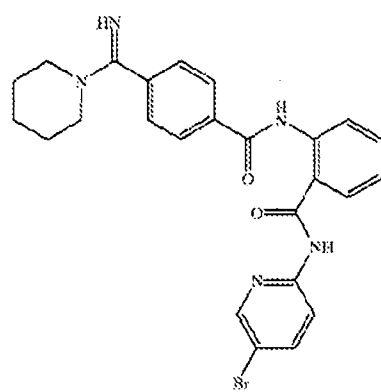
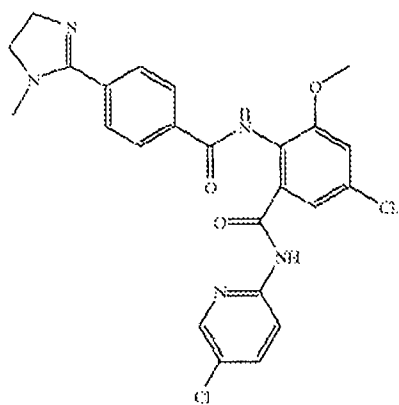
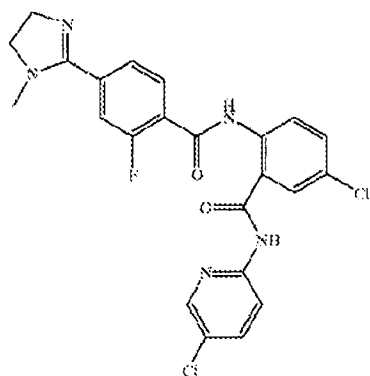
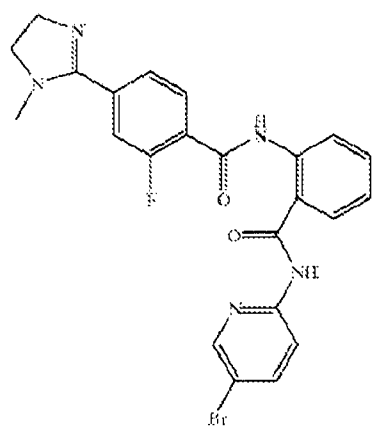
147



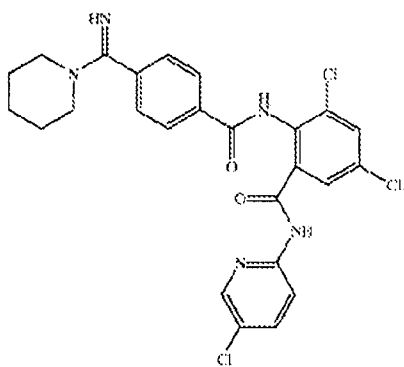
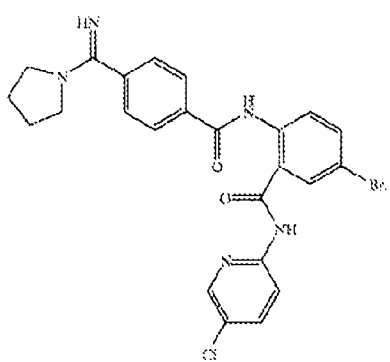
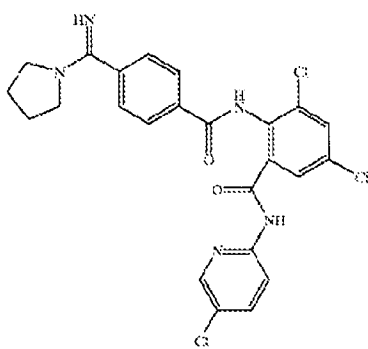
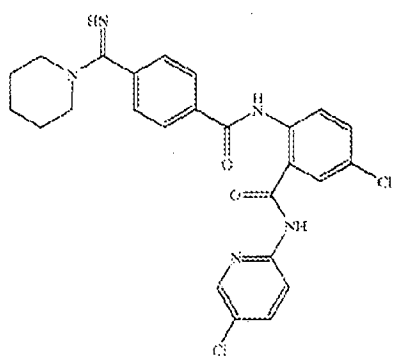
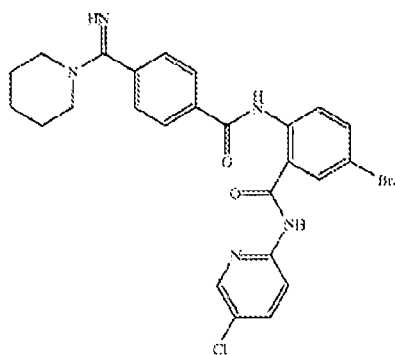
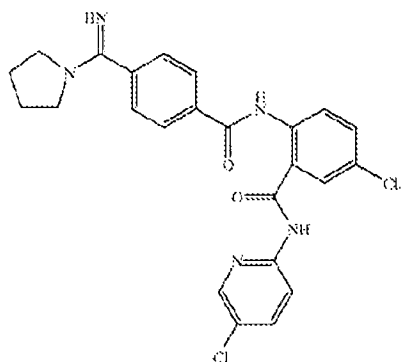
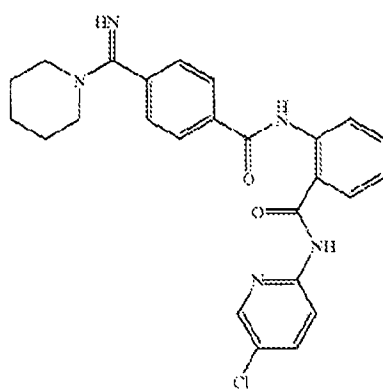
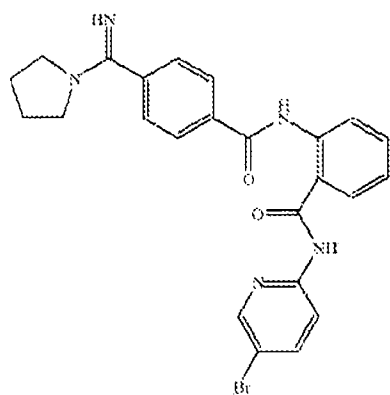
193



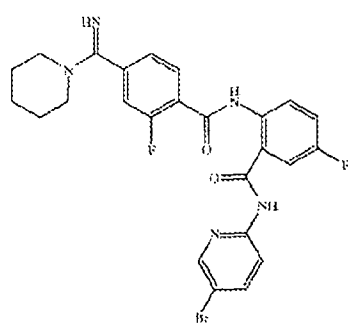
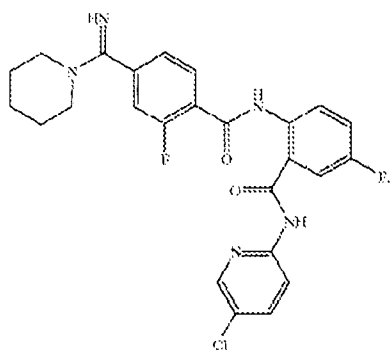
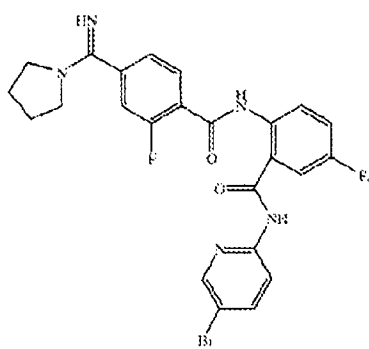
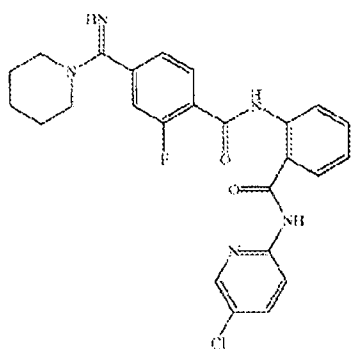
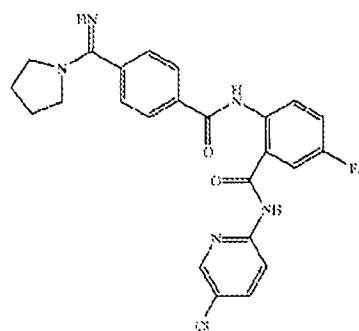
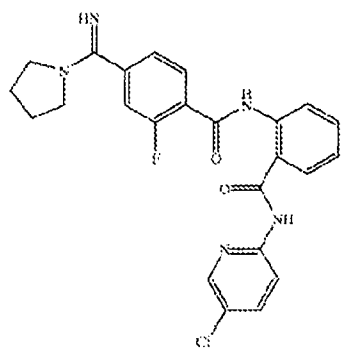
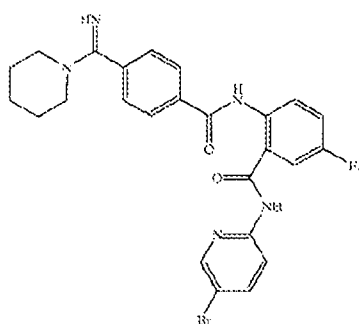
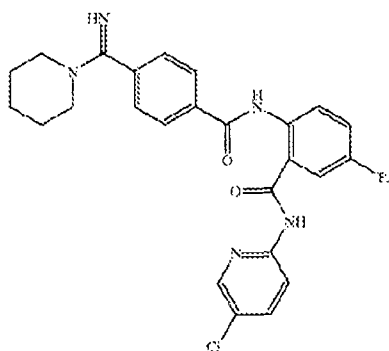
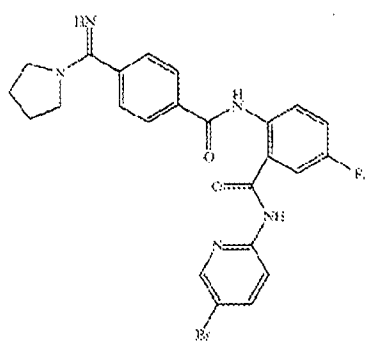
12/2/18



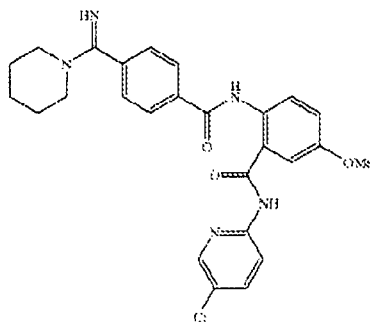
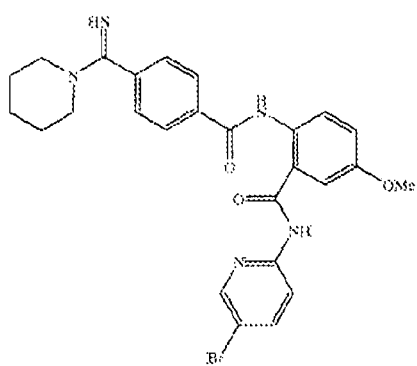
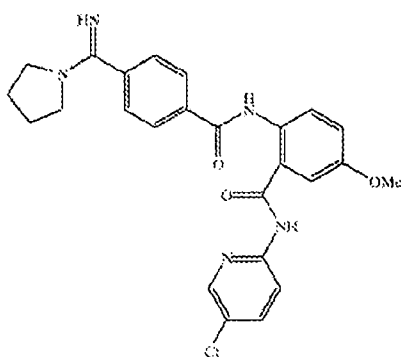
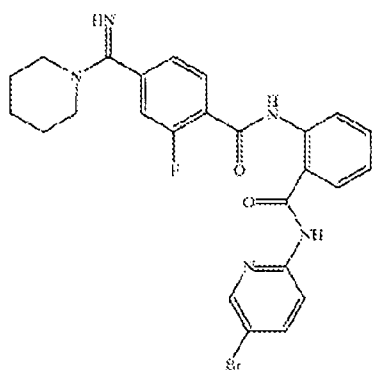
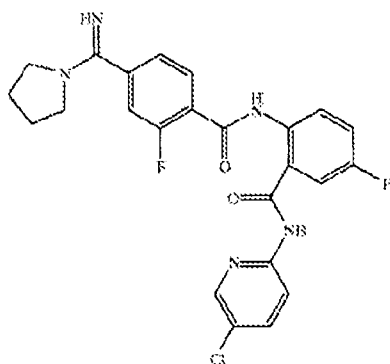
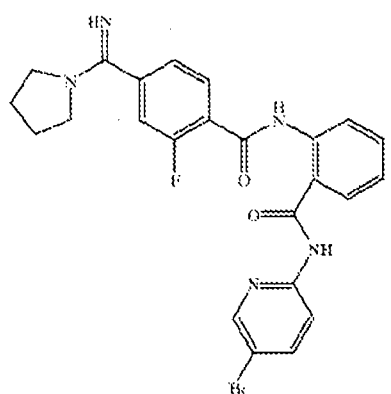
MS



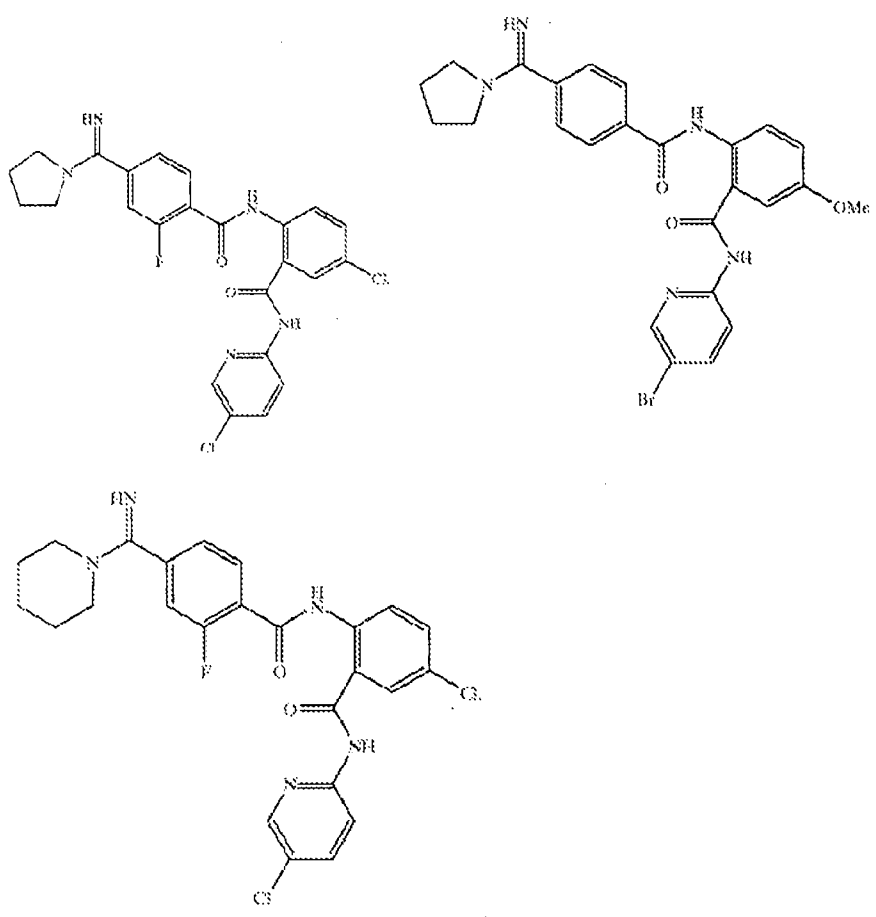
786



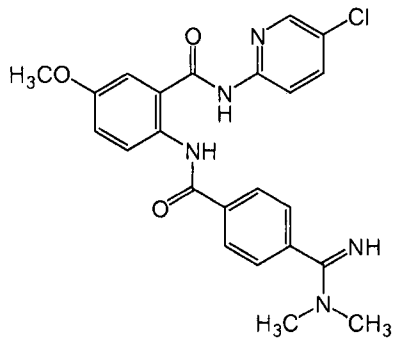
142



148



En realizaciones adicionales del invento, los inhibidores del factor Xa son compuestos de la Fórmula II:



II

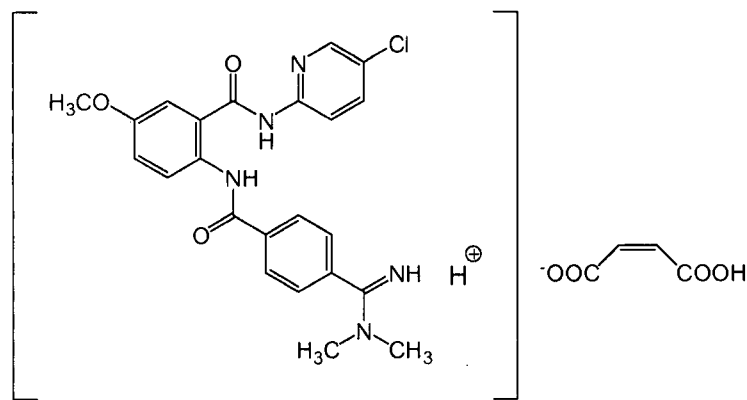
5 así como también todos los isómeros, sales, hidratos, solvatos y derivados de profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos de la Fórmula II son divulgados como el Ejemplo 206 en las Patentes Americanas No. 6,376,515 y 6,835,739, ambas incorporadas en la presente como referencia en su totalidad. El compuesto de la Fórmula II tiene el nombre

149

genérico de betrixaban y algunas veces se conoce así.

En una realización específica, la sal de un compuesto de la Fórmula II es una sal de maleato. La sal de maleato se puede formar al protonar uno o más átomos de nitrógeno del compuesto de la Fórmula II. En una realización, el nitrógeno de amidino (=NH) de la Fórmula II es protonado (=NH²⁺) para formar la sal.

En una realización, la sal de maleato del compuesto de la Fórmula II es representada por la Fórmula III:



III

Este también es citado en la presente como maleato de betrixaban.

En otra realización, el presente invento proporciona una sal de la Fórmula III que tiene una forma polimorfa cristalina. En realizaciones preferidas, la forma polimorfa cristalina exhibe un patrón de difracción de polvo de rayos- X que tiene al menos cuatro y más preferiblemente ocho de las siguientes locaciones pico características aproximadas: 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 grados 2θ. En aún otra realización, el patrón de difracción de polvo de rayos- X tiene locaciones pico características aproximadas de 4.9, 9.7, 11.8, 13.8, 14.1, 15.2, 17.6, 18.5, 19.9, 20.8, 21.6, 22.7, 24.1, 25.0, 26.3, 26.8 grados 2θ. El invento contempla que los picos característicos aproximados tendrán una desviación de hasta ± 0.2 grados 2θ. Ver PCT/US2006/43635, registrada en Noviembre 7, 2006, incorporada como referencia en su totalidad en la presente, para divulgación adicional de sales y polimorfos de sales del compuesto de la Fórmula II.

4. Formulaciones

Una realización de este invento es directa a una formulación de dosis unitaria. La formulación de dosis unitaria comprende una composición farmacéutica que comprende un

150

inhibidor del factor Xa como se describe anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El inhibidor del factor Xa está presente en una cantidad inhibitoria de la coagulación efectiva la cual está típicamente entre 0.1 mg/kg aproximadamente y 2.0 mg/kg aproximadamente. En ciertas realizaciones, la dosis se formula para administrar una o dos veces
5 diariamente, tal que la cantidad total por día es la cantidad efectiva de coagulación. En algunas realizaciones, la formulación de dosis unitaria es para administración oral.

En el manejo de trastornos trombóticos los compuestos y/o sales de este invento se pueden utilizar en composiciones tales como tabletas, capsulas, pastillas o elixires para administración oral, supositorios, soluciones estériles o suspensiones o administración inyectable,
10 y similares, o incorporados en artículos formados. El método de administración variará entre sujeto y sujeto y depende de factores tales como el tipo de mamífero tratado, su sexo, peso, dieta, medicación concurrente, condición clínica general, el compuesto particular y/o sales empleadas, el uso específico por el cual estos compuestos y/o sales se emplean, y otros factores que aquellos con experiencia en el estado de la técnica médica reconocerán.

15 Las capsulas útiles en el presente invento se pueden preparar utilizando técnicas de encapsulación convencionales y conocidas, tales como aquellas descritas en Stroud, Patente Americana No. 5,735,105. La capsula es típicamente una envoltura hueca de forma generalmente cilíndrica teniendo un diámetro y longitud suficiente tal que las composiciones de solución farmacéutica conteniendo la dosis apropiada del agente activo encajan dentro de la capsula. El
20 exterior de las capsulas puede incluir plastificantes, agua, gelatina, almidones modificados, gomas, carrageninas, y mezclas de los mismos. Aquellos con experiencia en el estado de la técnica apreciaran cuales composiciones son apropiadas.

Además del agente activo, las tabletas útiles en el presente invento pueden comprender
rellenos, aglomerantes, agentes de compresión, lubricantes, desintegrantes, colorantes, agua, talco
25 y otros elementos reconocidos por uno de experiencia en el estado de la técnica. Las tabletas pueden ser homogéneas con una capa única en el núcleo, o tiene múltiples capas con el fin de realizar perfiles de liberación preferidos. En algunas instancias, las tabletas del presente invento se pueden recubrir, mediante por ejemplo un recubrimiento entérico. Alguien con experiencia en el estado de la técnica apreciara que otros excipientes son útiles en las tabletas del presente
30 invento.

Las pastillas útiles en el presente invento incluyen una cantidad apropiada del agente

activo así como también cualquier carga, aglomerante, desintegrante, solvente, agente solubilizante, endulzante, agente colorante y cualquier otro ingrediente que alguien con experiencia en el estado de la técnica apreciará es necesario. Las pastillas del presente invento están diseñadas para disolver y liberar el agente activo en contacto con la boca del paciente.

5 Alguien con experiencia en el estado de la técnica apreciara que otros métodos de administración son útiles en el presente invento.

Las formulaciones de los compuestos y/o sales de este invento se preparan para almacenamiento o administración al mezclar la sal que tiene un grado deseado de pureza con carreras fisiológicamente aceptables, excipientes, estabilizadores etc., y se puede proporcionar en
10 formulaciones de liberación sostenida o liberación sincronizada. Los vehículos aceptables o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en el campo farmacéutico, y se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (A.R. Gennaro Ed. 1985) . Tales materiales no son tóxicos a los recipientes a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen buffers tales como fosfato, citrato, acetato y otros compuestos de ácidos
15 orgánicos y/o sales, antioxidantes tales como ácido ascórbico, péptidos de peso molecular bajo (menos que diez residuos aproximadamente) tales como poliarginina, proteínas, tales como albumina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas, polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidinona, aminoácidos tales como glicina, ácido glutamínico, ácido aspártico, o arginina, monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados,
20 glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, alcoholes sacarosos tales como manitol o sorbitol, iones contrarios tales como sodio, y/o surfactantes no iónicos tales como Tween, Pluronic o glicol de polietileno.

Las formulaciones de dosificación de los compuestos y/o sales de este invento para ser
utilizadas para administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad es fácilmente lograda
25 mediante filtración a través de membranas estériles tales como membranas de 0.2 micrones, o mediante otros métodos convencionales. Las formulaciones típicamente se almacenaran en formas liofilizadas o como una solución acuosa. El pH de las preparaciones de este invento típicamente será entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9 y más preferiblemente entre 7 y 8. Se entenderá que el uso de ciertos de los anteriores excipientes, vehículos, o estabilizadores
30 resultarán en la formación de compuestos polipeptídicos cíclicos y/o sales. Mientras la ruta preferida de administración es por inyección, otros métodos de administración también se

152

anticiparon tales como administración intravenosa (bolo y/o infusión) , subcutánea, intramuscular, colónica, rectal, nasal o intraperitoneal, empleando una variedad de formas de dosificación tales como supositorios, pellets implantados o cilindros pequeños, aerosoles, formulaciones de dosificación oral (tales como tabletas, capsulas y pastillas) y formulaciones tópicas tales como ungüentos, gotas y parches dérmicos. Las membranas estériles de este invento se incorporan deseablemente en artículos formados tales como implantes que pueden emplear materiales inertes tales como polímeros biodegradables o siliconas sintéticas, por ejemplo, Silastica, caucho de silicona u otros polímeros comercialmente disponibles.

Los compuestos y/o sales del invento también se pueden administrar en la forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de una variedad de lípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos y/o sales de este invento también se pueden administrar mediante el uso de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, factores de crecimiento, hormonas, u otras fracciones dianizantes, a las cuales las moléculas de sal se acoplan. Los compuestos y/o sales de este invento también se pueden acoplar con polímeros adecuados como vehículos farmacéuticos dianizables. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidinona, copolímero de pirano, polihidroxi- propil- metacrilamida- fenol, polihidroxietil- aspartamida- fenol, o polietilenóxido- polilisina sustituida con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos y/o sales del invento se pueden acoplar a una clase de polímeros biodegradables útiles en lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, caprolactona de poliepsilon, ácido butírico de polihidróxido, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranas, policianoacrilatos y copolímeros de bloque entrecruzados y anfipático de hidrogeles. Los polímeros y matrices poliméricas semipermeables se pueden elaborar en artículos formados, tales como válvulas, stents, tubería, prótesis y similares.

5. Preparación de Compuestos

a. Sales del compuesto de la Fórmula II

El compuesto de la Fórmula II se puede convertir en sales de varios ácidos inorgánicos y orgánicos incluyendo, pero sin limitar a sal de HCl, lactato, maleato, fenoxiacetato, propionato, succinato, adipato, ascorbato, camforato, gluconato, fosfato, tartrato, citrato, mesilato, fumarato,

glicolato, naftalen- 1,5- disulfonato, gentisato y sulfonato de benceno. Alguien con experiencia en el estado de la técnica reconocerá que otros ácidos se pueden utilizar para preparar sales que comprenden el compuesto de la Fórmula I que son útiles en el presente invento. También se contempla que las sales del invento se pueden convertir fácilmente en otras sales del invento.

5 Un número de métodos son útiles para la preparación de las sales descritas anteriormente y son conocidas a aquellos con experiencia en el estado de la técnica. Por ejemplo, la reacción del compuesto de la Fórmula II con uno o más molares equivalentes del ácido deseado en un solvente o mezcla de solvente en la cual la sal es insoluble, o en un solvente como agua después de la cual el solvente se removió mediante evaporación, destilación o secado frío. Alternativamente, el compuesto de la Fórmula II se puede pasar sobre una resina de intercambio iónico para formar la sal deseada o una forma salina del producto se puede convertir en otra utilizando el mismo procedimiento general.

10 El compuesto de la Fórmula II se preparó según el procedimiento descrito a continuación. La sal de maleato del compuesto de la Fórmula II se eligió por su excelente cristalinidad, estabilidad térmica e hidrolítica, y alta pureza.

b. Betrixaban

El compuesto de la Fórmula II o betrixaban se pueden preparar según cualquiera de las muchas metodologías diferentes, ya sea sobre una escala de gramos (< 1 kg) o una escala de kilogramos (> 1 kg) . Un método de escala de gramos se describe a continuación en el Ejemplo 2. Otro método de escala de gramos se describe en la Patente Americana No. 6,844,367B1, ver el Ejemplo 266, la cual está incorporada en la presente mediante referencia en su totalidad.

Alternativamente, el compuesto de la Fórmula II se puede preparar en una escala de kilogramos utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. La formación de la amidina de dimetilo de la Fórmula II involucra el ataque nucleofílico en un grupo ciano mediante una amina desprotonada, con la amina desprotonada formada a partir de una amina secundaria y un litio de alquilo. Como se utiliza en la presente, el término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbilo de entre 1 y 8 átomos de carbono. Alguien con experiencia en el estado de la técnica reconocerá que la amina desprotonada se puede formar mediante otros métodos, y la formación de la funcionalidad de amidina de la Fórmula II se puede preparar mediante una variedad de otros métodos.

Un solvente útil para el método del presente invento como se describe anteriormente es un

154

solvente aprótico tales como tetrahidrofurano (THF) , éter de dietilo, dimetoximetano, dioxano, hexano, éter tert- butílico de metilo, heptano, y ciclohexano. Además, la formación de la amina desprotonada se puede realizar a temperaturas bajo 10 °C. La adición nucleofílica de la amina para formar el compuesto de la Fórmula I se puede realizar a temperaturas bajo 10 °C. Alguien con experiencia en el estado de la técnica reconocerá que los métodos del presente invento se pueden practicar utilizando varios otros solventes, reactivos, y temperaturas de reacción.

