

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

AGENTES DE REVERSION ANTICOAGULANTE

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:

PEROSPHERE INC.

**Dirección
Electrónica:**

sic@castellanosyco.co

Dirección:

20 Kenosia Avenue,
Danbury, CT 06810,
ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA

**Domicilio/País de
constitución:**

ESTADOS UNIDOS DE
AMÉRICA -
CONNECTICUT -
DANBURY

Identificación:

☐ CEDULA DE
CIUDADANIA

☐ CEDULA DE
EXTRANJERIA

☒ EMPRESA
EXTRANJERA

☐ NIT

☐ PASAPORTE

Número:

516861772941-

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

1.	PEROSPHERE INC.	NN	516861772941
----	-----------------	----	--------------

4 Datos del Inventor

Nombre:	SOLOMON S. STEINER	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	24 Old Wagon Road, Mount Kisco, NY 10549, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - NEW YORK - NEW YORK
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE ☒ No Aplica Número: -			
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1. STEINER SOLOMON S.		ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
2. LAULICHT BRYAN E.		ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
3. BAKHRU SASHA H.		ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
4. MATHIOWITZ EDITH		ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
6	Datos Inventor(es)		
País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	NEW YORK	NEW YORK	24 Old Wagon Road, Mount Kisco, NY 10549, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MASSACHUSETTS	CAMBRIDGE	100 Landsdowne Street, Apt. # 1501, Cambridge, MA 02139, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	RHODE ISLAND	PROVIDENCE	200 Exchange Street, Unit 1612, Providence, RI 02903, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	MASSACHUSETTS	BROOKLINE	184 Rawson Road, Brookline, MA 02445, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:		CALLE 94A 7A 09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 39779654-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/US2012/066938	Fecha Solicitud:	29/11/2012
Número Publicacion:		WO 2013/082210	Fecha Publicacion:	06/06/2013
9	Declaraciones de prioridad			☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/564,559	29/11/2011
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/614,292	22/03/2012
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/641,698	02/05/2012
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/666,291	29/06/2012
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		37	Pago Reivindicaciones:	Si
11	Reducción de tasas.			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
12	Documentos Anexos			
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☐ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☐ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos				

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MANDRA, Raymond R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
1290 Avenue of The Americas
New York, NY 10104-3800
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 13 May 2014 (13.05.2014)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 04232.000100.PC	
International application No. PCT/US2012/066938	International filing date (day/month/year) 29 November 2012 (29.11.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address PEROSPHERE INC. 24 Old Wagon Road Mount Kisco, NY 10549 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☒ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address PEROSPHERE INC. 20 Kenosia Avenue Danbury, CT 06810 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:	☐ the International Preliminary Examining Authority ☒ the designated Offices concerned ☐ the elected Offices concerned ☐ other:
☒ the receiving Office ☐ the International Searching Authority ☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 95	Authorized officer Doherty Fiona e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04
---	--

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 June 2013 (06.06.2013)

(10) International Publication Number
WO 2013/082210 A1

(51) International Patent Classification:

C07D 241/04 (2006.01) A61K 31/495 (2006.01)
C07D 295/13 (2006.01) A61P 7/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2012/066938

(22) International Filing Date:

29 November 2012 (29.11.2012)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/564,559	29 November 2011 (29.11.2011)	US
61/614,292	22 March 2012 (22.03.2012)	US
61/641,698	2 May 2012 (02.05.2012)	US
61/666,291	29 June 2012 (29.06.2012)	US

(71) Applicant: PEROSPHERE INC. [US/US]; 24 Old Wagon Road, Mount Kisco, NY 10549 (US).

(72) Inventors: STEINER, Solomon, S.; 24 Old Wagon Road, Mount Kisco, NY 10549 (US). LAULICHT, Bryan, E.; 100 Landsdowne Street, Apt.#1501, Cambridge, MA 02139 (US). BAKHRU, Sasha, H.; 200 Exchange Street, Unit 1612, Providence, RI 02903 (US). MATHIOWITZ, Edith; 184 Rawson Road, Brookline, MA 02445 (US).

(74) Agents: MANDRA, Raymond R. et al.; Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto, 1290 Avenue of The Americas, New York, NY 10104-3800 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: ANTICOAGULANT REVERSAL AGENTS

(57) Abstract: Novel anticoagulant reversal compounds are disclosed, as well as methods of making the compounds, pharmaceutical compositions including the compounds, methods of using the compounds to reverse the anticoagulant effects of coagulation inhibitors, and diagnostic assays comprising the compounds.



WO 2013/082210 A1

- 1 -

TITLE

ANTICOAGULANT REVERSAL AGENTS

[0001] This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent Application No. 61/564,559, which was filed on November 29, 2011, U.S. Provisional Patent Application No. 61/614,292, which was filed on March 22, 2012, U.S. Provisional Patent Application No. 61/641,698, which was filed on May 2, 2012, and U.S. Provisional Patent Application No. 61/666,291, which was filed on June 29, 2012, the contents of which are incorporated herein in their entirety.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention discloses compounds that completely or partially reverse anticoagulant effects of coagulation inhibitors, such as unfractionated heparin ("UFH"), low molecular weight heparin ("LMWH"), fondaparinux, and other antithrombin binding anticoagulants, as well as direct Xa and IIa inhibitors.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] The coagulation cascade is a normal physiological process which aims at preventing significant blood loss or hemorrhage following vascular injury. There are times, however, when a blood clot (thrombus) will form when it is not

needed. For instance, some high risk conditions such as acute medical illness, prolonged immobilization, surgery, or cancer can increase the risk of developing a blood clot which can potentially lead to significant consequences such as atherosclerotic cardiovascular disease and/or abnormal cardiac rhythms.

[0004] The coagulation cascade consists of a series of steps in which a protease cleaves and subsequently activates the next protease in the sequence. Each protease can activate several molecules of the next protease in the series, amplifying this biological cascade. The final result of these reactions is to convert fibrinogen, a soluble protein, to insoluble threads of fibrin. Together with platelets, the fibrin threads form a stable blood clot.

[0005] Antithrombin (AT), a serine protease inhibitor, is the major plasma inhibitor of coagulation proteases. AT blocks the coagulation cascade by, e.g., inhibiting thrombin (factor IIa) and activated factor X (factor Xa). Heparin (unfractionated heparin) and low molecular weight heparins (LMWHs; fractionated heparin) inhibit the coagulation process through binding to AT via a pentasaccharide sequence. This binding leads to a conformational change of AT, which accelerates its inhibition of factors IIa, Xa, and other proteases involved in blood clotting. Once dissociated, heparin and LMWH are free to bind to another antithrombin molecule and subsequently inhibit more thrombin and factor Xa.

[0006] Unfractionated heparin is a mixture of glycosaminoglycans (GAGs) discovered in the liver of dogs to have anti-coagulant properties in 1916 by McLean and Howell at Johns Hopkins University. In addition to anti-coagulation, unfractionated heparin has been found to have other properties including anti-inflammation and angiogenesis. LMWHs are heparins consisting of short chains of polysaccharide, generally having molecular weight of less than 8000 Da. LMWH and heparin are both used to prevent blood from clotting inside the body, but are used in different situations in the clinic.

[0007] Heparin is available as a liquid solution administered parenterally. LMWH, such as enoxaparin, is a low molecular weight fraction of heparin. It is also available as a liquid injectable solution. The currently available brands of LMWH approved by FDA in the United States are LOVENOX® (generic name, enoxaparin) and FRAGMIN® (generic name, dalteparin).

[0008] Low molecular weight or fractionated heparin has greater specificity for blood factor Xa and factor IIa activity than unfractionated heparin. Additionally, LMWH has a more reproducible effect on activated partial thromboplastin time (aPTT), a measure of coagulation time. LMWH has a lower incidence of Heparin Induced Thrombocytopenia (HIT). Because LMWH has more predictable efficacy and a lower incidence of adverse effects such as HIT, patients can inject LMWH themselves at home, although it is also often used in the hospital. For these reasons, LMWHs have become the market-leading anticoagulant.

[0009] Protamine, a positively charged molecule, can be used to reverse anti-coagulation resulting from administration of highly negatively charged unfractionated heparin or low molecular weight heparin (LMWH). Protamine is a natural product that has been associated with supply problems, which highlights a need for additional, ideally synthetic, reversal agent options. The anti-coagulant activity of LMWH can be partially, but not fully, reversed by intravenous administration of protamine. The reason for the reduced anticoagulation reversal activity of protamine in the case of LMWH is believed to be due to a lesser binding affinity for the LMWH fraction in the blood than unfractionated heparin. Protamine must be administered slowly, due to hypotensive effects and concerns regarding anaphylaxis.

[0010] Recently, additional anticoagulant agents have begun to gain regulatory approval. Examples of such anticoagulants include dabigatran or PRADAXA®, argatroban or ARGATROBAN®, rivaroxaban or XARELTO®, apixaban or ELIQUIS®, edoxaban or LIXIANA®, and fondaparinux or ARIXTRA®. These anticoagulants inhibit either factor IIa or factor Xa from propagating coagulation.

[0011] Anticoagulants such as dabigatran, fondaparinux, rivaroxaban and apixaban have no approved reversal agent. The current state of the art for dabigatran or PRADAXA® reversal is to employ activated charcoal to attempt to remove dabigatran from the blood and to use blood transfusions. Other than Eerenberg et al. *Circulation*. 2011 Oct 4;124(14):1573-9. Epub 2011 Sep 6., which reports that in a small clinical trial, prothrombin complex concentrate was able to reverse dabigatran, but not rivaroxaban, there is no data or clinically available antidote for reversing any of these coagulation Factor IIa or Xa

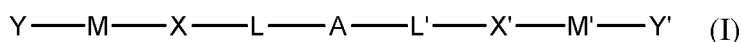
- 4 -

inhibitors. Therefore, when patients are anti-coagulated with these agents, adverse effects associated with overdosing, particularly significant or fatal bleeds, are much more dangerous than the side effects associated with administration of unfractionated heparin. The lack of reversal agent therefore limits the use of these drugs.

[0012] For these reasons, there is a longstanding, strong, unmet clinical need for new anti-coagulation reversal agents.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0013] Inhibitors of heparin, heparin fragments, fondaparinux and other factor Xa or factor IIa inhibitors has been developed. The general structure of the anti-coagulant reversal agents of interest is: **R-Z-R'**, where R and R' are positively charged agents at physiologic pH and can be the same or different molecules and Z is a hydrophobic cyclic or fused ring compound. More specifically, the inhibitor is represented by a compound of formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof:



wherein:

A is a substituted or unsubstituted aromatic or non-aromatic, carbocyclic or heterocyclic ring or a linear moiety;

L and L' are the same or different and are linkers;

X and X' are the same or different and are absent or are a functional group that attaches the linker L to M and the linker L' to M', respectively;

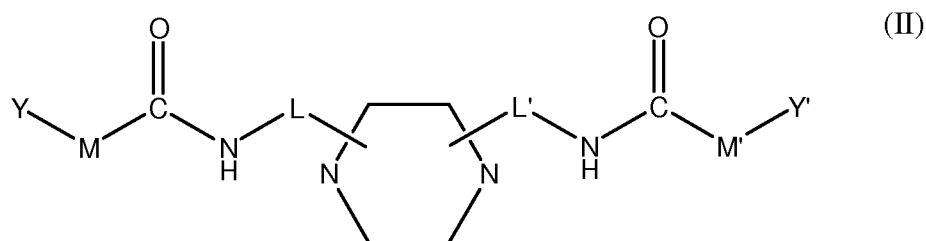
M and M' are the same or different and are absent or is a linker that attaches X to Y and X' to Y', respectively; and

Y and Y' are the same or different and are a moiety containing one or more cationic atoms or groups or one or more groups that become cationic under physiological conditions.

[0014] The compounds can be symmetrical or asymmetrical; that is, one or more of L, L', X, X', M, M', Y, or Y' can be the same or different. The compounds can be chiral (i.e., contain one or more chiral centers) or achiral.

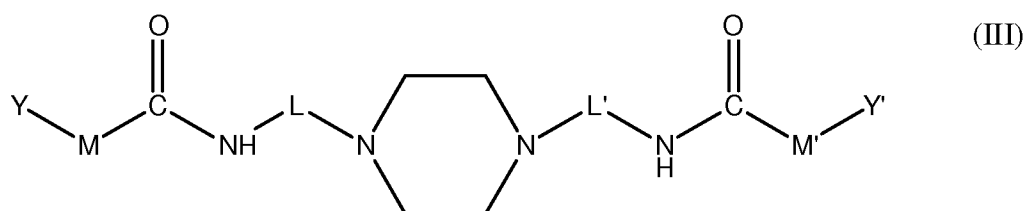
[0015] In some embodiments, A is a heterocyclic moiety. In other embodiments, A is a heterocyclic moiety and L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain. In still other embodiments, A is a heterocyclic moiety, L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain, and X and X' are -NH-C(=O)- . In still other embodiments, A is a heterocyclic moiety, L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain, X and X' are -NH-C(=O)- , and M and M' are a substituted alkylene chain. In still other embodiments, A is a heterocyclic moiety, L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain, X is -NH-C(=O)- , M and M' are a substituted alkylene chain, and Y and Y' are a guanidine moiety. In particular embodiments, A is a 1,4 or 2,5 disubstituted piperazine ring.

[0016] In another embodiment of the invention the inhibitor is a compound represented by the formula II or a pharmaceutically acceptable salt thereof:



wherein each of L, L', M, M', Y and Y' are as described herein.

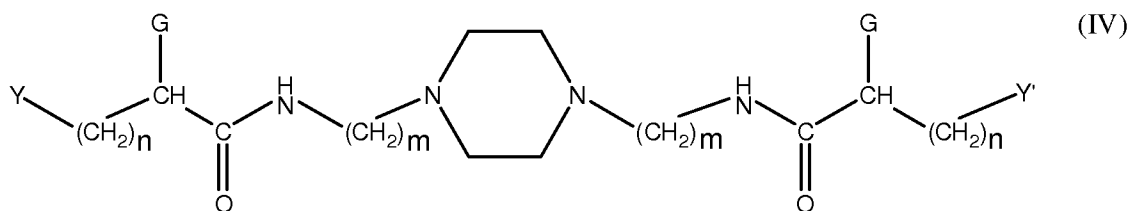
[0017] In another embodiment of the invention the inhibitor is a compound represented by the formula III or a pharmaceutically acceptable salt thereof:



wherein L, L', M, M', Y and Y' are as described herein.

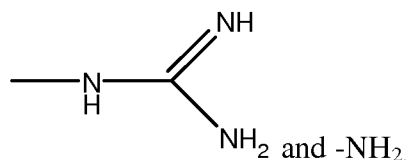
[0018] In yet another embodiment of the invention the inhibitor is a compound represented by the formula (IV) or pharmaceutically acceptable salt thereof:

- 6 -

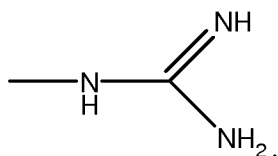


wherein Y and Y' are as described herein and n is 3 to 5, m is 3 to 6 and G is selected from -NH_2 and OH. Most preferably, G is amino.

[0019] Yet another embodiment of the invention the inhibitor is a compound represented by any of formula II, III or IV and Y and Y' are independently selected from the group consisting of

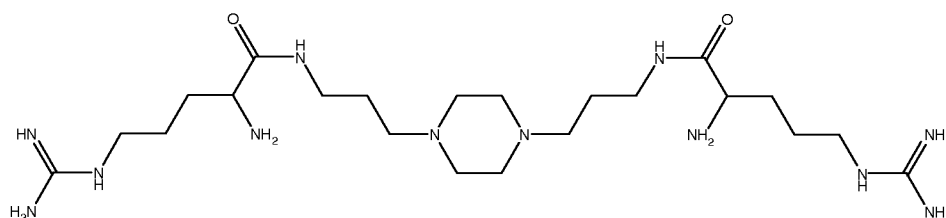


[0020] Most preferably G is -NH_2 and Y and Y' are



[0021] In the preferred embodiment, the compound is di-arginine piperazine (DAP), depicted in formula V, or a related compound, depicted in formula VI, or pharmaceutically acceptable salts of either compound:

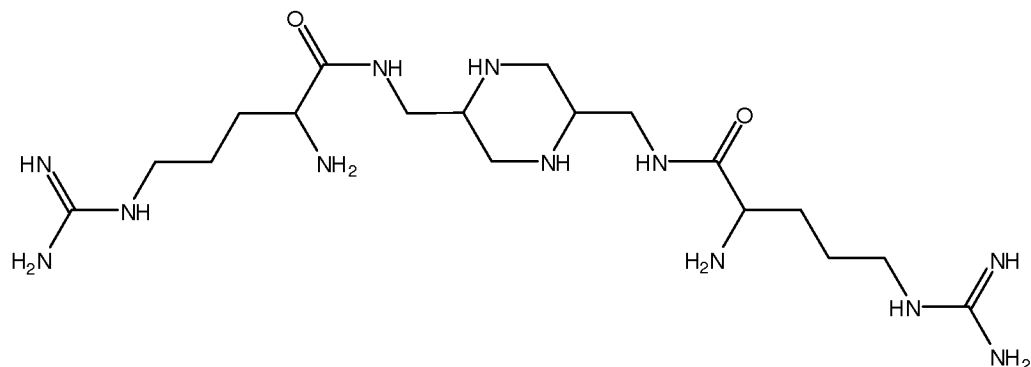
(V)



2-Amino-5-guanidino-pentanoic acid (3-{4-[3-(2-amino-5-guanidino-pentanoylamino)-propyl]-piperazin-1-yl}-propyl)-amide; or

- 7 -

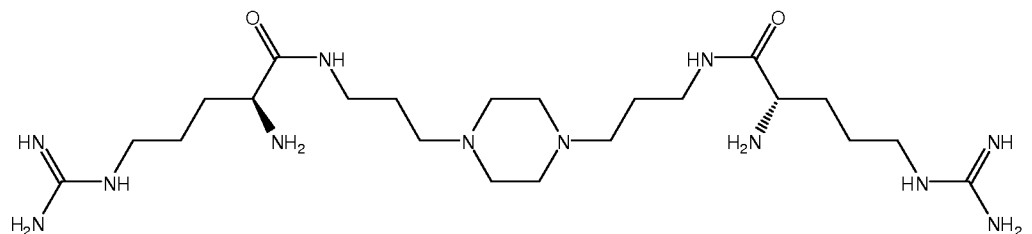
(VI)



2-Amino-5-guanidino-pentanoic acid { 5-[(2-amino-5-guanidino-pentanoylamino)-methyl]-piperazin-2-ylmethyl }-amide.

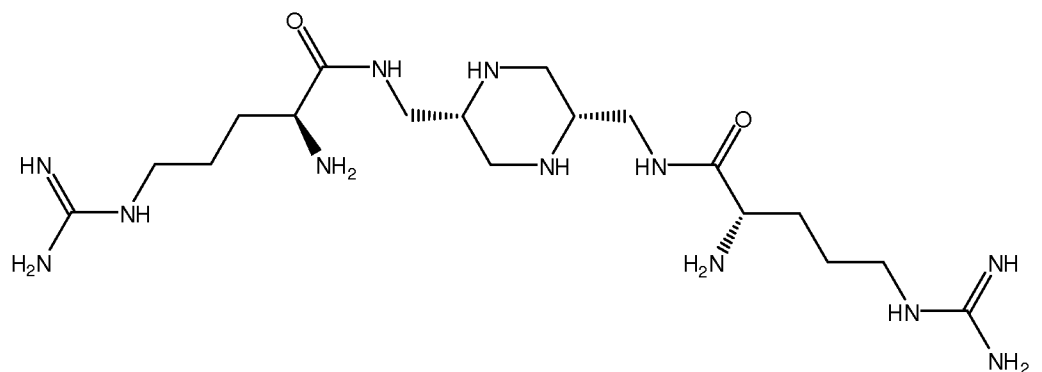
[0022] In a specific embodiment, the compound of formula V is a stereoisomer as depicted in formula VII:

(VII)



[0023] In another specific embodiment, the compound of formula VI is a stereoisomer as depicted in formula VIII:

(VIII)



[0024] The compounds of the invention can be administered in a pharmaceutical composition as an aqueous solution as a bolus and/or intravenous infusion, subcutaneous injection, or orally. In the preferred embodiment, the compounds are administered by injection (intravenous, intramuscular or subcutaneous) in a carrier such as distilled sterile water, saline, buffered saline, or another pharmaceutically acceptable excipient for injection. In some embodiments, the inhibitor may be administered orally, to a mucosal surface (nasal, pulmonary, vaginal, rectal or buccal) or by depot.

[0025] The compounds of the invention may be administered in pharmaceutical composition to the patient in need of reversal of heparin, LMWH or other thrombin inhibitor-mediated anticoagulation in an effective amount to restore normal coagulation and hemostasis. The pharmaceutical compositions including the compound of the inventions are suitable for hospital use or in non-emergency home reversal. It is administered to the patient in need of reversal of heparin, LMWH or other thrombin inhibitor mediated anticoagulation in an effective amount to restore coagulation. The compounds and pharmaceutical compositions described herein can also be used to reduce the activity of heparin-binding growth factors and/or for reversing completely or in part a combination of one or more Factor IIa and/or Factor Xa anticoagulant agents.

[0026] Thus, the compounds of the invention can be used in a method of completely or partially reversing an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor. The compounds of the invention can also be used as a part of a diagnostic kit, e.g., a diagnostic kit for determining concentration of an anticoagulant in the blood.

[0027] Examples demonstrate that DAP directly bound rivaroxaban, apixaban, unfractionated heparin, fondaparinux, and LMWH, reversing anticoagulant activity. DAP reversed oral rivaroxaban and subcutaneous LMWH anticoagulation *in vivo* as measured by aPTT and subcutaneous fondaparinux as measured by Xa activity in rats. DAP reversal, confirmed by statistically significant reduction in blood loss in tail rat transection assay, was shown for apixaban, dabigatran, edoxaban, and rivaroxaban. DAP completely reversed apixaban and rivaroxaban at a dose mass ratio of about 10:1 DAP:anticoagulant

in human blood *ex vivo* as measured using an anti-Xa kit. DAP exhibited a dose-dependent reversal of apixaban and rivaroxaban in human blood *ex vivo*.

Rivaroxaban reversal in freshly drawn human whole blood was confirmed by aPTT measurements *ex vivo*. DAP did not bind argatroban concentrations up to 1:1000 *in vitro*. DAP reversed oral dabigatran *in vivo* in rats as measured by aPTT. Argatroban dosed rats remained anticoagulated after a 200x IV dose of DAP, showing that DAP is safe and that the reversal interaction is specific for the heparins and new oral anticoagulants. In summary, the examples demonstrate complexation of DAP to heparin and LMWH and that DAP serves as an excellent reversal agent for heparin, heparin-like compounds and other thrombin inhibitors including dabigatran, approved low molecular weight heparins, as well as rivaroxaban (XARELTO®), fondaparinux (ARIXTRA®), edoxaban (LIXIANA®), and apixaban (ELIQUIS®), as tested in *in vitro* assays with human blood, anti-Xa and aPTT tests and/or *in vivo* in a rat tail transection assay.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0028] **Figure 1** is a graph of heat flow versus temperature as measured by differential scanning calorimetry (DCS) in which DAP is heated from -20°C to 200°C (“1” or “first heat”), cooled to -20°C, and heated back to 200°C (“2” or “second heat”).

[0029] **Figure 2** is a graph of DAP alone, UFH alone, and DAP-UFH combination, as a function of volume percent compared to size (d.nm) as measured by Dynamic Light Scattering (DLS).

[0030] **Figure 3** is a graph of DAP alone, rivaroxaban alone and DAP-rivaroxaban in ratios of 1:1 and 10:1, DAP:rivaroxaban, as a function of volume (percent) compared to size (d.nm) as measured by DLS.

[0031] **Figure 4** is a graph of DAP alone, apixaban alone and DAP- apixaban binding in ratios of 1:1, 10:1 and 100:1, as a function of volume (percent) compared to size (d.nm) as measured by DLS.

[0032] **Figure 5** is a graph of DAP alone, fondaparinux alone and DAP-fondaparinux binding in ratios of 1:1, 10:1 and 100:1, as a function of volume (percent) compared to size (d.nm) as measured by DLS.

[0033] **Figure 6** is a graph of DAP alone, LMWH alone and DAP-LMWH binding in ratios of 1:1, 1:10 and 100:1, as a function of volume (percent) compared to size (d.nm) as measured by DLS.

[0034] **Figure 7** is a graph of DAP alone, argatroban alone and DAP-argatroban binding in ratios of 1:1, 10:1, 100:1, and 1000:1, as a function of volume (percent) compared to size (d.nm) as measured by DLS.

[0035] **Figure 8** is a graph of activated partial thromboplastin time (aPTT, seconds) measured over time (hours) during five hours after subcutaneous administration of 10 mg of bemiparin (LMWH) to a rat. Four hours into treatment, the rat received an intravenous dose of 200 mg/kg (100mg) DAP.

[0036] **Figure 9** is a graph of activated partial thromboplastin time (aPTT, seconds) measured over time (hours) after oral administration of PRADAXA® (dabigatran) to a rat followed by intravenous administration of 200 and 100 mg/kg (100mg and 50 mg) DAP.

[0037] **Figure 10** is a graph of activated partial thromboplastin time (aPTT) measured over time (hours) after subcutaneous administration of unfractionated heparin (UFH) to a rat followed by intravenous administration of 200 mg/kg (100 mg) and 400 mg/kg (200 mg) DAP.

[0038] **Figure 11** is a graph of aPTT (seconds) measured over time (hours) after oral administration of 5mg/kg of rivaroxaban to a rat followed by intravenous administration of 5 mg/kg (2 mg) DAP.

[0039] **Figure 12** is a graph of active fondaparinux concentration ($\mu\text{g/mL}$) measured over time (minutes after reversal) after a subcutaneous administration of 5 mg/kg fondaparinux to a rat, followed by intravenous administration of 200 mg/kg DAP (i.e., “reversal”).

[0040] **Figure 13** is a graph of aPTT (seconds) measured over time (minutes after reversal) after oral administration of 15.5 mg/kg PRADAXA® (dabigatran) to a rat, followed by intravenous administration of 100 mg/kg DAP (i.e., “reversal”).

[0041] **Figure 14** is a graph of the aPTT time (seconds) for 0, 2, 10, 25, 50, and 100 mg intravenously administered DAP.

[0042] **Figure 15** is a graph of blood collected (i.e., cumulative blood loss) over 30 minutes in a rat tail transection bleeding assay in rats receiving 2 mg rivaroxaban and 0 mg DAP, 2 mg rivaroxaban and 2.5 mg DAP, 2 mg rivaroxaban and 12.5 mg DAP, or sham reversal and anticoagulant doses (“sham”). With groups of three age-matched rats, 12.5 mg of DAP reduced blood loss to sham dose levels yielding a statistically significant difference (* $p < 0.05$) from rats receiving rivaroxaban only.

[0043] **Figure 16** is a graph of blood collected (i.e., cumulative blood loss) over 30 minutes in a rat tail transection bleeding assay in rats receiving 1.25 mg apixaban and 0 mg DAP, 1.25 mg apixaban and 5 mg DAP, 1.25 mg apixaban and 12.5 mg DAP, or sham reversal and anticoagulant doses (“sham”). With groups of three age-matched rats, 5 mg and 12.5 mg of DAP reduced blood loss to sham dose levels yielding a statistically significant difference (*** $p < 0.01$) from rats receiving apixaban only.

[0044] **Figure 17** is a graph of blood collected (i.e., cumulative blood loss) over 30 minutes in a rat tail transection bleeding assay in rats receiving 1.25 mg edoxaban and 0 mg DAP, 1.25 mg edoxaban and 12.5 mg DAP, or sham reversal and anticoagulant doses (“sham”). With groups of three age-matched rats, 12.5 mg of DAP reduced blood loss to sham dose levels yielding a statistically significant difference (* $p < 0.05$) from rats receiving edoxaban only.

[0045] **Figure 18** is a graph of blood collected (i.e., cumulative blood loss) over 30 minutes in a rat tail transection bleeding assay in rats receiving 15 mg dabigatran etexilate and 0 mg DAP, 15 mg dabigatran etexilate and 5 mg DAP, 15 mg dabigatran etexilate and 12.5 mg DAP, or sham reversal and anticoagulant doses (“sham”). With groups of three age-matched rats, 12.5 mg of DAP reduced blood loss to sham dose levels yielding a statistically significant difference (*** $p < 0.01$) from rats receiving dabigatran etexilate only.

[0046] **Figure 19** is a graph of aPTT (seconds) measured in freshly drawn human blood treated *ex vivo* with 50 micrograms/ml DAP, 0.25 micrograms/ml rivaroxaban, 50 micrograms/ml DAP and 0.25 micrograms/ml rivaroxaban, or saline.