Además mientras el método del presente invento para preparar el compuesto de la Fórmula II en una escala de gramos es similar al procedimiento utilizado sobre la escala de kilogramos, hay un aumento en la escala de la reacción de más que 3400%. Además, en muchos pasos se obtuvieron rendimientos aumentados utilizando cantidades reducidas de los reactivos de exceso. Alguien con experiencia en el estado de la técnica reconocerán que el compuesto de la Fórmula I se puede preparar mediante otras metodologías químicas tanto en una escala de gramos y kilogramos.

EJEMPLOS

A menos que se indique lo contrario, las abreviaciones utilizadas en la especificación tienen los siguientes significados:

A = Angstrom

A% = área de porcentaje total

aq. = acuoso

cm = centímetro

d = doble

DSC = calorimetría de barrido diferencial

EDTA = ácido etilendiaminatetraacético

eq. =equivalente

EtOH = etanol

g = gramo

HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento

hr = hora

Hz = Hertz

IR = infrarrojo

J = constante de acoplamiento

153

kg = kilogramo

kV = kilovoltios

L = litro

LOD = límite de detección

5

M = molar

m = múltiple

mA = miliamperio

Me = metilo

MeO = metoxilo

10

MeOH = metanol

mg = miligramo

min. = minuto

mL = mililitro

mm = milímetro

15

MTBE = éter tert- butílico de metilo

N = normal

nM = nanomolar

NMR = resonancia magnética nuclear

s = sencillo

20

TDS = sólidos totales disueltos

TGA = análisis gravimétrico térmico

THF = tetrahidrofurano

μ M = micromolar

BID = dos veces cada día

25

Ejemplo 1

Preparación de una sal polimórfica cristalina de la Fórmula III

a. Preparación de escala de gramos

30

En una matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 1500 mL equipada con un condensador, se cargó compuesto de base libre de la Fórmula I (25 g; 1 eq.) y se agregó 9:1 EtOH/Agua (500

136

mL) mientras se agitaba. La pasta aguada resultante se calentó a 70 °C. Se agregó ácido máleico (12.77 g; 2 eq.) por goteo como una solución (100 mL de 9:1 EtOH/Agua) y después de agregarse 50 mL, la solución se volvió notablemente clara. En la adición completa de la solución de ácido máleico la temperatura se mantuvo a 80 °C durante 5 minutos. El recipiente se dejó enfriar lentamente a 45 °C y luego se agregó 400 mL de MTBE. La solución se agitó durante 12 hr más. El precipitado resultante se filtró y secó al vacío. La sal de maleato del compuesto de la Fórmula I se recuperó en un rendimiento al 45% (14.2 g) .

b. Preparación de escala de kilogramos

El compuesto de la Fórmula I (24.6 kg) se cargó en un reactor 760 L GLMS (Reactor A) . Se agregó ácido máleico (12.7 kg, 2.0 eq) , etanol (445 kg, 18.1 partes) , y agua de alta pureza (140 kg, 5.7 partes) . La mezcla de reacción se ajustó a 22 °C (19- 25 °C) y se agitó a esa temperatura por alrededor de 1 hr, luego se transfirió a través de un filtro pulidor en un reactor 780 L Hastelloy acondicionado (Reactor B) . La bomba y líneas del Reactor A se jugaron hacia delante en el Reactor B con etanol adicional (45 kg aproximadamente) a través del filtro pulidor. El filtro se concentró al vacío con una temperatura máxima de baño de glicol caliente (para calentar la camisa del reactor) de 45 °C, hasta que quedó 140 L aproximadamente (5.7 partes volumen) . El contenido del Reactor B se tomó como muestra para NMR en proceso, la cual mostró que la proporción molar de etanol: la sal de maleato del compuesto de la Fórmula I fue 26. Se cargó agua de alta pureza (49 kg, 2.0 partes) al Reactor B y se resumió la concentración al vacío hasta que se logró un volumen de recipiente de 140 L aproximadamente (5.7 partes volumen) . El NMR en proceso indicó que la proporción molar de etanol: la sal de maleato del compuesto de la Fórmula I fue 14. Se cargó nuevamente agua de alta pureza (49 kg, 2.0 partes) y se resumió la concentración al vacío para obtener un volumen de recipiente de 140 L aproximadamente. EL NMR en proceso mostró que la proporción molar de etanol: la sal de maleato del compuesto de la Fórmula I fue 5. La temperatura de los contenidos del Reactor B se ajustaron a 22 °C (19- 25 °C) y la formación de una pasta acuosa se confirmó visualmente. La mezcla de reacción se agitó a 22 °C (19- 25 °C) durante 2 hrs aproximadamente, y luego se filtró en un centrifuga 30" equipado con una tela de filtro. La bomba y líneas del Reactor B se jugaron hacia delante al centrifugo 30" a través de un filtro pulidor con dos porciones de agua de alta pureza (30 kg cada uno aproximadamente) . La torta de filtro se tomó como muestra para HPLC

Solicitud de
Patente de
Invencción

09-707411

2/2

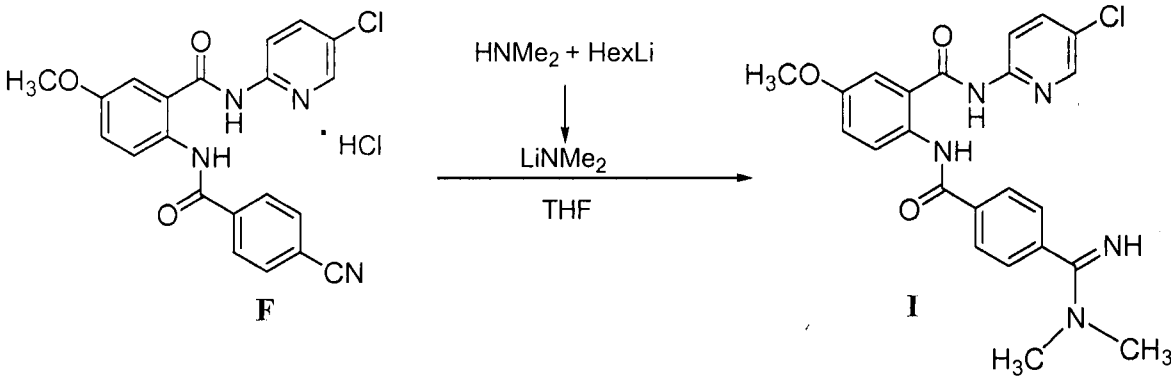
157

en proceso, la cual mostró que la pureza del producto fue 99.1 A%, la impureza más grande fue 0.26 A%, y por lo tanto la recrystalización no fue necesaria. La torta de filtro (33.1 kg) se secó al vacío con una temperatura máxima de baño de glicol caliente (para calentar la camisa del secador) de 40 °C. Después de 30.5 hrs aproximadamente, el análisis LOD en proceso indicó un contenido de solvente de 0%. El producto seco se descargó (26.4 kg) y almacenó a 2- 8 °C. El rendimiento para el producto final fue levemente más alto que lo esperado a 85% (se esperaba 50- 80%) . La pureza de la sal de maleato se midió mediante la presencia del contenido de amidina hidrolizado como se midió mediante HPLC, y la pureza encontrada fue >99%.

¹H NMR (DMSO- de) : 8 3.0 (s, 3H) , 3.2 (s, 3H) , 3.82 (s, 3H) , 7.2 (d, 1H, J = 9.0 Hz) , 7.42 (s, 1H) , 7.68 (d, 1H, J = 8.0 Hz) , 7.95 - 8.15 (m, 2H) , 8.12 (m) , 8.18 (m, 1H) , 8.42 (s, 1H) , 9.0 (s, 1H) , 11.0 (s, 1H) , 11.2 (s, 1H) ; IR (KBr, cm⁻¹) : 3300, 1685, 1600, 1515, 1380, 1270, 1200, 1100, 1050, 880, 800, 710.

Ejemplo 2

Preparación del compuesto de la Fórmula II



a. Preparación de escala de gramos

Una pasta aguada del compuesto de la Fórmula F (455 g, 1.0 eq.) en THF (4.67 kg, 10.3 partes) se preparó y ajustó a <10 °C. La amida de dimetilo de litio se preparó como sigue: se agregó hexilitio (2.3 N/hexano, 2.45 L, 5.5 eq.) a solución de dimetilamina (2 N/THF, 2.8 L, 5.5 eq.) manteniendo <10 °C. La solución de amida de dimetil de litio se cargó en la pasta aguada conteniendo el compuesto de la Fórmula F manteniendo la temperatura de la vasija de <10 °C. El progreso de reacción se monitoreó mediante HPLC en proceso la cual confirmó que la cantidad de la Fórmula F fue <1.0 A%. Una solución de buffer de NaHCO₃ (490 g, 1.1 partes, 5.7 eq.) y

159

se preparó Na_2CO_3 (490 g, 1.1 partes, 4.5 eq.) en agua deionizada (6.6 kg, 14.51 partes), y la mezcla de reacción anterior se transfirió a esta solución acuosa manteniendo $< 5^\circ\text{C}$. El producto se precipitó hacia afuera y la pasta aguada resultante se ajustó a 20°C durante un periodo de 12 hr. El sólido se filtró, y la torta mojada resultante se lavó con 3.5 kg (7.7 partes) de agua deionizada. El sólido se filtró utilizando un filtro de frita de vidrio grueso, y se jugó hacia delante con etanol absoluto frío ($0-5^\circ\text{C}$) (628 g, 1-4 partes). El producto se secó a $30-35^\circ\text{C}$. El producto seco se obtuvo en 458 g (73% rendimiento).

b. Preparación de escala de kilogramos

Una pasta aguada del compuesto de la Fórmula F (31.5 kg, 1.0 eq.) en THF (251 kg, 8.0 partes) se preparó en un reactor 780 L Hastelloy (Reactor A) y se ajustó a 0°C (-3 a 3°C). Se cargaron 2 M dimetilamina en THF (161.0 kg, 5.0 eq.) y THF (63 kg, 2 partes) en un reactor 1900 L GLMS (Reactor B) y se ajustó a 0°C (-3 a 3°C) con agitación máxima. Se cargó hexilitio (2.3 M, 97.2 kg, 4.5 eq.) lentamente al Reactor B mientras mantenía una temperatura máxima de 10°C . La bomba y líneas se jugaron hacia delante al Reactor B con THF (3.2 kg). El contenido del Reactor B se ajustó a 0°C (-3 a 3°C), luego se transfirió al Reactor A mientras mantenía la temperatura del Reactor A $< 10^\circ\text{C}$. La bomba y líneas del Reactor B se jugaron hacia delante con THF (31-4 kg, 1.0 parte). Los contenidos del Reactor A se ajustaron a 0°C (-3 a 3°C), y se agitaron a esta temperatura hasta que la reacción se completó como se verificó mediante HPLC (1-2 hrs). Después de aproximadamente 1 hr de agitación, El análisis de HPLC en proceso indicó que 0 A% del material de inicio permaneció (criterios en proceso: 1 A% máximo). Los contenidos del Reactor A se ajustaron a -5°C (-8 a -3°C). Se realizó limpieza en proceso del Reactor B con agua. Se cargaron dos soluciones acuosas previamente preparadas (NaHCO_3 (35.0 kg, 1.1 partes) en agua (236 kg, 7.5 partes), y Na_2CO_3 (35.0 kg 1.1 partes) en agua (236 kg, 7.5 partes) al Reactor B y se ajustó a -3°C (0 a 6°C). Los contenidos del Reactor A se transfirieron al Reactor B a través de una línea aislada, manteniendo la temperatura del Reactor B a -8°C a un máximo de 5°C . Las bombas y líneas del Reactor A se jugaron hacia delante con THF frío [-5°C (-8 a -3°C)] (31-4 kg, 1.0 parte). Los contenidos del Reactor B se ajustaron a 22°C ($19-25^\circ\text{C}$) y se agitaron durante 3 hrs aproximadamente. La formación de pasta acuosa se confirmó visualmente, y los contenidos del Reactor B se filtraron en un centrifuga 30" equipado con una tela de filtro. La bomba y líneas del Reactor B se jugaron hacia

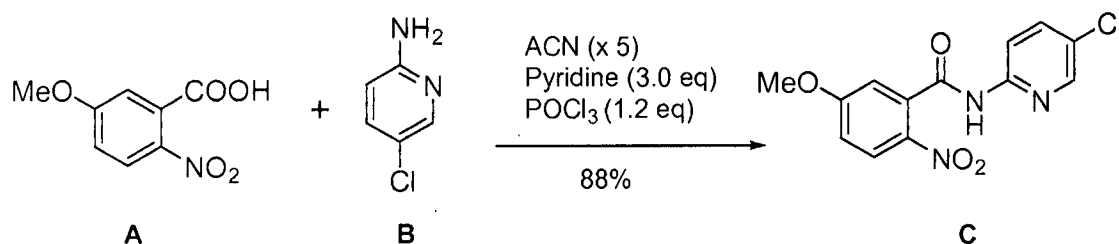
159

delante en el centrifugo 30" equipado con una tela de filtro con agua potable (63 kg, 2 partes) . La torta de filtro mojada (66.5 kg) se transfirió de vuelta al Reactor B y se sometió a una pasta acuosa lavada en agua potable (1005 kg, 32 partes) a 22 °C (19- 25) °C durante 1 hr aproximadamente. El producto se filtró en el centrifugo 30" (después de limpieza en proceso y ajuste con una tela de filtro) , y la bomba y líneas del Reactor B se jugaron hacia delante con agua potable (63 kg, 2 partes) . El enjuague de agua se tomó como muestra para el ensayo mediante TDS, el cual fue 0.46%. La bomba, líneas y torta de filtro mojada del Reactor B se jugaron adicionalmente con etanol frío [0 °C (- 3 a 3 °C)] (44 kg, 1.39 partes) . La torta de filtro mojada se secó al vacío con una temperatura máxima de baño de agua (para calentar la camisa del secador) de 35 °C. LOD en proceso fue 0% después de 24 hrs aproximadamente de secado, y el producto se descargó (24.8 kg) en rendimiento al 76.7%. La HPLC mostró 98 %> pureza, con impureza declarada a 1.14 %.

Ejemplo 3

Preparación del compuesto de la Fórmula F

Paso 1. Síntesis de 2- nitro- N- (5- cloro- piridin- 2- il) - 5- metoxi- benzamida (C)

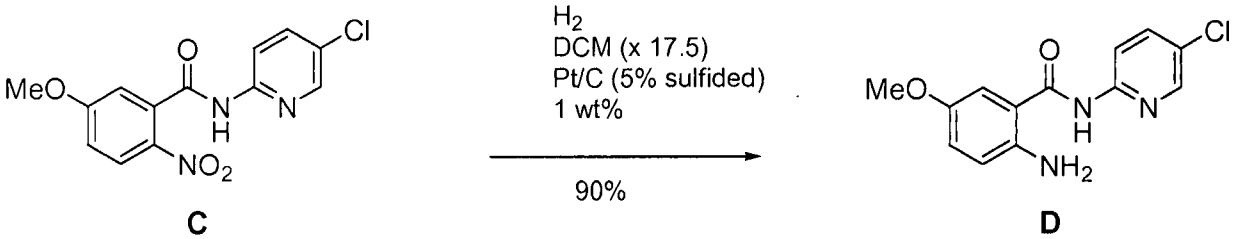


Se cargó ácido 5- metoxi- 2- nitrobenzoico (A) (25.0 kg, 1.0 eq.) , 2- amino- 5- cloropiridina (B) (16.3 kg, 1.0 eq.) , y acetonitrilo (87.5 kg, 3.5 partes) a un reactor 380 L GLMS. La mezcla de reacción se ajustó a 22 °C (19- 25 °C) y se agregó piridina anhidro (30.0 kg, 3.0 eq.) . La bomba y líneas se jugaron hacia delante con acetonitrilo (22.5 kg, 0.9 partes) , y los contenidos del reactor se ajustaron a una temperatura de 19- 22 °C. Se cargó oxiclورو de fosforo (23.3 kg, 1.20 eq.) a los contenidos del reactor mediante una bomba de medición, mientras se mantiene a temperatura de 25 °C (22- 28 °C) . La bomba y líneas de medición se jugaron hacia delante con acetonitrilo (12.5 kg, 0.5 partes) , mientras se mantiene la temperatura a 25 °C (22- 28 °C) . La mezcla de reacción se volvió normalmente una pasta acuosa a una solución clara después de la adición de aproximadamente 1/3 del POCl₃. En el final de la adición,

160

se volvió turbio. Después de completa la adición, la mezcla de reacción se agitó a 25 °C (22- 28 °C) durante 1 hr aproximadamente, en cuyo tiempo el análisis de HPLC confirmó la terminación de la reacción. La solución se enfrió a 15 °C (12- 18 °C) y se cargó agua potable (156.3 kg, 6.25 partes) lentamente mientras se mantiene la temperatura de reacción entre 12 y 30 °C. Luego la mezcla de reacción se ajustó a 22 °C (19- 25 °C) y se agitó durante aproximadamente 5 hrs hasta que la exoterma cesó. La formación de una pasta acuosa se confirmó visualmente y los contenidos del reactor se filtraron en un filtro de presión Nutsche equipado con una tela de filtro. El reactor, bomba y líneas se lavaron hacia delante en el nutsche de presión con dos porciones de agua potable (62.5 kg, 2.5 partes cada uno) . El filtrado tiene un valor pH de 7. El producto (41.8 kg) se secó al vacío con una temperatura máxima de baño de agua (para calentar la camisa del secador) de 50 °C. Después de 12 hrs aproximadamente, el análisis LOD en proceso indicó un contenido de solvente de 0.72%. El producto seco (C) se descargó (34.4 kg) con rendimiento al 88.2% y pureza al 99.1 % mediante HPLC.

Paso 2. Síntesis de 2- amino- N- (5- cloro- piridin- 2- il) - 5- metoxi- benzamida (D)

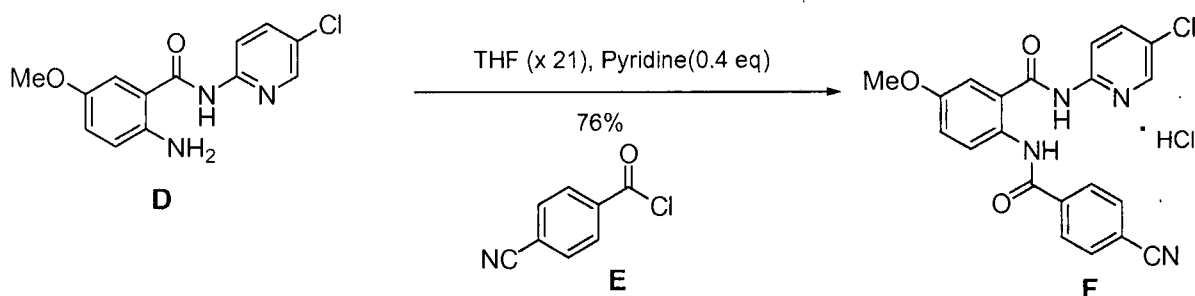


A un reactor 780 L Hastelloy, se cargaron compuesto C (33 kg, 1.0 eq.) , 5% carbono de platino (sulfidado, 0.33 kg, 0.010 partes) y diclorometano (578 kg, 17.5 partes) . La agitación empezó y los contenidos del reactor se ajustaron a 22 °C (19- 25 °C) . El reactor se presurizó con hidrogeno 30 psi aproximadamente y la mezcla de reacción se calentó suavemente a 28 °C (25- 31 °C) . La hidrogenación del los contenidos del reactor se realizaron bajo 30 psi aproximadamente a 28 °C (25 a 31 °C; máximo 31 °C) hasta que la reacción se completó mediante HPLC. Después de 16.5 hrs, la reacción se considero completa después de confirmar la desaparición del material de inicio (0.472 A%) . Los contenidos del reactor se circularon a través de un cojín de celite condicionado (0.2- 0.5 kg celite condicionado con 20- 55 kg diclorometano) preparado en un filtro Sparkler de 8" para remover el catalizador de platino. El reactor se presurizó y lecho de celite se juagó hacía delante con dos porciones de diclorometano (83 kg, 2.5 partes cada uno) . El filtrado se transfirió a y concentró en un reactor 570 L GLMS bajo una

presión atmosférica a 132 L aproximadamente. (4 partes volumen) . Se cargó etanol (69 kg, 2.1 partes) y la concentración continuó bajo presión atmosférica a 99 L aproximadamente (3 partes volumen) . NMR en proceso indicó que el contenido de diclorometano fue 39%. Se cargó etanol (69 kg, 2.1 partes) nuevamente y la concentración continuó nuevamente a 99 L

aproximadamente (3 partes volumen) . El NMR en proceso indicó que el contenido de diclorometano fue 5%. La mezcla de reacción se ajustó luego a 3 °C (0 a 6 °C) , se agitó durante 1 hr aproximadamente, y la pasta aguada resultante se filtró en un filtro de presión Nutsche con camisa equipado con una tela de filtro. El reactor, bomba y líneas se jugaron hacia delante con frío [3 °C (0- 6 °C)] etanol (26 kg, 0.8 partes) . La torta de filtro mojada (36.6 kg) se secó al vacío a 40- 50 °C con una temperatura máxima de baño de agua (para calentar la camisa del secador) de 50 °C. El análisis de LOD después de 12.5 hrs indicó que el solvente fue a 0.1%. El producto seco (D) se descargó (26.4 kg) en rendimiento al 89.5%. La HPLC mostró pureza al 98.4 A%, con impureza declarada al 0.083 %.

Paso 3. Síntesis de Hidrocloruro de N- (5- cloro- piridin- 2- il) - 2- (4- ciano- benzoil- amino) - 5- metoxi- benzamida (F)



A un reactor 780 L Hastelloy, se cargó cloruro de 4- cianobenzoil (E) (17.2 kg, 1.1 eq.) y THF (92 kg, 3.5 partes) . Los contenidos del reactor se agitaron a 22 °C (19- 25 °C) hasta que todos los sólidos se disolvieron. La solución resultante se transfirió a un receptor más bajo y el reactor se jugó hacia delante con THF (26 kg, 1 parte) . Se cargaron Compuesto D (26.4 kg, 1 eq.) , THF (396 kg, 15 partes) y piridina (2.90 kg, 0.4 eq.) a un reactor limpio. La bomba y líneas se jugaron hacia delante con THF (34 kg, 1.3 partes) . Mediante una bomba de medición, la solución 4- cianobenzoil cloruro/THF se cargó al reactor, manteniendo la temperatura a < 30 °C y jugando hacia delante con THF (10 kg aproximadamente) . La pasta aguada color amarillo resultante se agitó a 22 °C (19- 25 °C) durante 2 hrs aproximadamente. La HPLC en proceso tomada después de 2 hrs mostró un compuesto del contenido de la fórmula D de 0%, indicando

112

terminación de la reacción. La pasta aguada se filtró en un nutsche de presión equipado con una tela de filtro. El reactor, bomba, líneas y torta mojada se jugaron con tres porciones de etanol (15 kg cada una aproximadamente) . La torta de filtro mojada se descargó (65.4 kg) y se transfirió de vuelta al reactor para lavada de pasta acuosa en etanol (317 kg, 12 partes) a 22 °C (19- 25 °C) durante 1 hr aproximadamente. La pasta aguada se filtró en el nutsche de presión y el reactor, bomba, líneas, y torta de filtro mojada se jugaron con dos porciones de etanol (15 kg cada una aproximadamente) y dos porciones de THF (15 kg cada una aproximadamente) . La torta de filtro mojada se secó al vacío con una temperatura máxima de baño de glicol caliente (para calentar la camisa del secador) de 40 °C. Después de 14.5 hrs de secado, el LOD fue 0.75%. El material seco fue molido (tamiz 0.125") para proporcionar 31.8 kg del producto, el cual se secó al vacío durante más de 10.5 hrs. El LOD después de secado fue 1.8%, y el producto se descargó (31.5 kg) en rendimiento al 74.8% (se esperaba 60- 90%) . El HPLC mostró pureza al 100 %.

Ejemplo 4

Bioensayo para determinar Actividad Antitrombótica

Este ejemplo describe un ensayo *in vitro* para determinar actividad antitrombótica *in vivo*. El valor predecible del ensayo se ha verificado utilizando un modelo de babuino *in vivo* establecido descrito a continuación. El compuesto utilizado en el ensayo corresponde a un compuesto de la Fórmula II, o sal del mismo.

Materiales y Métodos

Para los estudios *in vitro*, un pool de plasma se generó a partir de la sangre recolectada a través de venipuntura en 3.2 % (1:9 v/v) citrato de tri- sodio a partir de un mínimo de diez donantes. El sustrato trombótico específico utilizado fue Z- GGR- AMC (Bachem) . El factor tisular (Innovin, "TF") se compró en Dade Behring. IgG de TF anti- humano de conejo y TF humano recombinante purificado fueron de American Diagnostica. COATEST LMW los Kits de Heparina/Heparina fueron de Chomogenix. La fuente de anticoagulantes ensayados fueron como sigue: sodio de enoxaparina (Aventis Pharmaceuticals) , sodio de fondaparinux (Glaxo Smith Kline) , bivalirudina (The Medicines Company) , inhibidor de fXa C921- 78 (Betz, A. et al. *Biochem.*, 1999; 38- 14582- 14591) ; rivaroxaban y razaxaban.

La generación de trombina en el pool de plasma en ausencia y presencia de varios anticoagulantes y en pacientes tratados con warfarina se inició mediante la adición de Innovin y

163

calcio. La generación de trombina se midió mediante la señal continua generada mediante escisión de sustrato de trombina durante un periodo de 10 min en un lector fluorescente de FlexStation (Molecular Probes) . La señal fluorescente (Max- Min unidades fluorescentes relativas) se presentó como unidades (RFU) o unidades arbitrarias (AU) de generación de trombina y se midieron unidades anti- fXa mediante Coatest™. La cuantificación de la concentración de TF en Innovin se realizó mediante el inmunoblot con TF IgG de conejo anti- humana, seguido mediante densitometría y comparación con TF humano purificado (residuos 1- 263, expresados en baculovirus) .

Para la validación *ex vivo* del ensayo, se recolectó plasma a partir 168 pacientes que reciben terapia de anticoagulación. Los sujetos comprendían pacientes hospitalizados clínicamente estables o aquellos por consulta externa y que estuvieran recibiendo warfarina (sin cambio en la dosis de la warfarina por aproximadamente 7 días) . La sangre se recolectó únicamente si la venesección y la medición de rutina de los ensayos de anticoagulación tradicionales (INR, aPTT etc.) ya se pretendían y no se realizaron pinchazos de aguja adicionales para este estudio. 5 mL de sangre adicionales se recolectaron y colocaron en tubos anticoagulados por citrato de sodio. Luego las muestras se centrifugaron dos veces para recolectar la fracción de plasma, y este plasma se almacenó inmediatamente a - 80°C.