- 12 -

[0047] **Figure 20** is a graph showing effective anticoagulant concentration measured by anti-factor Xa activity assay in human plasma treated *ex vivo* with of 218 µg/L rivaroxaban alone or in combination with 1,250 mg/L DAP, and 459 µg/L rivaroxaban alone or in combination with 6,250 µg/L DAP.

[0048] **Figure 21** is a graph showing effective anticoagulant concentration measured by anti-factor Xa activity assay in human plasma treated *ex vivo* with 156 µg/L apixaban alone or in combination with 1,156 µg/L DAP, and 313 µg/L apixaban alone or in combination with 3,125 µg/L DAP.

[0049] **Figure 22** is a graph showing effective anticoagulant concentration measured by anti-factor Xa activity assay in human plasma treated *ex vivo* with 218 µg/L rivaroxaban, alone or in combination with increasing amounts (1.25, 12.5, 125, and 1,250 µg/L) of DAP.

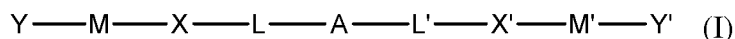
DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. Anticoagulant Reversal Agents

[0050] Novel anticoagulant reversal agents are disclosed. The compounds of the invention include compounds described herein, as well as the pharmaceutically acceptable salts thereof.

[0051] Inhibitors of heparin, heparin fragments, fondaparinux and factor Xa or factor IIa inhibitors (e.g., oral factor Xa or factor IIa inhibitors) have been developed. The general structure of the anti-coagulant reversal agents of interest is: **R-Z-R'**, where R and R' are positively charged agents at physiologic pH and can be the same or different molecules and Z is a hydrophobic cyclic or fused ring compound.

[0052] More specifically, the inhibitor is a compound of the formula (I) or pharmaceutically acceptable salt thereof:



wherein:

A is a substituted or unsubstituted aromatic or non-aromatic, carbocyclic or heterocyclic ring or a linear moiety;

L and L' are the same or different and are linkers;

X and X' are the same or different and are absent or are a functional group that attaches the linker L to M and the linker L' to M', respectively;

M and M' are the same or different and are absent or is a linker that attaches X to Y and X' to Y', respectively; and

Y and Y' are the same or different and are a moiety containing one or more cationic atoms or groups or one or more groups that become cationic under physiological conditions.

[0053] The compounds can be symmetrical or asymmetrical; that is, one or more of L, L', X, X', M, M', Y, or Y' can be the same or different. The compounds can be chiral (i.e., contain one or more chiral centers) or achiral.

[0054] In some embodiments, A is a heterocyclic moiety. In other embodiments, A is a heterocyclic moiety and L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain. In still other embodiments, A is a heterocyclic moiety, L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain, and X and X' are -NH-C(=O)- . In still other embodiments, A is a heterocyclic moiety, L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain, X and X' are -NH-C(=O)- , and M and M' are a substituted alkylene chain. As used herein, alkylene chain is a divalent alkylene moiety that is C_1 to C_{10} , preferably C_3 to C_6 in length, and which may be substituted or unsubstituted. Exemplary substituents include alkyl, hydroxyl, hydroxyl alkyl, amino, amino alkyl, alkoxy, alkyl alkoxy. As used herein, the term alkyl is C_1 to C_{10} , preferably C_1 - C_6 straight chain or branched hydrocarbon. In still other embodiments, A is a heterocyclic moiety, L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain, X is -NH-C(=O)- , M and M' are a substituted alkylene chain, and Y and Y' are a guanidine moiety.

[0055] In some embodiments, A is a non-aromatic, heterocyclic ring, such as piperazine or diketopiperazine. In other embodiments, A is a linear moiety, such as a linear diamine or other linear moiety containing reactive functional groups that can form a bond to X and X', when present, or Y and Y'. In some embodiments, the linkers L and L' are attached to the heteroatoms in the ring A, such as the two nitrogen atoms in piperazine. In other embodiments, the linker L and L' are attached to atoms other than the heteroatoms in the ring, such as carbon. In particular embodiments, A is a 1,4 or 2,5 disubstituted piperazine

ring. In some embodiments, L and L' and/or M and M' are a substituted or unsubstituted alkylene chains, such as $-(CH_2)_n-$, where n is an integer from 1-10, preferably from 1-6, e.g., 1-3. In particular embodiments, n is 3. In some embodiments, L and/or M are absent.

[0056] X and X' are a functional group that attaches the linkers L and L' to Y and Y'. Exemplary functional groups include, but are not limited to, esters, amides, carbonates, and ketones. In particular embodiments, X and X' are a functional group that is resistant to simple hydrolysis, such as an amide group.

[0057] Y and Y' are a moiety that contains one or more atoms or groups that are cationic or will be cationic under physiological conditions. Examples include amine and guanidine moieties as well as phosphorous containing moieties, such as alkyltriphenylphosphonium, tetraphenylphosphonium, tetraphenylarsonium, tribenzyl ammonium, and phosphonium moieties. Additional cationic moieties include cationic oligomers and polymers, such as oligo- or polylysine, oligo- or polyarginine, N-alkylated polyethylene imine, and the like. Other cationic moieties include delocalized lipophilic cations containing one to three carbimino, sulfinimino, or phosphinimino units as described in Kolomeitsev *et al.*, *Tet. Let.*, Vol. 44, No. 33, 5795-5798 (2003).

[0058] In some embodiments, the compound is a piperazine derivative, wherein the amino acid side chains contain one or more positively charged atoms or atoms that will be positively charged under physiological conditions. Examples include diarginine piperazine. Other amino acids that are positively charged or will be positively charged under physiological conditions can be substituted for arginine.

[0059] "Aromatic", as used herein, refers to 5-12-membered, preferably 5-, 6- and 7-membered aromatic, heterocyclic, fused aromatic, fused heterocyclic, biaromatic, or biheterocyclic ring systems, optionally substituted. Broadly defined, "Ar", as used herein, includes 5-, 6- and 7-membered single-ring aromatic groups that may include from zero to four heteroatoms, for example, benzene, pyrrole, furan, thiophene, imidazole, oxazole, thiazole, triazole, pyrazole, pyridine, pyrazine, pyridazine and pyrimidine, and the like. Those aryl groups having heteroatoms in the ring structure may also be referred to as "aryl heterocycles" or "heteroaromatics". The aromatic ring can be substituted at one

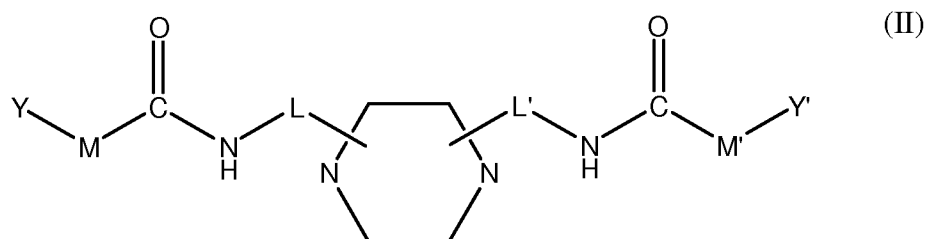
or more ring positions with such substituents as described above, for example, halogen, azide, alkyl, aralkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, hydroxyl, alkoxy, amino, nitro, sulfhydryl, imino, amido, phosphonate, phosphinate, carbonyl, carboxyl, silyl, ether, alkylthio, sulfonyl, sulfonamido, ketone, aldehyde, ester, heterocyclyl, aromatic or heteroaromatic moieties, --CF₃, --CN, or the like. The term “Ar” also includes polycyclic ring systems having two or more cyclic rings in which two or more carbons are common to two adjoining rings (i.e., “fused rings”) wherein at least one of the rings is aromatic, e.g., the other cyclic ring or rings can be cycloalkyls, cycloalkenyls, cycloalkynyls, aryls and/or heterocycles. Examples of heterocyclic ring include, but are not limited to, benzimidazolyl, benzofuranyl, benzothiofuranyl, benzothiophenyl, benzoxazolyl, benzoxazoliny, benzthiazolyl, benztriazolyl, benztetrazolyl, benzisoxazolyl, benzisothiazolyl, benzimidazoliny, carbazolyl, 4aH carbazolyl, carboliny, chromanyl, chromenyl, cinnoliny, decahydroquinoliny, 2H,6H-1,5,2-dithiaziny, dihydrofuro[2,3 b]tetrahydrofuran, furanyl, furazanyl, imidazolidiny, imidazoliny, imidazolyl, 1H-indazolyl, indolenyl, indoliny, indoliziny, indolyl, 3H-indolyl, isatinoyl, isobenzofuranyl, isochromanyl, isoindazolyl, isoindoliny, isoindolyl, isoquinoliny, isothiazolyl, isoxazolyl, methylenedioxyphenyl, morpholiny, naphthyridiny, octahydroisoquinoliny, oxadiazolyl, 1,2,3-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazolyl, 1,2,5-oxadiazolyl, 1,3,4-oxadiazolyl, oxazolidiny, oxazolyl, oxindolyl, pyrimidiny, phenanthridiny, phenanthroliny, phenaziny, phenothiaziny, phenoxathiny, phenoxaziny, phthalaziny, piperaziny, piperidiny, piperidonyl, 4-piperidonyl, piperonyl, pteridiny, puriny, pyranly, pyraziny, pyrazolidiny, pyrazoliny, pyrazolyl, pyridaziny, pyridooxazole, pyridoimidazole, pyridothiazole, pyridiny, pyridyl, pyrimidiny, pyrrolidiny, pyrroliny, 2H-pyrrolyl, pyrrolyl, quinazoliny, quinoliny, 4H-quinoliziny, quinoxaliny, quinuclidiny, tetrahydrofuranyl, tetrahydroisoquinoliny, tetrahydroquinoliny, tetrazolyl, 6H-1,2,5-thiadiaziny, 1,2,3-thiadiazolyl, 1,2,4-thiadiazolyl, 1,2,5-thiadiazolyl, 1,3,4-thiadiazolyl, thianthrenyl, thiazolyl, thienyl, thienothiazolyl, thienooxazolyl, thienoimidazolyl, thiophenyl and xanthenyl.

[0060] “Heterocycle” or “heterocyclic”, as used herein, refers to a cyclic radical attached via a ring carbon or nitrogen of a monocyclic or bicyclic ring containing

3-10 ring atoms, and preferably from 5-6 ring atoms, consisting of carbon and one to four heteroatoms each selected from the group consisting of non-peroxide oxygen, sulfur, and N(R) wherein R is absent or is H, O, (C₁₋₄)alkyl, phenyl or benzyl, and optionally containing 1-3 double bonds and optionally substituted with one or more substituents. Examples of heterocyclic ring include, but are not limited to, benzimidazolyl, benzofuranyl, benzothiofuranyl, benzothiophenyl, benzoxazolyl, benzoxazoliny, benzthiazolyl, benztriazolyl, benztetrazolyl, benzisoxazolyl, benzisothiazolyl, benzimidazoliny, carbazolyl, 4*aH*-carbazolyl, carboliny, chromanyl, chromenyl, cinnoliny, decahydroquinoliny, 2*H*,6*H*-1,5,2-dithiaziny, dihydrofuro[2,3-*b*]tetrahydrofuran, furanyl, furazanyl, imidazolidiny, imidazoliny, imidazolyl, 1*H*-indazolyl, indolenyl, indoliny, indoliziny, indolyl, 3*H*-indolyl, isatinoyl, isobenzofuranyl, isochromanyl, isoindazolyl, isoindoliny, isoindolyl, isoquinoliny, isothiazolyl, isoxazolyl, methylenedioxyphenyl, morpholiny, naphthyridiny, octahydroisoquinoliny, oxadiazolyl, 1,2,3-oxadiazolyl, 1,2,4-oxadiazolyl, 1,2,5-oxadiazolyl, 1,3,4-oxadiazolyl, oxazolidiny, oxazolyl, oxindolyl, pyrimidiny, phenanthridiny, phenanthroliny, phenaziny, phenothiaziny, phenoxathiny, phenoxaziny, phthalaziny, piperaziny, piperidiny, piperidonyl, 4-piperidonyl, piperonyl, pteridiny, puriny, pyranly, pyraziny, pyrazolidiny, pyrazoliny, pyrazolyl, pyridaziny, pyridooxazole, pyridoimidazole, pyridothiazole, pyridiny, pyridyl, pyrimidiny, pyrrolidiny, pyrroliny, 2*H*-pyrrolyl, pyrrolyl, quinazoliny, quinoliny, 4*H*-quinoliziny, quinoxaliny, quinuclidiny, tetrahydrofuranyl, tetrahydroisoquinoliny, tetrahydroquinoliny, tetrazolyl, 6*H*-1,2,5-thiadiaziny, 1,2,3-thiadiazolyl, 1,2,4-thiadiazolyl, 1,2,5-thiadiazolyl, 1,3,4-thiadiazolyl, thianthrenyl, thiazolyl, thienyl, thienothiazolyl, thienooxazolyl, thienoimidazolyl, thiophenyl and xanthenyl.

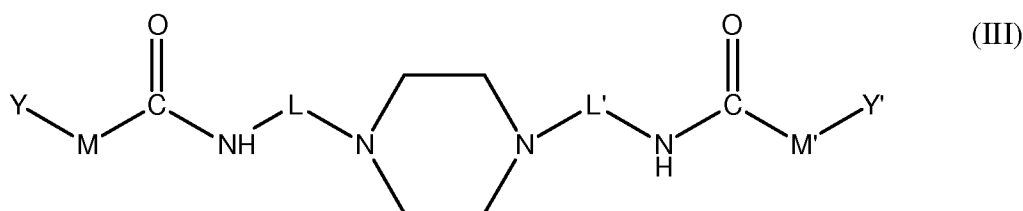
[0061] In another embodiment of the invention the inhibitor is a compound represented by the formula II or a pharmaceutically acceptable salt thereof:

- 17 -



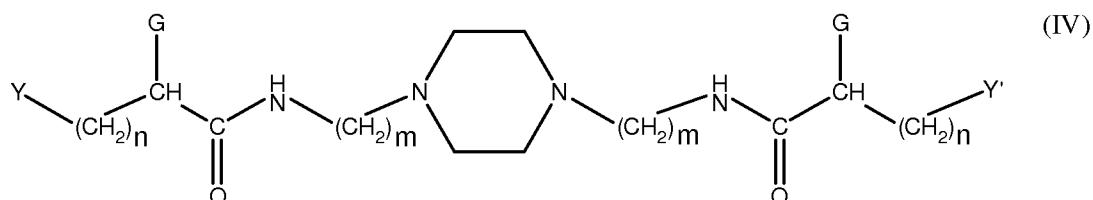
wherein each of L, L', M, M', Y and Y' are as previously described.

[0062] In another embodiment of the invention the inhibitor is a compound represented by the formula III or a pharmaceutically acceptable salt thereof:



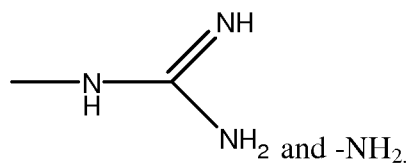
wherein L, L', M, M', Y and Y' are as previously described.

[0063] In yet another embodiment of the invention the inhibitor is a compound represented by the formula (IV) or pharmaceutically acceptable salt thereof:



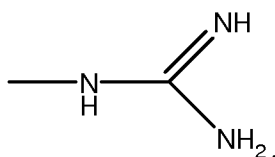
wherein Y and Y' are as previously described and n is 3 to 5, m is 3 to 6 and G is selected from -NH₂ and OH. Most preferably, G is amino.

[0064] Yet another embodiment of the invention the inhibitor is a compound represented by any of formula II, III or IV and Y and Y' are independently selected from the group consisting of



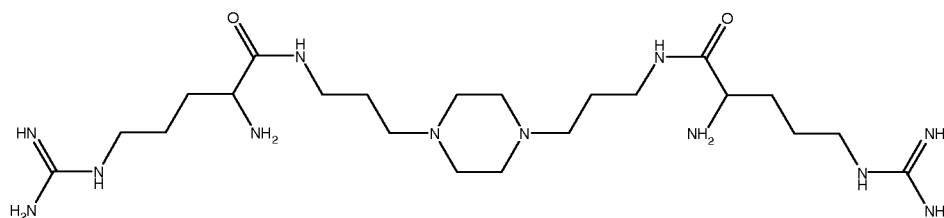
[0065] Most preferably G is -NH₂ and Y and Y' are

- 18 -



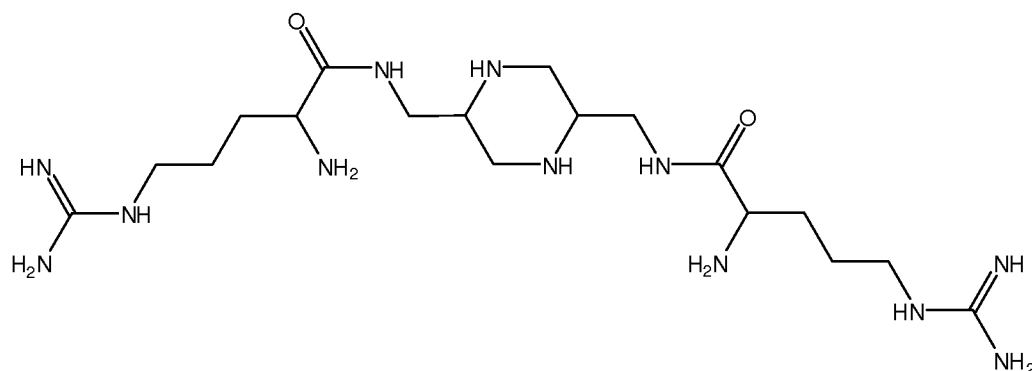
[0066] Thus, in one embodiment, the compound of the invention is di-arginine piperazine (“DAP”), such as the compound of formula V, or a related compound of formula VI, or pharmaceutically acceptable salts of either compound:

(V)



2-Amino-5-guanidino-pentanoic acid (3-{4-[3-(2-amino-5-guanidino-pentanoylamino)-propyl]-piperazin-1-yl}-propyl)-amide; or

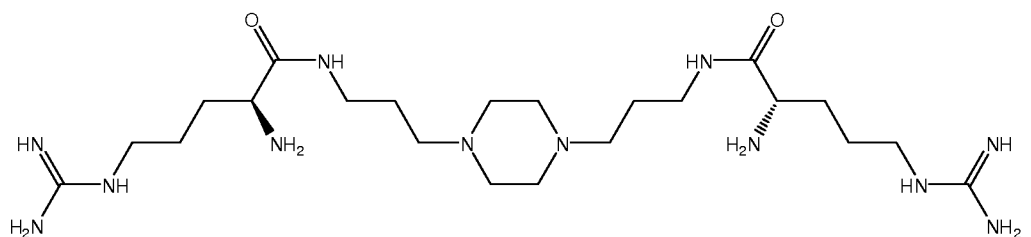
(VI)



2-Amino-5-guanidino-pentanoic acid {5-[(2-amino-5-guanidino-pentanoylamino)-methyl]-piperazin-2-ylmethyl}-amide.

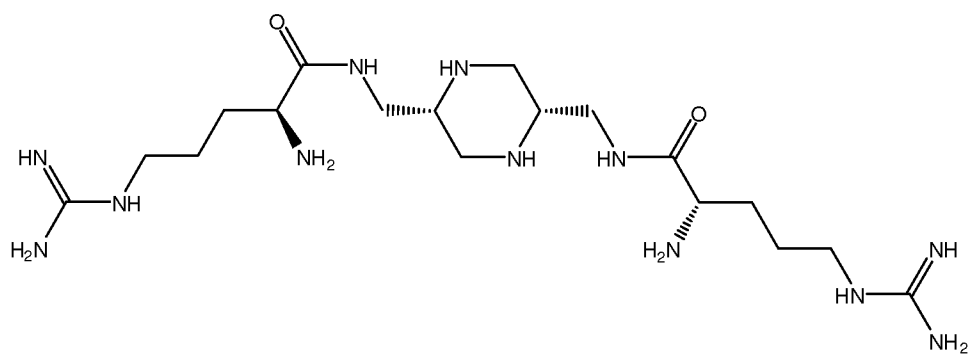
[0067] In a specific embodiment, the compound of formula V is a stereoisomer as depicted in formula VII:

(VII)



[0068] In another specific embodiment, the compound of formula VI is a stereoisomer as depicted in formula VIII:

(VIII)



[0069] The phrase “pharmaceutically acceptable salt” of a compound as used herein means a salt that is pharmaceutically acceptable and that possesses the desired pharmacological activity of the parent compound. Pharmaceutically acceptable salts include salts of acidic or basic groups present in compounds of the invention. Pharmaceutically acceptable acid addition salts include, but are not limited to, hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, nitrate, sulfate, bisulfate, phosphate, acid phosphate, isonicotinate, acetate, lactate, salicylate, citrate, tartrate, pantothenate, bitartrate, ascorbate, succinate, maleate, gentisinate, fumarate, gluconate, glucaronate, saccharate, formate, benzoate, glutamate, methanesulfonate, ethanesulfonate, benzensulfonate, p-toluenesulfonate and pamoate (i.e., 1,1'-methylene-bis-(2-hydroxy-3-naphthoate)) salts. Suitable base salts include, but are not limited to, aluminum, calcium, lithium, magnesium, potassium, sodium, zinc, and diethanolamine salts.

[0070] The compound of the invention inhibits activity of coagulation inhibitors. One proposed mechanism of action of the compound of the invention is through binding negatively charged molecules (e.g., fondaparinux, unfractionated

heparin, LMWH, described herein). Other coagulation inhibitors (e.g., factor IIa and factor Xa inhibitors such as dabigatran, apixaban, edoxaban, and rivaroxaban, described herein) also possess negative charges; thus, the compound of the invention may inhibit these coagulation inhibitors through neutralization of their negatively charged moieties.

[0071] Another proposed mechanism of action of the compound of the invention is through weak physical interactions such as hydrogen bonding and hydrophobic interactions with the coagulation inhibitors. Oral Factor IIa and Xa inhibitors possess hydrophobic portions, which may cause hydrophobic association with the compound of the invention, e.g., DAP.

[0072] Thus, in some embodiments, the compounds of the invention contain at least one cyclic hydrophobic moiety, e.g., one or a combination of aliphatic or aromatic rings including fused rings. In other embodiments, the compounds of the invention contain at least one cyclic hydrophobic moiety and a least two positively charged or partially charged moieties at physiological pH.

[0073] In some embodiments of the invention, one or both arginines of the compounds of Formulas V and VI (or the compounds of Formulas VII and VIII) are substituted by one or more positively charged amino acids, their derivatives, or similarly charged compounds, e.g., lysine, histidine, ornithine. The arginines in the compounds of Formulas V and VI or positively charged amino acids substituted for such arginines can be naturally occurring amino acids (i.e., L-amino acids), their enantiomers (i.e., D-amino acids), or racemic or other mixtures thereof. "Enantiomers" refer to two stereoisomers of a compound which are non-superimposable mirror images of one another.

[0074] Stereochemical definitions and conventions used herein generally follow S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Many organic compounds exist in optically active forms, i.e., they have the ability to rotate the plane of plane-polarized light. In describing an optically active compound, the prefixes D and L or R and S are used to denote the absolute configuration of the molecule about its chiral center(s). The prefixes D and L or (+) and (-) are

employed to designate the sign of rotation of plane-polarized light by the compound, with (-) or L meaning that the compound is levorotatory. A compound prefixed with (+) or D is dextrorotatory. For a given chemical structure, these stereoisomers are identical except that they are mirror images of one another. A specific stereoisomer may also be referred to as an enantiomer, and a mixture of such isomers is often called an enantiomeric mixture. A 50:50 mixture of enantiomers is referred to as a racemic mixture or a racemate, which may occur where there has been no stereoselection or stereospecificity in a chemical reaction or process. The terms “racemic mixture” and “racemate” refer to an equimolar mixture of two enantiomeric species, devoid of optical activity.

[0075] In other embodiments of the invention, the compound of the invention contains at least one cyclic hydrophobic moiety, e.g., one or a combination of aliphatic and aromatic rings including fused rings. Compounds of interest contain at least one cyclic hydrophobic moiety and at least two positively charged or partially charged moieties at physiological pH.

[0076] Special consideration should be given to the design of peptide-based therapeutic agents, since such agents may cause unwanted and often severe immunological reactions once administered to a subject. The compound of the invention is designed to be of sufficiently low molecular weight to minimize immunogenicity issues. In one embodiment, in order to avoid activation of the immune response, the compound is designed such that its molecular weight is less than about 5000 daltons, such as less than or about 1000 daltons, e.g., about 500 daltons. In one embodiment, the molecular weight of the compound is about 512 daltons.

[0077] It is preferable that the compounds of the invention do not bind, or otherwise interfere with the function of the ERG, a potassium ion channel that contributes to the electrical conductivity of the heart. Inhibition of this potassium channel may lead to potentially fatal long QT syndrome, and some otherwise successful drug candidates have exhibited human ERG binding.

[0078] In addition, it is preferable that the compound of the invention does not inhibit or serve as substrates for membrane-bound cytochrome p450 (CYP) enzymes. CYPs are major enzymes involved in drug metabolism, and

modulation of CYP activity may interfere with clearance and metabolism of other drugs administered to a subject, causing unwanted drug interactions.

[0079] Also preferably, the compounds of the invention do not exhibit significant plasma protein binding *in vitro* (e.g., albumin binding). Because the compounds of the invention are largely unbound to plasma proteins, they exhibit short activity half-lives minimizing the risk of accumulation-based overdose.

II. Synthesis of Anticoagulant Reversal Agents

[0080] The compounds and their pharmaceutically acceptable salts described herein are prepared using a variety of methods starting from commercially available compounds, known compounds, or compounds prepared by known methods. Exemplary synthetic routes to one of the compounds described herein (Compound of Formula V, di-arginine piperazine, “DAP”) are included in the schemes below. The schemes below are also applicable to the DAP stereoisomer compound of Formula VII by selecting the appropriate stereoisomeric starting compounds. Other compounds of the invention may be synthesized following a similar synthetic scheme. It is understood by those skilled in the art that the order of steps shown herein may be changed to accommodate functionality in the target molecule. It is also understood by those skilled in the art that various protection and deprotection steps may be required for synthesis. The need for protection and deprotection, and the selection of appropriate protecting groups are found, for example, in Greene and Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, John Wiley & Sons (1991), which is incorporated herein by reference in its entirety.

[0081] In some embodiments of the present invention, the protecting group is tertiary butyloxycarbonyl group (Boc). In other embodiments of the present invention, the protecting group is 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf). In another embodiment, amino acid protecting group may be, but is not limited to, 2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulphonyl (PMC).

[0082] Protecting groups may be removed by a variety of routes. Removal of protecting group comprises, e.g., treating protected compound with trifluoroacetic acid (TFA), aqueous HCl, or heating in acetic acid. Because removal of protecting groups, e.g., removal of protecting groups under acidic

conditions, can result in production of cationic species that can alkylate the functional groups on the peptide chain, scavengers may be added during the deprotection step to react with any of the free reactive species. Examples of scavengers include, but are not limited to, water, anisole derivatives and thiol derivatives. Thus, in one embodiment, removal of protecting groups comprises treating protected compound with TFA and a scavenger (e.g., TFA and water).

[0083] Various solvents, e.g., organic solvents, may be used in the steps of the synthesis. Appropriate solvents include, but are not limited to, dimethyl sulfoxide, dimethylformamide (DMF), tetrahydrofuran, methanol, ethanol, methylene chloride, toluene, and acetone. In some embodiments, the solvent is DMF.

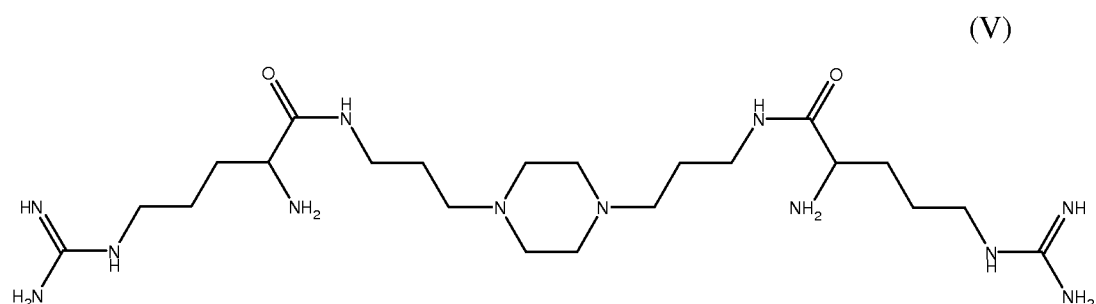
[0084] Suitable acid binding agents may be used in the steps of the synthesis. These include, but are not limited to, organic bases, such as, for example, pyridine, triethylamine, triethanolamine, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), and diisopropylethylamine (DIEA); and inorganic bases, such as, for example, sodium hydride, potassium carbonate, and sodium carbonates. In some embodiments, the acid binding agent is DIEA.