Resultados

El ensayo fue sensible a anticoagulantes con varios mecanismos de acción. La adición de heparina no fraccionada (UFH) o heparina de peso molecular bajo (LMWH) a el plasma de donante saludable produjo una inhibición dependiente de dosis en el ensayo. De manera similar, inhibidores de trombina directa o fXa también producen una actividad inhibidora proporcional a la dosis. El efecto de inhibidores específicos de trombina o factor Xa en generación de trombina de plasma inducida con TF se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Fármaco	IC ₅₀
Fondaparinux	160 nM
Bivalirudina inhibidora de trombina	2.4 (µg/mL
inhibidor de fXa C921- 78	17 nM

164

Rivaroxaban inhibidor de fXa	80 nM
Razaxaban inhibidor de fXa	125 nM

Este ensayo es también útil para medir anticoagulación en pacientes anticoagulados tanto agudos como crónicos. Las mediciones de aPTT en pacientes tratados con UFH o LMWH correlacionaron con la inhibición de generación de trombina. Relativo a los marcadores de de generación de trombina tradicionales (TAT y F 1.2 como se midió mediante ELISA) , este bioensayo proporcionó una correlación superior a las mediciones de INR. EL resultado el cual se muestra en las FIGS. 1 A, IB y 1C. La medida de la generación de trombina (AU) a 10 minutos se midió en muestras de plasma de (a) pacientes tratados con warfarina y se graficó contra valores INR a partir de 137 pacientes (FIG. 1 A) , (b) pacientes tratados con enoxaparina graficados contra valores aPTT a partir de 16 pacientes (FIG. IB) y (c) pacientes tratados con heparina no fraccionada (UFH) graficados contra valores aPTT a partir de 15 pacientes (FIG. 1C) .

Ejemplo 5
Comparación entre Betrixaban y Fondaparinux

La evaluación en un ensayo de protrombinasa de sangre entera se realizó para comparar betrixaban con fondaparinux, un inhibidor indirecto de fXa. Como fondaparinux, betrixaban dependientemente de la dosis inhibe la actividad de protrombinasa mediada por plaquetas en este sistema de ensayo.

Materiales y Métodos

Los ensayos amidolíticos para la inhibición de fXa humano purificado y proteasas relacionadas se realizaron como se reportó previamente (Sinha, U. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 114:2313- 6) . Para la determinación de actividad inhibidora de protrombinasa, se compró pretrombina- 2 de plasma humano en Tecnologías Hematológicas y el sustrato de trombina Boc- Asp (OBzl) - Pro- Arg- AMC. HCl se obtuvo en Bachem. El análisis de datos para parámetros cinéticos derivados se realizaron utilizando el software Dynafist (Biokin) . Betrixaban exhibió un Ki de 0.117 (nM) y un Ki de protrombinasa de 0.801 (nM)

El ensayo descrito en el Ejemplo 4 se empleó. Betrixaban se ensayo en un modelo de incorporación de dispositivo trombogénico en un shunt arteriovenoso en mandriles (Hanson SR et al. *J. Clin. Invest.* 1993; 92:2003- 12) . El dispositivo trombogénico de dos componentes mide

165

el crecimiento trómbico en un injerto de dacrón y una cámara de expansión utilizando plaquetas rotuladas ¹¹¹In y fibrinógeno rotulado ¹²⁵I. Este modelo se utilizado previamente para estudiar una amplia variedad de anticoagulantes (heparinas no fraccionadas y de peso molecular bajo, trombina e inhibidores de fXa) .

5

Resultados

10

La inhibición de dosis dependiente de trombosis venosa se observó en cuatro dosis (0.05, 0.12, 0.21 y 0.49 mg/kg) de betrixaban. Las mediciones *ex vivo* de generación de trombina de plasma, aPTT, PT, activaron el tiempo de la coagulación ("ACT") , y se realizaron unidades anti fXa durante el transcurso de tiempo. En contraste a la actividad antitrombótica observada (inhibición entre 30 y 89% de deposición de plaquetas, inhibición entre 0 y 87% de deposición de fibrina) , Hubo extensiones mínimas de parámetros de la coagulación ante tratamiento de betrixaban. Los resultados de esta se presentan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

	Veces de cambio a partir de la media del control ± desviación estándar		
Agente	ACT	PT	aPTT
Control	0.87± 0.09	1.04± 0.04	1.02±0.03
betrixaban 0.05 mg/kg	1.14±0.06	1.02±0.03	1.07±0.03
betrixaban 0.12 mg/kg	1.14±0.15	1.05±0.06	1.07±0.03
betrixaban 0.21 mg/kg	1.11±0.04	1.07±0.03	1.09±0.08
betrixaban 0.49 mg/kg	1.28±0.06	1.17±0.11	1.29±0.21

15



Las unidades anti fXa estaban bajo el límite de cuantificación para las tres dosis más bajas y 0.31 Unidades/ml en la dosis más alta. Los tiempos de sangrado del patrón no se perturbaron para ninguno de los animales tratados con betrixaban. El parámetro *ex vivo* que correlaciona a la actividad antitrombótica fue la inhibición proporcional a dosis (coeficiente de correlación R =0.99) de generación de trombina de plasma; la cual estuvo en el rango entre inhibición del 13% a la dosis menor a 72% en la dosis más alta. Así, este bioensayo de protrombinasa nuevo predice actividad antitrombótica *in vivo*.

20

La Tabla 3 a continuación proporciona inhibición en respuesta a la dosis de trombosis *in vivo* en el modelo de mandril. La Tabla 3 también proporciona la actividad anti- fXa en muestras

166

de plasma de mandril durante infusión del control o el compuesto de ensayo.

Tabla 3

Grupo Dosificado	Rango de Concentración de Plasma de Betrixaban(ng/ml)	% Inhibición de Deposición de plaquetas	% Inhibición de Formación de Fibrina
Control	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

La FIG. 2 proporciona evidencia adicional de que el ensayo *in vitro* es predictivo de la actividad antitrombica *in vivo*. Específicamente, la FIG. 2 muestra la inhibición en respuesta a la dosis de trombosis *in vitro* en el modelo de mandril. La deposición de plaquetas rotuladas ¹¹¹In en el tiempo en la cámara venosa durante la infusión de betrixaban (n=3 at cada dosis) . Los animales de control se infundieron con el vehículo (n=4) .

Las FIGS. 3, 4 A, y 4B muestran la inhibición de la generación de trombina iniciada del factor tisular en sangre entera humana mediante betrixaban comparado con fondaparinux. La actividad de trombina se cuantifico mediante escisión sustrato fluorogénico. Respuesta de dosis de inhibición de generación de trombina se midió mediante adición de cantidades variables de betrixaban y fondaparinux para sangre entera de once donantes saludables. Se muestran mediciones de unidad fluorescente relativa (RFU) de donantes representativos.

Este estudio mostró que las características *in vitro* e *in vivo* de betrixaban como un potente inhibidor de fXa humano purificado y el complejo de protrombinasa. Específicamente, hubo más de 86,000 veces la especificidad contra proteasas humanas relacionadas tales como trombina y Proteína C activada. También hubo una inhibición dependiente de dosis de generación de trombina iniciada en factor tisular en sangre entera humana y una inhibición dependiente de dosis de trombosis en proceso en un modelo de primate de arteriotrombosis venosa sin extender los parámetros de la coagulación o el tiempo de sangrado. Así, comparado a mediciones estándares de la coagulación, este ensayo fue más predictivo de eficacia *in vivo* en el modelo animal.

167

Ejemplo 6

Inhibición de Protrombinasa y Factor Xa No Soluble Predice Eficacia de Inhibidores de fXa en un Modelo *in vivo* de Trombosis de Vena Profunda (DVT)

Este ejemplo se diseñó para ensayar la hipótesis que la potencia de inhibidores de fXa contra fXa incorporado en el complejo de protrombinasa predecirá eficacia antitrombica *in vivo*. Ocho inhibidores de fXa a partir cuatro series químicas estructuralmente distintas con un rango de actividades contra fXa se ensayaron por sus habilidades para inhibir el complejo de enzima de protrombinasa en plasma humano. La generación de trombina y la escisión subsiguiente de un sustrato de trombina específico se utilizó como una medida de actividad de protrombinasa, la actividad inhibidora siendo definida mediante la concentración de inhibidor requerida para producir una extensión doble en el tiempo para máxima producción de trombina (2x lag). Tiempos PT de conejo *in vitro* también se determinaron. Tiempos de protrombina (PT) de conejo *in vitro* se determinaron mediante adición de tromboplastina a plasma de conejo. Inhibición en el modelo DVT de conejo se ensayó como se describió previamente (Hollenbach, *Thromb. Haemost.* 1994; 71:357) y relacionó a concentraciones de plasma de fármaco.

Materiales y Métodos

Los compuestos se sintetizaron (Zhu; *Curr. Top. Med. Chem.* 2001; 2:101- 119; Betz *Biochem.*, 1999; 36:14582- 91). La concentración del compuesto requirió inhibir la actividad amidolítica del fXa humano soluble purificado (*Haematologic Technologies*) mediante 50 % (IC₅₀) se midió al seguir la formación de p- nitroanilina a partir de sustrato de péptido Z- D- Arg- Gly- Arg pNA (Diapharma) a 405 nm en a lector de plato Spectramax (Molecular Devices) (Sinha et al, *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 395:51- 59). La formación de trombina mediante protrombinasa se evaluó en plasma pobre en plaquetas humanas agrupadas tratado con Reptilasa® mediante medición de p- nitroanilina a 405 nm después de escisión de sustrato de trombina peptídico Pefachrome TG (Pentapharm) (Sinha et al., *ATVB*; 2003; 23:1098- 1104). La concentración de compuesto la cual produjo un doble aumento en el tiempo de generación de trombina máxima se registró como la concentración 2x lag (fase de latencia). La eficacia antitrombótica contra trombosis venosa de conejo se determinó midiendo la acreción del trombo en una hebra de algodón colocada en la vena cava por medio de un catéter insertado en la vena femoral izquierda. La disminución en el peso del trombo siguiendo una infusión de dos horas del compuesto se expresó relativa al control del vehículo (Hollenbach, *Thromb. Haemost.* 1994; 71:357).

268

Las concentraciones de fármaco en el plasma de conejo se midieron mediante LC-MS/MS. Los tiempos de protrombina de conejo se midieron utilizando Tromboplastina C Plus (Dade) en un temporizador de la coagulación automatizado (ACL 3000, Instrumentation Laboratory) (Sinha, et al., *Eur. J. Pharmacol*, 2000; 395:51- 59) .

Resultados

Todos los compuestos inhibieron fXa soluble en un 50 % en concentraciones menores que 10 nM. Sin embargo, el orden de rango de potencias para inhibición de fXa soluble difiere de aquel requerido para inhibir el complejo de protrombinasa. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

No.	Clase de Compuesto	fXa IC ₅₀ (nM)	Protrombinasa 2x lag (µM)	Concentración de Plasma en DVT (µM)	Inhibición de Trombosis (%)	Cambio PT 2x de conejo (µM)
1	Keatiazola	0.5	0.18	0.06	94	7
2	Antranilamida	1.3	0.22	1.14	37	2.7
3	Antranilamida	0.7	0.24	1.65	47	1.7
4	Antranilamida	0.4	0.25	1.04	47	1.0
5	Antranilamida	0.8	0.34	3.39	41	1.5
6	naftalenepirazola	4.4	0.92	5.2	11	4.7
7	1,2- Benzenediaine	3.5	1.35	4.6	19	8.8
8	Isoxazola	8.2	1.66	9.2	0	64

También hubo correlación pobre entre los valores 2x lag para inhibición de protrombinasa y la concentración requirió lograr un cambio 2x en PT de conejo (R = 0.57) . Ni las actividades de inhibición de fXa ni los cambios en el PT de conejo predijo actividad en el modelo de trombosis de vena profunda (DVT) *in vivo*. En contraste, los compuestos se pueden dividir ampliamente en 3 niveles de eficacia para la inhibición de el crecimiento trómbico *in vivo* dependiendo en sus potencias en el ensayo de protrombinasa *en vitro*. El Compuesto 1 tuvo el menor valor 2x lag de 0.18 µM y fue el inhibidor más potente de trombosis *in vivo* con inhibición

161

del 94 % en una concentración de plasma de 65 nM. El segundo grupo de compuestos, con valor 2x lags en el ensayo de protrombinasa en el rango entre 0.22 y 0.34 μ M, inhibió la formación de trombo *in vivo* al entre 37y 47 % en concentraciones de plasma en el rango entre 1.04 y 3.39 μ M. Los compuestos en la tercera categoría fueron los inhibidores de protrombinasas menos potentes (valor 2x lags más grande que 0.92 μ M) y no pudo inhibir significativamente trombosis *in vivo* incluso en concentraciones de plasma de 9.2 μ M. Estos datos muestran que los valores 2x lag obtenidos en el ensayo de protrombinasa, y no inhibición de fXa soluble o extensión de tiempo de PT de conejo, es más predictiva de inhibidor de eficacia fXa en el modelo DVT de conejo *in vivo*.

Dadas las limitaciones de anti- coagulantes corrientes, la posición del factor Xa (fXa) en la convergencia de ambos los caminos extrínsecos e intrínsecos de la coagulación de sangre lo ha hecho un blanco atractivo para el desarrollo de nuevas terapias. Con respecto a investigar la relación de actividad estructural (SAR) de inhibidores potenciales de fXa, los ensayos que miden inhibición de actividad de proteasa de fXa de fase de solución son un punto de partida obvio. Sin embargo, las habilidades de los compuestos para inhibir fXa soluble, purificado no son una verdadera reflexión de la interacción entre inhibidor y enzima *in vivo*. Esto se debe a que la contribución más grande de fXa al proceso de la coagulación ocurre cuando se combina con el factor Va como parte del complejo de protrombinasa después de lo cual la actividad de proteasa se incrementa 300,000 veces relativo a el fXa de fase de solución. Esta actividad aumentada de fXa en el complejo de protrombinasa es más dura para inhibir, así cualquier evaluación de la potencia anti- fXa del compuesto debe incluir una evaluación de inhibición de protrombinasa. La actividad de protrombinasa se puede medir en plasma pobre de plaquetas (PPP) y, bajo estas condiciones, también toma en cuenta el efecto de de la unión de proteína de plasma en la potencia del compuesto. Otra forma más directa de evaluar el efecto de los compuestos sobre el proceso de anti- coagulación es a través el uso de *en vitro* ensayos de la coagulación tales como tiempo de protrombina (PT) y tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) .

Ejemplo 7

La evaluación de Bioensayo en Estudio de Dosis Ascendentes Múltiples

La FIG 5. muestra datos del ensayo *in vitro* realizados con plasma a partir de voluntarios humanos saludables oralmente dosificados con betrixaban. Nueve sujetos recibieron cada uno capsulas de fármaco de 40, 80 o 120 mg cada 12 horas para diez días consecutivos. Los sujetos de control (12) se trataron con placebo o control de fármaco no anticoagulante. Muestras de

MO

plasma obtenidas a partir de los sujetos se evaluaron en el ensayo biológico in vitro de generación de trombina iniciada con factor tisular. Muestras de plasma también se analizaron para la concentración de fármaco utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas en tándem. Los resultados muestran la correlación susceptible de dosis entre la concentración de fármaco de plasma de betrixaban e inhibición de generación de trombina en el ensayo biológico.

Ejemplo 8

Concentraciones Terapéuticas Humanas de Betrixaban

Los ensayos de generación de trombina se realizaron como se describe en el Ejemplo 4, con los compuestos agregados *ex vivo* a sangre entera humana. Valores PT y aPTT en varias especies se determinaron a partir de compuestos agregados a plasma pobre en plaquetas. Las muestras se realizaron en un ACL 3000plus (Coulter) , PT se determinó utilizando Dade® Tromboplastina C plus y aPTT se determinó utilizando Dade® Actin® FS reactivo activado PTT.

Betrixaban y fondaparinux, un inhibidor indirecto de fXa, ambos inhibieron significativamente la generación de TAT y F1 .2 en sangre entera humana. Comparado con un nivel terapéutico de fondaparinux (200 nM) , betrixaban (200 nM) fue más potente suprimiendo ambos marcadores de generación de trombina.

Materiales y Métodos

Las dosis múltiples de betrixaban se evaluaron en tres modelos de animales. El primer modelo, el cual midió acreción de coagulo en hebras de algodón colocadas en la vena cava abdominal de conejo, comparó inhibición de masa de trombo mediante betrixaban a aquel de dosis supratrapéuticas de enoxaparina (a LMW heparina) .

El segundo modelo comparó la habilidad de betrixaban para mantener la abertura del recipiente bajo condiciones de flujo arterial en trombosis inducida por FeCl₃ en arteria carótida de rata a aquella lograda mediante enoxaparina o clopidogrel (un agente antiplaqueta) .

El tercer modelo investigó inhibición de deposición rotulada ¹¹¹In de plaquetas en injertos de dacrón y las cámaras de expansión colocada en shunts arteriovenosos femorales en mandriles. En todos los modelos ensayados, betrixaban y enoxaparina se administraron como infusiones IV y clopidogrel se dosificó oralmente durante tres días. PT y aPTT *ex vivo* se midieron en todos los modelos. Los modelos incluyen criterios fuertes de trombosis arterial y venosa y betrixaban produjo actividad antitrombótica susceptible a dosis en cada uno de los tres modelos. La eficacia

de betrixaban comparada favorablemente a niveles supratrapéuticos de enoxaparina y clopidogrel.

La eficacia en trombosis venosa de conejo se determinó midiendo la acreción del trombo en hebras de algodón colocadas en la vena cava por medio de un catéter insertado en la vena femoral izquierda, como se describe mediante Hollenbach et al., *Thromb. Haemost.* 1994; 71:357- 362, incorporado mediante referencia en su totalidad en la presente. La disminución en el peso del trombo siguiendo una infusión de dos horas de compuesto se expresó relativa al control del vehículo. Ver también Sinha, et al, *Eur. J. Pharmacology.* 395:51- 59 (2000) , incorporado mediante referencia en su totalidad en la presente.

El modelo FeCl₃ de rata adaptado a partir Kurz, K.D. et al. *Thromb. Res.* 1990; 60(4):269- 280, incorporado mediante referencia en su totalidad en la presente, utilizando la arteria carótida izquierda. Una estenosis de la arteria se aplicó con una ligadura de seda reduciendo el flujo sanguíneo en un 50% con una leve lesión por aplastamiento seguido mediante la aplicación de FeCl₃ al 50% durante la duración del experimento. El flujo sanguíneo se monitoreó a través de sonda de flujo Doppler pulsada y se registró durante 90 minutos después de la aplicación de FeCl₃. Enoxaparina y Betrixaban administraron IV. Clopidogrel administró oralmente Q.D. durante 3 días.

El modelo de mandril se realizó en la Universidad de Salud & Ciencia de Oregón siguiendo los procedimientos descritos mediante Hanson, S.R. et al. *J. Clin. Invest.* 1993; 92:2003- 2012, incorporado mediante referencia en su totalidad en la presente. Brevemente, la trombosis se indujo mediante dos dispositivos trombogénicos diferentes incorporados dentro de un shunt arteria- vena (A- V) femoral excorpóreo. El modelo arterial utiliza un ambiente de alto esfuerzo cortante para promover la formación de trombos en un injerto de dacrón. Los modelos venosos utilizan un ambiente de bajo esfuerzo cortante para promover la formación de trombos en una cámara de expansión. Las plaquetas y fibrina se pre- rotulan con fibrinógeno ¹¹¹In e ¹²⁵I para medir deposición de plaquetas y acumulación de fibrina, respectivamente.

Resultados

Sorprendentemente, diferente a los modelos de roedor, la eficacia en primates se logró en una dosis mucho menor con prolongación mínima de PT. La especificidad de las especies se demostró también mediante extensiones *in vitro* de PT y aPTT en plasma de rata, conejo, mandril y humano. Un cambio 2x de PT se logró en concentraciones de 8.9, 1.6, 1 y 0.4 μM

192

respectivamente. Los datos indicaron que las dosis de betrixaban que inhiben la generación de trombina en sangre humana y que proporciona anticoagulación similar a mandril dosificado a 0.05- 0.49 mg/kg pueden ser suficientes para prevenir trombosis venosa en humanos. Modelación comparativa de extensiones de cambios en PT a niveles de eficacia antitrombica también llevaron a predecir que la actividad terapéutica humana para betrixaban se puede lograr sin cambios concurrentes en parámetros de la coagulación ex vivo. Los datos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Modelo de Trombosis	Agente, Dosis	Actividad Antitrombótica	Veces de cambio de APTT	Veces de cambio PT
Vena Cava de Conejo	betrixaban, 3 mg/kg	Inhibición al 76%	2.22	2.34
	Enoxaparina, 2.2 mg/kg	Inhibición al 96%	2.06	1.01
Carótida de Rata	betrixaban, 19.1 mg/kg	Abertura al 90%	1.69	2.20
	Enoxaparina, 7.6 mg/kg	abertura al 70%	3.49	1.19
	Clopidogrel, 3 mg/kg/día	Abertura al 80%	1.03	1.01
Arteriovenoso en Mandril	betrixaban, 0.49 mg/kg	Inhibición 90% (venosa) Inhibición 32% (arterial)	1.29	1.17

Ejemplo 9

Comparación de Betrixaban con Enoxaparina en un Ensayo Aleatorizado para la Prevención de Eventos Tromboembólicos Venosos después de Reemplazo de Rodilla Total

Este estudio incluyó 215 pacientes sometidos a reemplazo de rodilla total (TKR) los cuales se aleatorizaron en una proporción 2:2:1 a betrixaban dosis oral de 15 mg o 40 mg o enoxaparina (Enox) dosis subcutánea de 30 mg dos veces al día durante 10 a 14 días. El estudio se cegó con respecto a la dosis de 15 versus 40 mg, pero no con respecto a betrixaban vs. Enox.

El punto final primario de eficacia fue la incidencia de tromboembolismo venoso ("VTE") (trombosis de vena profunda sintomática o asintomática en un embolismo pulmonar sintomático o flebograma unilateral y obligatorio) en los Días 10 y 14. Puntos finales seguros incluyen la incidencia de hemorragia mayor y clínicamente significativa no mayor en los días después de la flebografía. Toda eficacia y puntos finales de hemorragia se adjudicaron mediante un comité de adjudicación central ciega, independiente.

Materiales y Métodos

Betrixaban en este estudio se administró en capsulas de gelatina. Las capsulas contienen maleato de betrixaban, monohidrato de dextrosa, y estearato de magnesio.

La dosis inicial de betrixaban se tomó entre 6 y 8 horas después de cirugía y dos veces diariamente (BID) en adelante. Enoxaparina se administró subcutáneamente entre 12 y 24 horas después de cirugía y cada 12 horas (q 12h) en adelante. El tratamiento continuó durante entre 10 y 14 días a menos que un criterio que detiene protocolo específico se encontrara. Después de descargar del hospital, los pacientes administraron por si mismos la medicación de estudio. La última dosis de medicación de estudio se administró la mañana de la flebografía obligatoria fijada de la pierna operada (Día entre 10 y 14) .

Las muestras de sangre para evaluación de concentración de fármacos de plasma y medidas farmacodinámicas se obtuvieron al momento del tamizaje, entre 1 y 4 horas después de administración de la dosis de la mañana de medicación de estudio en el Día 2, en el día de descarga y anterior al flebograma obligatorio entre el Día y 14. Las muestras de plasma se analizaron para betrixaban utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento con espectrometría de masas en tandém. El método se validó para un rango entre 0.100- 50.0 ng/mL, basado en los análisis de 0.2 mL plasma. La cuantificación se realizó utilizando una curva estándar de calibración generada desde el análisis de regresión de mínimos cuadrados sopesados.

La anticoagulación se midió mediante la generación de ensayo de inhibición de trombina como se discute en el Ejemplo 4 y actividad anti- Xa además de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) , tiempo de protrombina (PT) y proporción normalizada internacional (INR) . El ensayo de unidad anti- Xa se adaptó a partir del juego de heparina Coatest LMW (Diapharma) y se modificó en un formato de placa de 96 pozos. En este ensayo, ejemplos pacientes y estándares se ensayaron en duplicado y el límite de cuantificación fue 0.05 anti- Xa U/mL. La generación de trombina se inició mediante la adición del factor tisular (Innovin, Dade Behring) y calcio para

Handwritten signature or initials in the top right corner.

plasma de paciente anticoagulado de citrato (0.1 mL) . La formación de trombina se midió mediante escisión de un sustrato de trombina específico (Z- GGR- AMC, Bachem) durante un periodo de 10 minutos. Unidades de fluorescencia relativa se midieron en un lector fluorescente de FlexStation (Molecular Devices) y utilizaron para cuantificación de generación de trombina.

5 Todas las muestras de plasma de paciente se ensayaron en triplicado y la inhibición de generación de trombina reportó como cambio de unidad fluorescente relativa de baselina para cada individuo.

Resultados

Se observó un efecto dependiente de dosis y concentración de betrixaban en inhibición de 10 generación de trombina y niveles anti- fXa. 175 Pacientes (81- 4%) Tuvieron una eficacia y evaluación de seguridad como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Eficacia principal y resultados de seguridad	betrixaban 15mg BID	betrixaban 40 mg BID	Enox 30 mg BID
VTE % (95%C1)	20 (12- 32)	15 (8- 27)	10 (3- 23)
Hemorragias mayores % (95%C1)	0 (0- 4)	0 (0- 4)	2 (0- 12)
hemorragias no mayores clínicamente significativas	0 (0- 4)	2 (0- 8)	5(1- 16)

La FIG. 6 muestra las tasas VTE e intervalos de confianza al 95% para betrixaban y enoxaparina como se determinó en este estudio con flebografía unilateral entre los Días 8 y 10 y para controles históricos de enoxaparina a partir de estudios utilizando enografía bilateral realizada entre los Días 10 y 14 después de TKR. La FIG. 9 ilustra las concentraciones de betrixaban de plasma después de la segunda dosis (Día 2) , en descarga y en el tiempo de flebografía. Como se esperaba dada la vida media larga de betrixaban, concentraciones farmacológicas medias aumentaron después de las primeras pocas dosis y aparecieron para 20 alcanzar un estado firme mediante descarga (mediano Día 4) para ambos grupos de dosis de betrixaban. El Betrixaban exhibió un efecto dependiente de dosis y concentración en inhibición de generación de trombina y niveles anti- Xa (FIG. 7 y 8) . El efecto de 15 mg de betrixaban en la

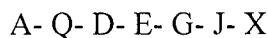
inhibición de generación de trombina fue similar a aquel observado con enoxaparina en donde el efecto visto con betrixaban 40 mg se pronunció más. A la inversa, el efecto visto en la actividad anti- Xa fue similar para 40 mg de betrixaban y enoxaparina y menor con 15 mg de betrixaban. El tratamiento con betrixaban no afectó apreciablemente otros parámetros de la coagulación (es decir aPTT, PT e INR) .

Betrixaban fue efectivo en prevenir VTE después de TKR y fue seguro y bien tolerado.

Se debe entender que mientras el invento se ha descrito en relación con las realizaciones anteriores, la descripción precedente y los ejemplos pretenden ilustrar y no limitar el alcance del invento. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance del invento serán aparentes para aquellos con experiencia en el estado de la técnica a los cuales atañe este invento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inhibir coagulación en un paciente humano en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad inhibitoria de la coagulación de un compuesto inhibidor del factor X de la Fórmula I:



I

en donde:

A se selecciona a partir de:

- (a) C1- C6- alquilo;
- (b) C3- C8- Cicloalquilo;
- (c) $-N(R^1R^2)$, $N(R^1,R^2) - C(=NR^3) -$, $N(R^1,R^2) - C(=NR^3) - N(R^4) -$, $R^1 - C(=NR^3) -$, $R^1 - C(=NR^3) - N(R^4) -$;
- (d) fenilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R;
- (e) naftilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R; y

un sistema anular monocíclico o heterocíclico bicíclico fusionado que tiene entre 5 y 10 átomos cíclicos, en donde 1- 4 átomos cíclicos del sistema anular son seleccionados a partir de N, O y S, y en donde el sistema anular se puede sustituir con 0- 2 Sustituyentes R;

R se selecciona a partir del grupo H, halo, $-CN$, $-CO_2R^1$, $-C(=O) - N(R^1, R^2)$, $-(CH_2)_m - CO_2R^1$, $-(CH_2)_m - C(=O) - N(R^1, R^2)$, $-NO_2$, $-SO_2NCR^1, R^2$, $-SO_2R^1$, $-(CH_2)_m - NR^1R^2$, $-(CH_2)_m - C(=NR^3) - R^1$, $-(CH_2)_m - C(=NR^3) - N(R^1, R^2)$, $-(CH_2)_m - N(R^4) - C(=NR^3) - N(R^1, R^2)$, $-(CH_2)_m - NR^1$ - anexado a un anillo heterocíclico de 3 a 6 miembros conteniendo entre 1 y 4

heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, $-C1-4$ alquilo, $-C2-6$ alquenilo, $-C2-$

6 alquinilo, $-C3-8$ Cicloalquilo, $-C0-4$ alquilenilo- $C3-8$ Cicloalquilo, $-CF_3$, $-O$, y un sistema heterocíclico de 5- 6 miembros conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, $-C1-4$ alquilo, $-C1-4$ alquil- CN , $-C2-6$ alquenilo, $-C2-6$ alquinilo, $-C3-8$ Cicloalquilo, $-C0-4$ alquilenilo- $C3-8$ Cicloalquilo y $-NO_2$;

m es un entero de 0- 2;

22

R^1, R^2, R^3 y R^4 son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de: H, -OR⁵, -N(-R⁵, -R⁶), -C1-4alquilo, -C2-6alquenilo, -C2-6alquinilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilfenilo y -C0-4alquilnaftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden

5 independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, -C1-4alquilo, -C2-6alquenilo, -C2-6alquinilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -C3-8Cicloalquilo, -CN, y -NO₂; o R^1 y R^2 , o R^1 y R^2 tomados juntos pueden formar un cicloalquilo de 3-8 miembros o un sistema anular heterocíclico, en donde el sistema anular heterocíclico puede

10 tener entre 3 y 10 átomos cíclicos, con 1 a 2 anillos en el sistema anular y contienen entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema anular heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, C1-4alquilo, -CN, -C2-6alquenilo, -C2-6alquinilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -C3-8Cicloalquilo y -NO₂;

R^5 y R^6 son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de:

15 H, -C1-4alquilo, -C2-6alquenilo, -C2-6alquinilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -fenilo y -C0-4alquilenilo, -naftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden

independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, -C1-4alquilo, -C2-6alquenilo, -C2-6alquinilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -C3-8Cicloalquilo, -CN, y -NO₂; o R^5 y R^6 tomados juntos pueden formar un cicloalquilo de 3-8

20 miembros o un sistema anular heterocíclico, en donde el sistema anular heterocíclico pueden tener entre 3 y 10 átomos cíclicos, con 1 a 2 anillos en el sistema anular y contienen entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema anular heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro

25 seleccionado a partir del grupo que consta de halo, -C1-4alquilo, -CN, -C2-6alquenilo, -C2-6alquinilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -C3-8Cicloalquilo y -NO₂;

Q es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: un enlace directo, -CH₂-, -C(=O)-, -O-, -N(R⁷)-, -N(R⁷)CH₂-, -CH₂N(R⁷)-, -C(=NR⁷)-, -C(=O)-N(R⁷)-, -N(R⁷)-C(=O)-, -S-, -SO-, -SO₂-, -SO₂-N(R⁷)- y -N(R⁷)-SO₂-;

30 R^7 se selecciona a partir de H, -C1-4alquilo, -C2-6alquenilo, -C2-6alquinilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -C3-8Cicloalquilo, -C0-4alquilenilo, -fenilo y -C0-4alquilenilo-

naftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos - C3- 8Cicloalquilo, - CN, y - NO₂;

D es un enlace directo o es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

- (a) fenilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R^{1a};
- (b) naftilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R^{1a}; y
- (c) un sistema anular monocíclico o heterocíclico bicíclico fusionado que tiene entre 5

y 10 átomos cíclicos, en donde 1- 4 átomos cíclicos del sistema anular son seleccionados a partir de N, O y S, y en donde el sistema anular se puede sustituir a partir de 0- 2 sustituyentes R^{1a};

R^{1a} se selecciona a partir de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos - C3- 8Cicloalquilo, - CN, - NO₂, - (CH₂)_nNR^{2a}R^{3a}, - (CH₂)_nCO₂R^{2a}, - (CH₂)_nCONR^{2a}R^{3a}, - SO₂NR^{2a}R^{3a}, - SO₂R^{2a}, - CF₃, - OR^{2a}, y un sistema heterocíclico aromático de 5- 6 miembros conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O

y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema heterocíclico aromático se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos - C3- 8Cicloalquilo, - CN y - NO₂;

R^{2a} y R^{3a} son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de:

H, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos - fenil y - C0- 4alquilenos - naftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de

halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenos - C3- 8Cicloalquilo, - CN y - NO₂;

n es un entero de 0- 2;

E es un enlace directo o un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

- C1- 2- alquilenos -, - O-, - S-, - SO-, - SO₂-, - C₀₋₁- alquilenos - C(=O) -, - C₀₋₁- alquilenos - C(=O) - N(- R⁸) - C₀₋₁- alquilenos -, - C₀₋₁- alquilenos - N(- R⁸) - C(=O) - C₀₋₁- alquilenos -, - N(- R⁸) - C(=O) - N(- R⁸) - y - C₀₋₁- alquilenos - N(- R⁸) - ;

R⁸ es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; - C1- 4- alquilo; - C0-

4- alquilenos- arilo; - C0- 4- alquilenos- heteroarilo; - C₁₋₄- alquilenos- C(=O) - OH, - C1- 4- alquilenos- C(=O) - O- C1- 4- alquilo, y - C₁₋₄- alquilenos- C(=O) - N(- R^{2b}, - R^{3b}) ;

R^{2b} y R^{3b} son cada uno un miembro independientemente seleccionados a partir del grupo que consta del grupo H, - C1- 4- alquilo, - C0- 4- alquilenos- arilo; - C0- 4- alquilenos-

5 heterocíclico, y

R^{2b} y R^{3b} junto con el átomo N al cual están fijados pueden formar un anillo heterocíclico de 5- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde el anillo heterocíclico se puede sustituir por grupos 0- 2 R^{1c};

10 R^{1c} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: Halo; - C1- 4- alquilo; - CN; - NO₂; - C(=O) - N(- R^{2c}, - R^{3c}) ; - C(=O) - OR^{2c}; - (CH₂)_q- N(- R^{2c}, - R^{3c}) ; - SO₂- N(- R^{2c}, - R^{3c}) ; - SO₂R^{2c}; - CF₃; y - (CH₂)_q- OR^{2c};

R^{2c} y R^{3c} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; - C1- 4- alquilo; y - C1- 4- alquilenos- arilo;

q es un entero de 0- 2;

15 G es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

(a) C₂- alquenoil o C₃- 8- Cicloalquenoil, en donde los puntos de unión de alquenoil y cicloalquenoil son los átomos de carbono de alquenoil y en donde el - C₂- alquenoil o - C₃- 8- Cicloalquenoil son sustituidos con grupos 0- 4 R^{1d};

20 (b) un grupo fenilo en donde los átomos de carbono cíclico del grupo fenileno son sustituidos con 0- 4 grupos R^{1d};

(c) un sistema anular heterocíclico de 3- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde 0- 2 átomos cíclicos del anillo heterocíclico se pueden sustituir con 0- 4 grupos R^{1d}; y,

25 (d) un sistema anular bicíclico heterocíclico fusionado de 8- 10 miembros, conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde 0- 2 átomos cíclicos del sistema anular bicíclico fusionado se pueden sustituir con 0- 4 grupos R^{1d};

30 R^{1d} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H, halo; C1- 6- alquilo, arilo, - CN; - NO₂; - (CH₂)₀₋₆- NR^{2d}R^{3d}; - SO₂NR^{2d}R^{3d}; - SO₂R^{2d}; - CF₃; - (CH₂)₀₋₆- OR^{2d}; - O- (CH₂)₁₋₆OR^{2d}; - O- (CH₂)₁₋₆- C(=O) - O- R^{2d}; - O- (CH₂)₁₋₆- C(=O) - N(R^{2d}, R^{3d}) ; - N(R^{5a}) - (CH₂)₁₋₆- OR^{2d}; - N(R^{5a}) - (CH₂)₁₋₆- N(R^{2d}, R^{3d}) ; - C(=O) - N(R^{2d}, R^{3d}) ; - N(R^{5a}) - (CH₂)₁₋₆- C(=O) - N(R^{2d}, R^{3d}) ; - N(- (CH₂)₁₋₆- OR^{2d})₂;

180

- N(R^{5a}) - (CH₂)₁₋₆- OR^{2d}; - N(R^{5a}) - C(=O) - R^{2d}; - N(R^{5a}) - SO₂- R^{2d}; - (CH₂)₀₋₆- C(=O) - O- R^{2d}; - (CH₂)₀₋₆- C(=O) - N(R^{2d}, R^{3d}); - (CH₂)₀₋₆- C(=NR^{2d}) - N(R^{3d}, R^{4d}); - (CH₂)₀₋₆- N(R^{5a}) C(=NR^{2d}) - N(R^{3d}, R^{4d}); un anillo heterocíclico - (CH₂)₀₋₆- N(R^{3d}) C de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, y un anillo heterocíclico - (CH₂)₀₋₆ de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

R^{5a}, R^{2d}, R^{3d} y R^{4d} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H, C1- 6- alquilo, C1- 6- alquilarilo, - CN; - NO₂; arilo carbocíclico, - CN; - NO₂; o R^{2d} y R^{3d} tomados junto con el átomo N al cual están independientemente fijado forman un anillo heterocíclico de a 5- 7 miembros; o R^{3d} y R^{4d} tomados junto con el átomo N al cual están fijados forman un anillo heterocíclico de 5- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

J es un enlace directo o es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: - N(- R⁹) - C(=O) - ; - C(=O) - N(- R⁹) - ; - O- ; - S- ; - SO- ; - SO₂- ; - CH₂- ; - N(- R⁹) - ; y - N(- R⁹) - SO₂- ;

R⁹ es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; - C1- 4- alquilo; - C0- 4- alquil- arilo carbocíclico; anillo heterocíclico - (CH₂)₀₋₄ de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S; - (CH₂)₁₋₆- C(=O) - O- C1- 4- alquilo; y - (CH₂)₁₋₆- C(=O) - N(R^{6a}, R^{6b});

R^{6a} y R^{6b} son cada uno un miembro independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de: H y - C1- 6- alquilo;

X es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

- (a) fenilo sustituido con 0- 3 grupos R^{1e};
- (b) naftilo sustituido con 0- 3 grupos R^{1e} y
- (c) un sistema anular heterocíclico aromático de 6 miembros conteniendo 1- 3 átomos N y con 0- 3 átomos cíclicos sustituidos por 0- 3 grupos R^{1e}; y

(d) un sistema anular bicíclico heterocíclico aromático fusionado de 8- 10 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S y 0- 3 átomos cíclicos del sistema anular bicíclico heterocíclico fusionado son sustituidos con 0- 3 grupos R^{1e};

R^{1e} es un miembro independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de: halo; CF₃; - C1- 4- alquilo; arilo carbocíclico; - C0- 2- alquilenos- CN; - O- R^{2e};

18

- C₀₋₂- alquilenos- C(=O) - O- R^{2e}; - C₀₋₂- alquilenos- C(=O) - N(R^{2e}, R^{3e}) ; - C₀₋₂- alquilenos- NO₂;
- C₀₋₂- alquilenos- N(R^{2e}, R^{3e}) ; - C₀₋₂- alquilenos- SO₂- N(R^{2e}, R^{3e}) ; - C₀₋₂- alquilenos- SO₂- R^{2e};
trihaloalquilo; - O- C₀₋₂- alquilenos- O- R^{2e}; - C₀₋₂- alquilenos- O- R^{2e}; - O- C₁₋₄- alquilenos-
C(=O) - N(R^{2e}, R^{3e}) ; - O- C₁₋₄- alquilenos- C(=O) - O- R^{2e}; - C₀₋₂- alquilenos-
5 N(R^{2e}) - C(=O) - R^{3e}; - C₀₋₂- alquilenos- N(- R^{2e}) - SO₂- R^{3e}; - CH₂- N(R^{2e}) - C(=O) - R^{3e}
;- CH₂- N(R^{2e}) - SO₂- R^{3e}; - (CH₂)₀₋₆- NR^{2e}R^{3e}; - C(=O) - N(R^{2e}, R^{3e}) ; - N(- (CH₂)₁₋₆- OR^{2e})₂;
- N(R¹⁰) - (CH₂)₁₋₆- OR^{2e}; - N(R¹⁰) - C(=O) - R^{2e}; - N(R¹⁰) - SO₂- R^{2e};
- C(=N(R)) - N(R^{1e}, R^{1e}) ; y un anillo heterocíclico - (CH₂)₀₋₆ de 5- 6 miembros conteniendo
1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

10 R¹⁰, R^{2e} y R^{3e} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del
grupo que consta de: H; - C₁₋₄- alquilo; - C₀₋₂- alquilenos- O- R^{1g}; - C₀₋₂- alquilenos-
N(- R^{1g}, - R^{2g}) ; - C₁₋₄- alquilenos- arilo carbocíclico; - C₁₋₄- alquilenos- heterocíclico; y

R¹⁰ y R^{2e}, o R^{2e} y R^{3e} junto con el átomo N al cual están fijados pueden formar un anillo
heterocíclico de 5- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y

15 S los cuales pueden ser sustituidos por 0- 2 grupos R^{1g};

R^{1g} y R^{2g} son independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo de: H; halo;
- C₁₋₄- alquilo, un grupo arilo carbocíclico; un grupo heterocíclico; - CN; - C(=O) - N(R^{3g}) R^{4g};
- C(=O) - OR^{3g}; - NO₂; - (CH₂)_p- NR^{3g}R^{4g}; - SO₂NR^{3g}R^{4g}; - SO₂R^{3g}; - CF₃; y - (CH₂)_pOR^{3g};

p es un entero de 0- 2; y

20 R^{3g} y R^{4g} son cada uno independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de
H; C₁₋₄- alquilo y - C₀₋₄- alquilenos- arilo carbocíclico;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa
es una dosis diaria agregada entre 0.01 y 2.0 mg/kg aproximadamente.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad inhibitoria de la
coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.1 y 1.5
mg/kg aproximadamente.

30 3. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad inhibitoria de la
coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.4 y 1.2

182

mg/kg aproximadamente.

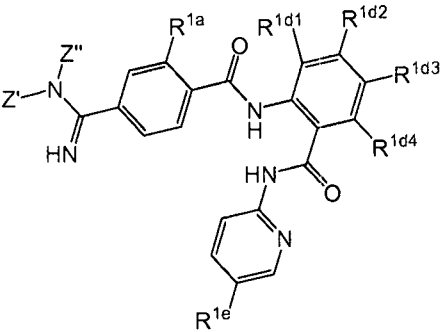
4. El método de la reivindicación 1, en donde la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto inhibidor del factor Xa es una sal de maleato.

5

5. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto inhibidor del factor Xa es administrado al paciente una vez al día.

6. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto inhibidor del factor Xa se administra al paciente dos veces al día o tres veces al día.

7. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto inhibidor del factor Xa es de la Fórmula IV:



IV

15 en donde:

Z' y Z'' son cada uno independientemente un C1- C6 alquilo el cual es opcionalmente sustituido por u grupo hidroxilo, ácido carboxílico o éster de ácido carboxílico;

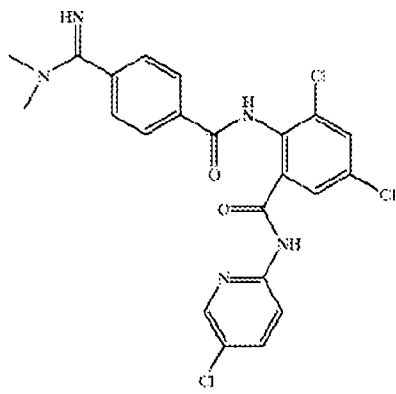
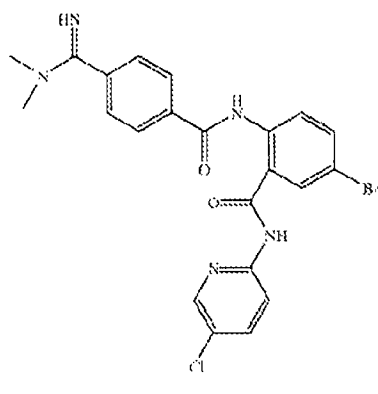
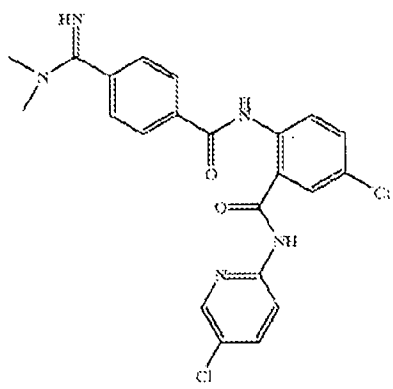
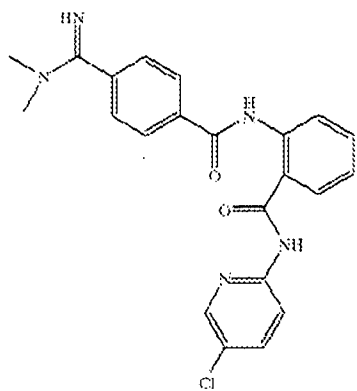
R^{1a} se selecciona a partir del grupo que consta de: H, - F, - Cl, y Br;

R^{1d2} y R^{1d4} son cada uno H;

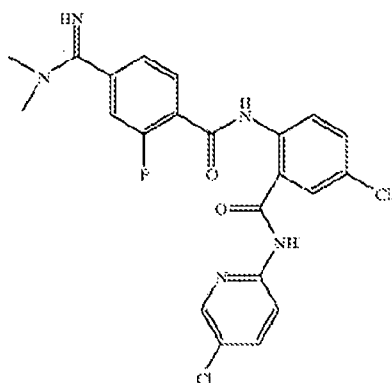
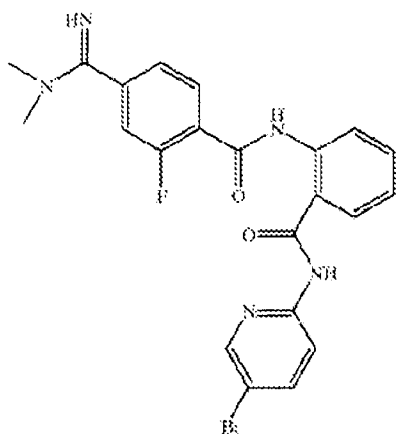
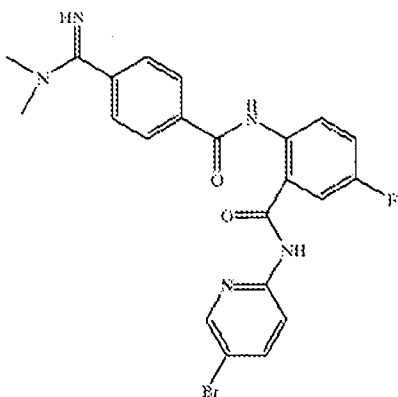
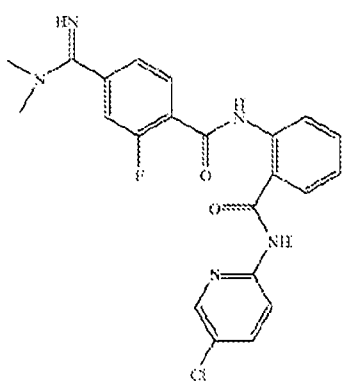
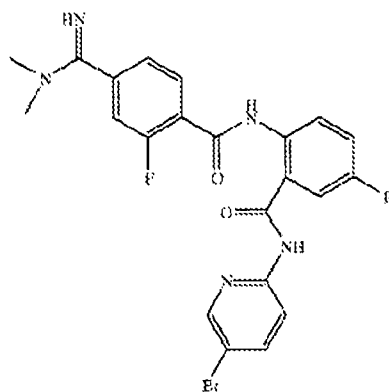
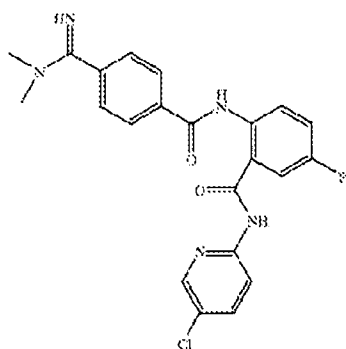
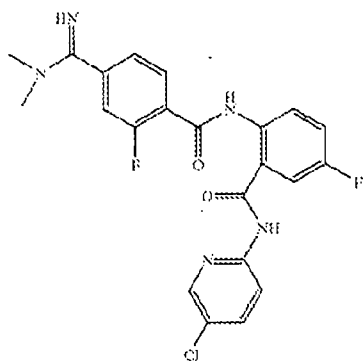
20 R^{1d1} y R^{1d3} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H, - Cl, - F, - Br, - OH y - OCH₃; y

R^{1e} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: - F, - Cl, - Br, - OH, - CH₃, y - OCH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

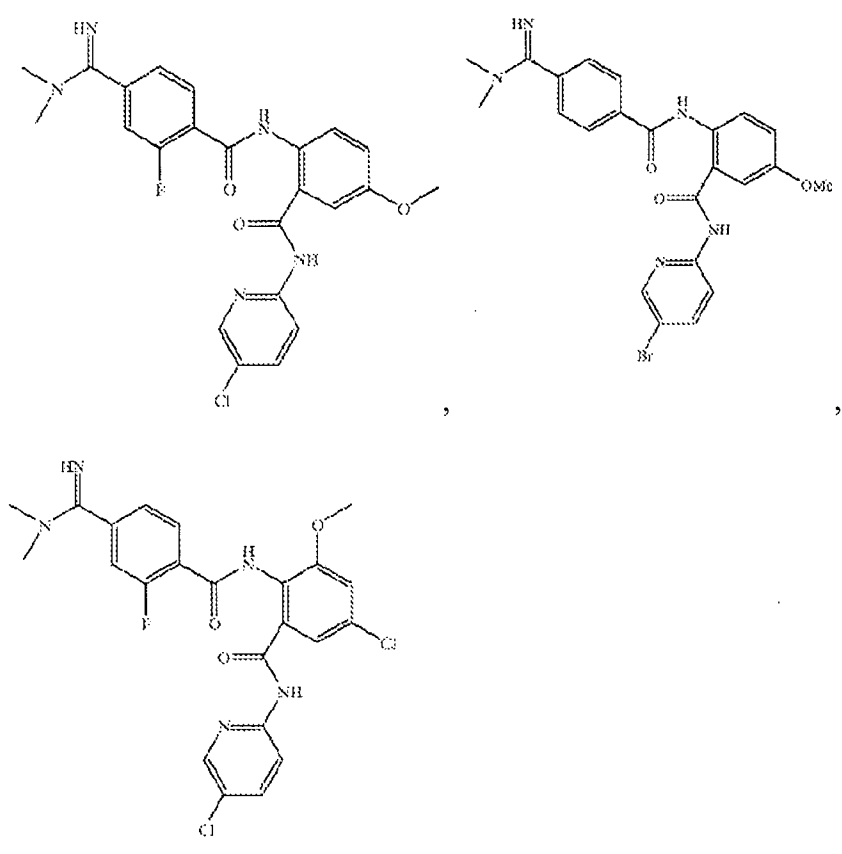
8. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona a partir del grupo que consta de:



184

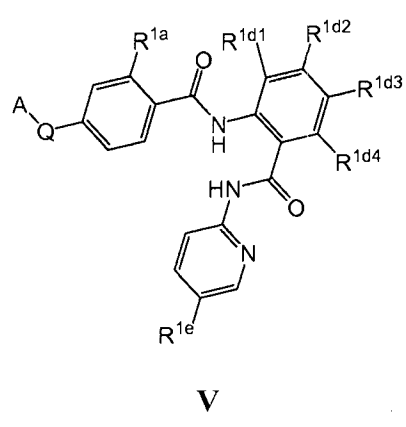


185



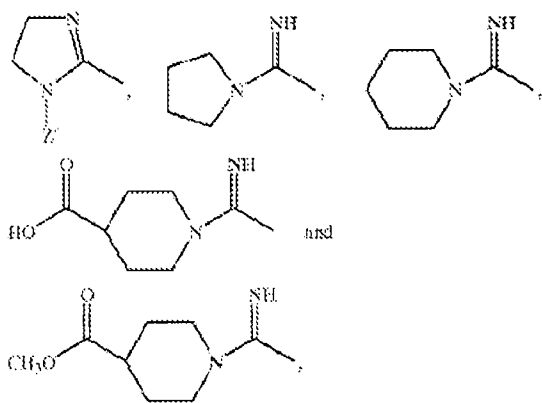
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 9. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto inhibidor del factor Xa es de la Fórmula V:



en donde:
 A- Q es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

186



donde Z' es un C1- 6 alquilo el cual es opcionalmente sustituido por un grupo hidroxilo, ácido carboxílico o éster de ácido carboxílico;

R^{la} se selecciona a partir del grupo que consta de: H, - F, - Cl, y Br;

R^{ld2} y R^{ld4} son cada uno H;

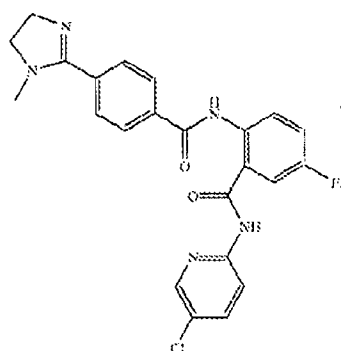
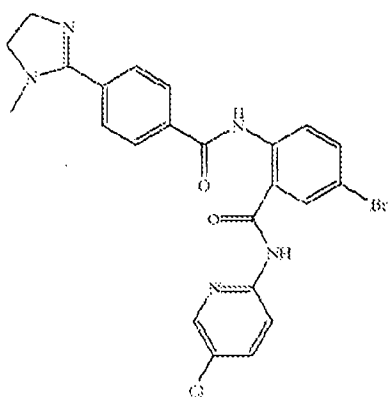
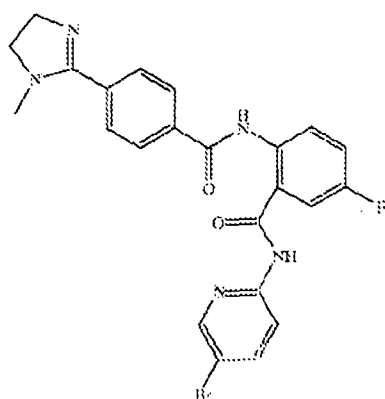
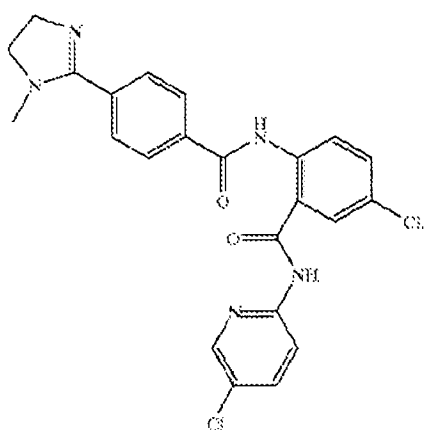
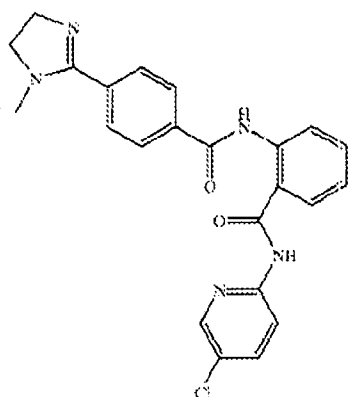
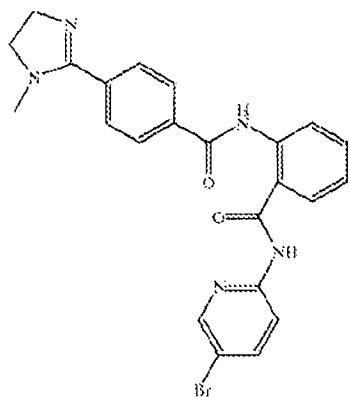
R^{ld1} y R^{ld3} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H, - Cl, - F, - Br, - OH y - OCH₃; y