[0085] Synthesis may include peptide coupling reagents. Peptide coupling reagents may include, but are not limited to, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-Hydroxybenzotriazole (HOBt), carbonyldiimidazole (CDI), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), active N-hydroxysuccinamide (OSu) ester, O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU), and combinations thereof. In one embodiment, the peptide coupling reagent is HBTU. In another embodiment, the peptide coupling reagent is EDC/HOBt. In yet another embodiment, the peptide coupling reagent is an active OSu ester.

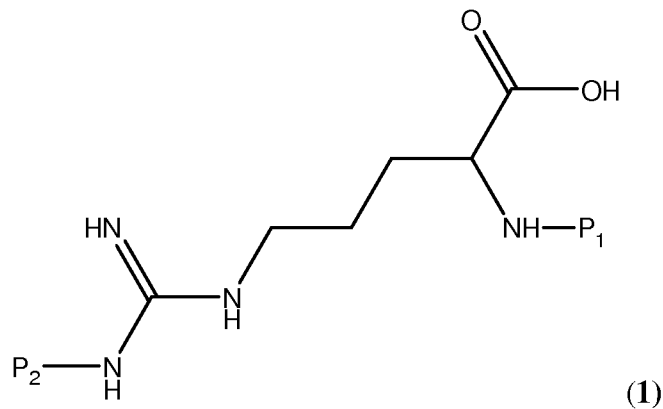
[0086] Additionally, the synthesis may include a step in which a crude product is purified, e.g., by column chromatography. The desired products of each step or series of steps may be separated and/or purified to the desired degree of homogeneity by the techniques common in the art. Typically such separations involve multiphase extraction, crystallization from a solvent or solvent mixture, distillation, sublimation, or chromatography. Chromatography can involve any

number of methods including, for example: reverse-phase and normal phase; size exclusion; ion exchange; high, medium, and low pressure liquid chromatography methods and apparatus; small scale analytical; simulated moving bed (SMB) and preparative thin or thick layer chromatography, as well as techniques of small scale thin layer and flash chromatography.

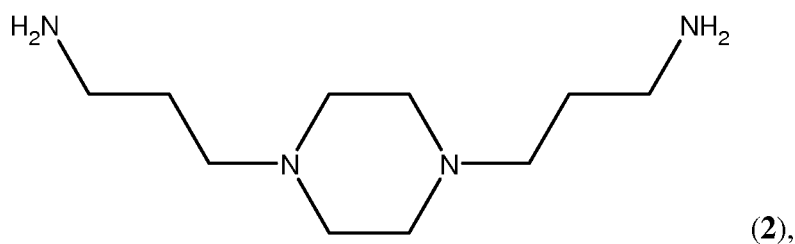
[0087] In one scheme, the compound of Formula V (DAP)



is synthesized by reacting excess equivalents (e.g., at least about two equivalents) of compound **1**

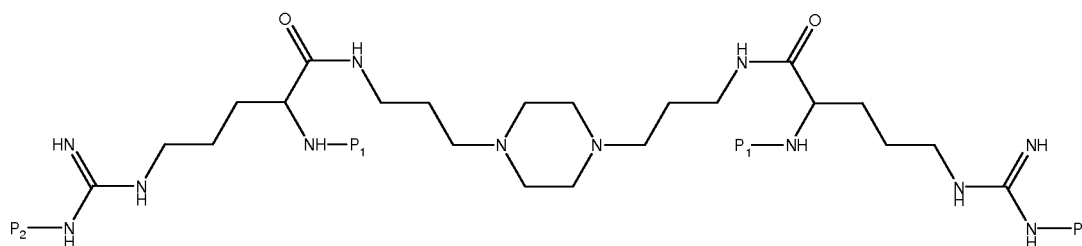


with one equivalent of compound **2**



in the presence of a peptide coupling reagent, to obtain a compound **3**

- 25 -



(3),

wherein P1 is a protecting group and P2 is a protecting group or is a hydrogen.

[0088] In one embodiment, the peptide coupling reagent is HBTU, EDC/HOBt, or an active OSu ester. In one embodiment, the protecting group P1 is Boc. In another embodiment, the protecting group P2 is Pbf. In a different embodiment, the protecting group P1 is Boc and P2 is a hydrogen.

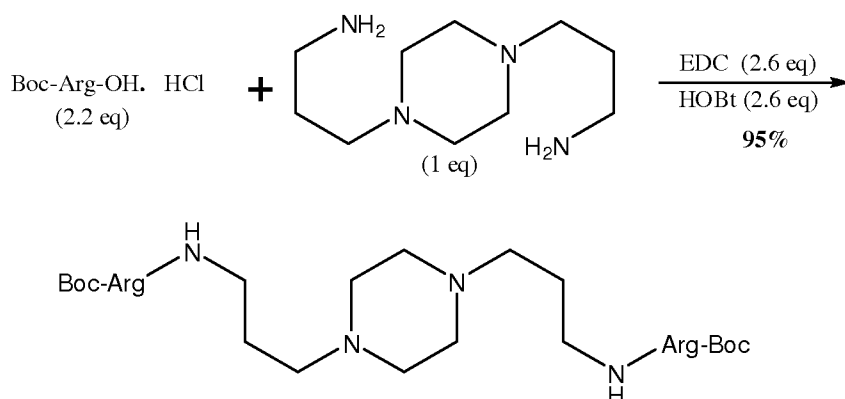
[0089] Subsequently, **3** may be purified. This purification may involve various column chromatography methods known in the art.

[0090] Protecting groups of **3** may be removed by a variety of methods known in the art in order to obtain the compound of Formula V. Deprotection can be achieved by, e.g., removal of protecting groups using trifluoroacetic acid (TFA) and water, TFA and water or another scavenger, including, but not limited to aqueous HCl, or heating in acetic acid.

[0091] The compound may be further purified using a column chromatography method, such as ion exchange chromatography with salt buffers or preparative HPLC with trifluoroacetic acid or acetic acid as a buffer.

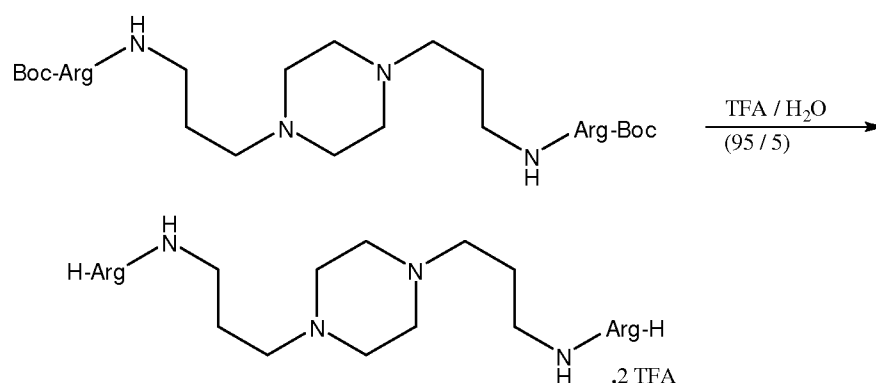
[0092] In a more specific scheme, the coupling involved reacting compound **1**, wherein P1 was Boc and P2 was a hydrogen (depicted as Boc-Arg-OH·HCl below), with compound **2** as depicted below:

- 26 -



The resultant crude product was more than 95% pure by thin layer chromatography (TLC).

[0093] Subsequently, the deprotection step was carried out as depicted below:



[0094] The deprotected product was purified by preparative HPLC using 1% acetic acid buffer. Product purity of $\geq 98\%$ was observed. Residual TFA was removed by low quantity of DOWEX resin. The molecular weight of DAP (the compound of Formula V) is 512.4, and the compound synthesized according to the above scheme exhibited the following primary peak by mass spectroscopy: $[\text{M}+\text{H}]^+=513.4$.

III. Pharmaceutical Compositions

[0095] Pharmaceutical compositions comprising the compounds described herein are provided. Such a composition may contain, in addition to the compound of the invention, a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. The term “pharmaceutically acceptable” means a nontoxic material that is compatible with the physical and chemical characteristics of the active ingredient and does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the

active. The compositions may contain various diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials well known in the art. The characteristics of the carrier will depend on the route of administration, and are generally well known in the art.

[0096] The pharmaceutical composition of the invention may be adapted for enteral administration – administration of the composition, wherein the composition is absorbed through the digestive tract, e.g., oral ingestion, rectal administration. In other embodiments, the pharmaceutical composition of the invention may be adapted for parenteral administration – administration of the composition, wherein the composition is introduced via a route other than digestive tract, e.g., intravenous, subcutaneous, cutaneous, nasal, pulmonary, vaginal, buccal route.

[0097] Suitable pharmaceutical compositions, e.g., compositions for oral administration, may be prepared as described in references such as “Pharmaceutical dosage form tablets”, eds. Liberman et. al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), “Remington – The science and practice of pharmacy”, 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, and “Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems”, 6th Edition, Ansel et.al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995), incorporated herein by reference, which provide information on carriers, materials (e.g., coating materials), equipment and process for preparing tablets and capsules and delayed release dosage forms of tablets, capsules, and granules.

[0098] Examples of suitable coating materials include, but are not limited to, cellulose polymers such as cellulose acetate phthalate, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate and hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate; polyvinyl acetate phthalate, acrylic acid polymers and copolymers, and methacrylic resins that are commercially available under the trade name Eudragit[®] (Roth Pharma, Westerstadt, Germany), Zein, shellac, and polysaccharides. Additionally, the coating material may contain conventional carriers such as plasticizers, pigments, colorants, glidants, stabilization agents, pore formers and surfactants.

[0099] Optional pharmaceutically acceptable excipients present in the drug-containing tablets, beads, granules or particles include, but are not limited to, diluents, binders, lubricants, disintegrants, colorants, stabilizers, and surfactants.

[0100] Diluents, also termed "fillers," are typically necessary to increase the bulk of a solid dosage form so that a practical size is provided for compression of tablets or formation of beads and granules. Suitable diluents include, but are not limited to, dicalcium phosphate dihydrate, calcium sulfate, lactose, sucrose, mannitol, sorbitol, cellulose, microcrystalline cellulose, kaolin, sodium chloride, dry starch, hydrolyzed starches, pregelatinized starch, silicone dioxide, titanium oxide, magnesium aluminum silicate and powder sugar.

[0101] Binders are used to impart cohesive qualities to a solid dosage formulation, and thus ensure that a tablet or bead or granule remains intact after the formation of the dosage forms. Suitable binder materials include, but are not limited to, starch, pregelatinized starch, gelatin, sugars (including sucrose, glucose, dextrose, lactose and sorbitol), polyethylene glycol, waxes, natural and synthetic gums such as acacia, tragacanth, sodium alginate, cellulose, including hydroxypropylmethylcellulose, hydroxypropylcellulose, ethylcellulose, and veegum, and synthetic polymers such as acrylic acid and methacrylic acid copolymers, methacrylic acid copolymers, methyl methacrylate copolymers, aminoalkyl methacrylate copolymers, polyacrylic acid/polymethacrylic acid and polyvinylpyrrolidone.

[0102] Lubricants are used to facilitate tablet manufacture. Examples of suitable lubricants include, but are not limited to, magnesium stearate, calcium stearate, stearic acid, glycerol behenate, polyethylene glycol, talc, and mineral oil.

[0103] Disintegrants are used to facilitate dosage form disintegration or "breakup" after administration, and generally include, but are not limited to, starch, sodium starch glycolate, sodium carboxymethyl starch, sodium carboxymethylcellulose, hydroxypropyl cellulose, pregelatinized starch, clays, cellulose, alginine, gums or cross linked polymers, such as cross-linked PVP (Polyplasdone XL from GAF Chemical Corp).

[0104] Stabilizers are used to inhibit or retard drug decomposition reactions which include, by way of example, oxidative reactions.

[0105] Surfactants may be anionic, cationic, amphoteric or nonionic surface active agents. Suitable anionic surfactants include, but are not limited to, those containing carboxylate, sulfonate and sulfate ions. Examples of anionic surfactants include sodium, potassium, ammonium or long chain alkyl sulfonates and alkyl aryl sulfonates such as sodium dodecylbenzene sulfonate; dialkyl sodium sulfosuccinates, such as sodium dodecylbenzene sulfonate; dialkyl sodium sulfosuccinates, such as sodium bis-(2-ethylthioxy)-sulfosuccinate; and alkyl sulfates such as sodium lauryl sulfate. Cationic surfactants include, but are not limited to, quaternary ammonium compounds such as benzalkonium chloride, benzethonium chloride, cetrimonium bromide, stearyl dimethylbenzyl ammonium chloride, polyoxyethylene and coconut amine. Examples of nonionic surfactants include ethylene glycol monostearate, propylene glycol myristate, glyceryl monostearate, glyceryl stearate, polyglyceryl-4-oleate, sorbitan acylate, sucrose acylate, PEG-150 laurate, PEG-400 monolaurate, polyoxyethylene monolaurate, polysorbates, polyoxyethylene octylphenylether, PEG-1000 cetyl ether, polyoxyethylene tridecyl ether, polypropylene glycol butyl ether, Poloxamer[®] 401, stearyl monoisopropanolamide, and polyoxyethylene hydrogenated tallow amide. Examples of amphoteric surfactants include sodium N-dodecyl-.beta.-alanine, sodium N-lauryl-.beta.-iminodipropionate, myristoamphoacetate, lauryl betaine and lauryl sulfobetaine.

[0106] Pharmaceutical compositions of the invention may be designed to provide delayed, sustained, pulsatile or other modified release.

[0107] If desired, the tablets, beads granules or particles may also contain minor amount of nontoxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, dyes, pH buffering agents, and preservatives.

[0108] Bioadhesive formulations may also be utilized to enhance uptake or modify release. Such formulations are known in the art. See, for example, US Patent Application No. 20060045865 by Jacob, incorporated herein by reference.

[0109] Pharmaceutical compositions adapted for delivery via nasal or pulmonary administration may also be useful. Aerosols for the delivery of therapeutic agents to the respiratory tract have been described, for example, Adjei, A. and Garren, J. *Pharm. Res.*, 7: 565-569 (1990); and Zanen, P. and Lamm, J.-W.J. *Int. J. Pharm.*,

114: 111-115 (1995). The respiratory tract encompasses the upper airways, including the oropharynx and larynx, followed by the lower airways, which include the trachea followed by bifurcations into the bronchi and bronchioli. The upper and lower airways are called the conducting airways. The terminal bronchioli then divide into respiratory bronchioli which then lead to the ultimate respiratory zone, the alveoli, or deep lung. Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313 (1990). The deep lung, or alveoli, is the primary target of inhaled therapeutic aerosols for systemic drug delivery.

[0110] Drugs administered by inhalation may come as liquid aerosol formulations.

[0111] For injectable compositions (e.g., intravenous compositions), the carrier is distilled sterile water, saline, buffered saline, or another pharmaceutically acceptable excipient for injection. Additives may include preservatives and acids or base to adjust pH, to alter solubility or uptake.

[0112] In one embodiment, wherein the pharmaceutical composition comprises the DAP compound of formula V (or its stereoisomer of formula VII) and the composition is adapted for parenteral administration in an injection, the compound is dissolved in water with appropriate tonicity and molality modifiers (such as phosphate buffered saline). DAP is water-soluble at greater than 100 mg/ml. In the one embodiment, DAP is adapted as a sterile solution for IV administration. In one aspect, the molality of the pharmaceutical composition in which DAP is adapted for IV administration is adjusted to 290 mOsm/L with sodium chloride, and the pH is adjusted to 7.4 with sodium hydroxide. Preferably the pharmaceutical composition is administered as an intravenous bolus by slow push.

IV. Methods of Use

[0113] The present invention provides a method of completely or partially reversing an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the invention (e.g., a compound of formula I, II, III, IV, V, VI, VII, or VIII) or pharmaceutically acceptable salt thereof. The present invention also provides a method of promoting coagulation in a subject in need thereof, wherein the subject is receiving a coagulation inhibitor, comprising administering to the

subject a therapeutically effective amount of a compound of the invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof. In addition, the present invention provides a method of neutralizing or inhibiting a coagulation inhibitor comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of the invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

[0114] In the present invention, coagulation inhibitor (also referred to herein as anticoagulant) is a molecule that inhibits coagulation process. Exemplary coagulation inhibitors include, but are not limited to, antithrombin activators (e.g., unfractionated heparin and LMWH), factor IIa inhibitors, and factor Xa inhibitors.

[0115] *Heparin*: Heparin is a naturally occurring mucopolysaccharide that acts in the body as an antithrombin co-factor to prevent intravascular clotting. The substance is produced by basophils and mast cells, which are found in large numbers in the connective tissue surrounding capillaries, particularly in the lungs and liver. In the form of sodium salt, heparin is used therapeutically as an anticoagulant.

[0116] *Low Molecular Weight Heparin*: Low Molecular Weight Heparin (LMWH) is made from heparin using various methods of depolymerization, including oxidative depolymerization with hydrogen peroxide, used in the manufacture of ardeparin (NORMIFLO®); deaminative cleavage with isoamyl nitrite, used in the manufacture of certoparin (SANDOPARIN®); alkaline beta-eliminative cleavage of the benzyl ester of heparin, used in the manufacture of enoxaparin (LOVENOX® and CLEXANE®); oxidative depolymerization with Cu^{2+} and hydrogen peroxide, used in the manufacture of parnaparin (FLUXUM®); beta-eliminative cleavage by the heparinase enzyme, used in the manufacture of tinzaparin (INNOHEP® and LOGIPARIN®); deaminative cleavage with nitrous acid, used in the manufacture of dalteparin (FRAGMIN®), reviparin (CLIVARIN®) and nadroparin (FRAXIPARIN®), which results in the formation of an unnatural anhydromannose residue at the reducing terminal of the oligosaccharides produced. This can subsequently be converted to anhydromannitol using a suitable reducing agent. Both chemical and enzymatic beta-elimination result in the formation of an unnatural unsaturated uronate residue (UA) at the non-reducing terminal.

[0117] Summary of anticoagulant activities of several LMWHs is presented in Table 1.

Table 1: Molecular weight (MW) data and anticoagulant activities of currently available LMWH products.

LMWH	Average molecular weight	Ratio anti-Xa/anti-IIa activity
BEMIPARIN	3600	9.7
CERTOPARIN	5400	2.4
DALTEPARIN	6000	2.5
ENOXAPARIN	4500	3.9
NADROPARIN	4300	3.3
PARNAPARIN	5000	2.3
REVIPARIN	4400	4.2
TINZAPARIN	6500	1.6

Adapted from Gray E. et al., Thromb Haemost, 99: 807–818 (2008).

[0118] Clinically, LMWH (average molecular weight of about 4.5 kDa) differs from heparin (i.e., "unfractionated heparin"; average molecular weight of about 15 kDa) in a variety of ways: (a) LMWH requires less frequent subcutaneous dosing for postoperative prophylaxis of venous thromboembolism; (2) LMWH requires once or twice daily subcutaneous injection in patients treated for venous thromboembolism and unstable angina instead of intravenous infusion required with heparin; (3) LMWH requires no monitoring of the aPTT coagulation parameter; (4) LMWH poses a lower risk of bleeding; (5) long term use of LMWH poses a lower risk of osteoporosis; and (6) LMWH poses a lower risk of heparin-induced thrombocytopenia (a potential side effect of heparin administration). However, the anticoagulant effects of heparin are typically reversible with protamine sulfate, while protamine's effect on LMWH is limited. In addition, LMWH has less effect on thrombin (Factor IIa) activity compared to heparin, while both LMWH and heparin have a similar effect on Factor Xa activity.

[0119] *Thrombin and Other Factor IIa or Xa Inhibitors:* Examples of thrombin (Factor IIa) and factor Xa inhibitors include anticoagulants such as dabigatran (PRADAXA®), rivaroxaban (XARELTO®), apixaban (ELIQUIS®), edoxaban (LIXIANA®), fondaparinux (ARIXTRA®), and argatroban (ARGATROBAN®).

[0120] The chemical name for oral anticoagulant PRADAXA®, dabigatran etexilate mesylate, a direct thrombin inhibitor, is β -Alanine, N-[[2-[[[4-[[[(hexyloxy)carbonyl]amino]iminomethyl]phenyl]amino]methyl]-1-methyl-1H-benzimidazol-5-yl]carbonyl]-N-2-pyridinyl-,ethyl ester, methanesulfonate. Dabigatran and its acyl glucuronides are competitive, direct thrombin inhibitors. Because thrombin (Factor IIa, serine protease) enables the conversion of fibrinogen into fibrin during the coagulation cascade, its inhibition prevents the development of a thrombus.

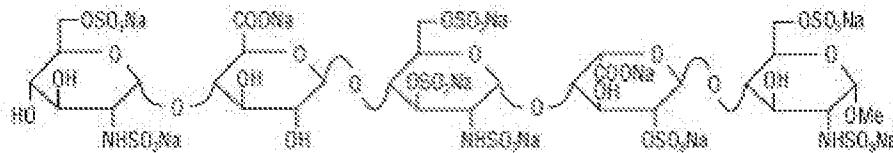
[0121] Rivaroxaban, a factor Xa inhibitor, is the active ingredient in XARELTO®, and has the chemical name 5-Chloro-N-({(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morpholinyl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl}methyl)-2-thiophenecarboxamide. Rivaroxaban is a pure (*S*)-enantiomer. XARELTO® is an orally bioavailable factor Xa inhibitor that selectively blocks the active site of factor Xa and does not require a cofactor (such as Anti-thrombin III) for activity.

[0122] Apixaban or ELIQUIS® is 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl]-4,5-dihydropyrazolo[5,4-c]pyridine-3-carboxamide. It is an orally administered direct factor Xa inhibitor approved in Europe and presently undergoing phase III trials in the U.S. for the prevention of venous thromboembolism.

[0123] Edoxaban or LIXIANA® is N'-(5-chloropyridin-2-yl)-N-[(1S,2R,4S)-4-(dimethylcarbamoyl)-2-[(5-methyl-6,7-dihydro-4H-[1,3]thiazolo[5,4-c]pyridine-2-carbonyl)amino]cyclohexyl]oxamide. Edoxaban is a direct factor Xa inhibitor, and it has been approved in Japan for use in preventing venous thromboembolism.

[0124] ARIXTRA® is fondaparinux sodium. It is a synthetic and specific inhibitor of activated Factor X (Xa). Fondaparinux sodium is methyl O-2-deoxy-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-glucopyranuronosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-deoxy-3,6-di-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-O-sulfo- α -L-idopyranuronosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-deoxy-6-O-sulfo-2-

(sulfoamino)- α -D-glucopyranoside, decasodium salt. The molecular formula of fondaparinux sodium is $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ and its molecular weight is 1728. The structural formula is provided below:



[0125] The antithrombotic activity of fondaparinux sodium is the result of antithrombin III (ATIII)-mediated selective inhibition of Factor Xa. By selectively binding to ATIII, fondaparinux sodium potentiates (about 300 times) the innate neutralization of Factor Xa by ATIII. Neutralization of Factor Xa interrupts the blood coagulation cascade and thus inhibits thrombin formation and thrombus development. Fondaparinux sodium does not inactivate thrombin (activated Factor II) and has no known effect on platelet function. At the recommended dose, fondaparinux sodium does not affect fibrinolytic activity or bleeding time. The pharmacodynamics/pharmacokinetics of fondaparinux sodium are derived from fondaparinux plasma concentrations quantified via anti-factor Xa activity. Only fondaparinux can be used to calibrate the anti-Xa assay. (The international standards of heparin or LMWH are not appropriate for this use.) As a result, the activity of fondaparinux sodium is expressed as milligrams (mg) of the fondaparinux calibrator. The anti-Xa activity of the drug increases with increasing drug concentration, reaching maximum values in approximately three hours. Fondaparinux sodium administered by subcutaneous injection is rapidly and completely absorbed (absolute bioavailability is 100%). In patients undergoing treatment with fondaparinux sodium injection 2.5 mg, once daily, the peak steady-state plasma concentration is, on average, 0.39 to 0.50 mg/L and is reached approximately 3 hours post-dose. In these patients, the minimum steady-state plasma concentration is 0.14 to 0.19 mg/L. In patients with symptomatic deep vein thrombosis and pulmonary embolism undergoing treatment with fondaparinux sodium injection 5 mg (body weight <50 kg), 7.5 mg (body weight 50 to 100 kg), and 10 mg (body weight >100 kg) once daily, the body-weight-adjusted doses provide similar mean steady-state peaks and minimum plasma concentrations

across all body weight categories. The mean peak steady-state plasma concentration is in the range of 1.20 to 1.26 mg/L. In these patients, the mean minimum steady-state plasma concentration is in the range of 0.46 to 0.62 mg/L.

[0126] ARGATROBAN® is a synthetic direct thrombin (Factor IIa) inhibitor, derived from L-arginine. The chemical name for ARGATROBAN® is 1-[5-[(aminoiminomethyl) amino]-1-oxo-2-[[1,2,3,4-tetrahydro-3-methyl-8-quinoliny]sulfonyl]amino]pentyl]-4-methyl-2-piperidinecarboxylic acid, monohydrate. The molecular formula of ARGATROBAN® is $C_{23}H_{36}N_6O_5S \cdot H_2O$. Its molecular weight is 526.66. ARGATROBAN® is a direct thrombin inhibitor that reversibly binds to the thrombin active site. ARGATROBAN® does not require the co-factor antithrombin III for antithrombotic activity.

ARGATROBAN® is administered by injection, and it exerts its anticoagulant effects by inhibiting thrombin-catalyzed or thrombin-induced reactions, including fibrin formation; activation of coagulation factors V, VIII, and XIII; activation of protein C; and platelet aggregation.

[0127] An anticoagulant effect is any effect of a coagulation inhibitor (e.g., heparin, LMWH, Factor Xa inhibitor, Factor IIa inhibitor) that results from its blockage of the propagation of the coagulation cascades. Nonlimiting examples of anticoagulation effects include upregulation of antithrombin activity, decreased Factor Xa activity, decreased Factor IIa activity, increased blood loss, and any other conditions wherein the activity or concentrations of clotting factors are altered in such a way as to inhibit blood clot formation.

[0128] Activity of a coagulation inhibitor (i.e., its anticoagulant effects) may be measured by a variety of methods, including but not limited to a chromogenic anti-factor Xa activity assay, activated partial thromboplastin time assay, prothrombin time, bleeding assay (e.g., rat tail bleeding assay), thromboelastography, thrombin generation assay, dilute Russel's viper venom time, ecarin clotting time, kaolin clotting time, International Normalized Ratio (INR), fibrinogen testing (Clauss), thrombin time (TCT), mixing time, and euglobulin lysis time. These methods aid in determining various anticoagulation parameters, and are known to those skilled in the art. Thus, in some embodiments, anticoagulation can be monitored by one or a combination of the above listed assays.

[0129] The anti-factor Xa assay directly measures anti-factor Xa activity. The methodology behind an anti-factor Xa assay is that patient plasma is added to a known amount of excess factor Xa and excess antithrombin. If a factor Xa inhibitor is present in the patient plasma, it will reduce the enzymatic activity of factor Xa. The amount of residual factor Xa is inversely proportional to the amount of anti-Xa agent in the plasma. The amount of residual factor Xa is detected by adding a chromogenic substrate that mimics the natural substrate of factor Xa, making residual factor Xa cleave it, releasing a colored compound that can be detected by a spectrophotometer. Antithrombin deficiencies in the patient do not affect the assay, because excess amounts of antithrombin are provided in the reaction. Results are given in anticoagulant concentration in units/mL of antifactor Xa, such that high values indicate high levels of anticoagulation and low values indicate low levels of anticoagulation.

[0130] The activated partial thromboplastin time (aPTT) assay is an assay that measures how long it takes for the blood to clot. Blood samples are collected for direct measurement or in tubes with oxalate and citrate to arrest coagulation by calcium until the assay can be performed. In the assay, a phospholipid, an activator (silica, celite, kaolin, ellagic acid, etc.), and calcium are mixed into the plasma to induce coagulation. The assay measures the time until a thrombus (clot) forms.

[0131] Rat tail bleeding assay or rat tail transection assay is an assay that measures blood loss, e.g., blood loss after drug administration. In one embodiment, where the effect of the compound of the invention (e.g., DAP) is being tested, at the T_{max} of the anticoagulant, DAP is administered intravenously. After 20 minutes, rat tails are transected approximately 1 mm from the tip, placed in room temperature saline, and blood is collected for 30 minutes and weighed.