R^{le} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: - F, - Cl, - Br, - OH, - CH₃, y - OCH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

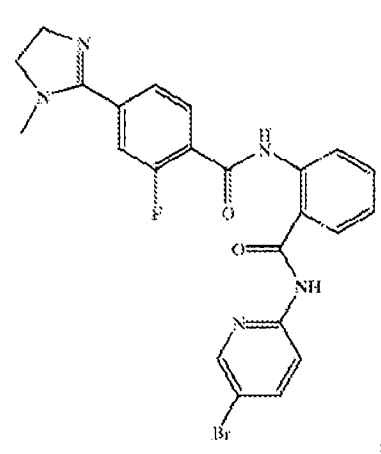
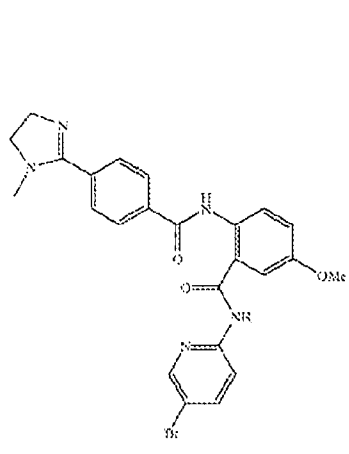
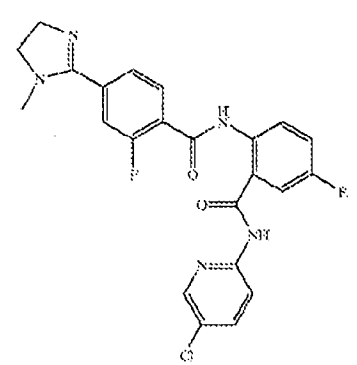
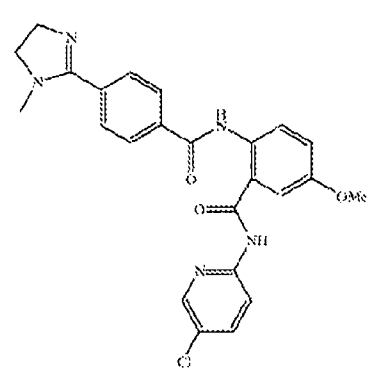
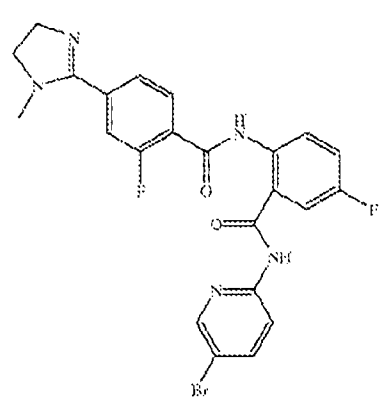
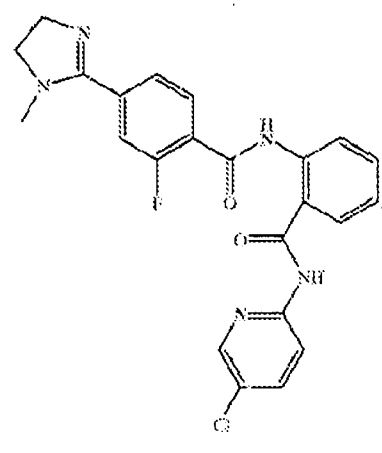
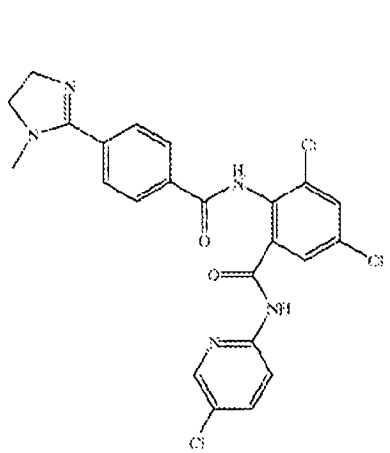
10

10. El compuesto de la reivindicación 9, en donde el compuesto se selecciona a partir del grupo que consta de:

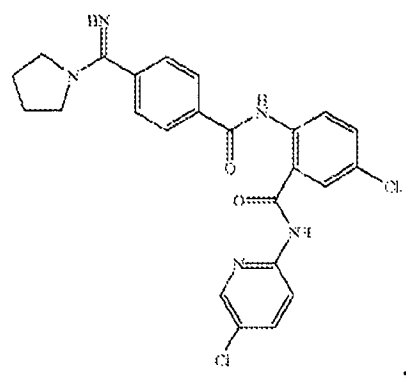
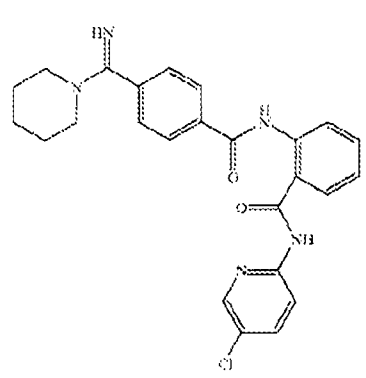
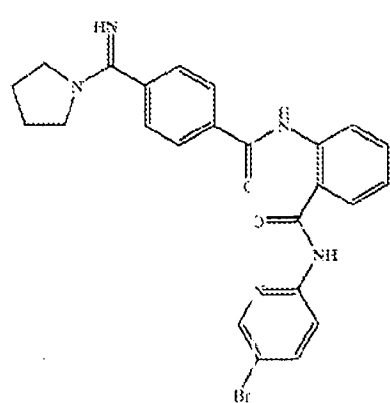
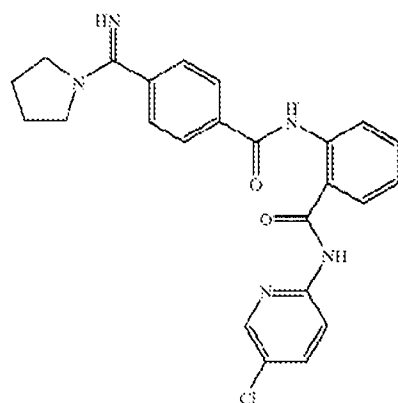
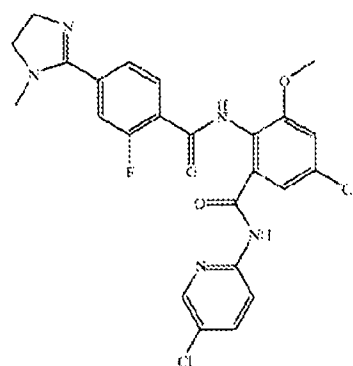
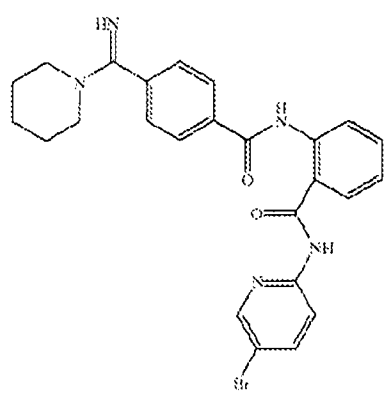
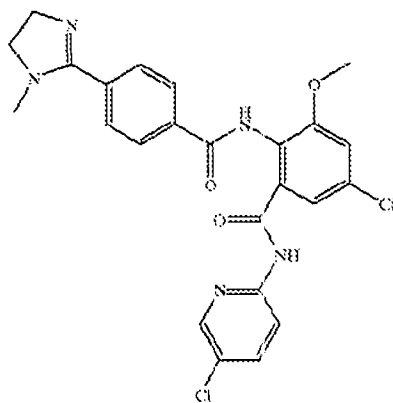
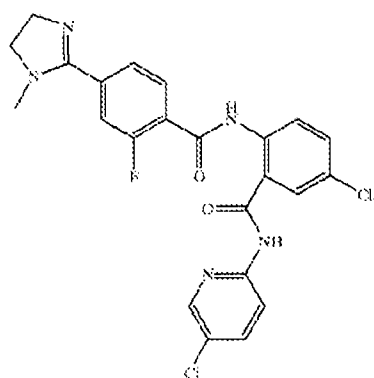
182



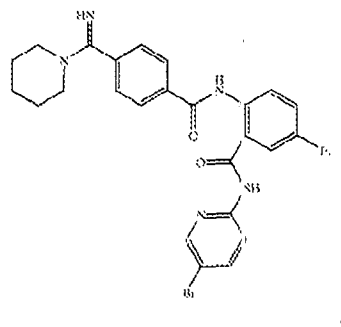
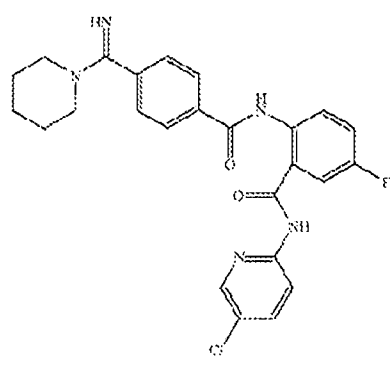
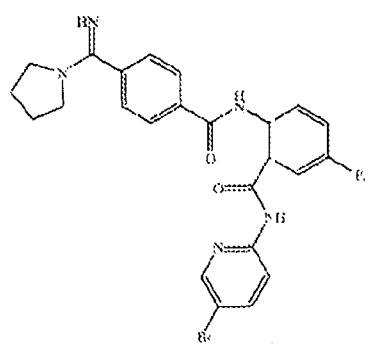
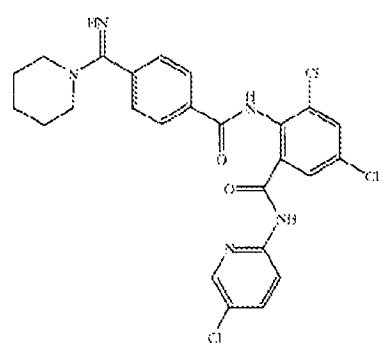
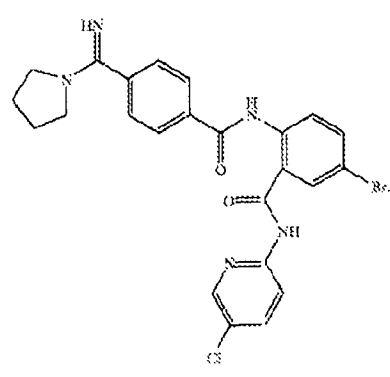
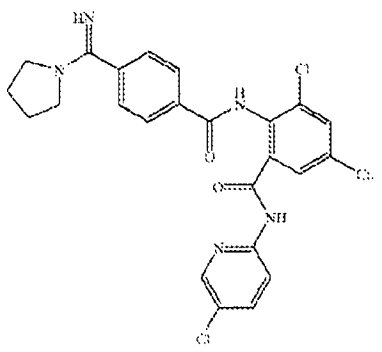
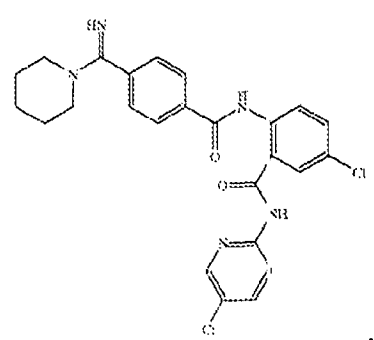
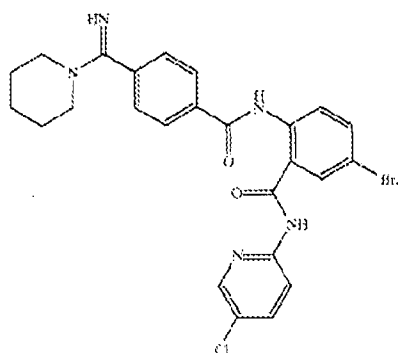
188



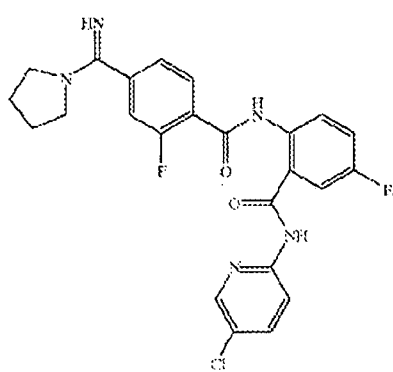
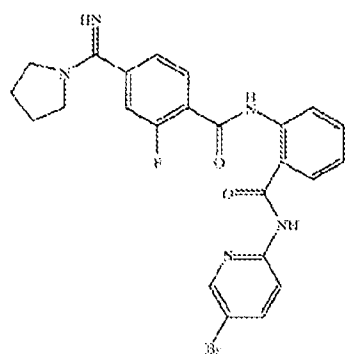
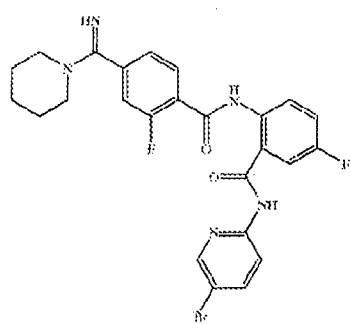
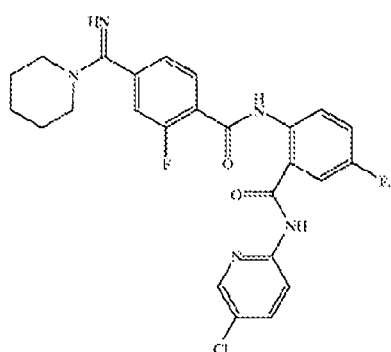
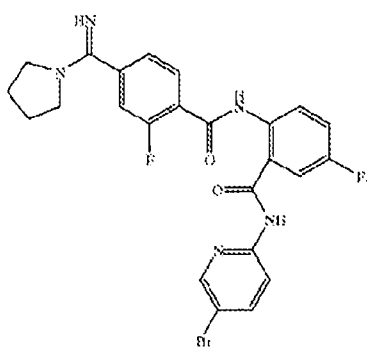
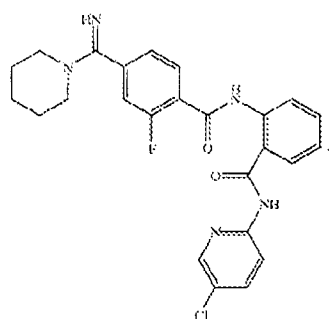
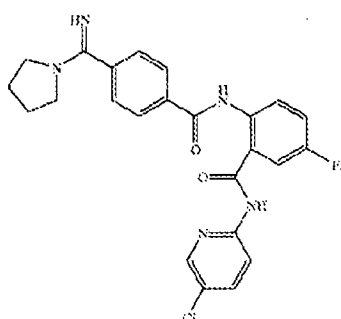
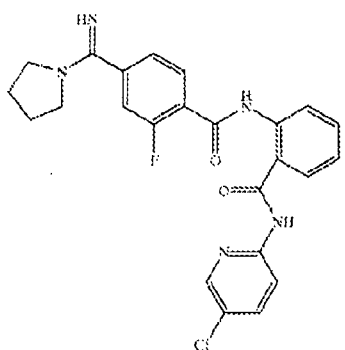
189



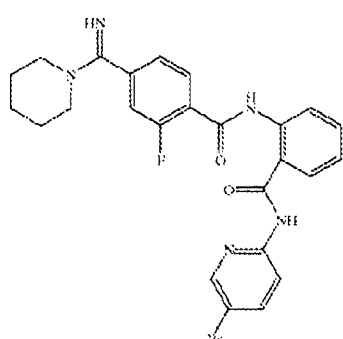
190



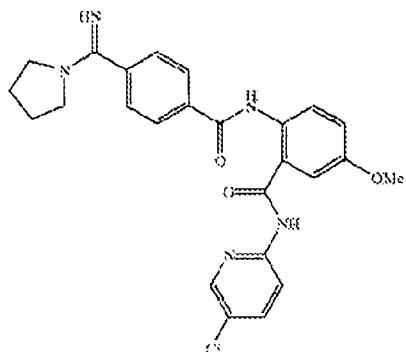
191



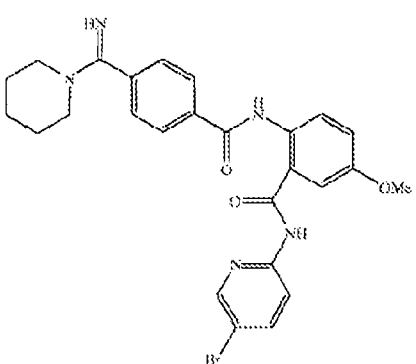
102



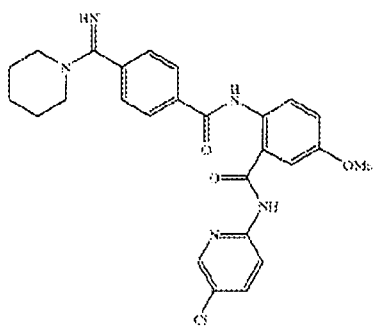
3



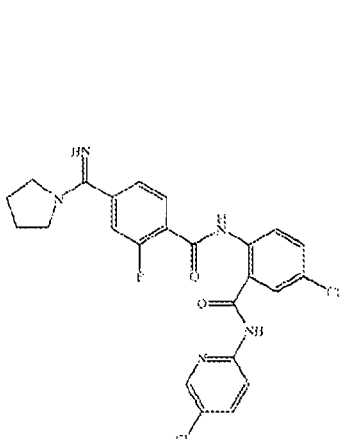
3



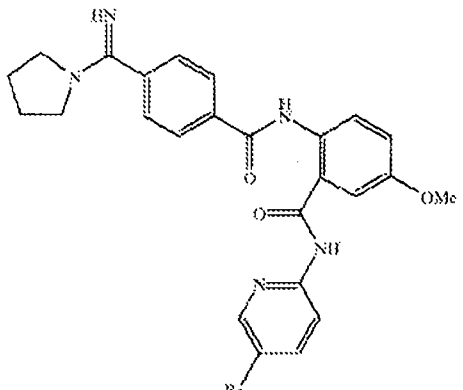
3



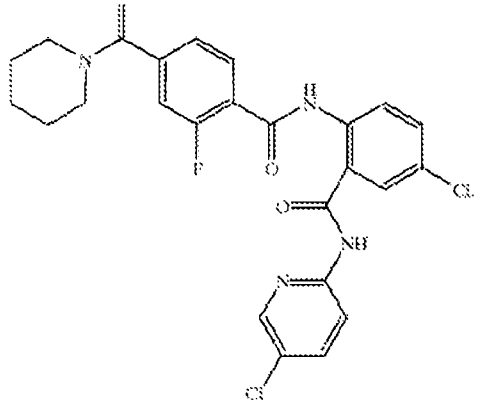
3



3



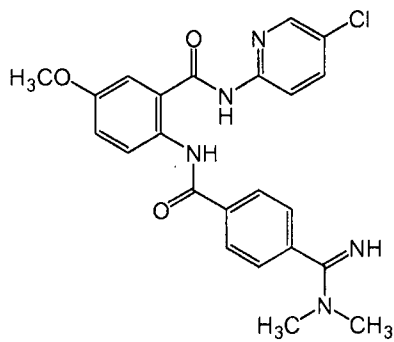
3



193

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

11. Un método para inhibir coagulación en un paciente humano en necesidad de lo mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad inhibitoria de la coagulación de un compuesto inhibidor del factor Xa de la Fórmula II:



o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.01 y 2.0 mg/kg aproximadamente.

12. El método de la reivindicación 11, en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre 0.1 y 1.5 mg/kg aproximadamente.

13. El método de la reivindicación 12, en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada entre aproximadamente 0.4 y aproximadamente 1.2 mg/kg.

14. El método de la reivindicación 12, en donde la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto inhibidor del factor Xa es una sal de maleato.

15. Una formulación de dosis unitaria que comprende una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa de la Fórmula I:

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

en donde:

A se selecciona a partir de:

(a) C1- C6- alquilo;

(b) C₃- C₈- Cicloalquilo;

(c) - N(R¹R²) , N(R¹,R²) - C(=NR³) - , N(R¹,R²) - C(=NR³) - N(R⁴) - , R¹- C(=NR³) - , R¹- C(=NR³) - N(R⁴) - ;

(d) fenilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 sustituyentes R;

(e) naftilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 Sustituyentes R; y

un sistema anular monocíclico o heterocíclico bicíclico fusionado que tiene entre 5 y 10 átomos cíclicos, en donde 1- 4 átomos cíclicos del sistema anular son seleccionados a partir de N, O y S, y en donde el sistema anular se puede sustituir con 0- 2 sustituyentes R;

R se selecciona a partir de: del grupo H, halo, - CN, - CO₂R¹, - C(=O) - N(R¹, R²) , - (CH₂)_m- CO₂R¹, - (CH₂)_m- C(=O) - N(R¹, R²) , - NO₂, - SO₂N(R¹, R²) , - SO₂R¹, - (CH₂)_mNR¹R², - (CH₂)_m- C(=NR³) - R¹, - (CH₂)_m- C(=NR³) - N(R¹,R²) , - (CH₂)_m- N(R⁴) - C(=NR³) - N(R¹,R²) , - (CH₂)_mNR¹anexado a un anillo heterocíclico de 3 a 6 miembros conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenoilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CF₃, - O, y un sistema heterocíclico de 5- 6 miembros conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- C4- alquilo, - C1- 4alquil- CN, - C2- 6alquenoilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo y - NO₂;

m es un entero de 0- 2;

R¹, R², R³ y R⁴ son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de: H, - OR⁵, - N(- R⁵, - R⁶) , - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenoilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilfenilo y - C0- 4alquilnaftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo pueden ser independientemente reemplazados por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenoilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CN, y - NO₂; o R¹ y R², o R² y R³ tomados juntos pueden formar un cicloalquilo

105

de 3- 8 miembros o un sistema anular heterocíclico, en donde el sistema anular heterocíclico puede tener entre 3 y 10 átomos cíclicos, con 1 a 2 anillos en el sistema anular y contienen entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema anular heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro
5 seleccionado a partir del grupo que consta de halo, C1- C4- alquilo, - CN, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo y - NO₂;

R⁵ y R⁶ son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de:
H, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- fenil y - C0- 4alquilenilo- naftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de
10 hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CN, y - NO₂; o R⁵ y R⁶ tomados juntos pueden formar un un cicloalquilo de 3- 8 miembros o un sistema anular heterocíclico, en donde el sistema anular heterocíclico puede tener

entre 3 y 10 átomos cíclicos, con 1 a 2 anillos en el sistema anular y contienen entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema anular heterocíclico se pueden independientemente reemplazar por un miembro
15 seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- C4- alquilo, - CN, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo y - NO₂;

Q es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: un enlace directo, - CH₂- ,
20 - C(=O) - , - O - , - N(R⁷) - , - N(R⁷) CH₂- , - CH₂N(R⁷) - , - C(=NR⁷) - , - C(=O) - N(R⁷) - , - N(R⁷) - C(=O) - , - S - , - SO - , - SO₂- , - SO₂- N(R⁷) - y - N(R⁷) - SO₂- ;

R⁷ se selecciona a partir de H, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- fenil y - C0- 4alquilenilo-
25 naftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8cicloalquilo, - CN, y - NO₂;

D es un enlace directo o es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:
30 (a) fenilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 Sustituyentes R1a;
(b) naftilo, el cual es independientemente sustituido por 0- 2 Sustituyentes R1a; y

(c) un sistema anular monocíclico o heterocíclico bicíclico fusionado que tiene entre 5 y 10 átomos cíclicos, en donde 1- 4 átomos cíclicos del sistema anular son seleccionados a partir de N, O y S, y en donde el sistema anular se puede sustituir desde 0- 2 sustituyentes R^{1a};

R^{1a} se selecciona a partir de: halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CN, - NO₂, - (CH₂)_nNR^{2a}R^{3a}, - (CH₂)_nC(O)R^{2a}, - (CH₂)_nCONR^{2a}R^{3a}, - SO₂NR^{2a}R^{3a}, - SO₂R^{2a}, - CF₃, - OR^{2a}, y un sistema heterocíclico aromático de 5- 6 miembros conteniendo entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre el sistema heterocíclico aromático se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CN y - NO₂;

R^{2a} y R^{3a} son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de:

H, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- fenilo y - C0- 4alquilenilo- naftilo, en donde entre 1 y 4 átomos de hidrógeno sobre los átomos cíclicos de las fracciones de fenilo y naftilo se pueden independientemente reemplazar por un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de halo, - C1- 4alquilo, - C2- 6alquenilo, - C2- 6alquinilo, - C3- 8Cicloalquilo, - C0- 4alquilenilo- C3- 8Cicloalquilo, - CN y - NO₂;

n es un entero de 0- 2;

E es un enlace directo o un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

- C1- 2- alquilenilo- , - O- , - S- , - SO- , - SO₂- , - C₀₋₁- alquilenilo- C(=O) , - C0- 1- alquilenilo- C(=O) - N(- R⁸) - C₀₋₁- alquilenilo- , - C₀₋₁- alquilenilo- N(- R⁸) - C(=O) - C₀₋₁- alquilenilo- , - N(- R⁸) - C(=O) - N(- R⁸) - y - C₀₋₁- alquilenilo- N(- R⁸) - ;

R⁸ es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H, - C1- 4- alquilo; - C0- 4- alquilenilo- arilo; - C0- 4- alquilenilo- heteroarilo; - C₁₋₄- alquilenilo- C(=O) - OH, - C1- 4- alquilenilo- C(=O) - O- C1- 4- alquilo, y - C₁₋₄- alquilenilo- C(=O) - N(- R^{2b}, - R^{3b}) ;

R^{2b} y R^{3b} son cada uno un miembro independientemente seleccionados a partir del grupo que consta del grupo H, - C1- 4- alquilo, - C0- 4- alquilenilo- arilo; - C0- 4- alquilenilo- heterocíclico, y R^{2b} y R^{3b} junto con el átomo N al cual están fijados pueden formar un anillo heterocíclico de 5- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde el anillo heterocíclico se puede sustituir con 0- 2 grupos R^{1c};

R^{1c} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: halo; - C1- 4- alquilo; - CN; - NO₂; - C(=O) - N(- R^{2c}, - R^{3c}) ; - C(=O) - OR^{2c}; - (CH₂)_q- N(- R^{2c}, - R^{3c}) ; - SO₂- N(- R^{2c}, - R^{3c}) ; - SO₂R^{2c}; - CF₃; y - (CH₂)_q- OR^{2c};

R^{2c} y R^{3c} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; - C1- 4- alquilo; y - C1- 4- alquilen- arilo;

q es un entero de 0- 2;

G es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

(a) C₂- alquenal o C₃- 8- Cicloalquenal, en donde los puntos de fijación de alquenal y cicloalquenal son los átomos de carbono de alquenal y en donde el - C₂- alquenal o - C₃- 8-

Cicloalquenal son sustituidos por 0- 4 grupos R^{ld};

(b) un grupo fenilo en donde los átomos de carbono cíclico del grupo fenileno son sustituidos por 0- 4 grupos R^{ld};

(c) un sistema anular heterocíclico de 3- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde 0- 2 átomos cíclicos del anillo heterocíclico se pueden sustituir por 0- 4 grupos R^{ld}; y,

(d) un sistema anular bicíclico heterocíclico fusionado de 8- 10 miembros, conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, en donde 0- 2 átomos cíclicos del sistema anular bicíclico fusionado se puede sustituir con 0- 4 grupos R^{ld};