[0132] Assays used to measure activity of coagulation inhibitors maybe used in the laboratory or in the clinic to measure reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor, e.g., reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor due to administration of a pharmaceutical composition comprising a compound of the invention. Thus, in one embodiment, the assays are utilized to

measure complete or partial reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor (such as heparin, LMWH, Factor IIa inhibitor, and Factor Xa inhibitor).

[0133] A complete reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor occurs upon neutralization of the anticoagulant activity. In one embodiment, a complete reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor, as measured by the anti-Xa activity assay, occurs when anticoagulant concentration is brought below the minimum effective concentration (MEC) for anticoagulation. MEC, as used herein, is a lowest amount of the drug (e.g., coagulation inhibitor) required for therapeutic effect. In another embodiment, a complete reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor, as measured by the aPTT assay, occurs when the aPTT returns within about 10% of baseline. A baseline, as used herein, refers to aPTT in the absence of coagulation inhibitors.

[0134] In many cases, anticoagulation will still be desired, but to a lesser degree. Thus, a partial reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor will be indicated. Partial reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor, as measured by the anti-Xa activity assay, occurs when the anticoagulant concentration is brought below the anticoagulant concentration in the absence of an anticoagulation reversal agent (e.g., a compound of the invention), but remains above the MEC for anticoagulation. Thus, in some embodiments, partial reversal of an anticoagulation effect of coagulation inhibitors occurs when the concentration of anticoagulant is lower than about four times the MEC, preferably about twice the MEC, more preferably less than about twice the MEC (e.g., at about the MEC). Partial reversal of an anticoagulant effect of coagulation inhibitor, as measured by aPTT assay, occurs when aPPT is reduced below the measurement in the absence of an anticoagulation reversal agent (e.g., a compound of the invention) but above the baseline. Thus, in other embodiments, partial reversal of an anticoagulation effect of coagulation inhibitors occurs when the aPTT measurement is reduced below about four times the baseline, preferably about twice the baseline, more preferably less than about twice the baseline. Generally, the extent and duration of anticoagulation reversal is determined by the physician or veterinarian.

[0135] As used herein, “subject in need thereof” is a subject in need of either acute or planned reversal of anticoagulation, e.g., a subject suffering from anticoagulant overdose, a subject suffering from hemorrhage (e.g., trauma-induced hemorrhage or spontaneous hemorrhage in the GI tract or elsewhere), a subject requiring planned surgical intervention, a subject undergoing an invasive or non-invasive procedure requiring a biopsy, a subject undergoing a procedure wherein a procedural error may risk hemorrhage if the subject remains anticoagulated, a subject requiring spinal or epidural anesthesia. “Subject in need thereof” may be a patient in whom the presence of a direct factor inhibitor (Factor Xa, Factor IIa and/or antithrombin) is producing or is likely to produce bleeding effects. Thus, “subject in need thereof” may be a subject receiving anticoagulation therapy (e.g., subject receiving heparin, LMWH, Factor IIa inhibitor, or Factor Xa inhibitor) for, e.g., stroke prevention, cardiac surgical and diagnostic procedures, cardiac arrhythmias, deep vein thrombosis (DVT) prevention, pulmonary embolism, general prevention of the formation of pathologic blood clots.

[0136] “Subject in need thereof,” as used herein, is an animal. “Subject in need thereof” includes, without limitation, a human, mouse, rat, guinea pig, dog, cat, horse, cow, pig, monkey, chimpanzee, baboon, or rhesus monkey. In one embodiment, “subject in need thereof” is a mammal. In another embodiment, “subject in need thereof” is a human.

[0137] As used herein, “therapeutically effective amount” refers to an amount of an anticoagulation reversal agent (e.g., a compound of the invention described herein), which is effective, upon single or multiple dose administration (e.g., bolus and/or maintenance doses) to a subject, in neutralizing or inhibiting (completely or partially reversing) an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor or in promoting coagulation.

[0138] In one aspect, a therapeutically effective amount is a dose of an anticoagulation reversal agent that is between 0.01 and 10,000 times the anticoagulant dose by weight. In another aspect, the anticoagulation reversal agent is administered at a dose mass ratio of between about 1:1 and 1000:1 of the anticoagulation reversal agent to anticoagulant, e.g., 100:1 of the anticoagulation reversal agent to anticoagulant, such as 10:1 of anticoagulation reversal agent to

anticoagulant. In one embodiment of the present method, a therapeutically effective amount of the anticoagulation reversal agent may be administered by subcutaneous, intramuscular, or intravenous route of administration. For example, it may be administered intravenously as a sterile solution. In another embodiment, a therapeutically effective amount of the anticoagulation reversal agent is administered by oral, nasal, or pulmonary route, or to a mucosal region (mouth, rectum, or vagina).

[0139] The therapeutically effective amount of the anticoagulation reversal agent (i.e., the compound of the invention) will typically range from about 0.001 mg/kg to about 1 g/kg of body weight per day; in another embodiment, from about 0.01 mg/kg to about 600 mg/kg body weight per day; in another embodiment, from about 0.01 mg/kg to about 250 mg/kg body weight per day; in another embodiment, from about 0.01 mg/kg to about 400 mg/kg body weight per day; in another embodiment, from about 0.01 mg/kg to about 200 mg/kg of body weight per day; in another embodiment, from about 0.01 mg/kg to about 100 mg/kg of body weight per day; in one embodiment, from about 0.01 mg/kg to about 25 mg/kg body weight per day; in another embodiment, from about 0.1 mg/kg to about 10 mg/kg body weight per day; in another embodiment, from about 0.001 mg/kg to about 100 mg/kg of body weight per day; in another embodiment, from about 0.001 mg/kg to about 10 mg/kg of body weight per day; and in another embodiment, from about 0.001 mg/kg to about 1 mg/kg of body weight per day. Standard coagulation assays (as those described herein) and other *in vitro* assays can be used to determine the therapeutically effective amount.

[0140] In some aspects of the invention, the compound of the invention may be co-administered with at least one additional therapeutic agent. In one embodiment, the at least one additional therapeutic agent may be vitamin K, which is typically used to correct clotting deficiencies induced by warfarin compounds.

[0141] The present invention also provides a diagnostic assay for determining the anticoagulant concentration in the blood. As shown in Example 13 below, DAP demonstrates a dose-responsive trend in reversing rivaroxaban *ex vivo* in human plasma using a 510k-cleared anti-factor Xa chromogenic assay. Thus, the compound of the invention, e.g., DAP, can be used in a diagnostic assay to

determine the concentration of an anticoagulant, e.g., a Factor Xa inhibitor, in the blood. In such an assay, the compound of the invention, e.g., DAP, can be used either in conjunction with the currently available kit reagents or as a direct binding substrate replacing synthetic factors present in currently available kits. In one embodiment, the diagnostic assay may comprise the compound of the invention (e.g., DAP) as a binding substrate, wherein the compound of the invention binds an anticoagulant in a blood sample, and the residual activity of the clotting factor (e.g., Factor Xa) is quantified to determine the concentration of the anticoagulant in the sample. In another embodiment, the diagnostic assay may comprise the compound of the invention (e.g., DAP) conjugated to magnetic microparticles, wherein the compound of the invention can bind an anticoagulant in a blood sample in order to either remove the anticoagulant from the sample or to concentrate it. The DAP-based chromogenic or point of care assay of the invention can aid in the determination of anticoagulant levels in subjects, which is currently a significant clinical unmet need since current diagnostics cannot determine blood concentrations of direct inhibitors with high accuracy.

[0142] Additionally, the present invention provides an assay, e.g., a chromogenic assay, to determine the concentration of the compound of the invention, e.g., DAP, required to reverse the anticoagulant present in the blood. In one embodiment, the assay uses DAP as a direct binding agent for various anticoagulants.

[0143] The invention also provides an assay, e.g., a chromogenic assay, to determine the amount of the compound of the invention, e.g., DAP, in the blood. Such assay may utilize predetermined concentrations of an anticoagulant.

[0144] The present invention also provides a diagnostic kit that incorporates a diagnostic assay described herein above. Thus, in one embodiment, the kit is used for determining the anticoagulant concentration in the blood. The kit may contain other components, packaging, instructions, reagents, and/or other material to aid in the determination of anticoagulant (e.g., Factor Xa inhibitor) or DAP concentration and to aid in the use of the kit. Additionally, the kit may be used to determine if there is a combination of warfarin and another anticoagulant as warfarin will be unaffected by the compound of the invention, while other anticoagulants will be reversed.

[0145] As demonstrated in the following examples, a compound of the invention (e.g., DAP) is capable of binding heparin, inactivating it *in vivo*. Thus, in addition to its effects on coagulation, a compound of the invention may also be used to deprive tissues of the biochemical activities of heparin. For example, other heparin-binding molecules have demonstrated the ability to reduce fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and other heparin binding growth factors. VEGF and FGF deprivation has been shown useful in anti-cancer therapy, making compounds of the invention possible candidates for the treatment of cancer. Therefore, in one aspect, the present invention provides a method for treating, preventing, or ameliorating a cancer in a subject, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound of the invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

[0146] As demonstrated in the examples, one compound of the invention, DAP, bound XARELTO®, ELIQUIS®, ARIXTRA® and LMWH *in vitro* as measured by dynamic light scattering (DLS). DAP reversed subcutaneously administered ARIXTRA® and LMWH *in vivo*. DAP reversed XARELTO®, ELIQUIS®, PRADAXA®, LIXIANA®, unfractionated heparin and bemiparin *in vivo*. DAP intravenously administered at 100mg/kg, 250mg/kg and 400mg/kg doses in rats showed no adverse effect. DAP was orally bioavailable in rats. DAP exhibited no human ERG binding, did not inhibit or serve as a substrate of CYP enzymes, and did not appreciably bind any plasma proteins (data not shown). In addition, it appears that DAP has a short elimination half-life, because anti-coagulation induced by PRADAXA® returned in 20-30 minutes following an intravenous bolus dose of DAP in rats. Moreover, DAP was stable to sterilization (survived heating to 200° C) and to storage as a lyophilized powder at 4°C for more than one year. Summary of anticoagulant reversal by DAP is presented in Table 2.

Table 2: Anticoagulant reversal

Trade Name	Generic Name	Company	Blood Factor Inhibited	Route of Administration	Bind s DAP	Reversal Agents
Lovenox®	Enoxaparin	Sanofi, Sandoz/ Momenta, Rovi	~80-90% Xa,	s.c. Injection	X	Protamine * & DAP
Hibor®	Bemiparin		~10-20% IIa			
Arixtra®	Fondaparinux	GSK	Xa	s.c. Injection	X	DAP
Eliquis®	Apixaban	Pfizer, BMS	Xa	Oral	X	DAP
Xarelto®	Rivaroxaban	Bayer, Janssen, J&J	Xa	Oral	X	DAP
Argatroban®	Argatroban	GSK	IIa	s.c. Injection	--	None
Pradaxa®	Dabigatran etexilate	Boehringer Ingelheim	IIa	Oral	X	DAP

*Protamine partially reverses low molecular weight heparins.

Table 3: *In vitro in vivo* correlation

Drug Generic Name	DLS Binding Molar Ratio [DAP/drug]	Reversal Molar Ratio [DAP/drug]	<i>in vivo</i> Measure	Blood Factor(s) Inhibited	Route of Administration
Rivaroxaban	9	3*	Bleeding assay	Xa	Oral
Apixaban	10	8*	Bleeding assay	Xa	Oral
Fondaparinux	3	130	Xa kit	Xa	s.c. Injection
Bemiparin	7	140	aPTT	~80-90% Xa, ~10-20% IIa	s.c. Injection
Argatroban	N/A	N/A	aPTT	IIa	s.c. Injection

Assumes oral bioavailabilities of 60% for rivaroxaban, 50% for apixaban, and 5% for dabigatran; Assumes 100% bioavailability for injectable anticoagulants.

[0147] Summary of *in vitro-in vivo* correlation of treatment with DAP is presented in Table 3. DLS binding molar ratio is calculated by dividing the lowest mass ratio of DAP to anticoagulant that shows significant binding, defined as an association in phosphate buffered saline above 50nm in apparent diameter, by the molecular weight ratio of DAP and the anticoagulant. The molecular weights used in the calculations were 512Da (DAP), 436Da (rivaroxaban), 460Da (apixaban), 1.7kDa (fondaparinux), 3.6kDa (bemiparin), 628Da (dabigatran), and 509Da

- 43 -

(ARGATROBAN®). Reversal molar ratio was calculated similarly using the minimal *in vivo* reversal dose of DAP necessary to achieve reversal as measured by the rat tail transection bleeding assay, chromogenic anti-Xa kit, or by activated partial thromboplastin time (aPTT). For the bleeding assay, the anticoagulant was considered reversed if the blood loss over a period of 30 minutes after tail transection, with the cut tail immersed in room temperature saline, was within 25% of the control (no anticoagulant administered). As measured by the Xa kit, reversal was achieved when the effective anticoagulant concentration was brought below the minimum effective concentration (MEC) for anticoagulation. As measured by aPTT, reversal was considered achieved when an anticoagulated rat aPTT returned to within 10% of baseline. In the case of fondaparinux, although 200mg/kg DAP was the lowest dose administered *in vivo*, the *in vitro* data indicate that significantly lower reversal doses are possible.

[0148] The entire contents of all references, patent applications, and patents cited throughout this application are hereby incorporated by reference herein.

EXAMPLES

[0149] The invention will be further illustrated in the following nonlimiting Examples. These Examples are set forth to aid in the understanding of the invention but are not intended to, and should not be construed to, limit its scope in any way. The Examples do not include detailed descriptions of conventional methods that are well known to those of ordinary skill in the art.

Example 1: *In vitro* Stability Testing of Diarginine piperazine (“DAP”)

Materials and Methods

[0150] An acetate salt of DAP was prepared as described herein. As described in these examples, DAP solid or powder refers to the acetate salt, while DAP in solution refers to the free base as the salt ionizes in aqueous solution. As described in these examples, the DAP compound used was the compound of Formula VII.

[0151] The DAP powder was tested for thermal stability in two ways. DAP was stored at 4°C for 7 months prior to use. Additionally, the DAP solid was tested by

differential scanning calorimetry (DSC) by heating from -20°C to 200°C, back to -20°C and again to 200°C.

Results

[0152] DAP powder was stable at 4°C for more than 12 months. The results of DSC are shown in **Figure 1**. The second heat (“2”) showed similar thermal behavior to the first heat (“1”), indicating that DAP survived repeated heating to 200°C. This finding indicates that DAP is able to survive heating to temperatures above those necessary for sterilization.

Example 2: Binding of DAP to Heparin and LMWH

Materials and Methods

[0153] Dynamic light scattering (DLS) was used to assess association of 1 mg/ml unfractionated heparin and 1 mg/ml bemiparin (LMWH; HIBOR®), either alone or in combination with 100 mg/ml DAP in water (mass ratios of 100:1 of DAP to heparin or LMWH).

Results

[0154] DAP physically associated in water with both unfractionated heparin (**Figure 2**) and LMWH (not shown) to form physical associations that increase the apparent diameter. When solutions of DAP were mixed with solutions of LMWH or unfractionated heparin, they formed particles due to their physical interactions, which supports the theory that DAP could reverse heparin and LMWH anticoagulation by physically associating with these molecules.

Example 3: DAP Binding to Anticoagulants as Measured by DLS.

Materials and Methods

[0155] Rivaroxaban (XARELTO®) alone, DAP alone, and DAP:rivaroxaban combinations at mass ratios of 1:1 and 10:1 were added into an aqueous solution and analyzed by dynamic light scattering (DLS) to assess association of the DAP and rivaroxaban. A similar experiment was conducted on apixaban (ELIQUIS®) alone, DAP alone, and DAP:apixaban combinations at mass ratios of 1:1, 10:1 and 100:1. Fondaparinux (ARIXTRA®) alone, DAP alone, and fondaparinux:DAP

combinations at mass ratios of 1:1, 10:1 and 100:1 were similarly tested. LMWH (bemiparin; HIBOR®), alone, DAP alone, and LMWH:DAP combinations at mass ratios of 1:1, 10:1, and 100:1 were also tested. The concentration of LMWH tested was 0.1 mg/ml. Therefore, at 1:1, 0.1 mg/ml DAP was tested, at 10:1, 1 mg/ml was tested, and at 100:1, 10 mg/ml DAP was tested.

[0156] Additionally, dabigatran alone, DAP alone, and dabigatran:DAP combination at mass ratios of 1:1, 10:1, 100:1, 1,000:1, and 10,000:1 DAP were tested. Finally, ARGATROBAN® alone, DAP alone, or combinations of argatroban:DAP at mass ratios of 1:1, 10:1, 100:1, and 1,000:1 were tested.

Results

[0157] The results are shown in **Figure 3** for rivaroxaban; **Figure 4** for apixaban; **Figure 5** for fondaparinux (ARIXTRA®), **Figure 6** for LMWH; and **Figure 7** for argatroban. Each figure shows individual peaks representing DAP and the anticoagulant alone in aqueous solution. When the anticoagulant was mixed with DAP at sufficiently high mass ratios, a change in size was observed. In this assay, even a slight increase in size indicates physical interaction between the two; however, only significant shifts in the apparent diameter are used in assessing the *in vitro in vivo* correlation. Apparent diameter is a measure of the degree of interaction.

Example 4: DAP Reversal of LMWH Anticoagulation *In Vivo*

Materials and Methods

[0158] A male albino rat, weighing 470 g, was administered 10 mg of bemiparin (an overdose of LMWH) by subcutaneous injection. aPTT time was measured over the course of five hours. Four hours after LMWH administration, the rat received an intravenous dose of 200 mg/kg of DAP (100mg DAP).

Results

[0159] Upon administration of LMWH, the aPTT rose from 53 to 246 seconds over the course of four hours. Intravenous administration of 200 mg/kg of DAP (100 mg DAP) brought aPTT time below baseline within 60 minutes (**Figure 8**).

**Example 5: DAP Reversal of Dabigatran (PRADAXA®) Anticoagulation
In Vivo; an Overdose Study**

Materials and Methods

[0160] A male albino rat, weighing 430 g, was administered 40 mg/kg of PRADAXA® (20mg PRADAXA®; overdose of PRADAXA®) by oral gavage.

[0161] Approximately 2 hours into PRADAXA® treatment, 200 mg/kg DAP (100 mg DAP) was administered as an intravenous bolus injection. Approximately 2 hours later, the rat was administered a dose of 100 mg/kg of DAP (50mg DAP). In another hour, the rat was administered another dose of 100 mg/kg of DAP (50 mg DAP). aPTT was measured throughout the course of the entire treatment.

Results

[0162] The results are shown in **Figures 9** and **13**. 2 hours following administration of PRADAXA®, aPTT rose from 43 to 81 seconds, showing significant anti-coagulation. 100 mg of DAP was administered as an intravenous bolus injection, which brought aPTT down below baseline within 25 minutes. 2 hours later, aPTT had risen back to 79 seconds and the rat was administered a dose of 50 mg of DAP. Within 30 minutes, aPTT was brought down below baseline. Both times, within 60 minutes following DAP administration, the aPTT levels had returned above baseline. After the second dose of DAP, the aPTT rose to 53 seconds. A third dose of DAP, 100 mg/kg of DAP (50 mg DAP), was administered intravenously and the aPTT was dropped to baseline within 20 minutes. **Figure 13** demonstrates a similar experiment where, after 15.5 mg/kg administration of PRADAXA®, the aPTT returned to normal within about 30 minutes of initiation of 100 mg/kg DAP treatment.

**Example 6: DAP Reversal of Unfractionated Heparin (“UHF”)
Anticoagulation *In Vivo*.**

Materials and Methods

[0163] A male albino rat, weighing 515 g, was administered 10 mg /kg of unfractionated heparin (5 mg UFH) by subcutaneous injection.

[0164] 200 mg/kg of DAP (100 mg DAP) was administered as two intravenous bolus injections after UFH administration. Subsequently, the rat was administered a dose of 400mg/kg of DAP (200mg of DAP). aPTT was measured throughout the course of the entire treatment.

Results

[0165] As demonstrated in **Figure 10**, the aPTT time rose significantly from 28 to 102 seconds over the course of one hour after administration of heparin. 100 mg of DAP was administered intravenously and it brought aPTT time to 48 seconds in 20 minutes. Within 1 hour, aPTT rose to 120 seconds, then another 100mg of DAP was administered intravenously. In 15 minutes, the aPTT was lowered to 47 seconds. Within 1 hour, aPTT rose to 96 seconds, then a dose of 200mg of DAP was administered intravenously. 10 minutes after, aPTT dropped to 33 seconds.

Example 7: DAP Reversal of Rivaroxaban (XARELTO®) Anticoagulation *In Vivo*

Materials and Methods

[0166] 5 mg /kg rivaroxaban (XARELTO®) was orally administered to rats. After four hours, 5 mg/kg of DAP (2 mg DAP) was administered intravenously. aPTT were measured at zero, 15, 30, 45, 60 and 240 minutes, prior to administration of DAP. aPTT was again measured at about 5, 10, 25, 35, 45, 60, 120, and 240 minutes after DAP administration.

Results

[0167] The results are shown in **Figure 11**. DAP effectively reversed the rivaroxaban (XARELTO®) anticoagulation *in vivo* in rats.

Example 8: DAP Reversal of Fondaparinux (ARIXTRA®) Anticoagulation *In Vivo*.

Materials and Methods

[0168] 5 mg/kg fondaparinux was administered subcutaneously to rats. 200 mg/kg DAP was administered intravenously after 2 hours. Activity was

measured by chromogenic 510k cleared Factor Xa Assay (Biophen) at 10, 20, 30 and 60 minutes after DAP administration.

Results

[0169] **Figure 12** demonstrates DAP-mediated reversal of fondaparinux anticoagulation within 10 minutes of administration.

Example 9: Intravenous DAP does not influence aPTT

Materials and Methods

[0170] 0, 2, 10, 25, 50 or 100 mg DAP were administered intravenously to male, weight matched CD rats and aPTT was measured.

Results

[0171] The results shown in **Figure 16** demonstrate that DAP administered intravenously did not influence aPTT in a dose dependent fashion in the absence of anticoagulants. Error bars represent standard error from seven aPTT measurements averaged over 90 minutes.

Example 10: DAP Reversal of Anticoagulation in a Rat Tail Transection Model.

Materials and Methods

[0172] Three rats each were administered 2 mg of rivaroxaban. One rat received a sham reversal containing no DAP, the second received 2.5 mg of DAP, and the third received 12.5 mg DAP. A fourth rat received sham anticoagulant and reversal doses ("sham"). 20 minutes after the reversal dose, tails were transected 1 mm from the tip, placed in room temperature saline, and blood loss was collected for 30 minutes and then weighed.

[0173] Same procedures were used with 1.25 mg apixaban (ELIQUIS®) alone or in combination with 5 or 12.5 mg DAP; with 15.5 mg dabigatran etexilate (PRADAXA®) alone or in combination with 5 or 12.5 mg DAP; and with 5 mg edoxaban (LIXIANA®) alone or in combination with 12.5 mg DAP.

Results

[0174] The results are shown in **Figure 15** for rivaroxaban, in **Figure 16** for apixaban, in **Figure 17** for edoxaban, and in **Figure 18** for dabigatran etexilate. The rat tail transection bleeding assay is analogous to the clinical situation in which acute anticoagulant reversal is needed. Results show that DAP effectively reversed anticoagulant activity leading to statistically significant reduction in blood loss compared to rats receiving anticoagulant only.

Example 11: DAP Reversal of Rivaroxaban (XARELTO®) Anticoagulation in Freshly Drawn Human Blood *Ex Vivo*.

Materials and Methods

[0175] Human blood was drawn from a volunteer. Rivaroxaban at 0.25 µg/ml was added alone or in combination with 50 µg/ml DAP. Controls contained 50 µg/ml DAP or saline. aPTT was measured within 2 minutes of blood collection.

Results

[0176] **Figure 19** demonstrates that administration of DAP led to a reversal of rivaroxaban-induced anticoagulation in freshly drawn human blood, as measured by aPTT. Error bars represent standard error from three independent experiments.

Example 12: DAP Reversal of Rivaroxaban and Apixaban Anticoagulation in Human Plasma *Ex Vivo*

Materials and Methods

[0177] 218 µg/L or 459 µg/L of rivaroxaban was added to human plasma, with or without 1,250 µg/L or 6,250 µg/L of DAP, respectively. Similarly, 156 µg/L or 313 µg/L of apixaban was added to human plasma with or without 1,156 µg/L or 3,125 µg/L of DAP, respectively. DAP effect on anticoagulation was measured by 510k cleared Biophen anti-Factor Xa chromogenic assay. Rivaroxaban concentrations were determined by comparison with plasma calibration standards, while apixaban concentrations were inferred from stock solution dilutions as calibration standards are not yet available.

Results

[0178] For both concentrations of rivaroxaban and apixaban, DAP returned the effective anticoagulant concentration to below the minimum effective concentration. **Figure 20** shows the results for rivaroxaban and **Figure 21** shows the results for apixaban.

**Example 13: DAP Dose-Dependent Reversal of Rivaroxaban
Anticoagulation in Human Plasma *Ex Vivo***

Materials and Methods

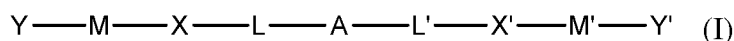
[0179] 218 µg/L rivaroxaban was added to human plasma either alone or in combination with 1.25, 12.5, 125, or 1,250 µg/L of DAP. Factor Xa activity was measured by 510k cleared Biophen anti-Xa chromogenic assay kit. Rivaroxaban concentrations were determined by comparison with plasma calibration standards.

Results

[0180] **Figure 22** demonstrates that DAP was effective in dose-dependent reversal of rivaroxaban anticoagulation in human plasma, as demonstrated by its effect on rivaroxaban concentration (measured by Factor Xa activity assay).

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound of formula I



or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein:

A is a substituted or unsubstituted aromatic or non-aromatic, carbocyclic or heterocyclic ring or a linear moiety;

L and L' are the same or different and are linkers;

X and X' are the same or different and are absent or are a functional group that attaches the linker L to M and linker L' to M', respectively;

M and M' are the same or different and are absent or is a linker that attaches X to Y and X' to Y', respectively; and

Y and Y' are the same or different and are a moiety containing one or more cationic atoms or groups or one or more groups that become cationic under physiological conditions.

2. The compound of claim 1, wherein A is a non-aromatic, heterocyclic ring or a linear moiety, and wherein the ring or the linear moiety contain reactive functional groups that can form a bond to X and/or X', when present, or Y and/or Y'.

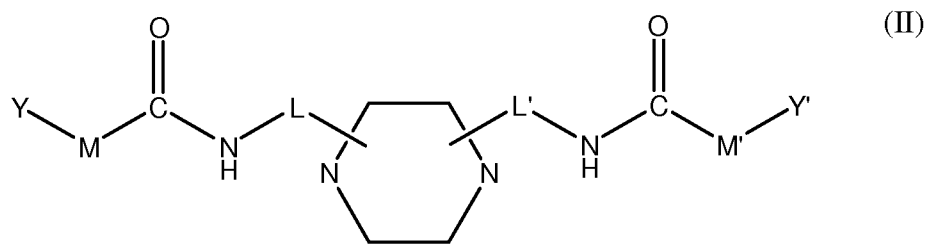
3. The compound of claim 2, wherein A is a piperazine or diketopiperazine.

4. The compound of any one of claims 1-3, wherein X and X', when present, is a functional group that attaches linker L to Y and linker L' to Y', respectively, and wherein the functional group is selected from the group consisting of esters, amides, and ketones.

5. The compound of any one of claims 1-4, wherein L and/or L' is a substituted or unsubstituted alkylene chain that is C₁ to C₆.

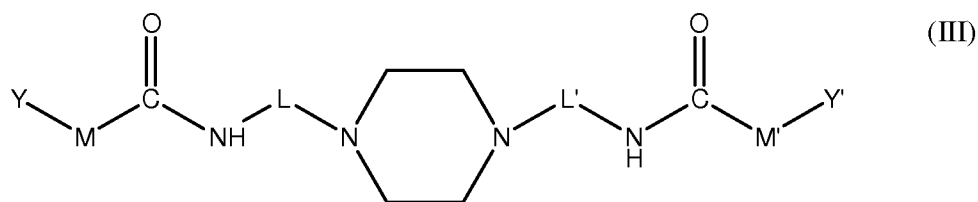
- 52 -

6. The compound of claim 1, wherein the compound is represented by formula II:



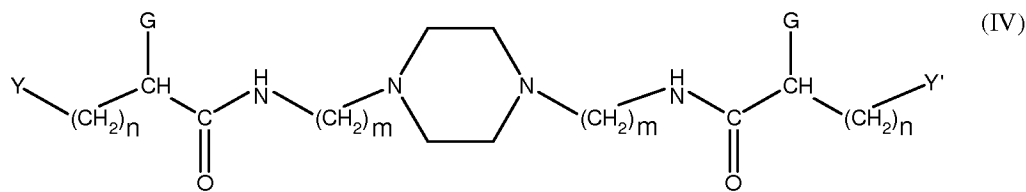
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

7. The compound of claim 6, wherein the compound is represented by formula III:



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

8. The compound of claim 7, wherein the compound is represented by formula IV:



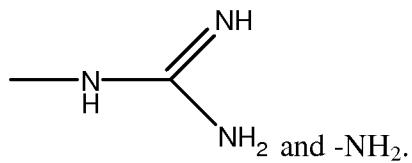
or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein n is 3 to 5, m is 3 to 6 and G is selected from -NH₂ and OH.

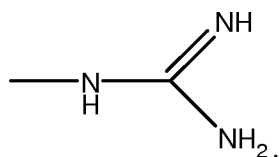
9. The compound of claim 8, wherein G is amino.

- 53 -

10. The compound of any one of claims 1-9, wherein Y and Y' are independently selected from

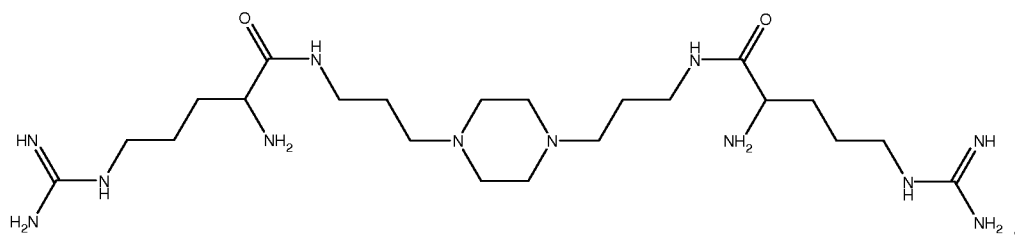


11. The compound of claim 10, wherein Y and Y' is



12. A compound of formula V

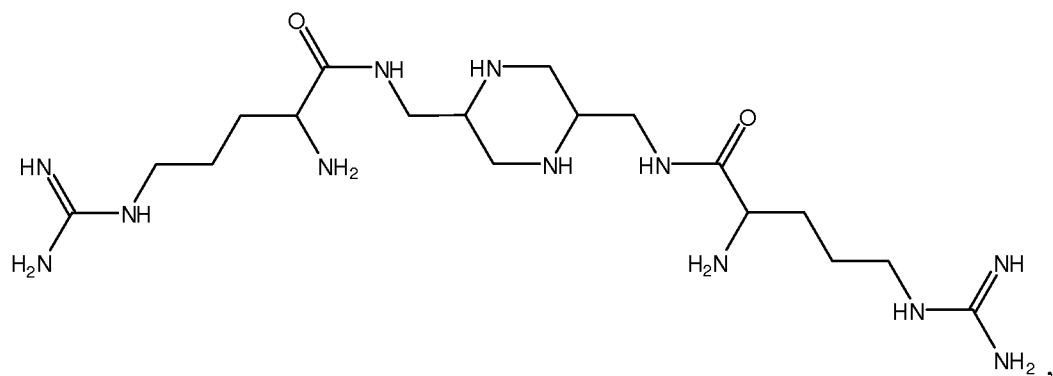
(V)



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

13. A compound of formula VI

(VI)

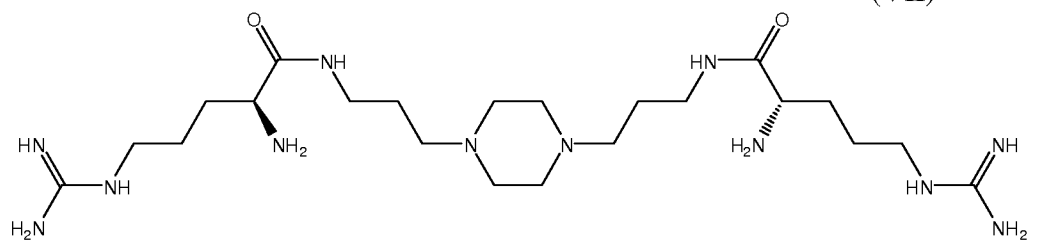


or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

- 54 -

14. A compound of formula VII

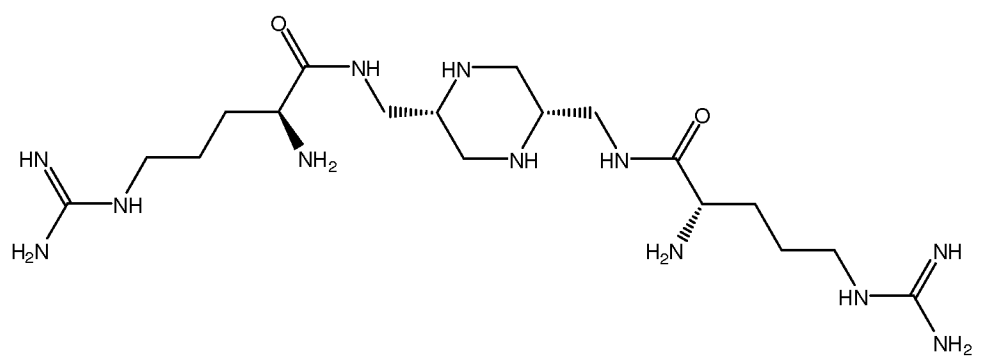
(VII)



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15. A compound of formula VIII

(VIII)



or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

16. A pharmaceutical composition comprising the compound of any one of claims 1-15 and a pharmaceutically acceptable carrier.

17. The pharmaceutical composition of claim 16, wherein the composition is adapted for enteral administration.

18. The pharmaceutical composition of claim 17, wherein the composition is adapted for oral administration.

19. The pharmaceutical composition of claim 16, wherein the composition is adapted for parenteral administration.

- 55 -

20. The pharmaceutical composition of claim 19, wherein the composition is adapted for intravenous or subcutaneous administration.
21. A method of completely or partially reversing an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a compound of any one of claims 1-15 or pharmaceutically acceptable salt thereof.
22. The method of claim 21, wherein the coagulation inhibitor is selected from the group consisting of an unfractionated heparin, low molecular weight heparin (LMWH), Factor IIa inhibitor, and Factor Xa inhibitor.
23. The method of claim 22, wherein the coagulation inhibitor is a factor Xa inhibitor.
24. The method of claim 23, wherein the factor Xa inhibitor is selected from the group consisting of rivaroxaban, apixaban, edoxaban, and fondaparinux.
25. The method of claim 21, wherein the subject is a mammal.
26. The method of claim 25, wherein the subject is a human.
27. The method of claim 21, wherein the complete or partial reversal of an anticoagulant effect of a coagulation inhibitor is measured by anti-factor Xa activity assay.
28. The method of claim 21, wherein the subject in need thereof is a subject in whom acute or planned reversal of anticoagulation is indicated.
29. The method of claim 28, wherein the subject in whom acute or planned reversal of anticoagulation is indicated is a subject suffering from anticoagulant overdose, a subject suffering from hemorrhage, a subject requiring planned surgical intervention, a subject undergoing an invasive or non-invasive procedure

- 56 -

requiring a biopsy, a subject undergoing a procedure wherein a procedural error may result in hemorrhage if the subject remains anticoagulated, or a subject requiring spinal or epidural anesthesia.

30. The method of claim 28, wherein the subject in need thereof is a subject receiving anticoagulation for stroke prevention, cardiac surgical and diagnostic procedures, cardiac arrhythmias, deep vein thrombosis (DVT) prevention, pulmonary embolism, or generally for the prevention of pathologic blood clots.

31. The method of claim 22, wherein the coagulation inhibitor is a LMWH, and wherein the LMWH is selected from the group consisting of bemiparin, certoparin, dalteparin, enoxaparin, nadroparin, parnaparin, reviparin, and tinzaparin.

32. The method of claim 21, wherein the compound or the pharmaceutically acceptable salt thereof is administered at a dose mass ratio of between about 0.01:1 to about 1000:1 of the compound or the pharmaceutically acceptable salt thereof to anticoagulant.

33. The method of claim 32, wherein the compound or the pharmaceutically acceptable salt thereof is administered at a dose mass ratio of about 10:1 of the compound or the pharmaceutically acceptable salt thereof to anticoagulant.

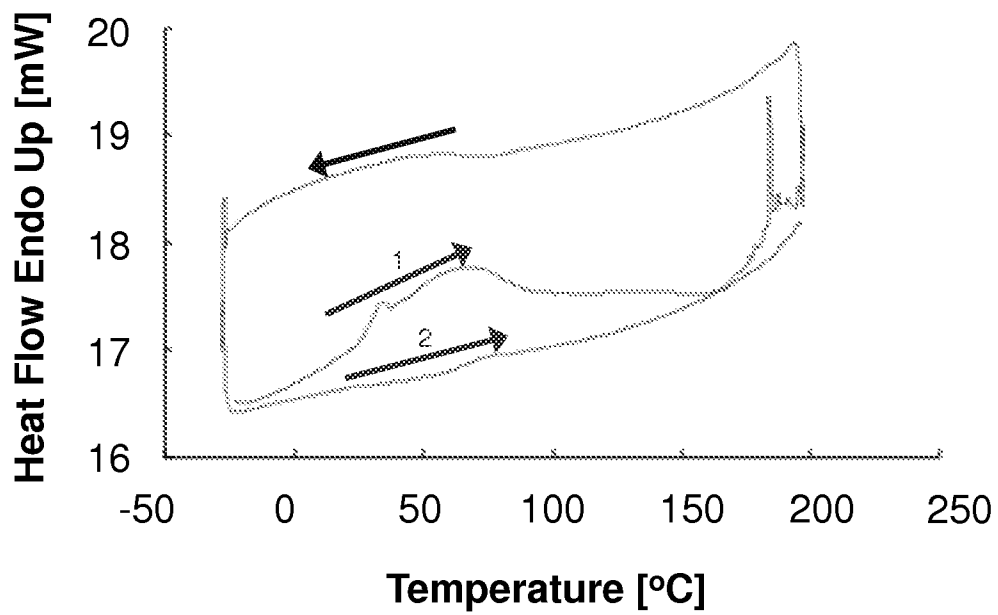
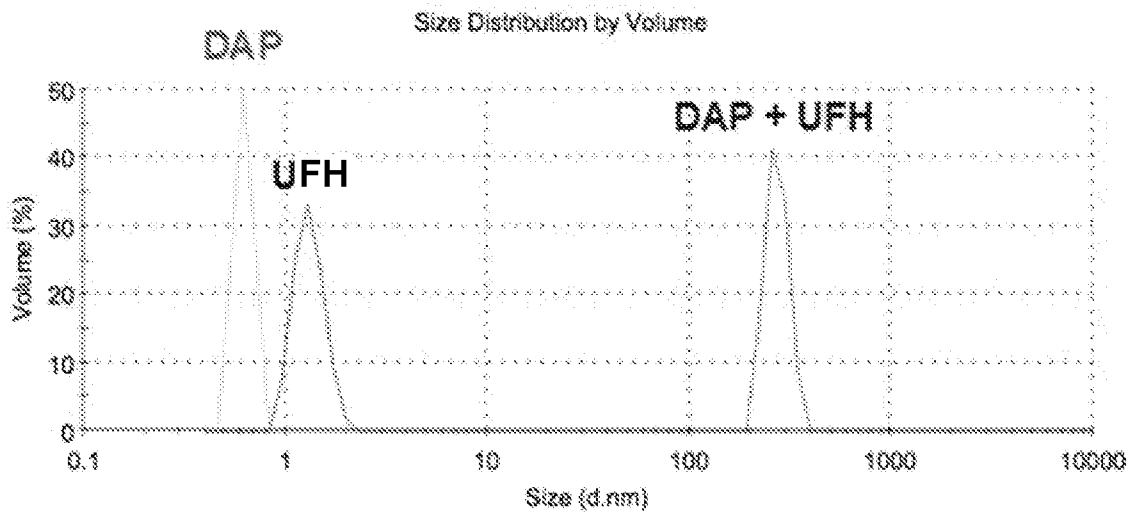
34. The method of claim 21, wherein the method comprises administering at least one additional therapeutic agent.

35. The method of claim 34, wherein the at least one additional therapeutic agent is vitamin K.

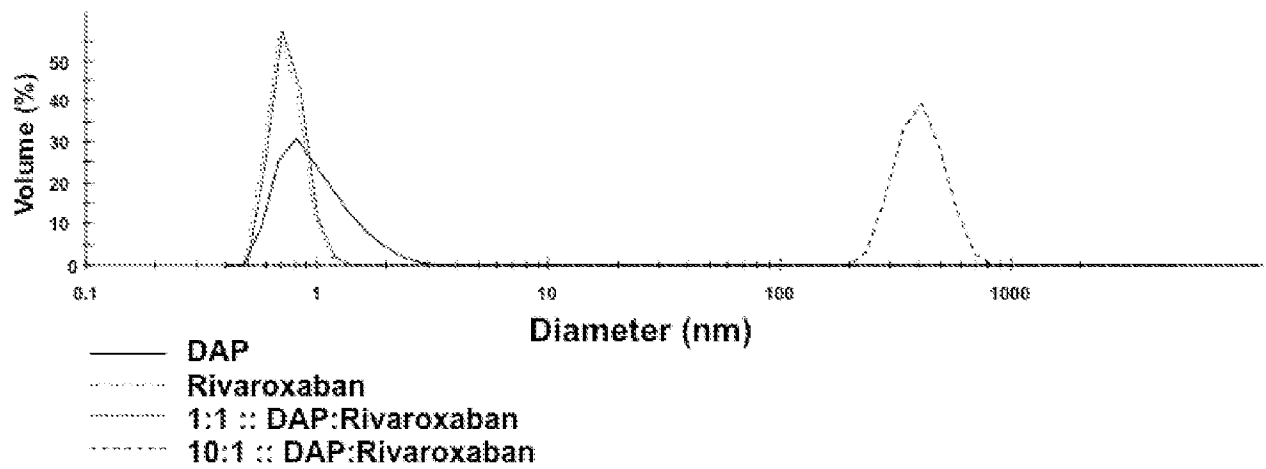
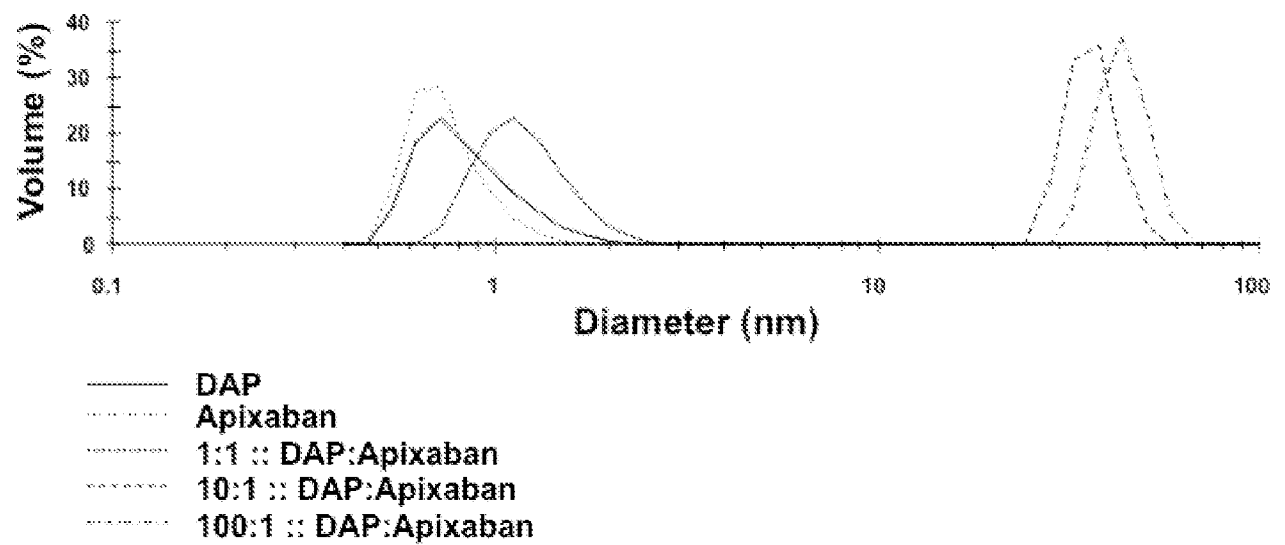
36. A diagnostic kit comprising the compound of any one of claims 1-15.

37. The kit of claim 36, wherein the kit is used for determining an anticoagulant concentration in blood.

1/12

Figure 1**Figure 2**

2/12

Figure 3**Figure 4**

3/12

Figure 5

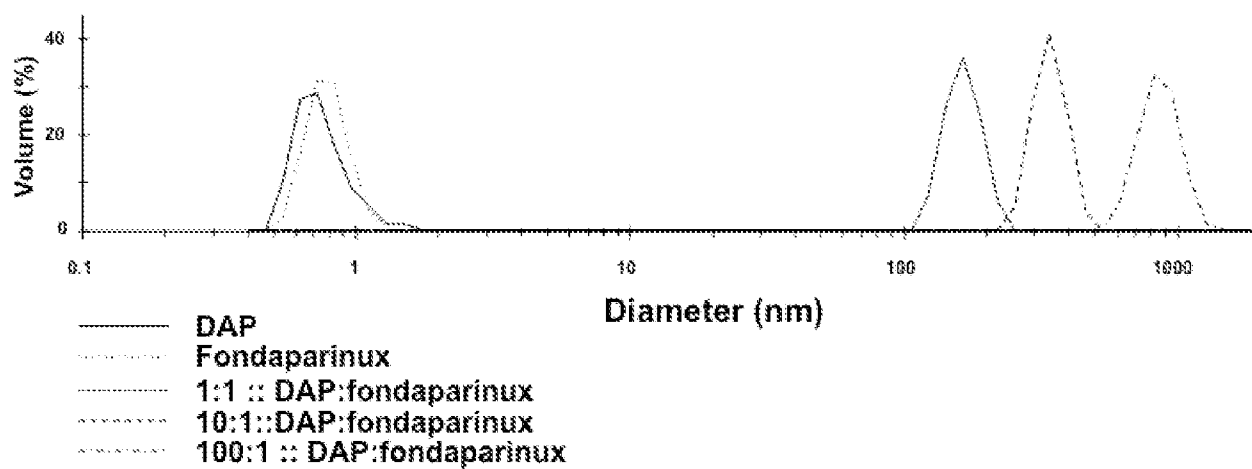
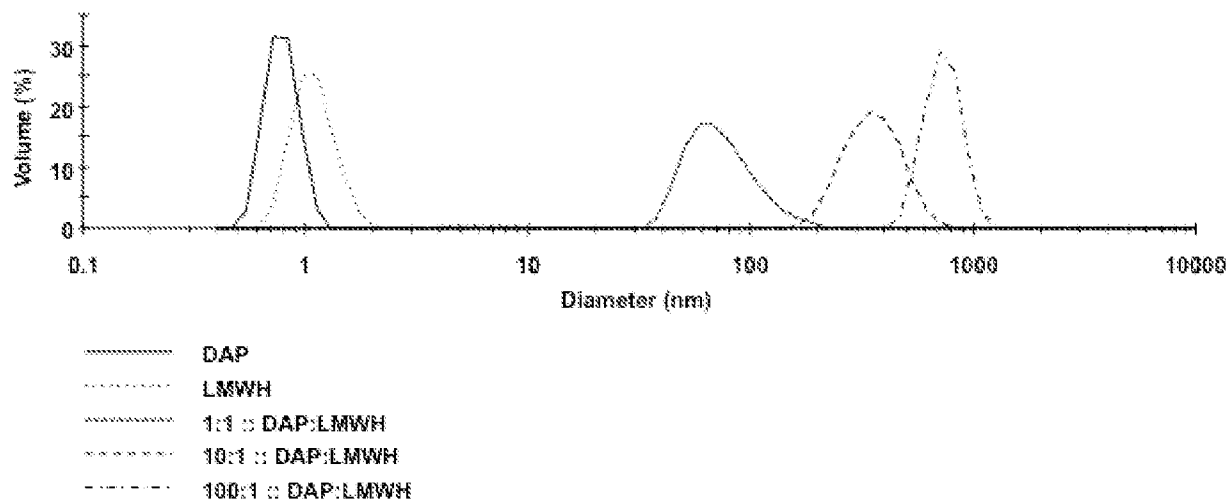
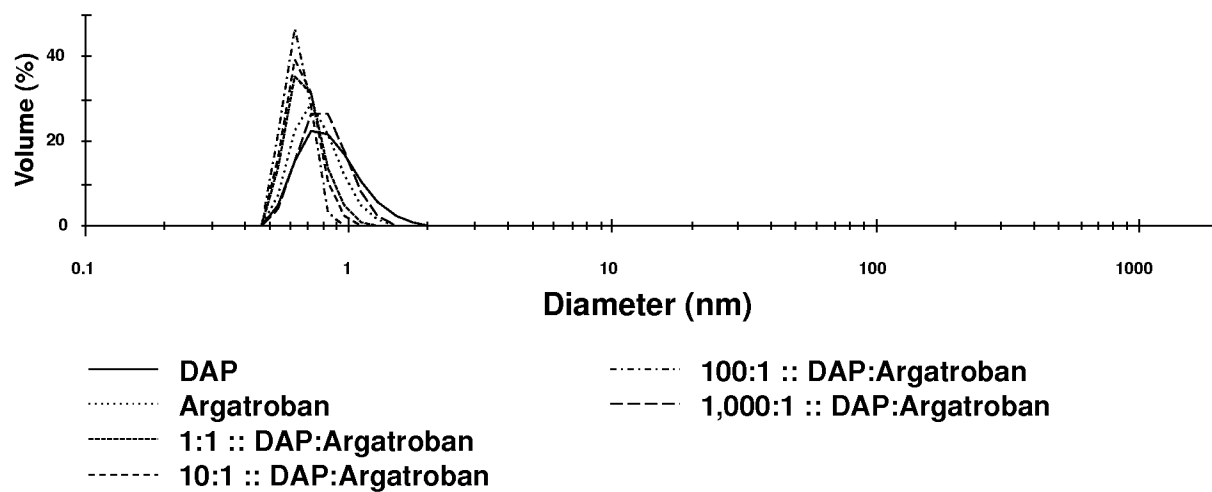


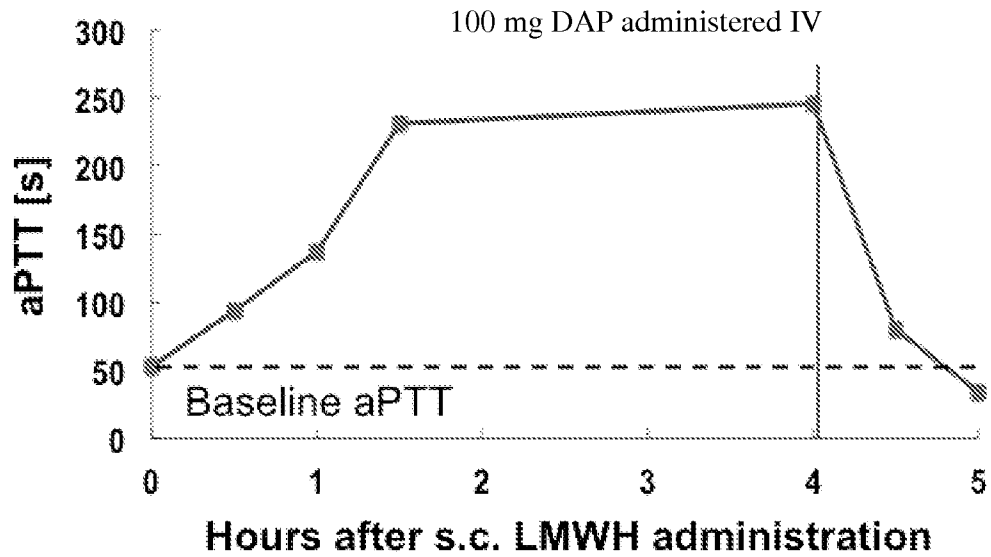
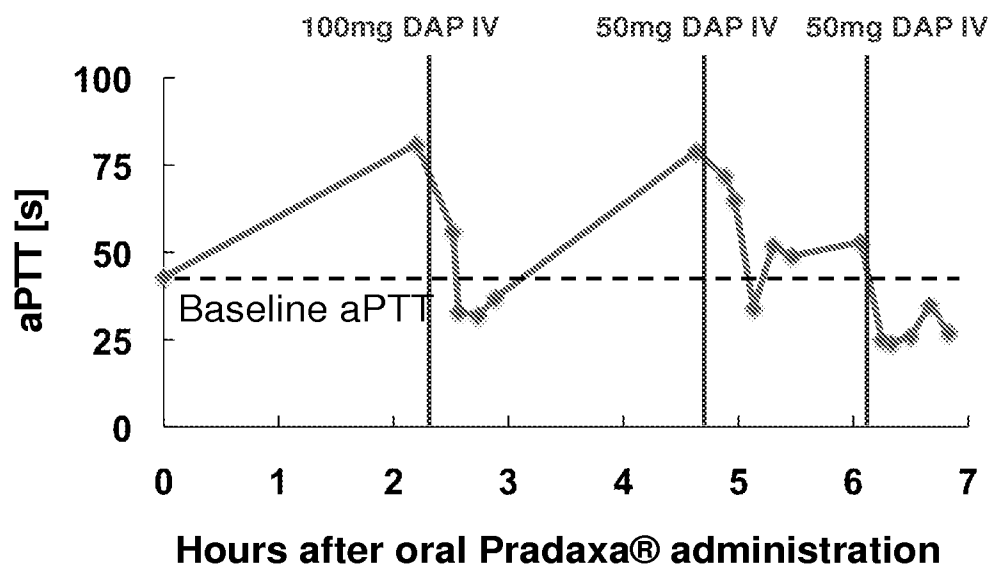
Figure 6



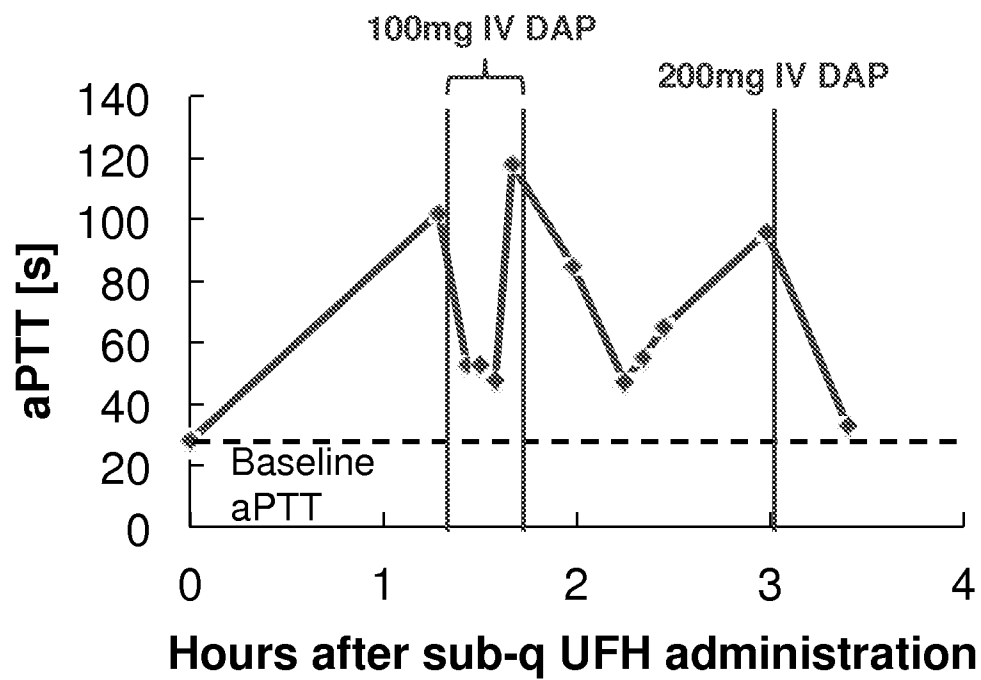
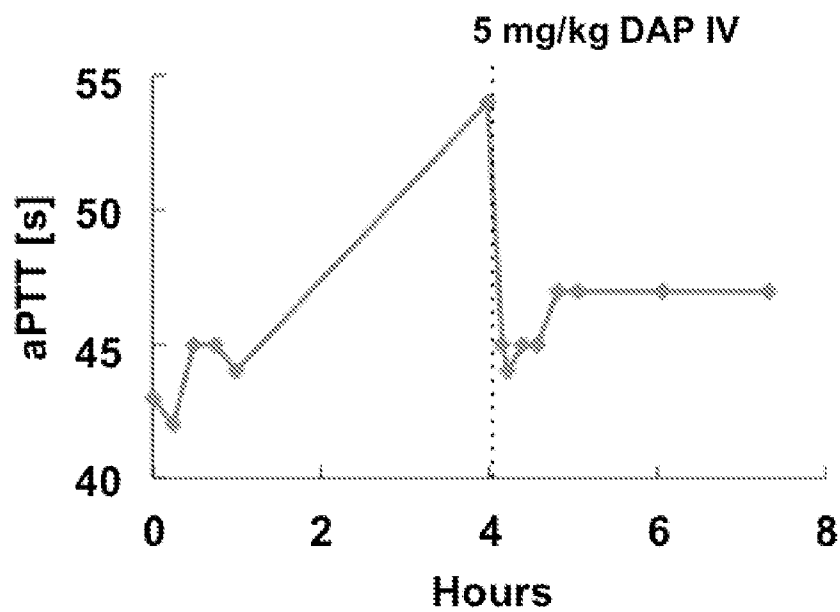
4/12