R^{ld} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H, halo; C1- 6- alquilo, arilo, - CN; - NO₂; - (CH₂)_{0- 6}- NR^{2d}R^{3d}; - SO₂NR^{2d}R^{3d}; - SO₂R^{2d}; - CF₃; - (CH₂)_{0- 6}- OR^{2d}; - O- (CH₂)_{1- 6}OR^{2d}; - O- (CH₂)_{1- 6}- C(=O) - O- R^{2d}; - O- (CH₂)_{1- 6}- C(=O) - N(R^{2d},R^{3d}) ; - N(R^{5a}) - (CH₂)_{1- 6}- OR^{2d}; - N(R^{5a}) - (CH₂)_{1- 6}- N(R^{2d},R^{3d}) ; - C(=O) - N(R^{2d},R^{3d}) ; - N(R^{5a}) - (CH₂)_{1- 6}- C(=O) - N(R^{2d},R^{3d}) ; - N(- (CH₂)_{1- 6}- OR^{2d})₂;

- N(R^{5a}) - (CH₂)_{1- 6}- OR^{2d}; - N(R^{5a}) - C(=O) - R^{2d}; - N(R^{5a}) - SO₂- R^{2d}; - (CH₂)_{0- 6}- C(=O) - O- R^{2d}; - (CH₂)_{0- 6}- C(=O) - N(R^{2d},R^{3d}) ; - (CH₂)_{0- 6}- C(=NR^{2d}) - N(R^{3d},R^{4d}) ; - (CH₂)_{0- 6}- N(R^{5a}) C(=NR^{2d}) - N(R^{3d},R^{4d}) ; un anillo heterocíclico - (CH₂)_{0- 6}- N(R^{3d}) C de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S, y un anillo heterocíclico - (CH₂)_{0- 6} de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

R^{5a} , R^{2d} , R^{3d} y R^{4d} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del

grupo que consta de: H, C1- 6- alquilo, C1- 6- alquilarilo, - CN; - NO₂; arilo carbocíclico, - CN; - NO₂; o R^{2d} y R^{3d} tomados junto con los átomos N a los cuales están independientemente fijados forman un anillo heterocíclico de 5- 7 miembros; o R^{3d} y R^{4d} tomados junto con el átomo N al cual están fijados forman un anillo heterocíclico de 5- 8 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

J es un enlace directo o es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:
- N(- R⁹) - C(=O) - ; - C(=O) - N(- R⁹) - ; - O- ; - S- ; - SO- ; - SO₂- ; - CH₂- ; - N(- R⁹) - ; y - N(- R⁹) - SO₂- ;

R⁹ es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: H; - C1- 4- alquilo; - C0- 4- alquil- arilo carbocíclico; - (CH₂)_{0- 4}- anillo heterocíclico de 5- 6 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S; - (CH₂)_{1- 6}- C(=O) - O- C1- 4- alquilo; y - (CH₂)_{1- 6}- C(=O) - N(R^{6a}, R^{6b}) ;

R^{6a} y R^{6b} son cada uno un miembro independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de: H y - C1- 6- alquilo;

X es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

- (a) fenilo sustituido con 0- 3 grupos R^{1e};
- (b) naftilo sustituido con 0- 3 grupos R^{1e} y
- (c) un sistema anular heterocíclico aromático de 6 miembros conteniendo 1- 3 átomos N y con 0- 3 átomos cíclicos sustituidos por 0- 3 grupos R^{1e}; y
- (d) un sistema anular bicíclico heterocíclico aromático fusionado de 8- 10 miembros conteniendo 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S y 0- 3 átomos cíclicos del sistema anular bicíclico heterocíclico fusionado son sustituidos con 0- 3 grupos R^{1e};

R^{1e} es un miembro independientemente seleccionado a partir del grupo que consta de:

halo; CF₃; - C1- 4- alquilo; arilo carbocíclico; - C0- 2- alquilenos - CN; - O- R^{2e};
- C0- 2- alquilenos - C(=O) - O- R^{2e}; - C0- 2- alquilenos - C(=O) - N(R^{2e}, R^{3e}) ; - C0- 2- alquilenos - NO₂;
- C0- 2- alquilenos - N(R^{2e}, R^{3e}) ; - C0- 2- alquilenos - SO₂- N(R^{2e}, R^{3e}) ; - C0- 2- alquilenos - SO₂- R^{2e};
trihaloalquilo; - O- C0- 2- alquilenos - O- R^{2e}; - C0- 2- alquilenos - O- R^{2e}; - O- C1- 4- alquilenos - C(=O) - N(R^{2e}, R^{3e}) ; - O- C1- 4- alquilenos - C(=O) - O- R^{2e}; - C0- 2- alquilenos - N(R^{2e}) - C(=O) - R^{3e}; - C0- 2- alquilenos - N(- R^{2e}) - SO₂- R^{3e}; - CH₂- N(R^{2e}) - C(=O) - R^{3e};
;- CH₂- N(R^{2e}) - SO₂- R^{3e}; - (CH₂)_{0- 6}- NR^{2e}R^{3e}; - C(=O) - N(R^{2e}, R^{3e}) ; - N(- (CH₂)_{1- 6}- OR^{2e})
2;

- N(R¹⁰) - (CH₂)₁₋₆ - OR^{2e}; - N(R¹⁰) - C(=O) - R^{2e}; - N(R¹⁰) - SO₂ - R^{2e};
- C(=N(R¹⁰)) - N(R^{2e}, R^{3e}); y un anillo heterocíclico - (CH₂)₀₋₆ de 5-6 miembros conteniendo
1-4 heteroátomos seleccionados a partir de N, O y S;

R¹⁰, R^{2e} y R^{3e} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del
grupo que consta de: H; - C₁₋₄- alquilo; - C₀₋₂- alquileo- O- R^{1g}; - C₀₋₂- alquileo-
N(- R^{1g}, - R^{2g}); - C₁₋₄- alquileo- arilo carbocíclico; - C₁₋₄- alquileo- heterocíclico; y R¹⁰
y R^{2e}, o R^{2e} y R^{3e} junto con el átomo N al cual están fijados pueden formar un
anillo heterocíclico de 5-8 miembros conteniendo 1-4 heteroátomos seleccionados a partir de N,
O y S los cuales pueden ser sustituidos por 0-2 grupos R^{1g};

R^{1g} y R^{2g} son independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo de:
H; halo; - C₁₋₄- alquilo, un grupo arilo carbocíclico; un grupo heterocíclico; - CN;
- C(=O) - N(R^{3g}) R^{4g}; - C(=O) - OR^{3g}; - NO₂; - (CH₂)_p - NR^{3g}R^{4g}; - SO₂NR^{3g}R^{4g}; - SO₂R^{3g};
- CF₃; y - (CH₂)_pOR^{3g};

p es un entero de 0-2; y

R^{3g} y R^{4g} son cada uno independientemente seleccionados a partir del grupo que consta
de: H; C₁₋₄- alquilo y - C₀₋₄- alquileo- arilo carbocíclico;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

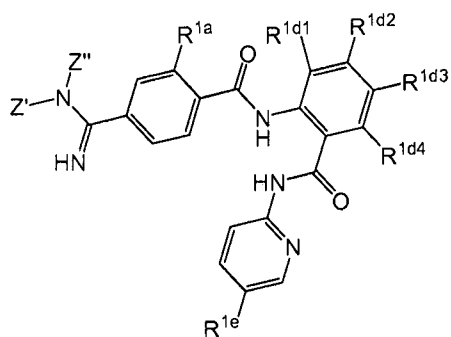
en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa
es una dosis diaria agregada entre 0.01 y 2.0 mg/kg aproximadamente.

16. Una formulación de dosis unitaria de la reivindicación 15, en donde la cantidad
inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada
entre 0.1 y 1.5 mg/kg aproximadamente.

17. Una formulación de dosis unitaria de la reivindicación 15, en donde la cantidad
inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada
entre 0.4 y 1.2 mg/kg aproximadamente.

18. Una formulación de dosis unitaria de la reivindicación 15, en donde la sal
farmacéuticamente aceptable del compuesto inhibidor del factor Xa es una sal de maleato.

19. Una formulación de dosis unitaria de la reivindicación 15, en donde el compuesto inhibidor del factor Xa es de la Fórmula IV:



IV

en donde:

5 Z' y Z'' son cada uno independientemente un C1- C6 alquilo el cual es opcionalmente sustituido por un grupo hidroxilo, ácido carboxílico o éster de ácido carboxílico;

R^{1a} se selecciona a partir del grupo que consta de: H, - F, - Cl, y Br;

R^{1d2} y R^{1d4} son cada uno H;

R^{1d1} y R^{1d3} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo

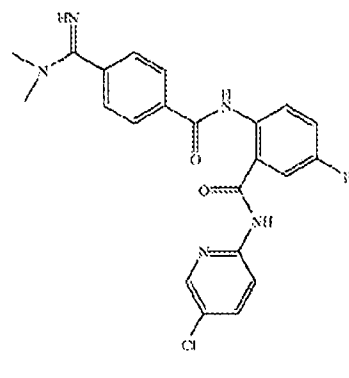
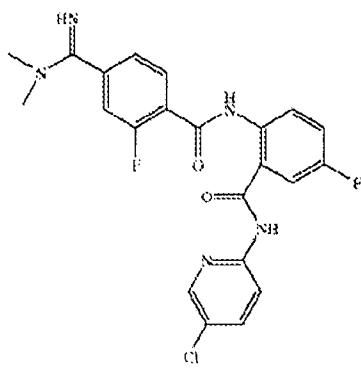
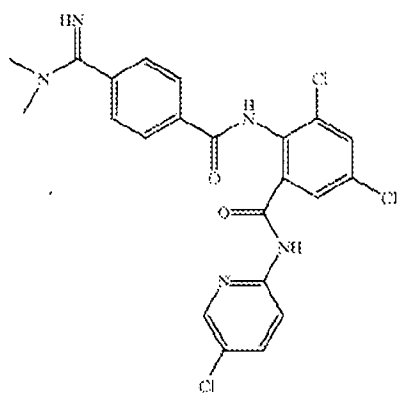
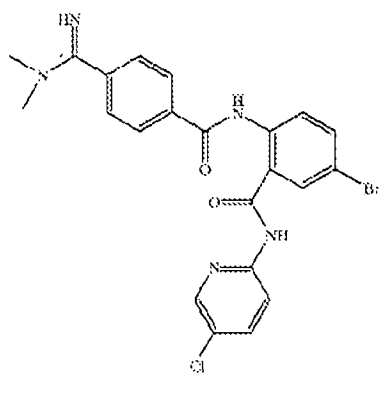
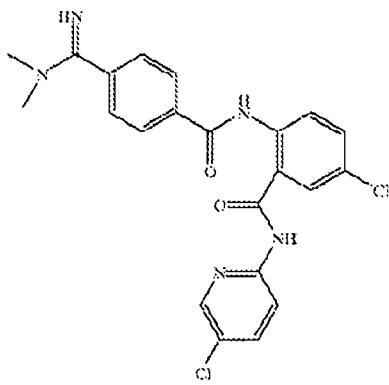
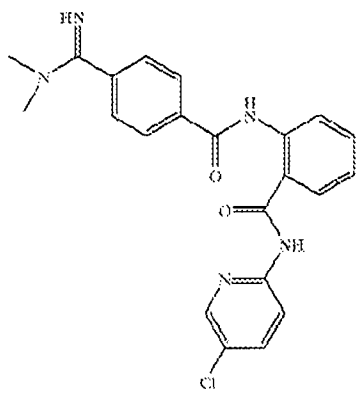
10 que consta de: H, - Cl, - F, - Br, - OH y - OCH₃; y

R^{1e} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:

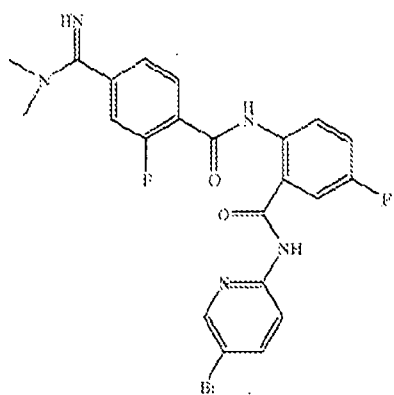
- F, - Cl, - Br, - OH, - CH₃, y - OCH₃, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20. Una formulación de dosis unitaria de la reivindicación 19, en donde el compuesto
15 se selecciona a partir del grupo que consta de:

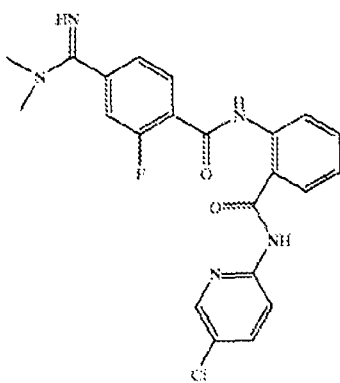
201



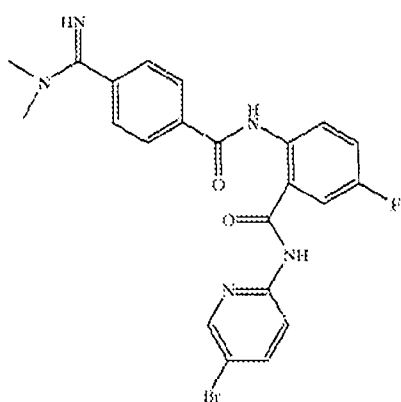
202



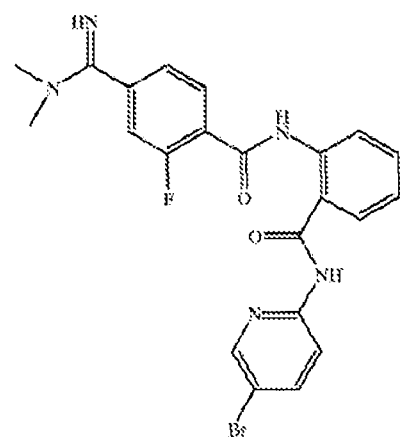
,



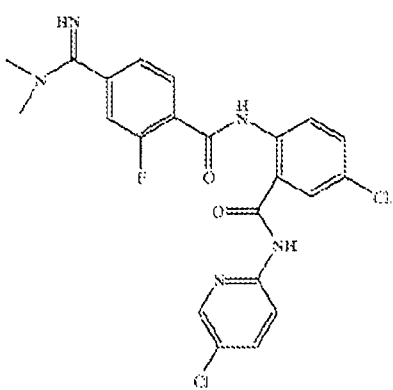
,



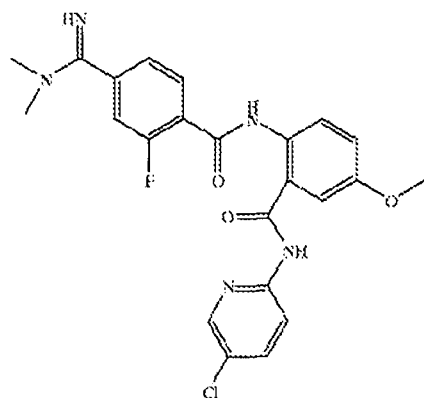
,



,

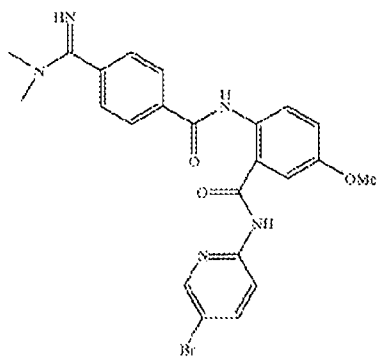


,

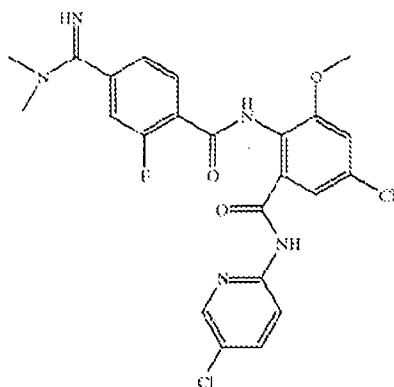


,

203



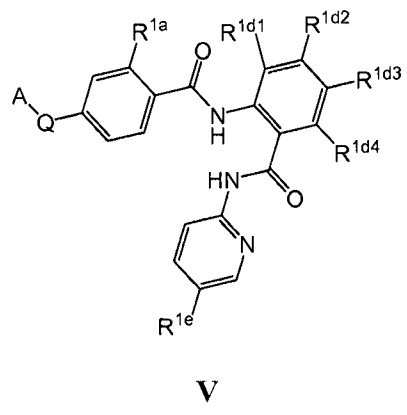
, y



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

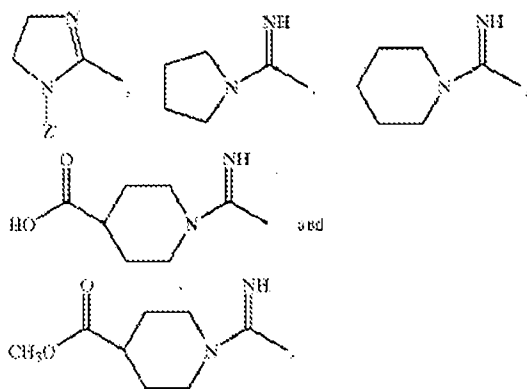
5

21. Una formulación de dosis unitaria de la reivindicación 15, en donde el compuesto inhibidor del factor Xa es de la Fórmula V:



en donde:

10 A- Q es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de:



201

donde Z' es un C1- 6 alquilo el cual es opcionalmente sustituido por un grupo hidroxilo, ácido carboxílico o éster de ácido carboxílico;

R^{la} se selecciona a partir del grupo que consta de: H, - F, - Cl, y Br;

5 R^{ld2} y R^{ld4} son cada uno H;

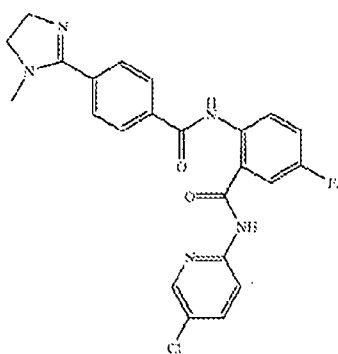
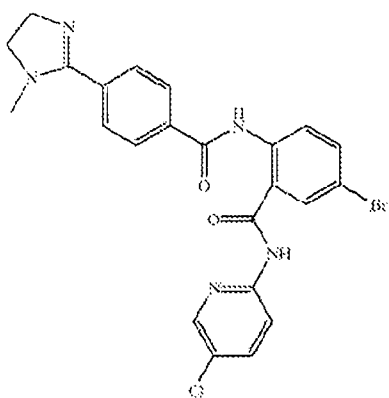
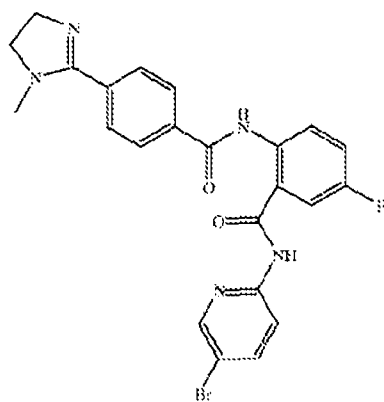
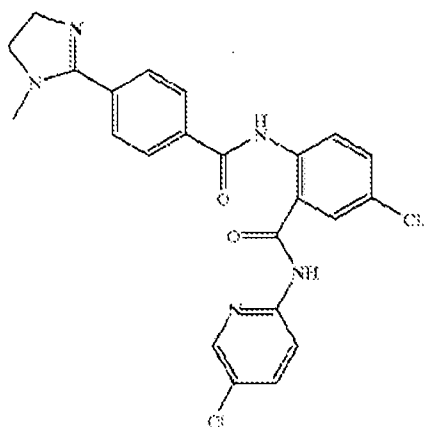
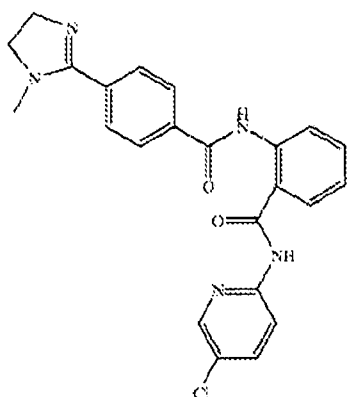
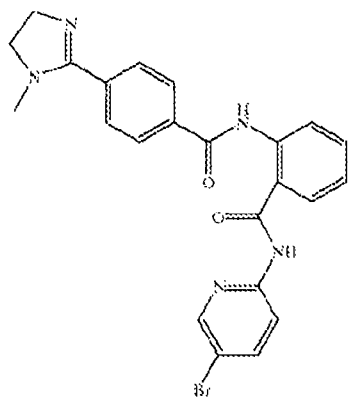
R^{ld1} y R^{ld3} son cada uno independientemente un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de H, - Cl, - F, - Br, - OH y - OCH₃; y

R^{le} es un miembro seleccionado a partir del grupo que consta de: - F, - Cl, - Br, - OH, - CH₃, y - OCH₃,

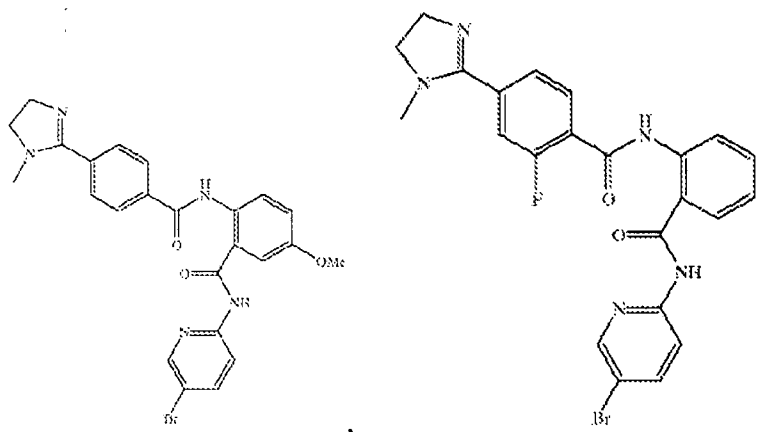
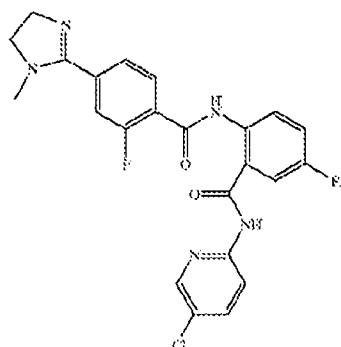
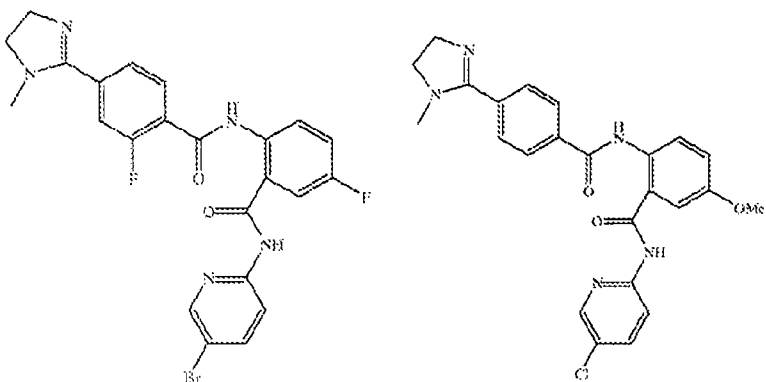
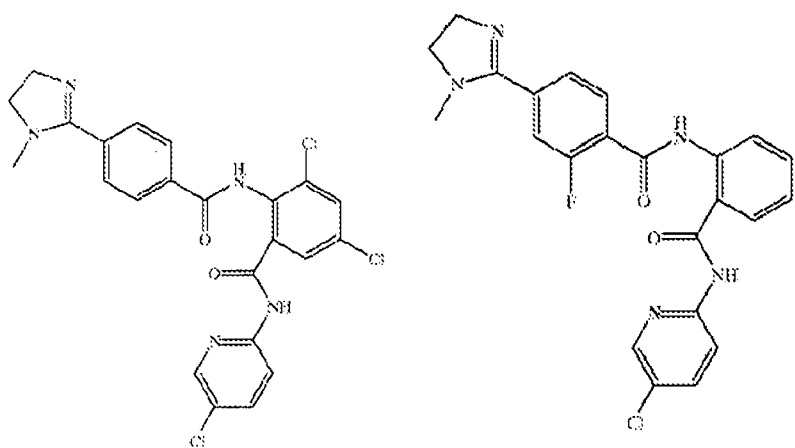
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

22. Una formulación de dosis unitaria de la reivindicación 21, en donde el compuesto se selecciona a partir del grupo que consta de:

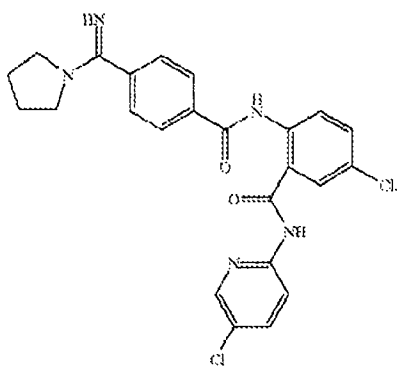
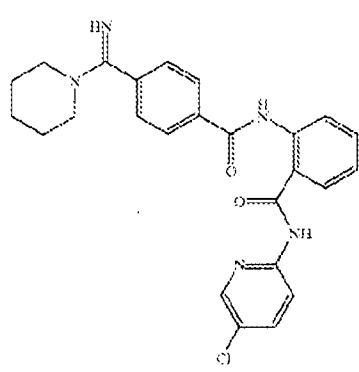
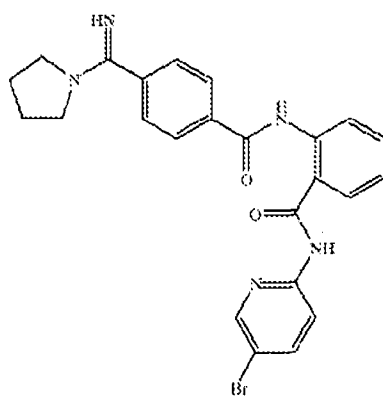
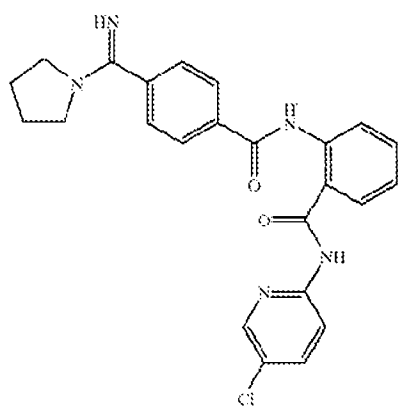
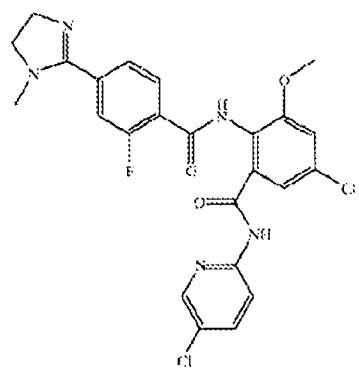
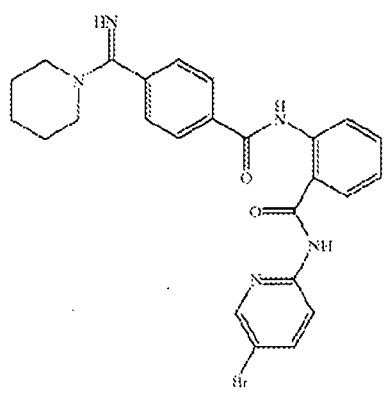
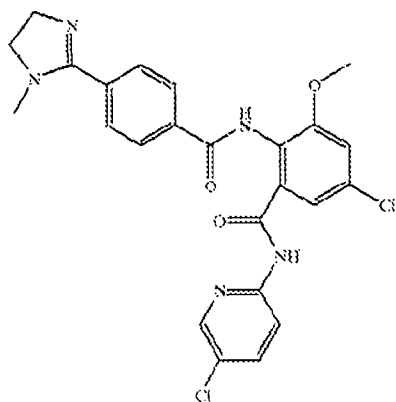
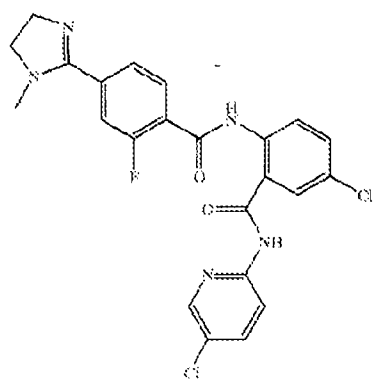
205