Figure 7

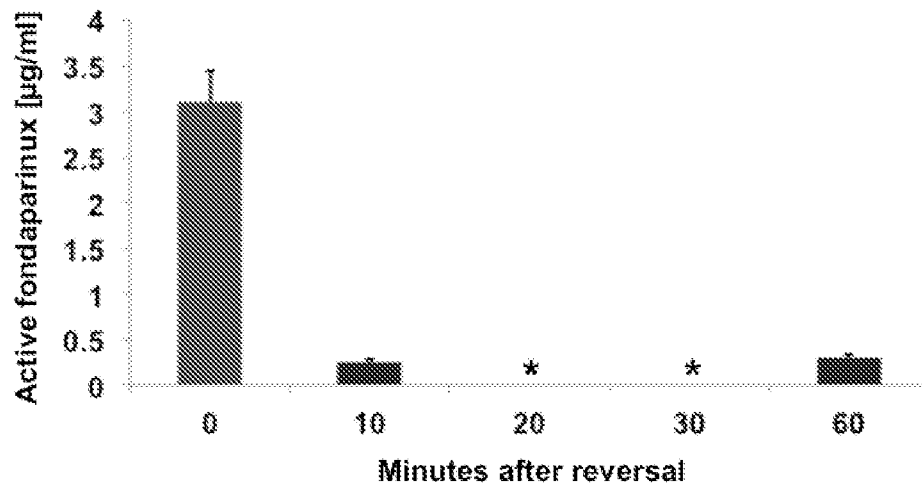
5/12

Figure 8**Figure 9**

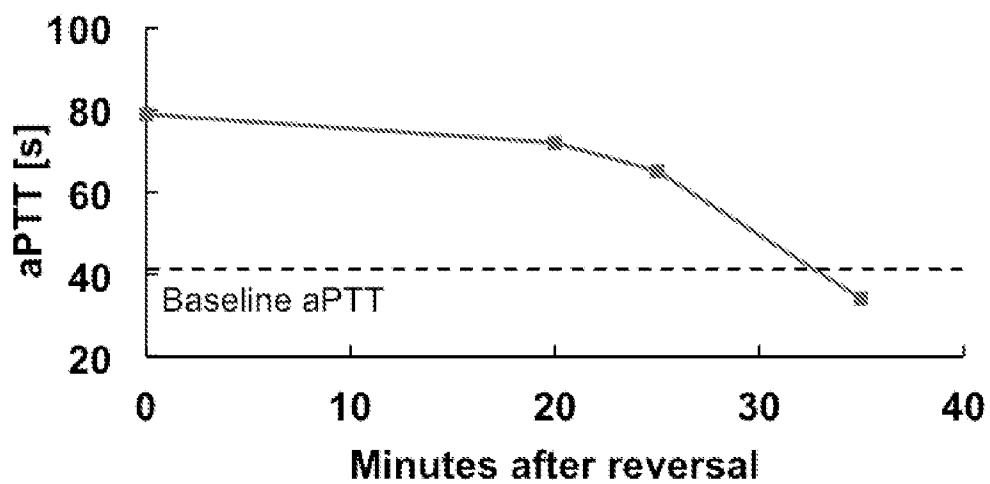
6/12

Figure 10**Figure 11**

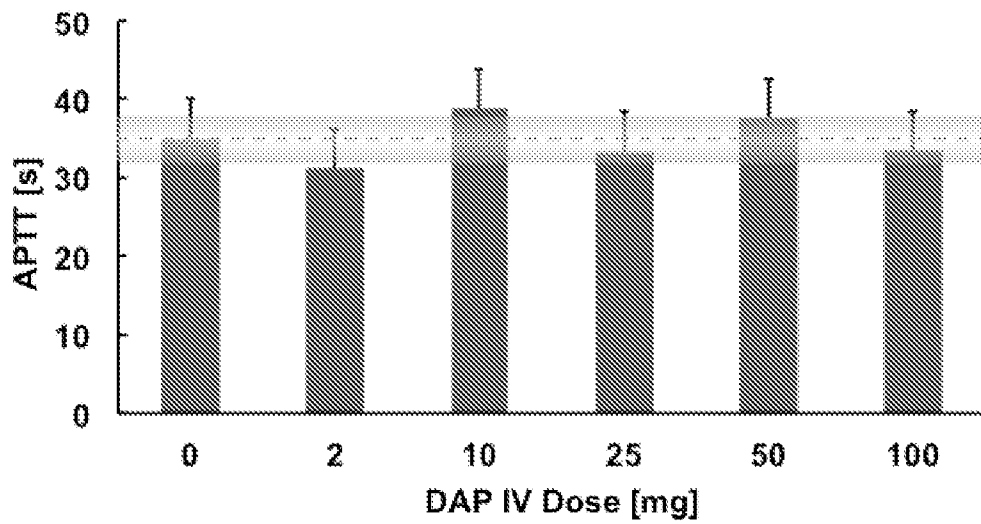
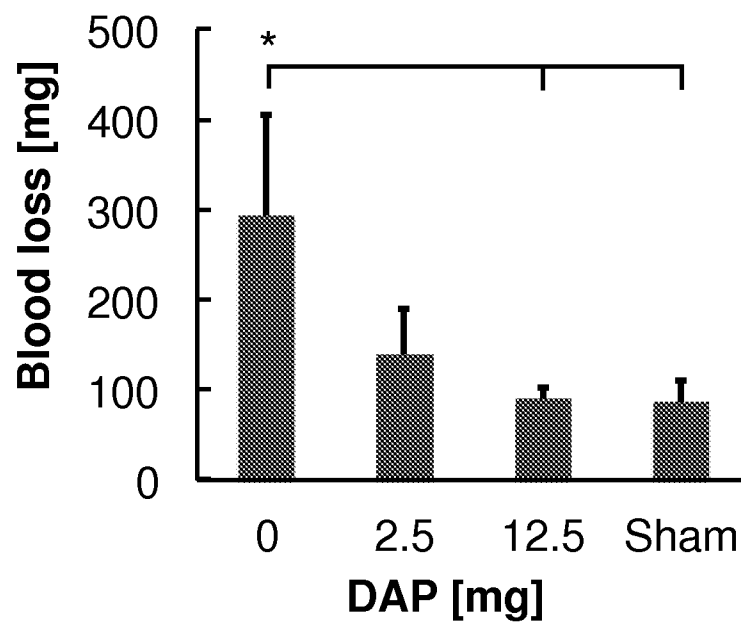
7/12

Figure 12

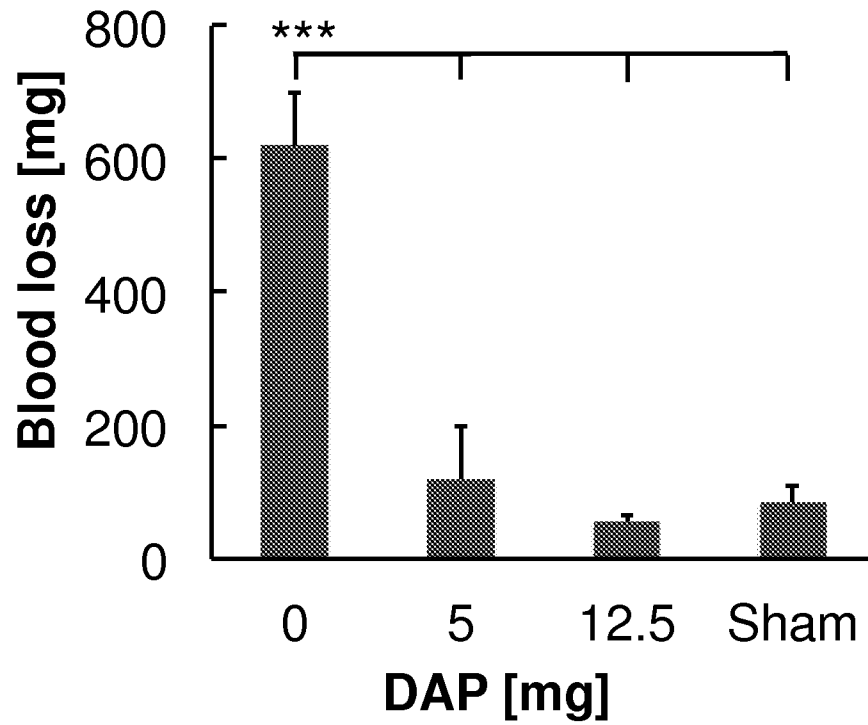
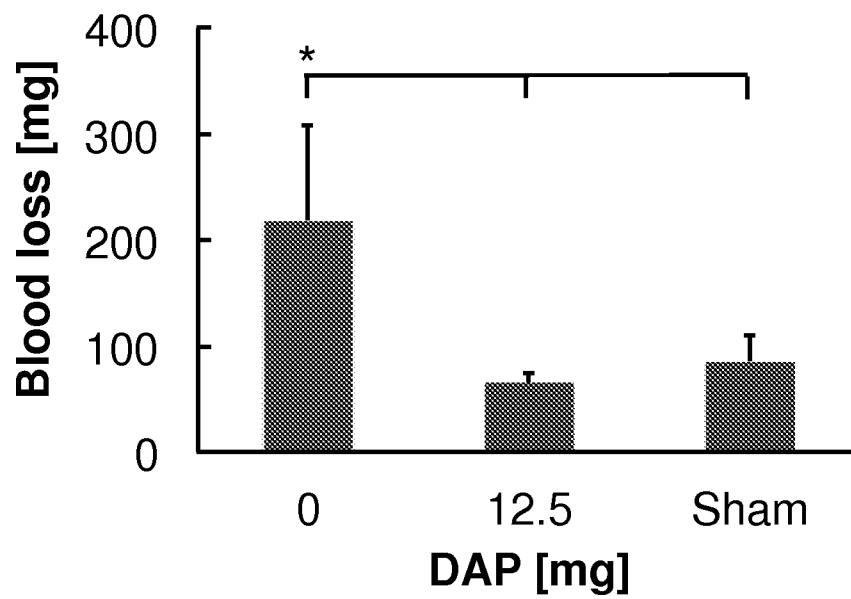
* Indicates below the limit of detection

Figure 13

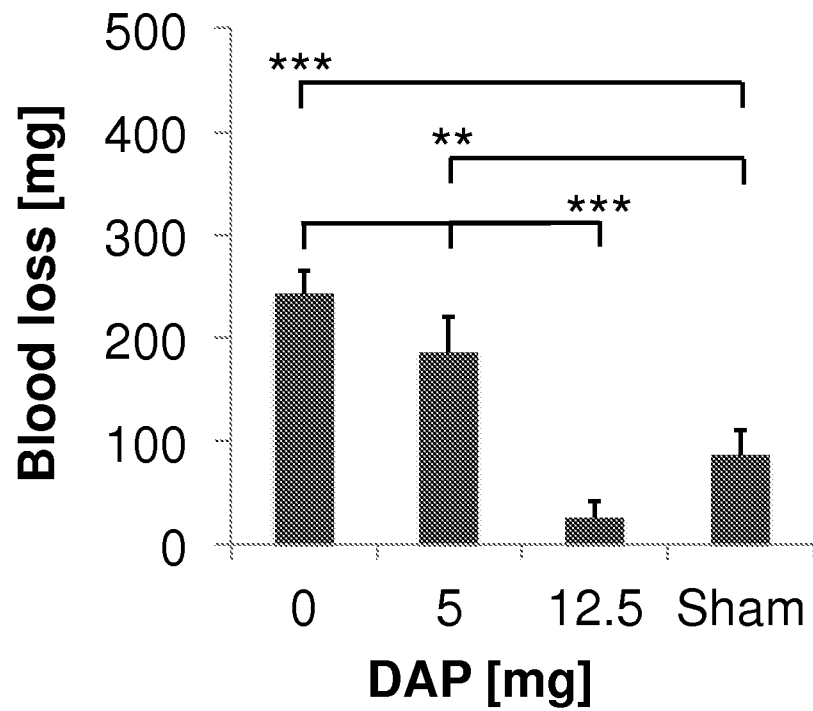
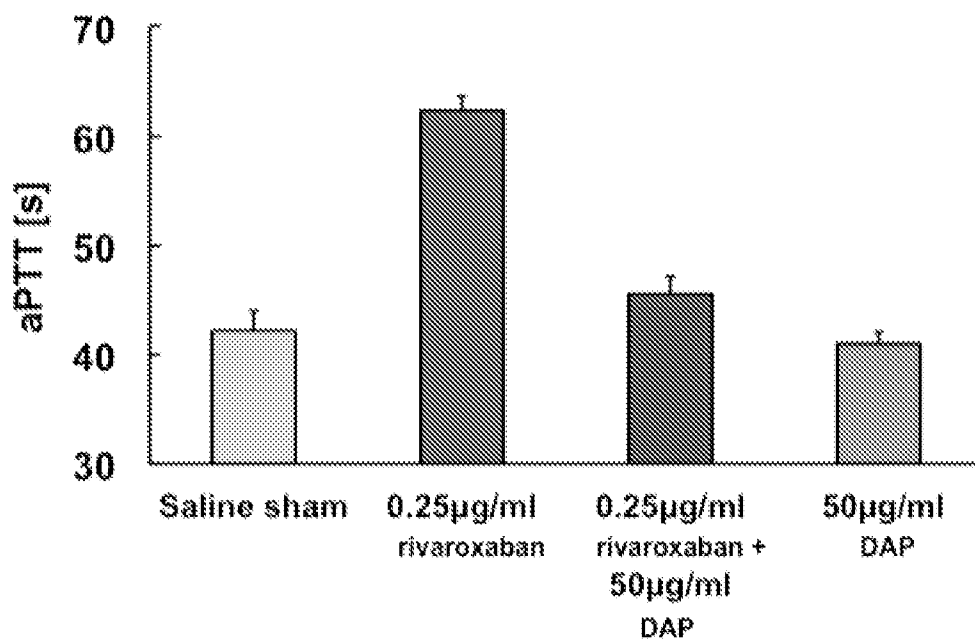
8/12

Figure 14**Figure 15**

9/12

Figure 16**Figure 17**

10/12

Figure 18**Dabigatran****Figure 19**

11/12

Figure 20

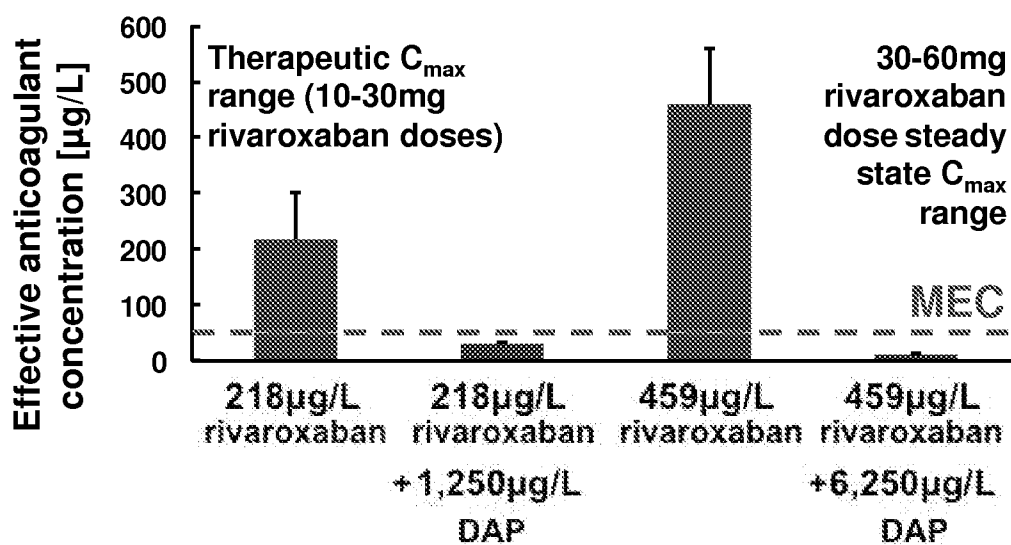
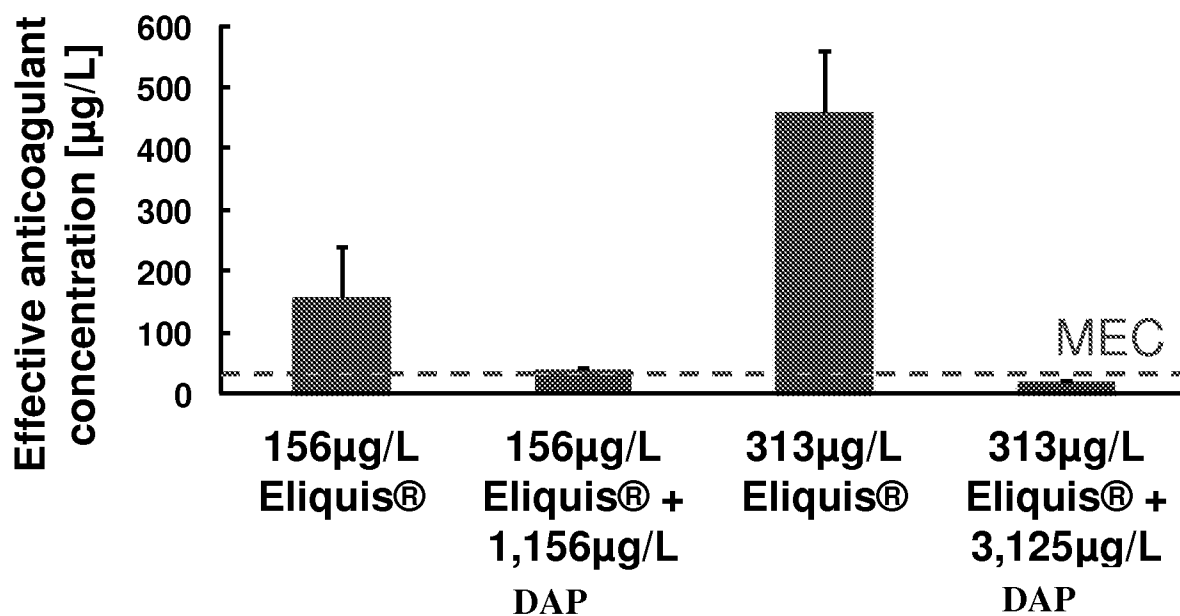
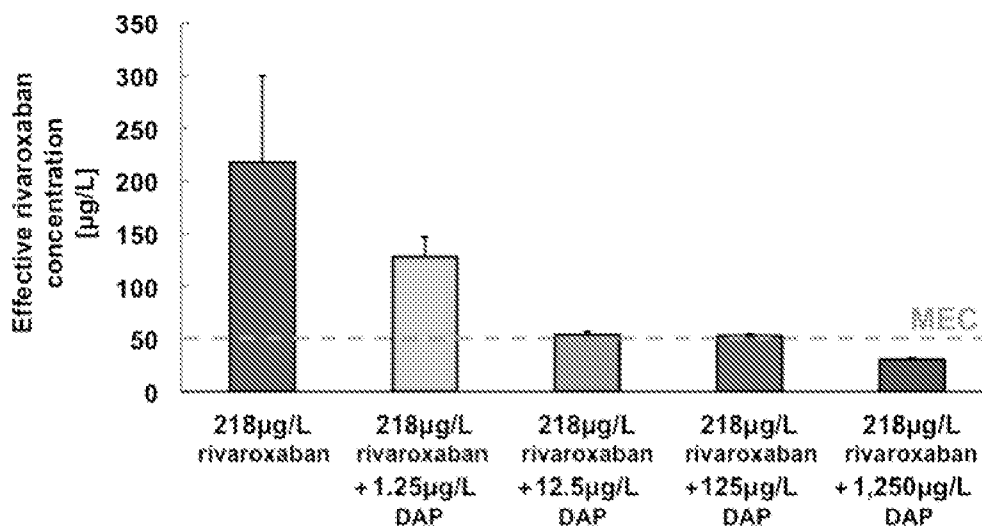


Figure 21



12/12

Figure 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/066938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D241/04 C07D295/13 A61K31/495 A61P7/00
ADD.

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)

C07D 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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Sigma-Aldrich Catalogue", 1 January 1996 (1996-01-01), Sigma-Aldrich GmbH, XP002692061, page 497,502,1305, page 497 page 502 page 1305	1
X	----- F. BISCHOFF: "Preparation of some substituted guanidines", J. BIOL. CHEM., vol. 80, 1 January 1928 (1928-01-01), pages 345-355, XP055053032, page 347 ----- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 2013

Date of mailing of the international search report

07/03/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Johnson, Claire

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/066938

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MULL R P ET AL: "GUANIDINES WITH ANTIHYPERTENSIVE ACTIVITY. II", JOURNAL OF MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, US, vol. 5, 1 September 1962 (1962-09-01), pages 944-949, XP009084771, table III -----	1
X	A. SABET HAMMAM: "Heterocyclic Quinones VIII. Synthesis and spectra of new carbazoloquinone derivatives of naturally occurring amino acids", J. APPL. CHEM. BIOTECHNOL., vol. 26, 1 January 1976 (1976-01-01), pages 667-682, XP055053034, page 670; compound (IX) -----	1
X	SHUJI KITAMURA ET AL: "Potent Dibasic GPIIb/IIIa Antagonists with Reduced Prolongation of Bleeding Time: Synthesis and Pharmacological Evaluation of 2-Oxopiperazine Derivatives", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 44, no. 15, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 2438-2450, XP055053054, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm0004345 compounds 12a-c -----	1
A	M. A. CROWTHER ET AL: "Bleeding risk and the management of bleeding complications in patients undergoing anticoagulant therapy: focus on new anticoagulant agents", BLOOD, vol. 111, no. 10, 15 May 2008 (2008-05-15), pages 4871-4879, XP055053182, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2007-10-120543 table 2 -----	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/066938

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.: 1-11, 16-37(all partially)
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-11, 16-37(all partially)

Present claims 1-11 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 (diarginine piperazines of general formulae (V) or (VI). 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 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23). An exhaustive search was only performed for compounds (and compositions and uses thereof) of formula (I) in which A is 1,4- or 2,5-disubstituted piperazine, L and L' are a substituted or unsubstituted alkylene chain, X is NHC(=O)-, M and M' are a substituted alkylene chain and Y and Y' are a guanidine moiety, i.e. to compounds wherein the groups are as defined as on p. 5, l. 8-11.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

Figura 1

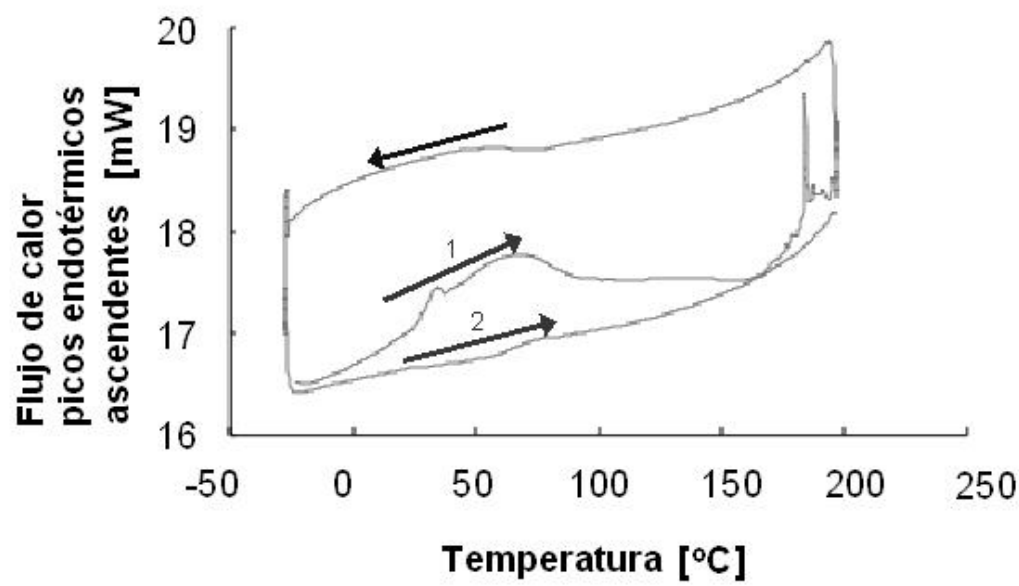


Figura 2

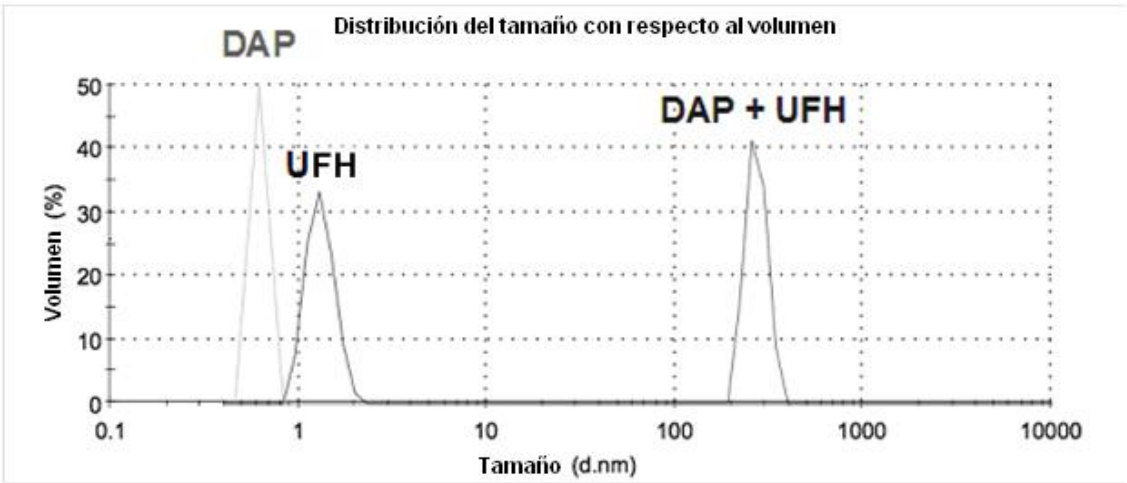


Figura 3

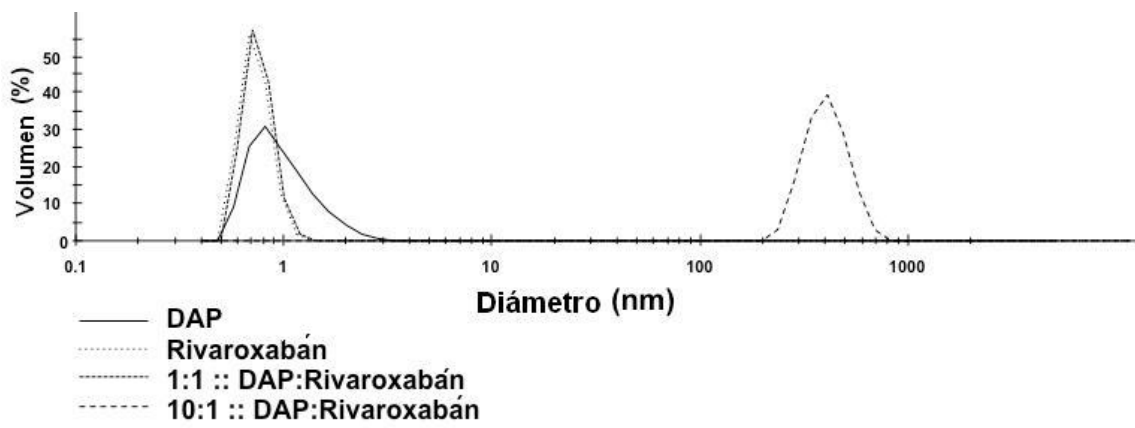


Figura 4

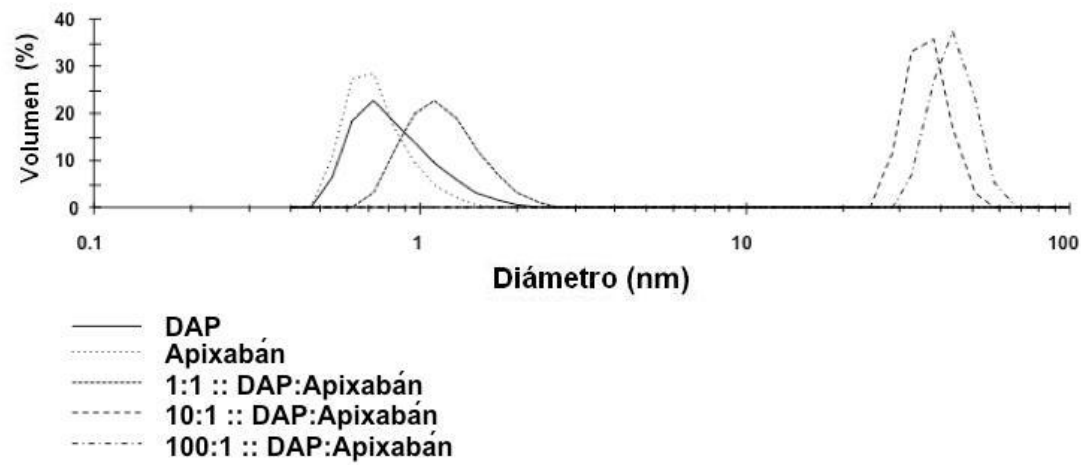


Figura 5

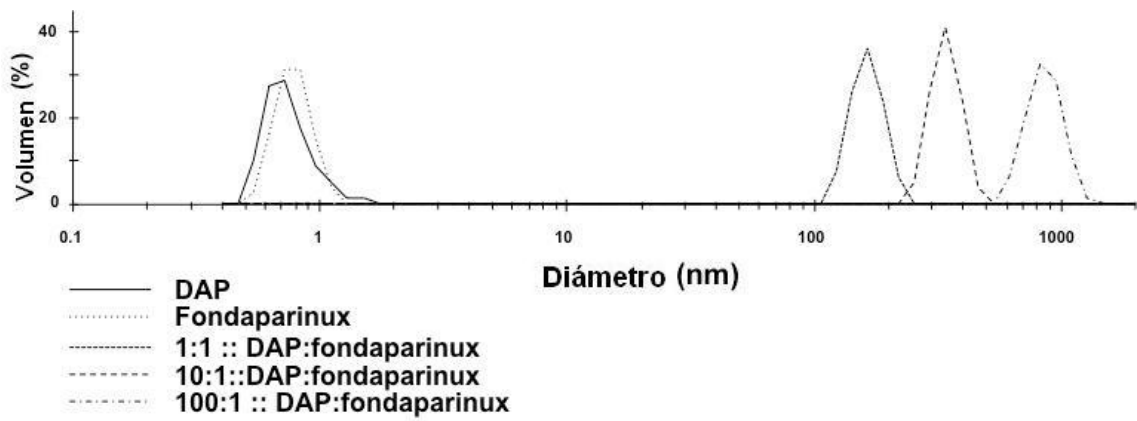


Figura 6

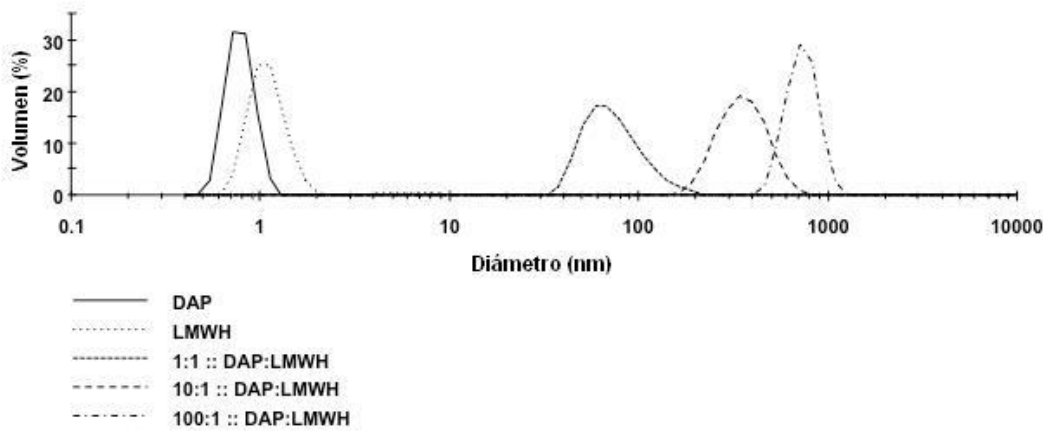


Figura 7

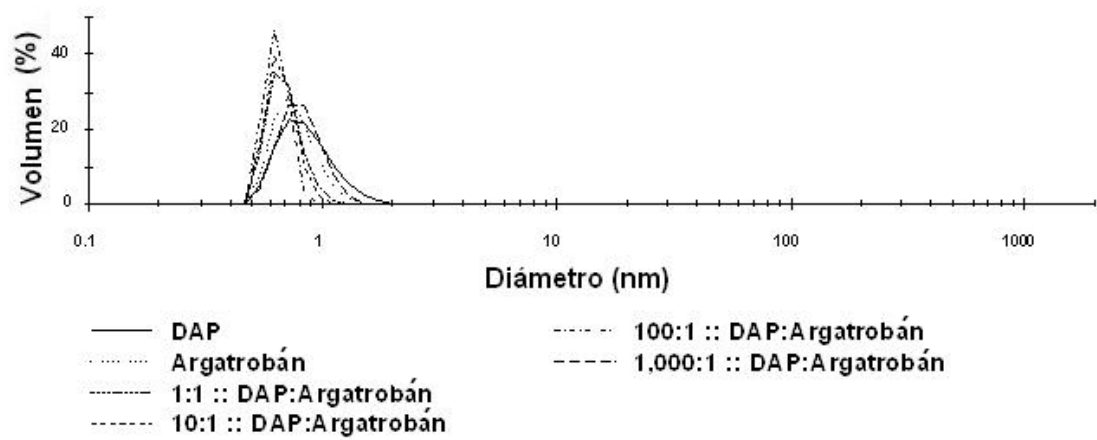


Figura 8

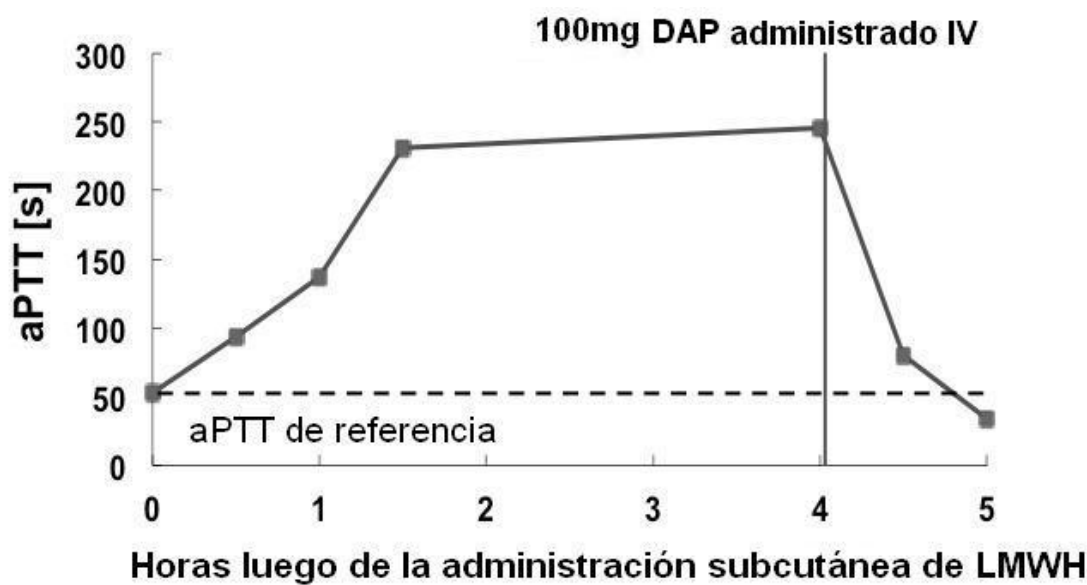


Figura 9

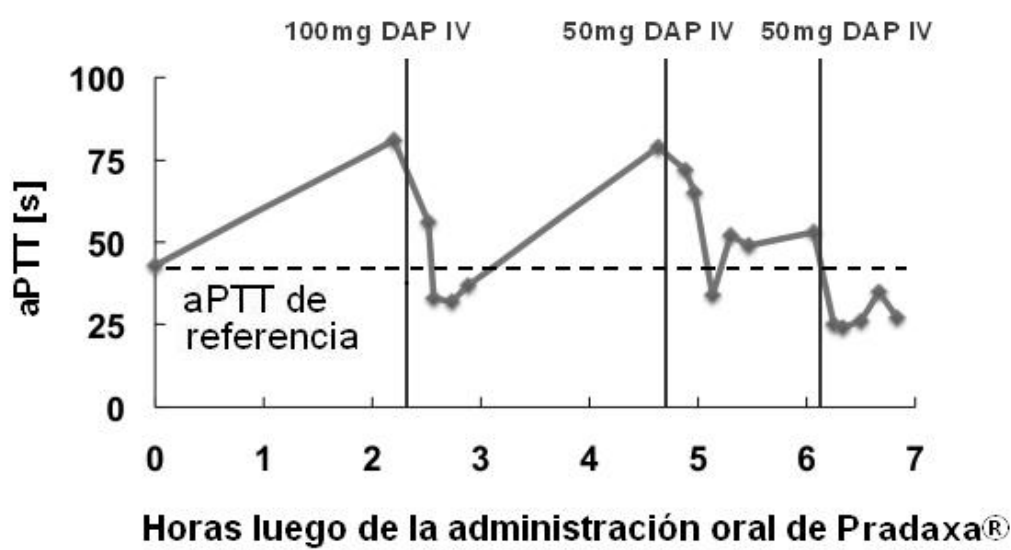
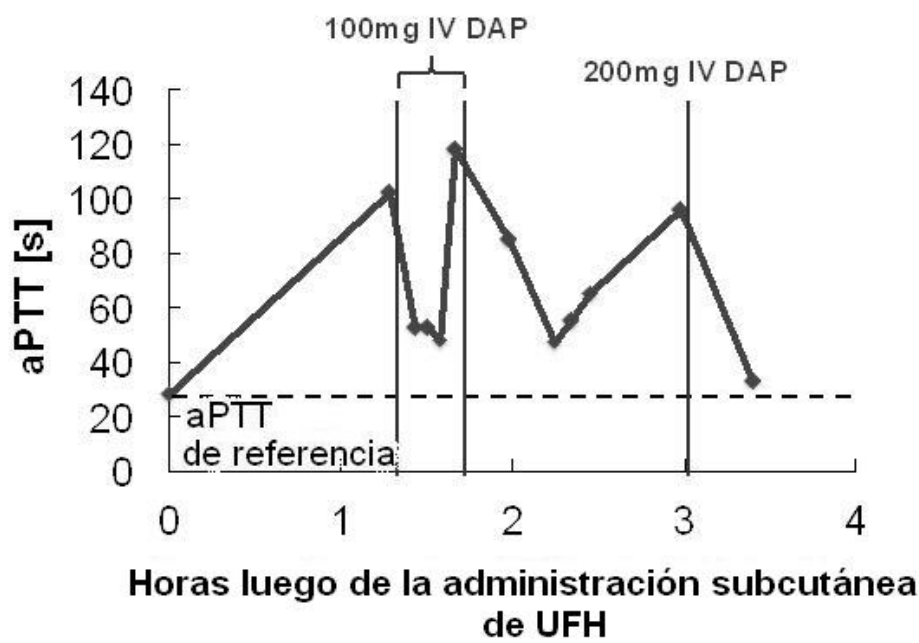


Figura 10



5

Figura 11

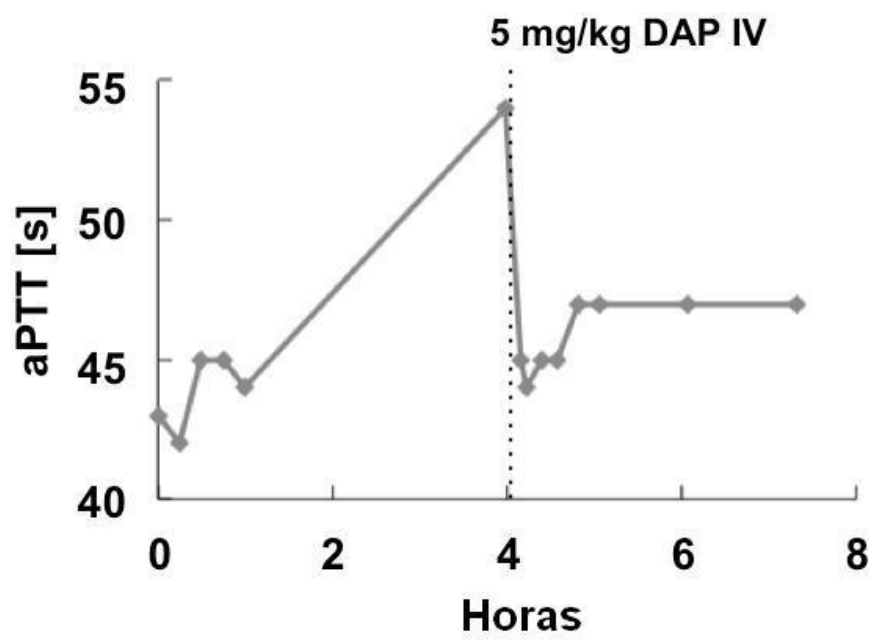


Figura 12

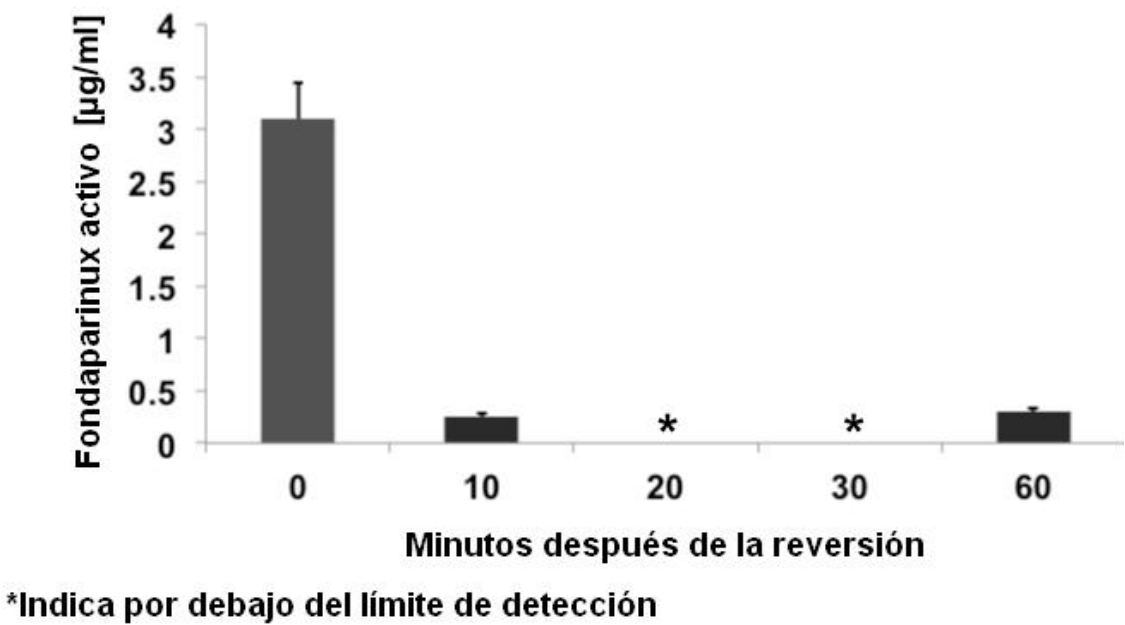


Figura 13

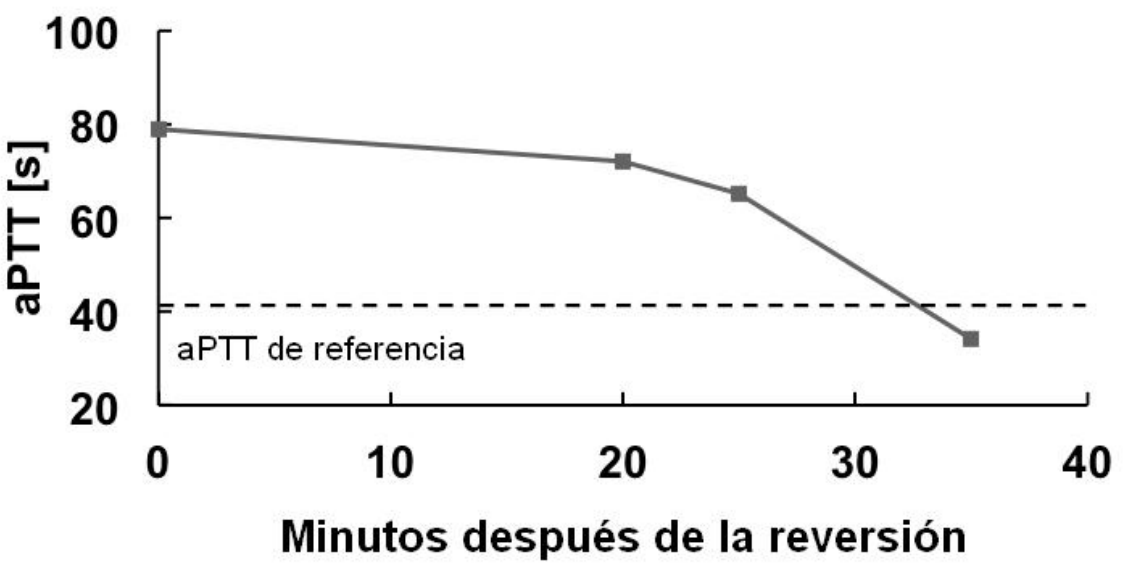


Figura 14

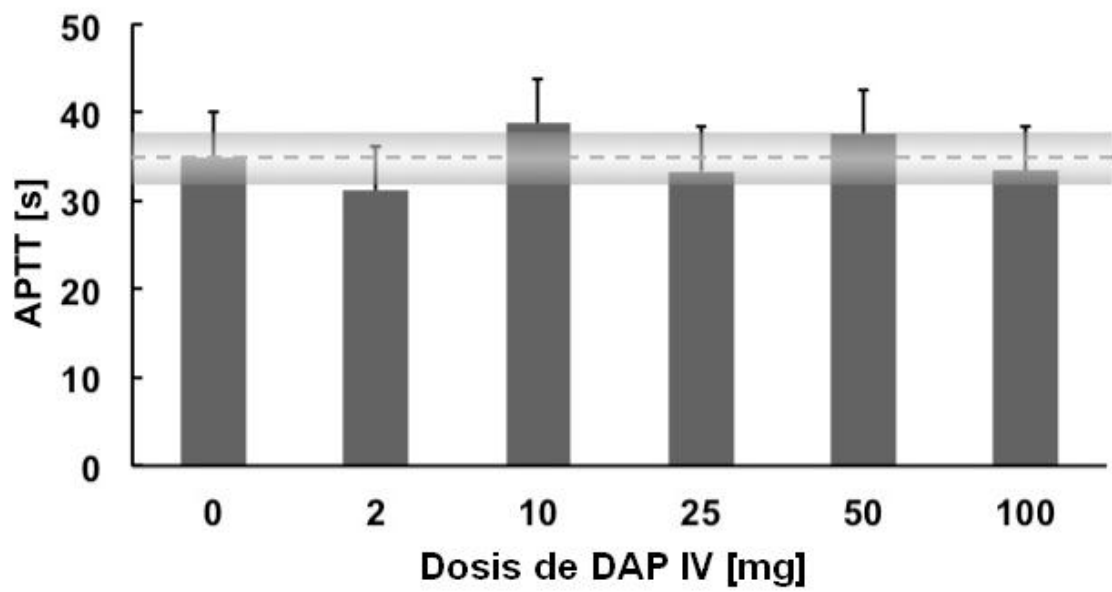


Figura 15

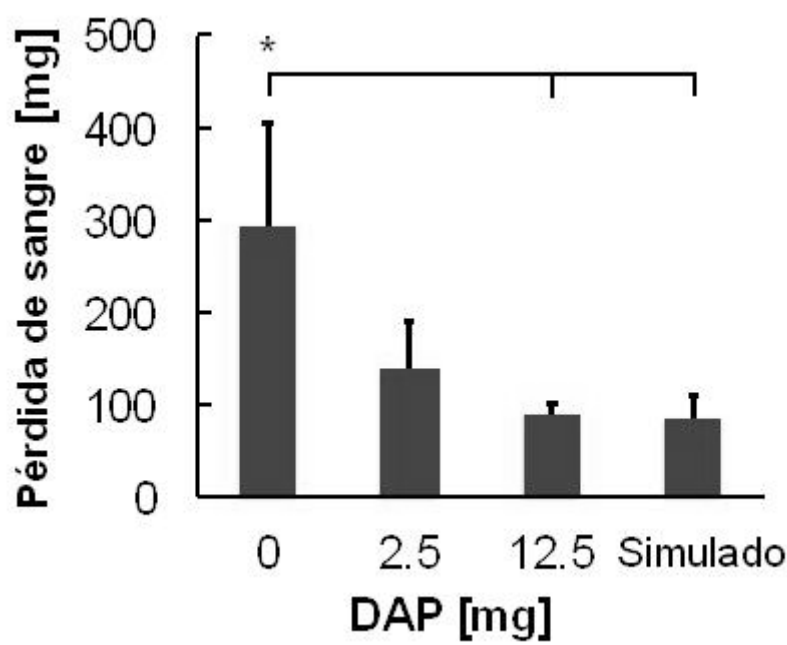


Figura 16

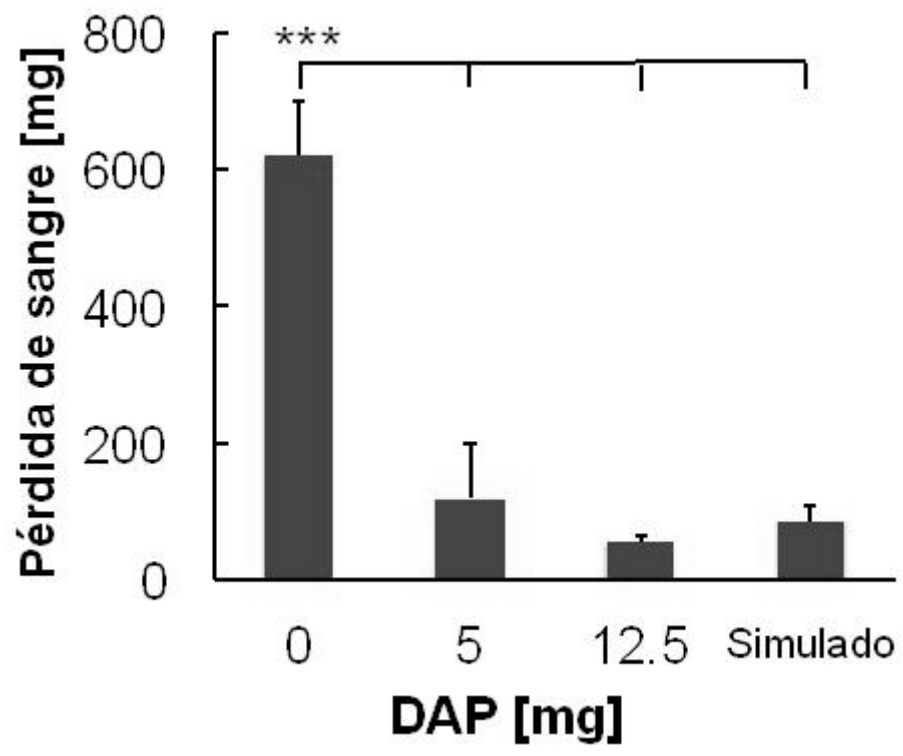


Figura 17

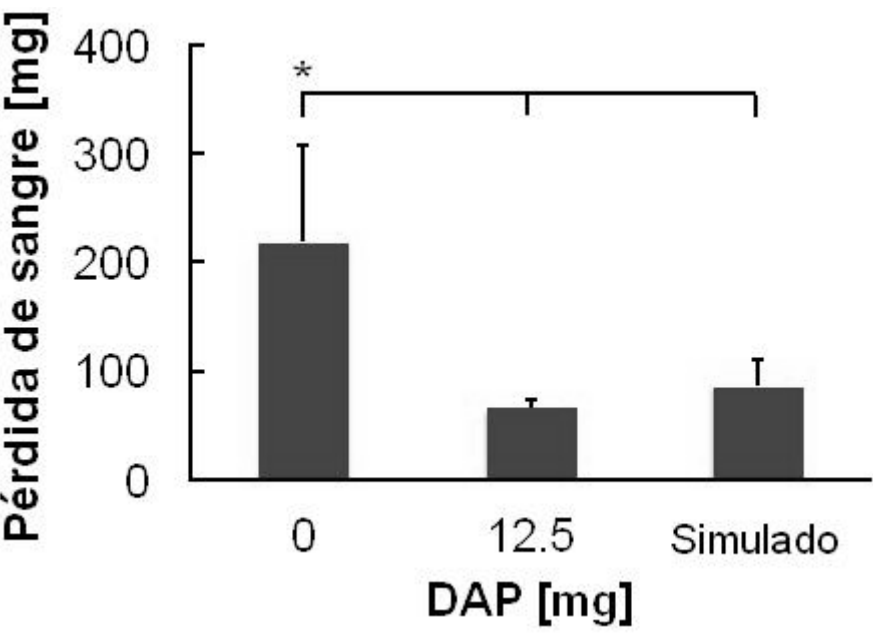
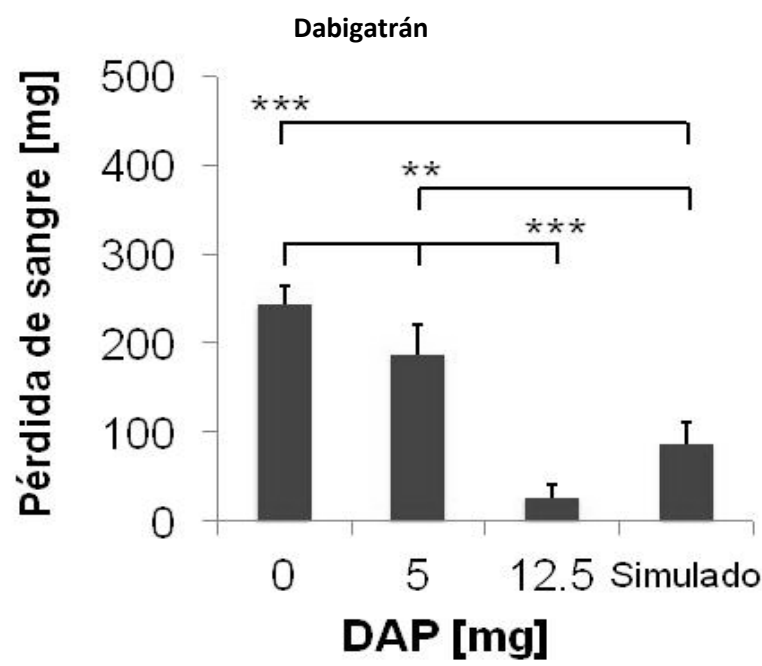