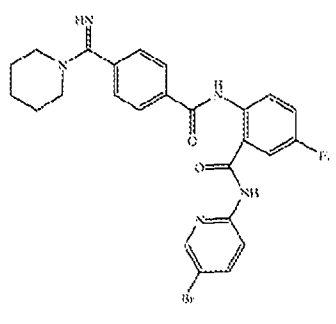
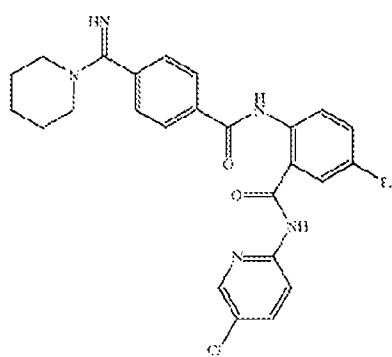
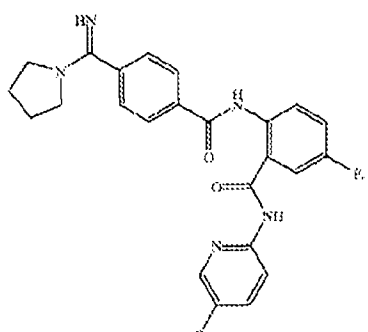
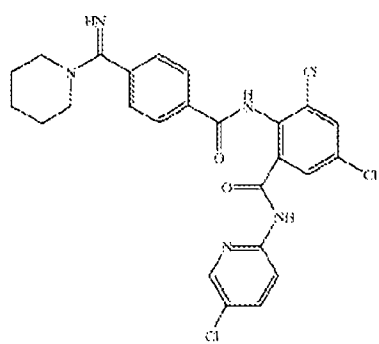
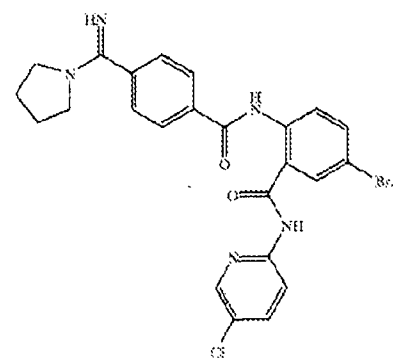
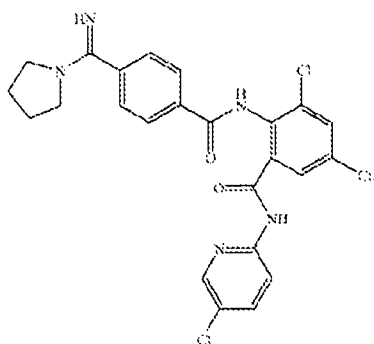
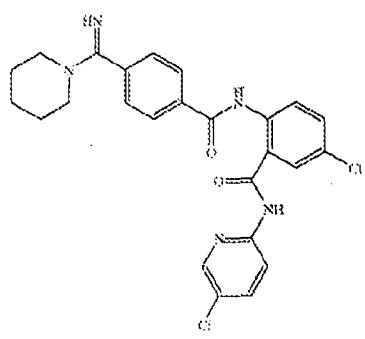
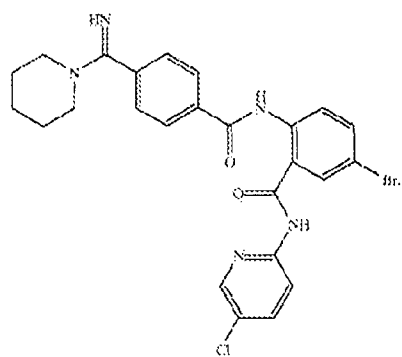
206



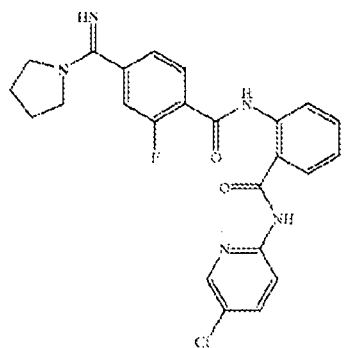
20



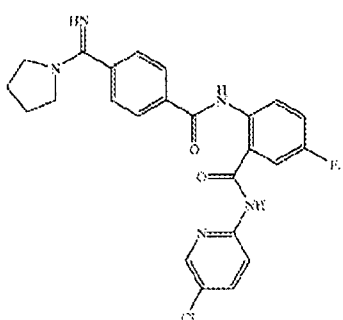
20



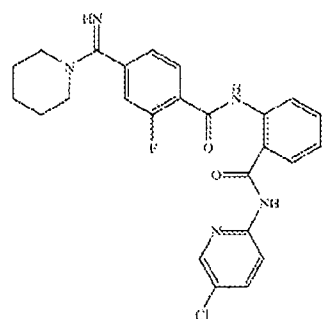
202



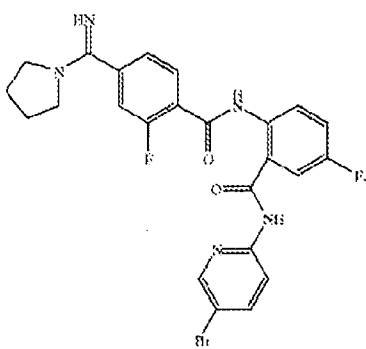
,



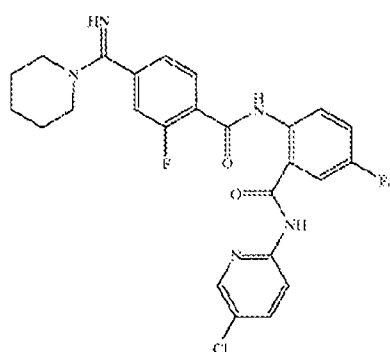
,



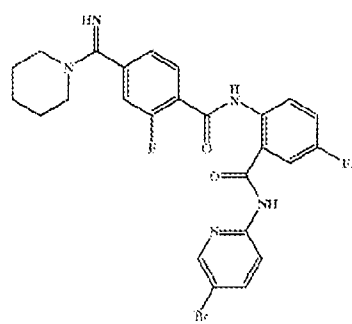
,



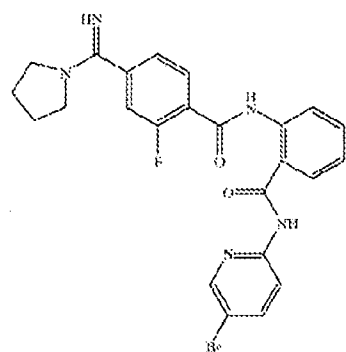
,



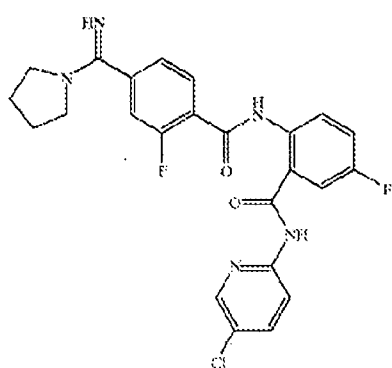
,



,

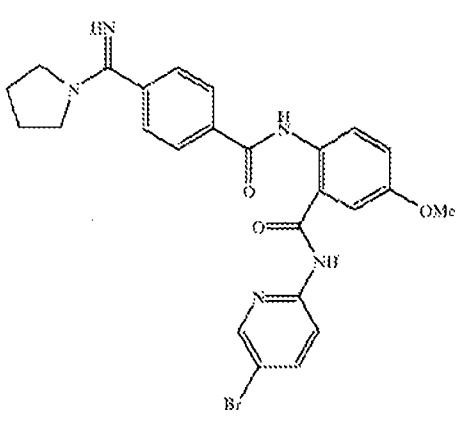
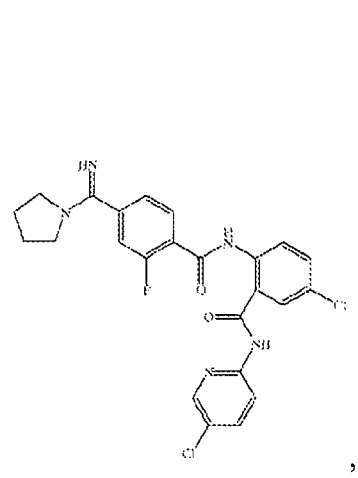
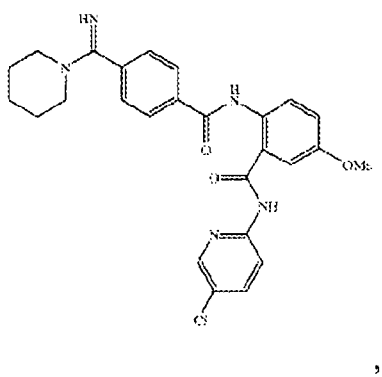
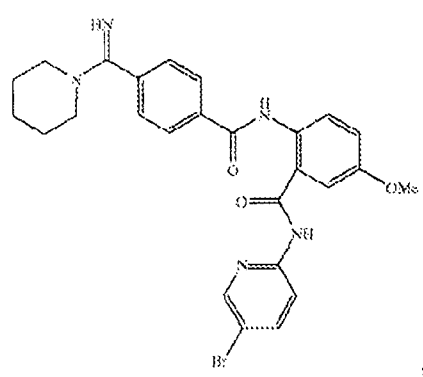
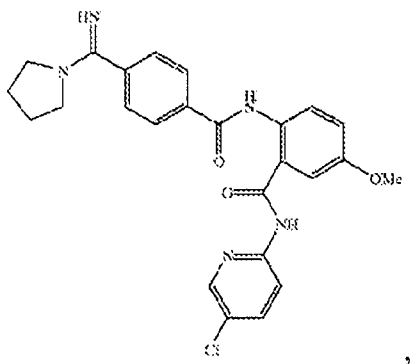
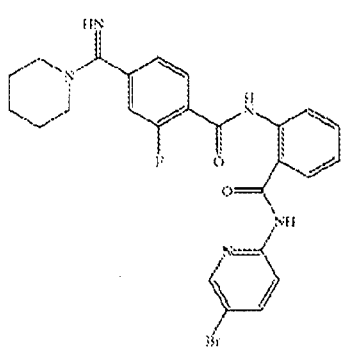


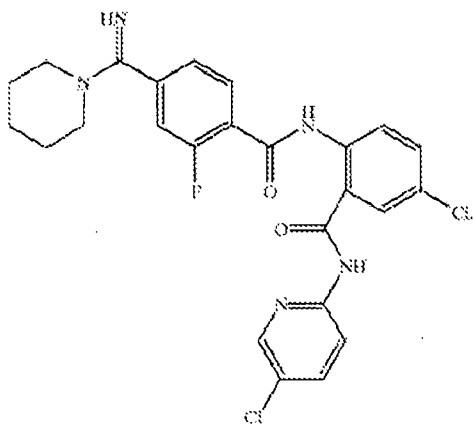
,



,

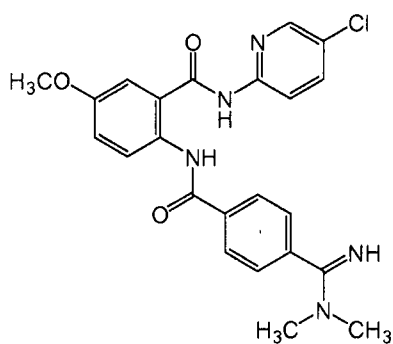
210





o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

23. Una formulación de dosis unitaria que comprende una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa II :



II

o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada de entre 0.01 y 2.0 mg/kg aproximadamente.

24. Una formulación de dosis unitaria de la reivindicación 23, en donde la cantidad inhibitoria de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria agregada de entre 0.1 y 1.5 mg/kg aproximadamente.

25. El método de la reivindicación 10, en donde la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto inhibidor del factor Xa es una sal de maleato.

27

26. Un ensayo in vitro para determinar si un compuesto tiene actividad antitrombótica en vivo que comprende:

a) introducir un compuesto de prueba en una muestra in vitro de sangre entera o plasma que comprende el factor tisular (TF) y un sustrato de trombina detectablemente rotulado para formar una muestra de prueba;

b) determinar el nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba al monitorear la escisión del sustrato de trombina detectablemente rotulado en la muestra de prueba como una función de tiempo;

c) determinar el nivel de actividad de trombina en una muestra de control al monitorear la escisión del sustrato de trombina detectablemente rotulado en la muestra de control como una función de tiempo, en donde la muestra de control comprende sangre entera o plasma que comprende el factor tisular (TF) y un sustrato de trombina detectablemente rotulado;

d) comparar el nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba y la muestra de control, en donde un nivel inferior de actividad de trombina en la muestra de prueba es una indicación que el compuesto de prueba tiene actividad antitrombótica in vivo.

27. El ensayo de la reivindicación 26, en donde la muestra de prueba y la muestra de control comprenden sangre entera.

28. El ensayo de la reivindicación 27, en donde la sangre entera es anticoagulada.

29. El ensayo de la reivindicación 27, en donde la sangre entera es no anticoagulada.

30. El ensayo de la reivindicación 26, en donde la muestra de prueba y la muestra de control comprenden plasma.

31. El ensayo de la reivindicación 30, en donde el plasma es anticoagulado.

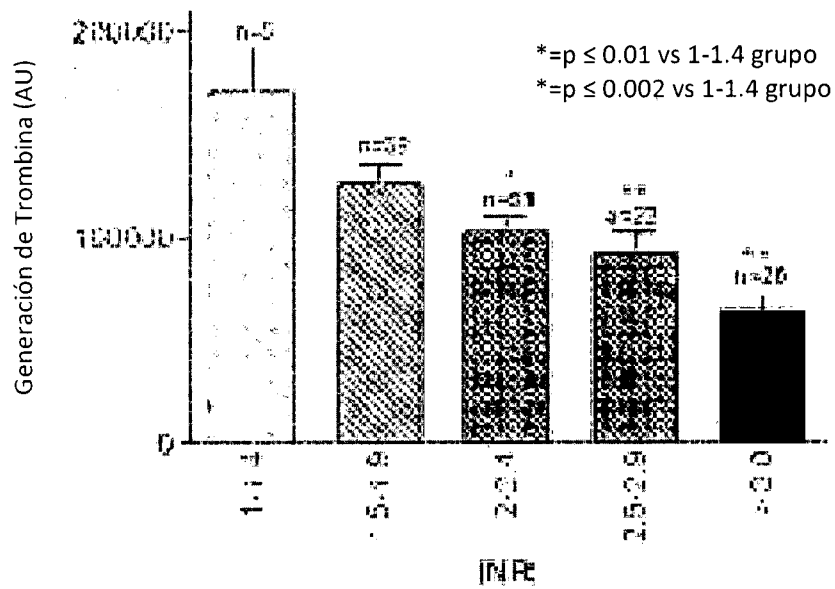
32. El ensayo de la reivindicación 30, en donde el plasma es no anticoagulado.

2/3

33. El ensayo de la reivindicación 26, en donde sustrato de trombina detectablemente rotulado es un Z- Gly- Gly- Arg- AMC.

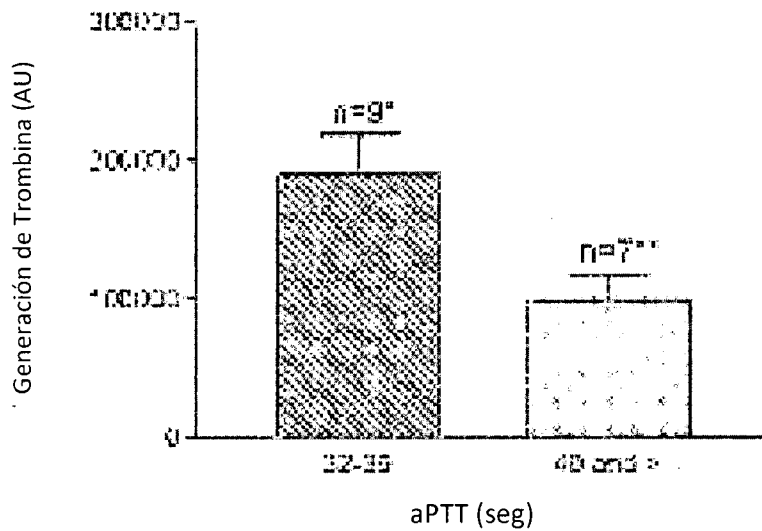
214

FIG. 1A



n =Numero de pacientes
 p valor derivado de la prueba T de Student

FIG. 1B



***p < 0.001 vs 32-35 seg
 **p < 0.01 vs 32-35 seg

2/5

FIG. 1C

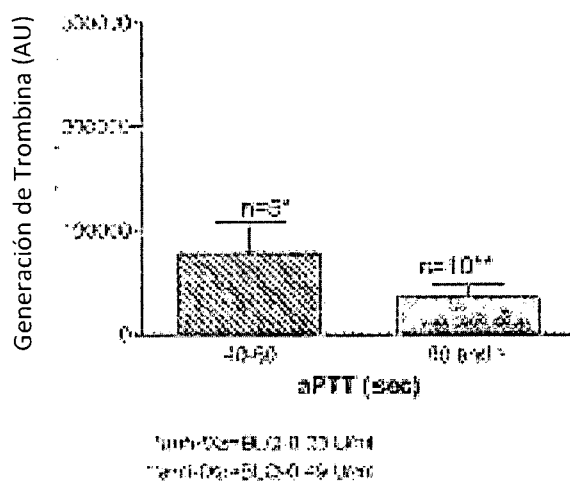
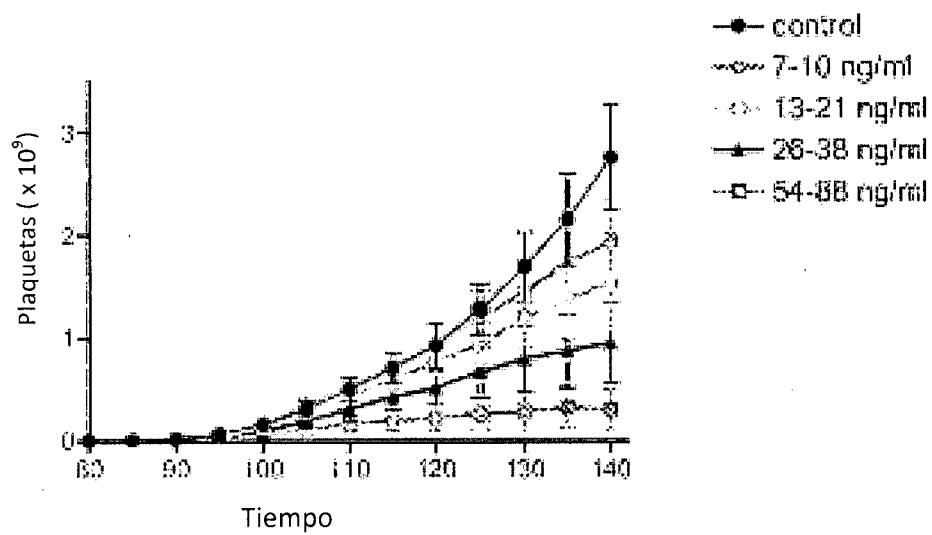


FIG. 2



216

FIG. 3

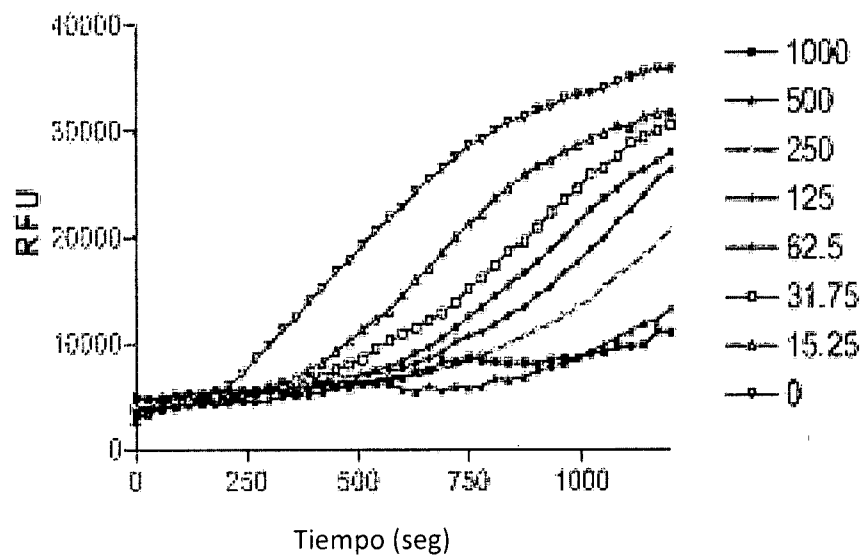
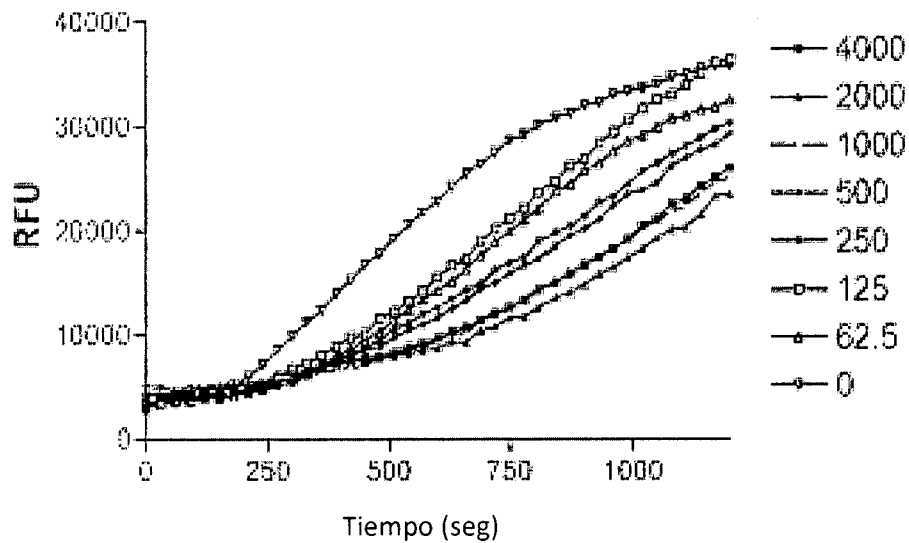


FIG. 4A



217

FIG. 4B

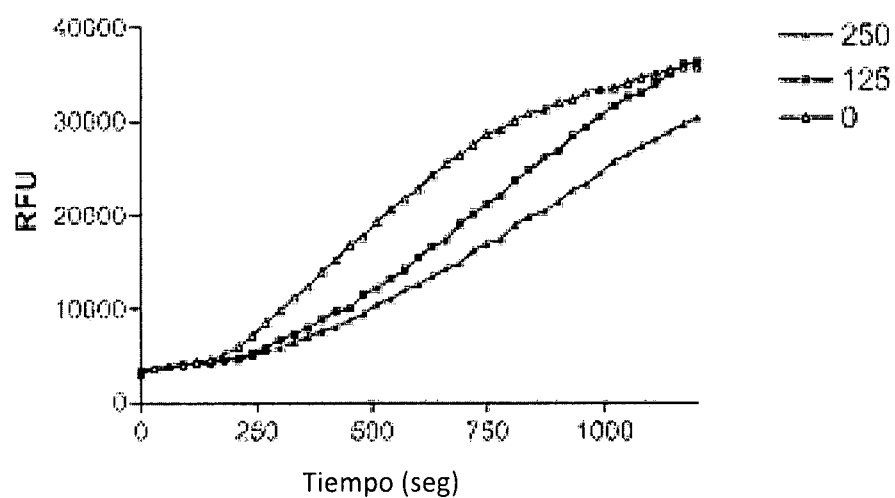
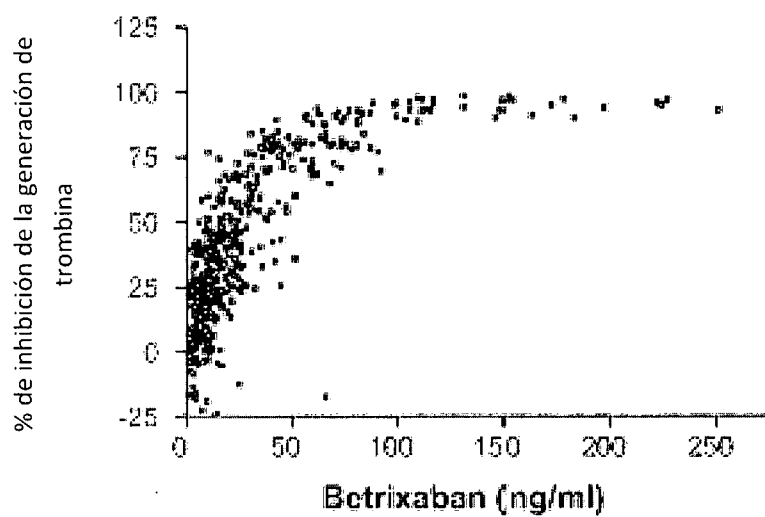


FIG. 5



219

FIG. 6

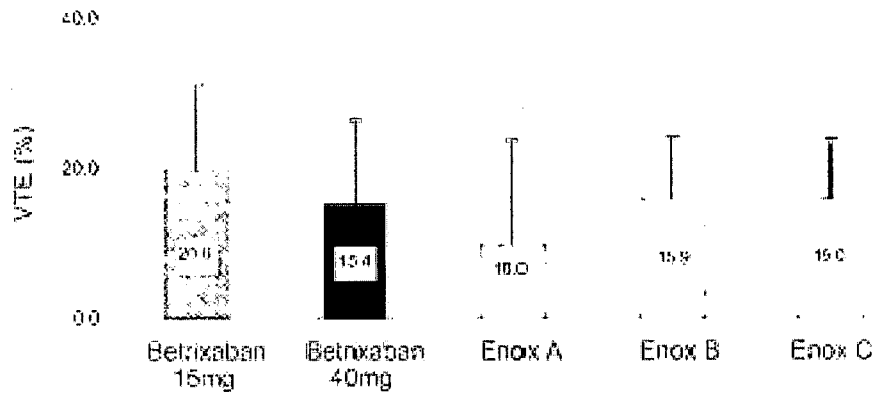
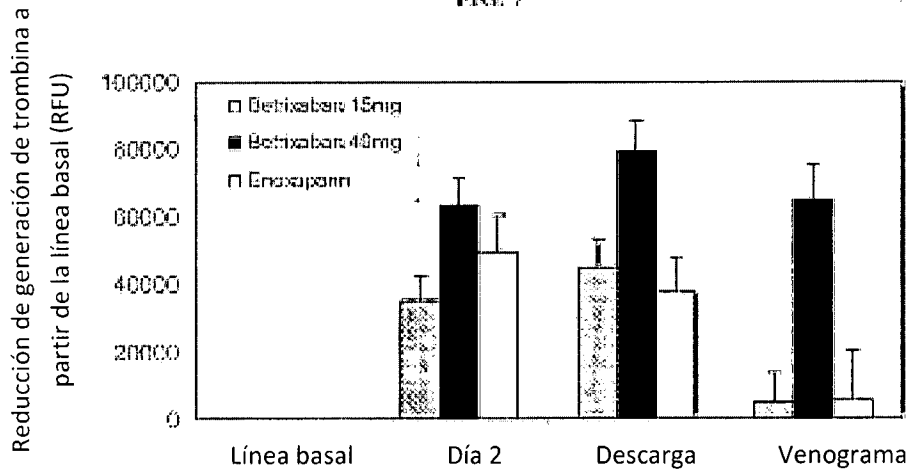


FIG. 7



219

FIG. 8

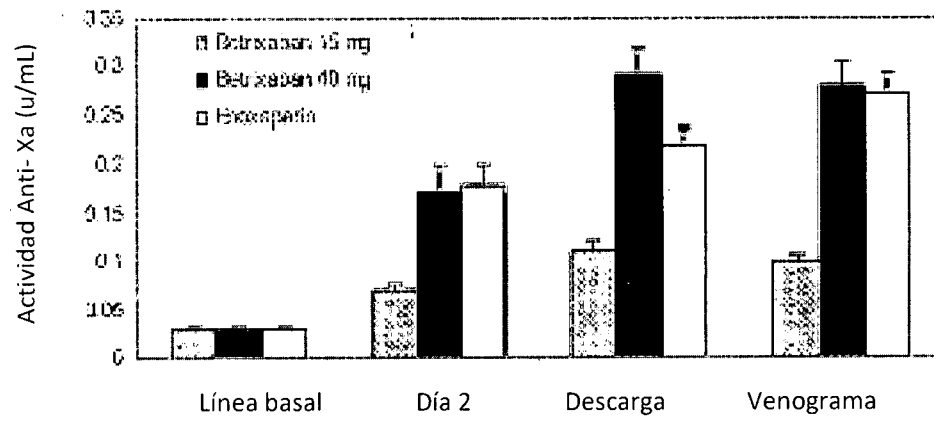
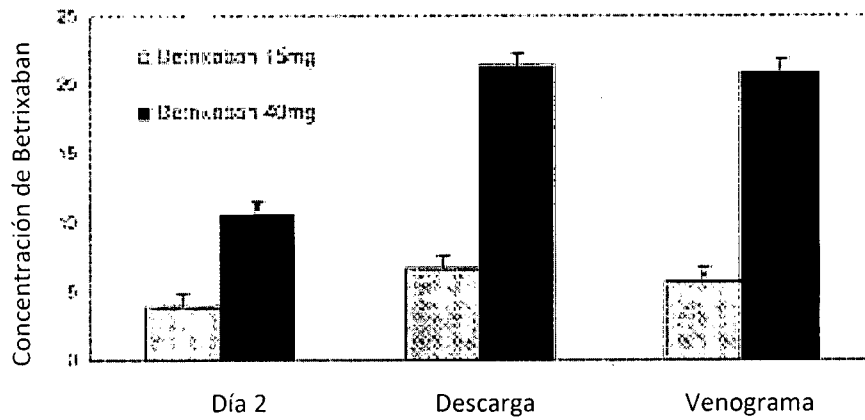


FIG. 9



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 070545-1510	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2007/084887	International filing date (day/month/year) 15/11/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 08/12/2006
Applicant MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 8

- ☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. application No
PCT/US2007/084887

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/40 A61P7/02 A61K31/4164 A61K31/435 A61K31/4409
A61K31/4412 A61K31/535

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 376 515 B2 (ZHU BING-YAN [US] ET AL ZHU BING-YAN [US] ET AL) 23 April 2002 (2002-04-23) column 227, line 40 - line 45 paragraph [0843] column 62 - column 87 column 232 - column 498 -----	1-25
X	ZHANG P ET AL: "Design, synthesis, and SAR of anthranilamide-based factor Xa inhibitors with improved functional activity" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 4, 2004, pages 989-993, XP002414600 ISSN: 0960-894X the whole document ----- -/--	1-25

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

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 July 2008

Date of mailing of the international search report

09/10/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Albayrak, Timur

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal application No
PCT/US2007/084887

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHU ET AL: "Inhibitory effect of carboxylic acid group on hERG binding" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 16, no. 21, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 5507-5512, XP005663480 ISSN: 0960-894X the whole document	1-25
X	ZHANG PENGLIE ET AL: "Design, synthesis, and SAR of anthranilamide-based factor Xa inhibitors incorporating substituted biphenyl P4 motifs." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 14, no. 4, 23 February 2004 (2004-02-23), pages 983-987, XP002471265 ISSN: 0960-894X the whole document	1-25
X	WO 02/26731 A (COR THERAPEUTICS INC [US]; ZHU BING YAN [US]; HUANG WENRONG [US]; ZHAN) 4 April 2002 (2002-04-04) claims 1-16	1-25
X	US 6 635 657 B1 (BEIGHT DOUGLAS WADE [US] ET AL) 21 October 2003 (2003-10-21) examples 278-280	1-25
P, X	WO 2007/056517 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; GRANT CRAIG [GB]; KANTER JAMES P [US]; LANG) 18 May 2007 (2007-05-18) the whole document	1-25
Y	WO 02/18623 A (NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG [CH]; ALBRECHT HUGO [CH]; HENGST ULRICH [C]) 7 March 2002 (2002-03-07) claims 14,15	26-33
Y	US 5 153 176 A (ABE YOSHIHITO [JP] ET AL) 6 October 1992 (1992-10-06) column 28	26-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/084887

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-25

A method of inhibiting coagulation comprising the administration of compounds as claimed in claim 1-25 in specific dosages as well as unit dosage forms and pharmaceutical compositions comprising the compounds and the compounds PER SE.

2. claims: 26-33

An in vitro assay to determine whether a compound has in vivo antithrombotic activity comprising

- introducing a test compound into an invitro sample of whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate to form a test sample;
- determining the level of thrombin activity in the test sample by monitoring the cleavage of the detectably -labeled thrombin substrate in the test sample as a function of time;
- determining the level of thrombin activity in a control sample by monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the control sample as a function of time, wherein the control sample comprises whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate;
- comparing the level of thrombin activity in the test sample and the control sample, wherein a lower level of thrombin activity in the test sample is an indication that the test compound has in vivo antithrombotic activity.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. application No
PCT/US2007/084887

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6376515	B2	23-04-2002	AT 311366 T AU 4535301 A AU 5078301 A CA 2401778 A1 DE 60115394 D1 DE 60115394 T2 DK 1259485 T3 EP 1259485 A2 ES 2254385 T3 HK 1051539 A1 WO 0164642 A2 WO 0164643 A2 US 2002002183 A1	15-12-2005 12-09-2001 12-09-2001 07-09-2001 05-01-2006 19-10-2006 10-04-2006 27-11-2002 16-06-2006 17-03-2006 07-09-2001 07-09-2001 03-01-2002
WO 0226731	A	04-04-2002	AU 1128102 A EP 1322637 A2	08-04-2002 02-07-2003
US 6635657	B1	21-10-2003	US 2004029874 A1 US 2005282862 A1	12-02-2004 22-12-2005
WO 2007056517	A	18-05-2007	AR 056787 A1 AU 2006311544 A1	24-10-2007 18-05-2007
WO 0218623	A	07-03-2002	AU 1218402 A CA 2420832 A1 EP 1315758 A2 JP 2004507471 T US 2006177432 A1 US 2005037009 A1	13-03-2002 07-03-2002 04-06-2003 11-03-2004 10-08-2006 17-02-2005
US 5153176	A	06-10-1992	JP 2094315 C JP 4089498 A JP 8013834 B	02-10-1996 23-03-1992 14-02-1996

INTERNET COOPERATION TREATY

276

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220		Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
International application No. PCT/US2007/084887		International filing date (day/month/year) 15.11.2007	Priority date (day/month/year) 08.12.2006
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. A61K31/40 A61P7/02 A61K31/4164 A61K31/435 A61K31/4409 A61K31/4412 A61K31/535			
Applicant MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.			

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Albayrak, Timur Telephone No. +49 89 2399-7549
--	--	---



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/084887

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/084887

ms

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

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

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-9,11-14,25,26-33

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-9,11-14,25 (industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

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

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 26-33

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/084887

Handwritten signature

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-25

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>26-33</u>
	No: Claims	<u>1-25</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	=
	No: Claims	<u>1-33</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>10,25-24</u>
	No: Claims	=

2. Citations and explanations

see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/084887

20

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item III.

The subject-matter of claims 1-9, 11-14, 25 is related to subject-matter considered to be covered by the provisions of Rule 67.1 (iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4) (a) (i) PCT).

Re Item IV.

The separate inventions/groups of inventions are:

Claims 1-25:

A method of inhibiting coagulation comprising the administration of compounds as claimed in claims 1-25 in specific dosages as well as unit dosage forms and pharmaceutical compositions comprising the compounds and the compounds PER SE.

Claims 26-33:

An in vitro assay to determine whether a compound has in vivo antithrombotic activity comprising

- a) introducing a test compound into an in vitro sample of whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labelled thrombin substrate to form a test sample;
- b) determining the level of thrombin activity in the test sample by monitoring the cleavage of the detectably -labelled thrombin substrate in the test sample as a function of time;
- c) determining the level of thrombin activity in a control sample by monitoring the cleavage of the detectably-labelled thrombin substrate in the control sample as a function of time, wherein the control sample comprises whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labelled thrombin substrate;
- d) comparing the level of thrombin activity in the test sample and the control sample, wherein a lower level of thrombin activity in the test sample is an indication that the test compound has in vivo antithrombotic activity.

The reasons for which the present application has been deemed to contain two inventions which are not linked such that they form a general inventive concept, as required by Rules 13.1, 13.2 and 13.3 PCT are as follows:

The prior art has been identified as: US6376515

From a comparison of the disclosure of this prior art and the technical features of claim 1 the features which are known from D1 are the following:

Treatment of coagulation with inhibitors of factor Xa, said inhibitors falling within the formula of claim 1, the dosages used fall within the range of claim 1. It follows that the technical features of claim 1 which make over the prior art (Special Technical Features (STF), (Rule 13.2 PCT)) are the following: The specific dosage of between 0.01 and 2.0 mg/kg/day in humans.

From a comparison of the disclosure of the above identified prior art and the technical features of claim 10 it appears that no Special Technical Features can be identified.

From a comparison of the disclosure of the above identified prior art and the technical features of claim 11 the features which are known from D1 are the following:
Treatment of coagulation with the compound of claim 11. It follows that the Special Technical Features of claim 11 are the combination of the compound in humans at the given dosage range of 0.01 and 2.0 mg/kg/day.

From comparison of the disclosure of the above identified prior art and the technical features of claim 15 the features which are known from D1 are the following:
Unit dosage forms (capsules or tablets) comprising compounds of formula I. It follows that the Special Technical Feature of claim 15 is the aggregate daily dose from between about 0.01 and about 2.0 mg/kg.

From comparison of the disclosure of the above identified prior art and the technical features of claim 23 the features which are known from D1 are the following:
Unit dosage forms (capsules or tablets) comprising the compound of formula II. It follows that the Special Technical Feature of claim 12 is the aggregate daily dose from between about 0.01 and about 2.0 mg/kg.

From these Special Technical Features the objective problem to be solved by the 1st invention is the provision of a suitable dosage range for treating coagulation with the compounds claimed.

From comparison of the disclosure of the above identified prior art and the technical

features of claim 26 the features which are known from D1 are the following:
compounds which are usable to inhibit factor Xa.

It follows that the Special Technical Features of claim 26 are the method steps a-d:

- a) introducing a test compound into an in vitro sample of whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labelled thrombin substrate to form a test sample;
- b) determining the level of thrombin activity in the test sample by monitoring the cleavage of the detectably -labelled thrombin substrate in the test sample as a function of time;
- c) determining the level of thrombin activity in a control sample by monitoring the cleavage of the detectably-labelled thrombin substrate in the control sample as a function of time, wherein the control sample comprises whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labelled thrombin substrate;
- d) comparing the level of thrombin activity in the test sample and the control sample, wherein a lower level of thrombin activity in the test sample is an indication that the test compound has in vivo antithrombotic activity.

From the Special Technical Features the objective problem to be solved by the 2nd invention is the provision of a screening assay to identify compounds with antithrombotic activity.

The above analysis shows that the Special Technical Features of invention I (claims 1-25) are neither the same nor corresponding to those of invention II (claims 26-33).

Also, examining the possible correspondence by technical effect, one finds the technical effect of invention 1 to be the inhibition of coagulation and the technical effect of invention II to be the identification of compounds with antithrombotic activity.

This appears to show lack of corresponding technical effect as well. Consequently, neither the objective problem underlying the subjects of the two claimed inventions, nor their solutions defined by the Special Technical Features allow for a relationship to be established between the said inventions which involves a single general inventive concept.

In conclusion, therefore, the two groups of claims are not linked by a common or corresponding Special Technical Feature and define two different inventions not linked by a single general inventive concept.

The application, hence does not meet the requirements of Unity of Invention as defined in Rule 13(1) and 13(2) PCT

Re Item V

Reference is made to the following documents; unless otherwise indicated, reference is made to the relevant passages emphasized in the Search Report.

- D1: US-B2-6 376 515 (ZHU BING-YAN [US] ET AL ZHU BING-YAN [US] ET AL) 23 April 2002 (2002-04-23)
- D2: ZHANG P ET AL: "Design, synthesis, and SAR of anthranilamide-based factor Xa inhibitors with improved functional activity" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 4, 2004, pages 989-993, XP002414600 ISSN: 0960-894X
- D3: ZHU ET AL: "Inhibitory effect of carboxylic acid group on hERG binding" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 16, no. 21, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 5507-5512, XP005663480 ISSN: 0960-894X
- D4: ZHANG PENGLIE ET AL: "Design, synthesis, and SAR of anthranilamide-based factor Xa inhibitors incorporating substituted biphenyl P4 motifs." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 14, no. 4, 23 February 2004 (2004-02-23), pages 983-987, XP002471265 ISSN: 0960-894X
- D5: WO 02/26731 A (COR THERAPEUTICS INC [US]; ZHU BING YAN [US]; HUANG WENRONG [US]; ZHAN) 4 April 2002 (2002-04-04)
- D6: US-B1-6 635 657 (BEIGHT DOUGLAS WADE [US] ET AL) 21 October 2003 (2003-10-21)
- D7: WO 2007/056517 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; GRANT CRAIG [GB]; KANTER JAMES P [US]; LANG) 18 May 2007 (2007-05-18)
- D8: WO 02/18623 A (NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG [CH]; ALBRECHT HUGO [CH]; HENGST ULRICH [C]) 7 March 2002 (2002-03-07)
- D9: US-A-5 153 176 (ABE YOSHIHITO [JP] ET AL) 6 October 1992 (1992-10-06)

1. Novelty

- D1 discloses the compounds of claims 1-25 for **treating coagulation**. It is explicitly disclosed that the compounds can be used in **humans** and at **dosages of 0.1 to 100**

mg/kg or 1 to 20 mg/kg per day.

It follows that claims 1-25 lack novelty.

- The compounds disclosed in D2-D4 take away novelty of claims 10,15-25.
- D5 discloses unit doses comprising compounds as claimed (tablets, capsules). It is disclosed that the dosages are in a range from about 0.001 mg/kg to about 1000 mg/kg, preferably from about 0.01 mg/kg to about 100 mg/kg, and more preferably from about 0.10 mg/kg to about 20 mg/kg.
It follows that claims 10,15-25 lack novelty.
- D6 discloses unit doses comprising compounds as claimed (tablets, capsules). It is disclosed that the dosages are in a range from about 0.001 mg/kg to about 1000 mg/kg, preferably from about 0.01 mg/kg to about 100 mg/kg, and more preferably from about 0.10 mg/kg to about 20 mg/kg.
It follows that claims 10,15-25 lack novelty.

In summary, claims 1-25 lack novelty (Art. 33(2) PCT).

- It appears that claims 26-33 are not anticipated by the cited prior art (Art. 33(2) PCT).

2. Inventive step

- The prior art does already disclose that compounds of the present application can be used to inhibit coagulation in humans. Furthermore, it is disclosed that dosages falling into the claimed range can be used.

From the particular chosen dosage range of claims 1-25 no surprising/unexpected effect can be observed.

It must follow that claims 1-25 lack an inventive step (Art. 33(3) PCT).

- Moreover, the determination of suitable dosages of a given compound to achieve a certain biological effect must be regarded as routine work of the skilled person and

cannot form basis for the recognition of an inventive step.

It must follow that claims 1-25 lack an inventive step (Art. 33(3) PCT).

- The examples of the application are insufficient to proof the presence of an inventive step over the whole of the claimed range.

Examples 1-3 describe methods of preparing compounds and are silent as to the efficiency of the claimed dosages.

Example 4 is directed to an *in vitro* assay to determine antithrombotic activity.

Example 5 shows the coagulation-inhibition profile of betribaxan.

Example 6 shows that several compounds are able to inhibit soluble human fXa.

Example 7 shows a dose-dependency of betrixaban on the inhibition of thrombin generation.

Example 8 shows that betrixaban is more potent in suppressing markers of thrombin generation.

With respect to claims 1-25 only examples 7 and 8 appear to be directed to the allegedly surprising technical effects. However,

- a) no comparative data are provided which could form basis for the recognition of a surprising technical effect associated with the administration of the compounds at doses between 0.1 and 1.5 mg/kg.
- b) notwithstanding the argumentation under previous item (a) it is stressed that examples 7 and 8 were carried out with betribaxan which is **one** compound falling within the huge variety of compounds claimed. Since no other data for other compounds are provided it is not possible to judge which structural features of the compound betrixaban are essential for the technical effect. It follows that compounds are than betrixaban are not believed to result in any surprising effect.

- The problem underlying claims 26-33 is the screening of compounds with antithrombotic activity. The solution lies in the screening assay claimed.

D9 discloses a screening method for inhibitors of thrombin (see column 28). Said

screening method comprises all the steps of claim 26 except that neither whole blood nor plasma comprising tissue factor is present.

D8 discloses that inhibitors of thrombin are useful to treat blood clotting disorders (page 12, 4th paragraph).

The only difference between the teachings of D8/D9 is that the screen of the application is carried out with whole blood or plasma comprising tissue factor.

Since no surprising/unexpected effect is associated with these differences, claim 26 lacks an inventive step.

None of the additional technical features of claims 27-33 appears to result in any unexpected effect.

Thus, claims 27-33 lack an inventive step.

In summary, claims 26-33 lack an inventive step (Art. 33(3) PCT).

Re Item VI

WO2007056517 (D7) could become relevant in the regional phase. The document discloses a compound of claims 1-25 for **treating coagulation**. It is explicitly disclosed that the compounds can be used in **humans** and at **dosages of 0.1 to 100 mg/kg or 1 to 20 mg/kg** per day (page 13).

Re Item VIII.

- Claim 10 is directed to compounds PER SE. Claim 25 depends on claim 10 but is directed to a method. This inconsistency renders the scope of claims 10 and 25 unclear (Art. 6 PCT).
- The present claims 1,15 relate to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the compounds claimed (see Examples 1-9 and formulas II-V as well as the explicitly described compounds falling into formulas II-V).

The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claims 1-25 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claim 1-25 was restricted to those claimed compounds which appear to be supported and a generalisation of their structural formulae, (formulas II-V as well as the explicitly described compounds falling into formulas II-V).

- The initial phase of the search revealed a very large number of documents relevant to the issue of novelty. So many documents were retrieved that it is impossible to determine which parts of claims 1 and 15 may be said to define subject-matter for which protection might legitimately be sought (Article 6 PCT). For these reasons, the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claims 1-25.

The search of claim 1-25 was restricted to those claimed compounds which appear to be supported and a generalisation of their structural formulae, (formulas II-V as well as the explicitly described compounds falling into formulas II-V).

- Claims 15-25 are directed to unit dose formulations comprising certain compounds wherein the amount of said compounds is **an aggregate daily dose of from about 0.1 and about 1.5 mg/kg**.

It is stressed that the feature "aggregate daily dose of from about 0.1 and about 1.5 mg/kg" is directed to the use of the unit dosage forms and does not add anything to the question of novelty. It follows that any given unit dosage form comprising a compound in question takes away novelty of the claims.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 June 2008 (19.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/073670 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 31/40 (2006.01) A61K 31/4409 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01) A61K 31/4412 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01) A61K 31/535 (2006.01)
A61K 31/435 (2006.01)

[US/US]; 450 Alta Vista Drive, South San Francisco, California 94080 (US). ABE, Keith [US/US]; 57 Sable Pointe, Alameda, California 94502 (US).

(74) Agent: TANNER, Lorna L.; FOLEY & LARDNER LLP, 975 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304-1013 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2007/084887

(22) International Filing Date:

15 November 2007 (15.11.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/873,792 8 December 2006 (08.12.2006) US
60/947,629 2 July 2007 (02.07.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 40 Landsdowne Street, Cambridge, Massachusetts 02139 (US).

(72) Inventors; and

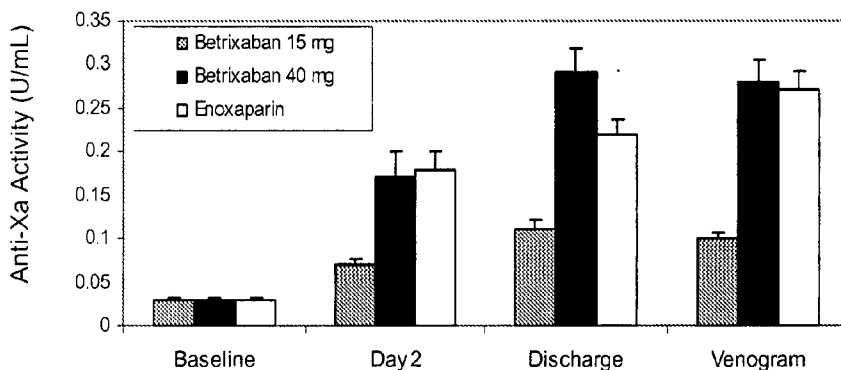
(75) Inventors/Applicants (for US only): SINHA, Uma [US/US]; 808 Junipero Serra Boulevard, San Francisco, California 94127 (US). HOLLENBACH, Stanley J.

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: UNIT DOSE FORMULATIONS AND METHODS OF TREATING THROMBOSIS WITH AN ORAL FACTOR XA INHIBITOR



(57) Abstract: Unit doses of factor Xa inhibitor compounds and methods of using these compounds for inhibiting blood coagulation in a human patient are taught herein. The unit dose of the factor Xa inhibitor compounds disclosed herein required to inhibit coagulation in a primate is lower than the unit dose required to obtain similar levels of coagulation inhibition in other animal models, such as rodents. Also taught are in vitro assays useful in predicting in vivo antithrombotic activity in humans.

WO 2008/073670 A3



240

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
27 November 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/084887

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/40 A61P7/02 A61K31/4164 A61K31/435 A61K31/4409
A61K31/4412 A61K31/535

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 376 515 B2 (ZHU BING-YAN [US] ET AL ZHU BING-YAN [US] ET AL) 23 April 2002 (2002-04-23) column 227, line 40 - line 45 paragraph [0843] column 62 - column 87 column 232 - column 498 -----	1-25
X	ZHANG P ET AL: "Design, synthesis, and SAR of anthranilamide-based factor Xa inhibitors with improved functional activity" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 14, no. 4, 2004, pages 989-993, XP002414600 ISSN: 0960-894X the whole document ----- -/--	1-25

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

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 July 2008

Date of mailing of the international search report

09/10/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Albayrak, Timur

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/084887

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHU ET AL: "Inhibitory effect of carboxylic acid group on hERG binding" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, OXFORD, GB, vol. 16, no. 21, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 5507-5512, XP005663480 ISSN: 0960-894X the whole document	1-25
X	ZHANG PENGLIE ET AL: "Design, synthesis, and SAR of anthranilamide-based factor Xa inhibitors incorporating substituted biphenyl P4 motifs." BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 14, no. 4, 23 February 2004 (2004-02-23), pages 983-987, XP002471265 ISSN: 0960-894X the whole document	1-25
X	WO 02/26731 A (COR THERAPEUTICS INC [US]; ZHU BING YAN [US]; HUANG WENRONG [US]; ZHAN) 4 April 2002 (2002-04-04) claims 1-16	1-25
X	US 6 635 657 B1 (BEIGHT DOUGLAS WADE [US] ET AL) 21 October 2003 (2003-10-21) examples 278-280	1-25
P, X	WO 2007/056517 A (MILLENNIUM PHARM INC [US]; GRANT CRAIG [GB]; KANTER JAMES P [US]; LANG) 18 May 2007 (2007-05-18) the whole document	1-25
Y	WO 02/18623 A (NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG [CH]; ALBRECHT HUGO [CH]; HENGST ULRICH [C]) 7 March 2002 (2002-03-07) claims 14,15	26-33
Y	US 5 153 176 A (ABE YOSHIHITO [JP] ET AL) 6 October 1992 (1992-10-06) column 28	26-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/084887

243

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-25

A method of inhibiting coagulation comprising the administration of compounds as claimed in claim 1-25 in specific dosages as well as unit dosage forms and pharmaceutical compositions comprising the compounds and the compounds PER SE.

2. claims: 26-33

An in vitro assay to determine whether a compound has in vivo antithrombotic activity comprising

- introducing a test compound into an invitro sample of whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate to form a test sample;
- determining the level of thrombin activity in the test sample by monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the test sample as a function of time;
- determining the level of thrombin activity in a control sample by monitoring the cleavage of the detectably-labeled thrombin substrate in the control sample as a function of time, wherein the control sample comprises whole blood or plasma comprising tissue factor (TF) and a detectably-labeled thrombin substrate;
- comparing the level of thrombin activity in the test sample and the control sample, wherein a lower level of thrombin activity in the test sample is an indication that the test compound has in vivo antithrombotic activity.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/084887

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6376515	B2	23-04-2002	AT 311366 T 15-12-2005
		AU 4535301 A 12-09-2001	
		AU 5078301 A 12-09-2001	
		CA 2401778 A1 07-09-2001	
		DE 60115394 D1 05-01-2006	
		DE 60115394 T2 19-10-2006	
		DK 1259485 T3 10-04-2006	
		EP 1259485 A2 27-11-2002	
		ES 2254385 T3 16-06-2006	
		HK 1051539 A1 17-03-2006	
		WO 0164642 A2 07-09-2001	
		WO 0164643 A2 07-09-2001	
		US 2002002183 A1 03-01-2002	
WO 0226731	A	04-04-2002	AU 1128102 A 08-04-2002
			EP 1322637 A2 02-07-2003
US 6635657	B1	21-10-2003	US 2004029874 A1 12-02-2004
			US 2005282862 A1 22-12-2005
WO 2007056517	A	18-05-2007	AR 056787 A1 24-10-2007
			AU 2006311544 A1 18-05-2007
WO 0218623	A	07-03-2002	AU 1218402 A 13-03-2002
			CA 2420832 A1 07-03-2002
			EP 1315758 A2 04-06-2003
			JP 2004507471 T 11-03-2004
			US 2006177432 A1 10-08-2006
			US 2005037009 A1 17-02-2005
US 5153176	A	06-10-1992	JP 2094315 C 02-10-1996
			JP 4089498 A 23-03-1992
			JP 8013834 B 14-02-1996



No. 09-070741- -00000-0000

Fecha: 2009-07-08 17:01:56 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 245

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE PCT

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 trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Eduar Navarro

Firma Responsable

Fecha 08-07-09

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO

REFERENCIA	Radicación No.	9 70741
	Solicitud internacional	PCT/US2007/084887
	Fecha inicio fase nacional	08/07/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	081571

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

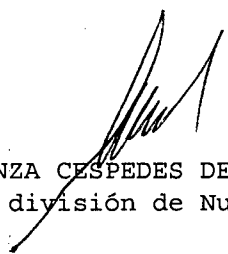
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 70741



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 17 JUL. 2009.
adpa11

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

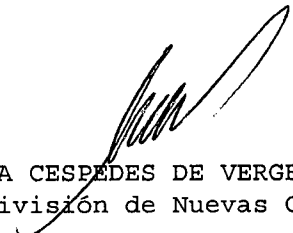
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	9 70741
	Solicitud internacional	PCT/US2007/084887
	Fecha inicio fase nacional	08/07/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 08158'

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 17 JUL. 2009.
adpall