Figura 18



5

Figura 19

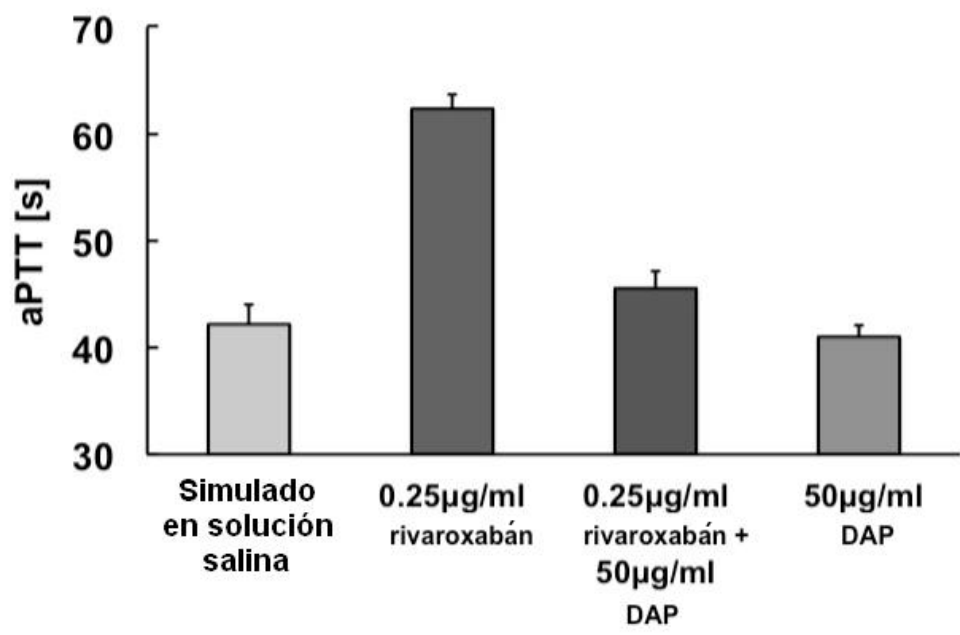
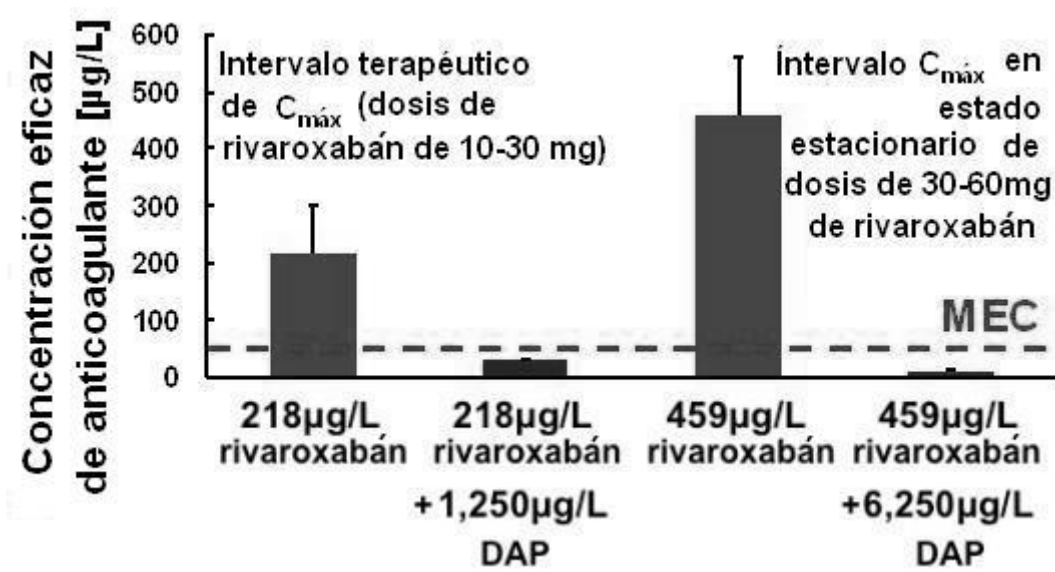


Figura 20



5

Figura 21

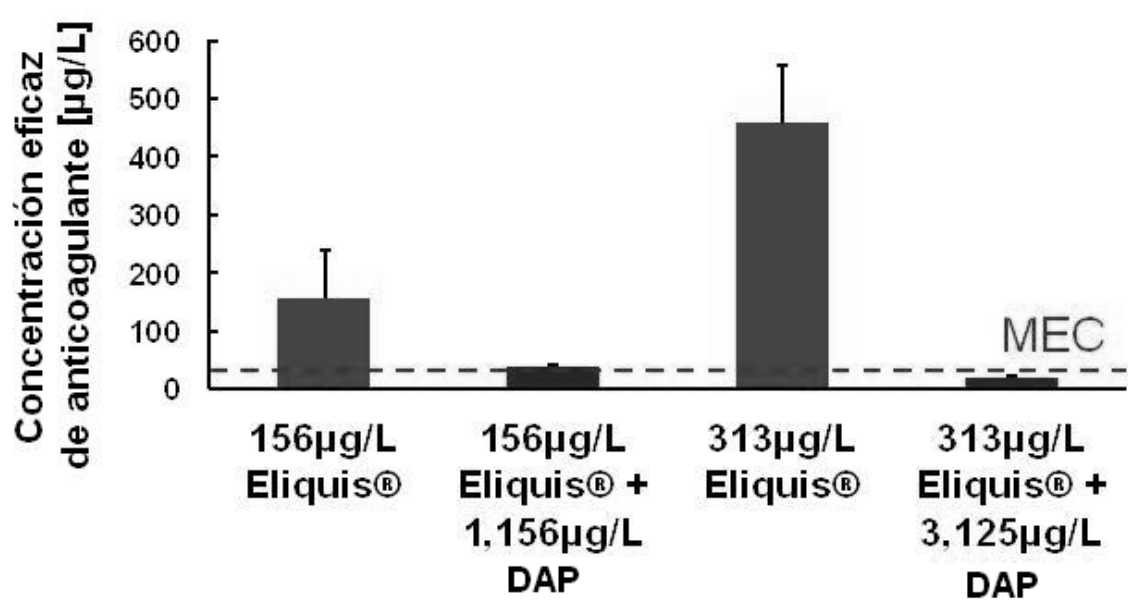
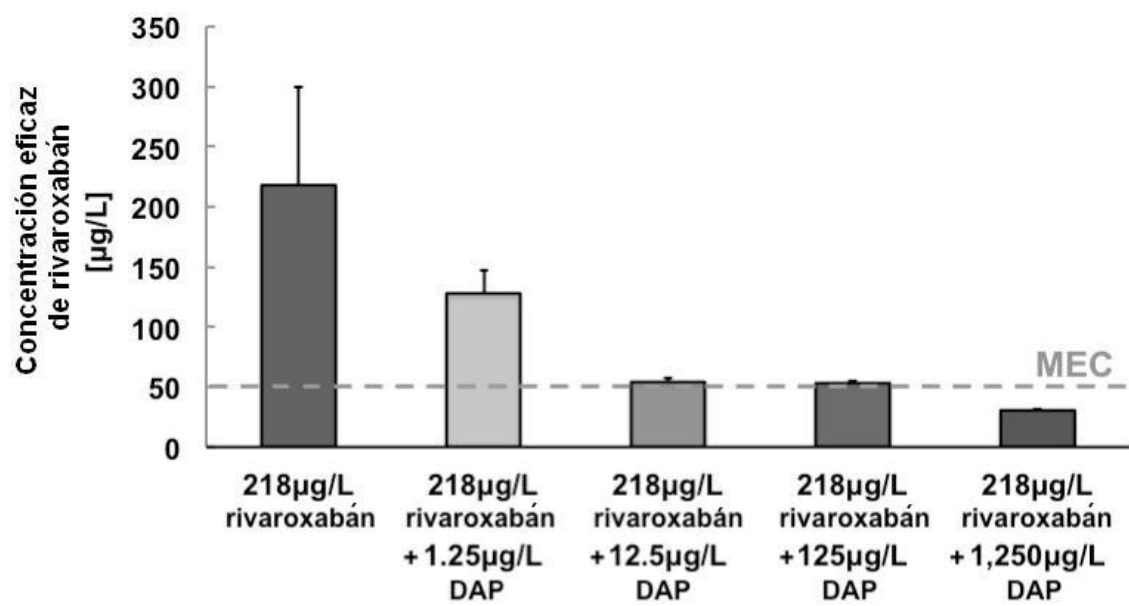


Figura 22



COLOMBIA

PODER

El (los)

Domiciliados en

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de registros sanitarios;
- c) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy

en

por

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)
(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned *SALOMON S. STEINER*

Of *PEROSPHERE INC.*

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of Sanitary registrations;
- c) For the obtainment of copyright registrations

Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this *13 MAY 2014*

in *DANBURY CT USA*

by *Salomon Steiner*
(Notary shall execute on the other side)
(Consular legalization or apostille is required)

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co

State of Connecticut

County of FAIRFIELD ss.

On this the 13 day of MAY, 2014, before me, JUSTINE M. HAGER, the undersigned officer, personally appeared Solomon S. Steiner, who acknowledged himself/herself to be the CEO & Chairman of PEROSPHERE INC., a corporation, and that s/he as such CEO & Chairman, being authorized so to do executed the foregoing instrument for the purposes therein contained, by signing the name of the corporation by himself/herself as (title of officer)

In witness whereof I hereunto set my hand.

Justin M. Hager
Signature of Notary Public

Date Commission Expires: 31 MAY 2016

JUSTINE M. HAGER
Printed Name of Notary

JUSTINE M. HAGER
NOTARY PUBLIC
State of Connecticut
My Commission Expires
May 31, 2016

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

MANDRA, Raymond R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
1290 Avenue of The Americas
New York, NY 10104-3800
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 13 May 2014 (13.05.2014)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 04232.000100.PC	
International application No. PCT/US2012/066938	International filing date (day/month/year) 29 November 2012 (29.11.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address PEROSPHERE INC. 24 Old Wagon Road Mount Kisco, NY 10549 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☒ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address PEROSPHERE INC. 20 Kenosia Avenue Danbury, CT 06810 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:	☐ the International Preliminary Examining Authority ☒ the designated Offices concerned ☐ the elected Offices concerned ☐ other:
☒ the receiving Office ☐ the International Searching Authority ☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 89 95	Authorized officer Doherty Fiona e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04
---	--

RESUMEN

Se describen compuestos de reversión de anticoagulantes novedosos, así como también métodos para fabricar los compuestos, composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos, métodos para utilizar los compuestos para revertir los efectos anticoagulantes de los inhibidores de la coagulación y ensayos de diagnóstico que comprende los compuestos.

AGENTES DE REVERSIÓN ANTICOAGULANTE

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 61/564,559 que se presentó el 29 de noviembre de 2011, la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 61/614,292 que se presentó el 22 de marzo de 2012, la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 61/641,698 que se presentó el 2 de mayo de 2012 y la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 61/666,291 que se presentó el 29 de junio de 2012, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención describe compuestos que revierten completa o parcialmente los efectos anticoagulantes de inhibidores de la coagulación, tales como heparina no fraccionada ("UFH", por sus siglas en inglés), heparina de bajo peso molecular ("LMWH", por sus siglas en inglés), fondaparinux y otros anticoagulantes de unión a la antitrombina, así como inhibidores de Xa e IIa directos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La cascada de coagulación es un proceso fisiológico normal cuyo objetivo es evitar una pérdida de sangre o hemorragia significativas luego de la lesión vascular. Hay veces, sin embargo, en que se formará un coágulo de sangre (trombo) cuando no es necesario. Por ejemplo, algunas condiciones de alto riesgo tales como enfermedad médica aguda, inmovilización prolongada, cirugía o cáncer pueden aumentar el riesgo de desarrollar un coágulo de sangre que posiblemente puede llevar a consecuencias significativas tales como enfermedad cardiovascular aterosclerótica y/o ritmos cardíacos anormales.

La cascada de coagulación consiste en una serie de pasos donde una proteasa escinde y posteriormente activa la siguiente proteasa en la secuencia. Cada proteasa puede activar diversas moléculas de la siguiente proteasa en la serie, amplificando esta cascada biológica. El resultado final de estas reacciones es convertir el fibrinógeno, una proteína soluble, en hilos insolubles de fibrina. Junto con las plaquetas, los hilos de fibrina forman un coágulo de sangre estable.

Antitrombina (AT), un inhibidor de proteasa de serina, es el inhibidor plasmático principal de las proteasas de coagulación. AT bloquea la cascada de coagulación mediante, por ej., inhibición de trombina (factor IIa) y factor X activado (factor Xa). La heparina (heparina no fraccionada) y heparinas de bajo peso molecular (LMWH; heparina fraccionada) inhiben el proceso de coagulación mediante la unión a AT mediante una secuencia de pentasacárido. Esta unión lleva a un cambio conformacional de AT que acelera su inhibición de los factores IIa, Xa y otras proteasas implicadas en la coagulación sanguínea. Una vez disociados, la heparina y LMWH son libres de unirse a otra molécula de antitrombina y posteriormente inhibir más trombina y factor Xa.

10

La heparina no fraccionada es una mezcla de glicosaminoglicanos (GAG) descubiertos en el hígado de perros que tienen propiedades anticoagulantes en 1916 por McLean y Howell en la Johns Hopkins University. Además de la anticoagulación, se ha encontrado que la heparina no fraccionada tiene otras propiedades incluyendo antiinflamación y angiogénesis. Las LMWH son heparinas que consisten en cadenas cortas de polisacáridos, que generalmente tienen un peso molecular de menos de 8000 Da. Tanto la LMWH como la heparina se usan para evitar que la sangre se coagule dentro del cuerpo, pero se usan en situaciones diferentes en la clínica.

15

La heparina está disponible como una solución líquida administrada parenteralmente. LMWH, tal como enoxaparina, es una fracción de bajo peso molecular de heparina. También está disponible como una solución inyectable líquida. Las marcas actualmente disponibles de LMWH aprobadas por la FDA en Estados Unidos son LOVENOX® (nombre genérico, enoxaparina) y FRAGMIN® (nombre genérico, dalteparina).

20

25

La heparina de bajo peso molecular o fraccionada tiene una mayor especificidad por la actividad del factor Xa y el factor IIa en sangre que la heparina no fraccionada. Además, LMWH tiene un efecto más reproducible en el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT, por sus siglas en inglés), una medida del tiempo de coagulación. LMWH tiene una menor incidencia de trombocitopenia inducida por heparina (HIT, por sus siglas en inglés). Debido a que LMWH tiene una eficacia más predecible y una incidencia menor de efectos adversos tales como HIT, los pacientes pueden inyectarse LMWH ellos mismos en su casa, pese a que también se usa con frecuencia en el hospital. Por estas razones, las LMWH se han vuelto el anticoagulante líder en el mercado.

30

35

La protamina, una molécula con carga positiva, se puede usar para revertir la anticoagulación que resulta de la administración de heparina no fraccionada con carga altamente negativa o heparina de bajo peso molecular (LMWH). La protamina es un producto natural que se ha asociado con problemas de suministro, lo que destaca una
 5 necesidad de opciones de agentes de reversión adicionales, idealmente sintéticos. La actividad anticoagulante de LMWH puede revertirse parcialmente, pero no completamente, mediante la administración intravenosa de protamina. Se cree que la razón de la reducción en la actividad de reversión de la anticoagulación de la protamina en el caso de LMWH se debe a una menor afinidad de unión por la fracción de LMWH
 10 en la sangre que la heparina no fraccionada. La protamina se debe administrar lentamente, debido a efectos hipotensivos y preocupaciones con respecto a la anafilaxis.

Recientemente, agentes anticoagulantes adicionales han comenzado a ganar aprobación reguladora. Los ejemplos de tales anticoagulantes incluyen dabigatrán o
 15 PRADAXA®, argatrobán o ARGATROBAN®, rivaroxabán o XARELTO®, apixabán o ELIQUIS®, edoxabán o LIXIANA® y fondaparinux o ARIXTRA®. Estos anticoagulantes inhiben la propagación de la coagulación por parte del factor IIa o factor Xa.

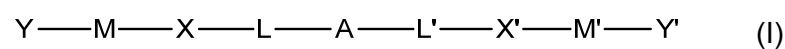
Los anticoagulantes tales como dabigatrán, fondaparinux, rivaroxabán y
 20 apixabán no tienen agente de reversión aprobado. El estado actual de la técnica para la reversión de dabigatrán o PRADAXA® es emplear carbón activado para intentar retirar el dabigatrán de la sangre y usar transfusiones de sangre. Además de Eerenberg et ál. *Circulation*. 4 de octubre de 2011;124(14):1573-9. Epub 6 de setiembre de 2011, que informa que en un pequeño ensayo clínico, el concentrado de complejo de protrombina
 25 fue capaz de revertir a dabigatrán, pero no a rivaroxabán, no existen datos o antídoto clínicamente disponible para revertir ninguno de estos inhibidores del Factor IIa o Xa de la coagulación. Por lo tanto, cuando los pacientes son anticoagulados con estos agentes, los efectos adversos asociados con la sobredosis, particularmente sangrados significativos o fatales, son mucho más peligrosos que los efectos secundarios
 30 asociados con la administración de heparina no fraccionada. La falta de agentes de reversión por lo tanto limita el uso de estos fármacos.

Por estas razones, existe una necesidad clínica antigua, fuerte y no satisfecha de nuevos agentes de reversión anticoagulación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se han desarrollado inhibidores de heparina, fragmentos de heparina, fondaparinux y otros inhibidores del factor Xa o IIa. La estructura general de los agentes de reversión anticoagulante de interés es: **R-Z-R'**, donde R y R' son agentes cargados positivamente a pH fisiológico y pueden ser las mismas moléculas o moléculas diferentes y Z es un compuesto de anillo hidrofóbico fusionado o cíclico. Más específicamente, el inhibidor está representado por un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

10



donde:

15

A es un anillo carbocíclico o heterocíclico, aromático o no aromático, sustituido o no sustituido o un resto lineal;

L y L' son iguales o diferentes y son enlaces;

20

X y X' son iguales o diferentes y están ausentes o son un grupo funcional que une el enlace L a M y en enlace L' a M', respectivamente;

M y M' son iguales o diferentes y están ausentes o son un enlace que une X a Y y X' a Y', respectivamente, y

25

Y e Y' son iguales o diferentes y son un resto que contiene uno o más átomos o grupos catiónicos o uno o más grupos que se vuelven catiónicos en condiciones fisiológicas.

30

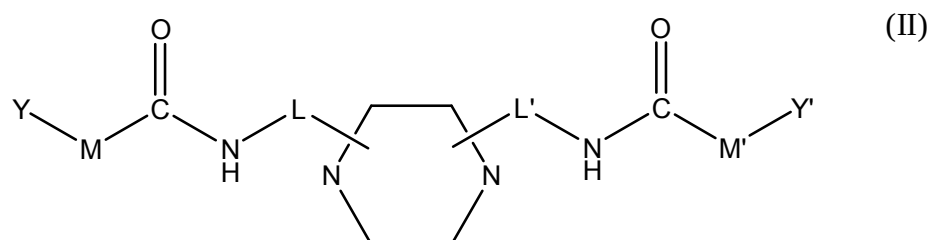
Los compuestos pueden ser simétricos o asimétricos; es decir, uno o más de L, L', X, X', M, M', Y o Y' puede ser igual o diferente. Los compuestos pueden ser quirales (es decir, contener uno o más centros quirales) o aquirales.

35

En algunas modalidades, A es un resto heterocíclico. En otras modalidades, A es un resto heterocíclico y L y L' son una cadena de alquileo sustituida o no sustituida. En aun otras modalidades, A es un resto heterocíclico, L y L' son una cadena de

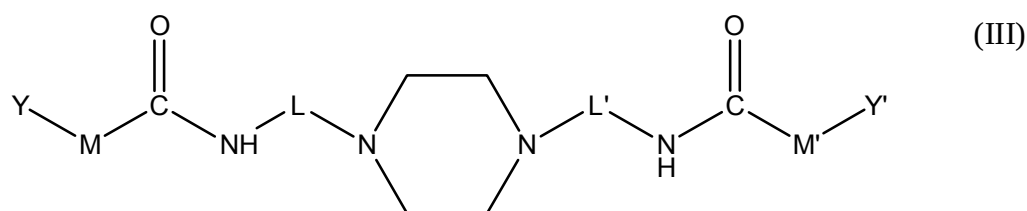
alquileo sustituida o no sustituida y X y X' son $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$. En aun otras modalidades, A es un resto heterocíclico, L y L' son una cadena de alquileo sustituida o no sustituida, X y X' son $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ y M y M' son una cadena de alquileo sustituida. En aun otras modalidades, A es un resto heterocíclico, L y L' son una cadena de alquileo sustituida o no sustituida, X es $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, M y M' son una cadena de alquileo sustituida, e Y e Y' son un resto de guanidina. En modalidades particulares, A es un anillo de piperazina 1,4 o 2,5 disustituido.

En otra modalidad de la invención, el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable de este:



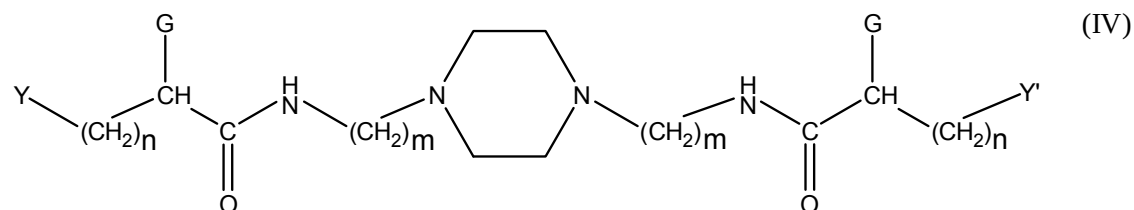
donde cada uno de L, L', M, M', Y e Y' son como se describe en la presente.

En otra modalidad de la invención, el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula III o una sal farmacéuticamente aceptable de este:



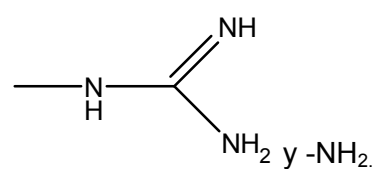
donde L, L', M, M', Y e Y' son como se describe en la presente.

En aun otra modalidad de la invención, el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

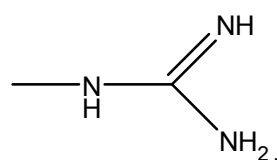


donde Y e Y' son como se describe en la presente y n es 3 a 5, m es 3 a 6 y G se selecciona de $-\text{NH}_2$ y OH. Más preferentemente, G es amino.

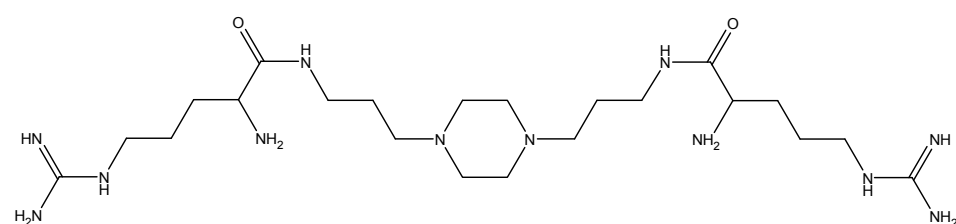
En aun otra modalidad de la invención, el inhibidor es un compuesto representado por cualquiera de las fórmulas II, III o IV e Y e Y' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en



Más preferentemente, G es $-\text{NH}_2$ e Y e Y' son



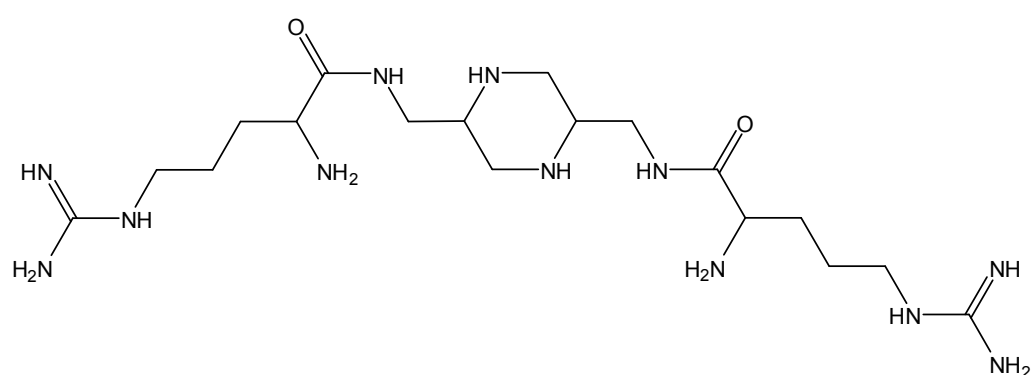
En la modalidad preferida, el compuesto es piperazina diarginina (DAP, por sus siglas en inglés), ilustrada en la fórmula V o un compuesto relacionado, ilustrado en la fórmula VI o sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos compuestos:



(V)

(3-{4-[3-(2-amino-5-guanidino-pentanoilamino)-propil]-piperazin-1-il}-propil)-amida del ácido 2-amino-5-guanidino-pentanoico; o

(VI)

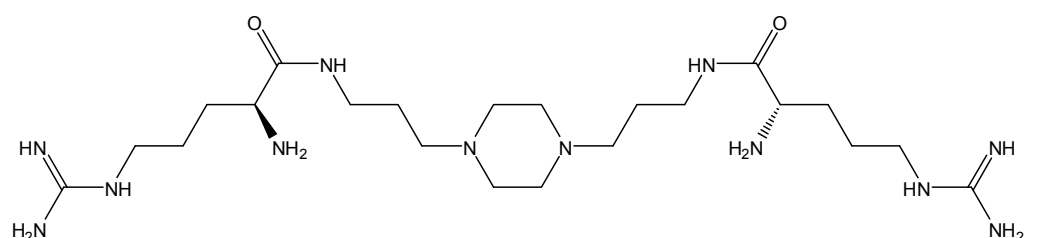


5 {5-[(2-amino-5-guanidino-pentanoilamino)-metil]-piperazin-2-ilmetil}-amida del ácido 2-amino-5-guanidino-pentanoico.

En una modalidad específica, el compuesto de fórmula V es un estereoisómero tal como se ilustra en la fórmula VII:

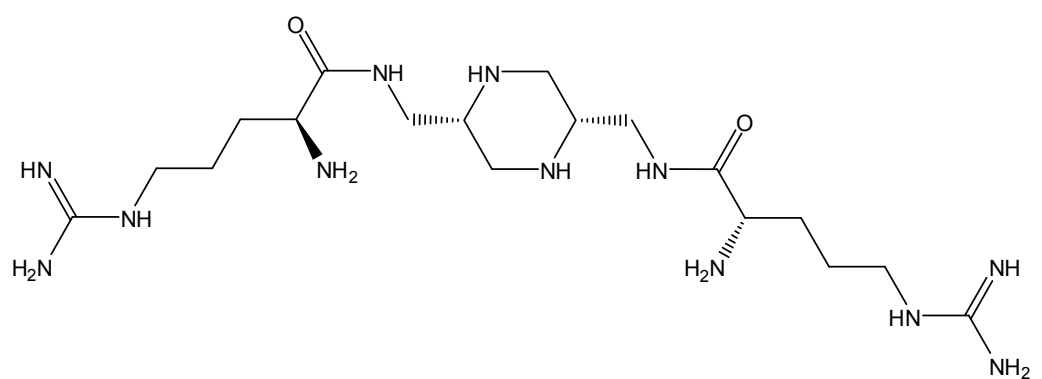
10

(VII)



15 En otra modalidad específica, el compuesto de fórmula VI es un estereoisómero tal como se ilustra en la fórmula VIII:

(VIII)



Los compuestos de la invención se pueden administrar en una composición farmacéutica como una solución acuosa como un bolo y/o infusión intravenosa, inyección subcutánea u oralmente. En la modalidad preferida, los compuestos se administran mediante inyección (intravenosa, intramuscular o subcutánea) en un portador tal como agua estéril destilada, solución salina, solución salina tamponada u otro excipiente farmacéuticamente aceptable para inyección. En algunas modalidades, el inhibidor se puede administrar oralmente, a una superficie mucosa (nasal, pulmonar, vaginal, rectal o bucal) o mediante un medicamento de liberación prolongada.

Los compuestos de la invención se pueden administrar en composición farmacéutica al paciente que necesita la reversión de la anticoagulación mediada por heparina, LMWH u otro inhibidor de trombina en una cantidad eficaz para restituir la coagulación y hemostasis normales. Las composiciones farmacéuticas incluyendo el compuesto de las invenciones son adecuadas para uso hospitalario o en la reversión en el hogar que no es de emergencia. Se administra al paciente que necesita revertir la anticoagulación mediada por heparina, LMWH u otro inhibidor de trombina en una cantidad eficaz para restituir la coagulación. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente también se pueden usar para reducir la actividad de los factores de crecimiento de unión a heparina y/o para revertir completamente o en parte una combinación de uno o más agentes anticoagulantes del Factor IIa y/o Factor Xa.

Por lo tanto, los compuestos de la invención se pueden usar en un método para revertir completa o parcialmente un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación. Los compuestos de la invención también se pueden usar como parte de un kit de diagnóstico, por ej., un kit de diagnóstico para determinar la concentración de un anticoagulante en la sangre.

Los ejemplos demuestran que DAP se unió directamente a rivaroxabán, apixabán, heparina no fraccionada, fondaparinux y LMWH, invirtiendo la actividad anticoagulante. DAP revirtió la anticoagulación *in vivo* de rivaroxabán oral y LMWH subcutánea, medida mediante aPTT y fondaparinux subcutánea como se midió mediante la actividad Xa en ratas. La reversión con DAP, confirmada mediante la reducción estadísticamente significativa de pérdida de sangre en el ensayo de corte transversal de cola de rata, se demostró para apixabán, dabigatrán, edoxabán y rivaroxabán. DAP revirtió por completo apixabán y rivaroxabán a una relación de masa de dosis de

alrededor de 10:1 DAP:anticoagulante en sangre humana *ex vivo* como se midió usando un kit anti-Xa. DAP exhibió una reversión dependiente de la dosis de apixabán y rivaroxabán en sangre humana *ex vivo*. La reversión de rivaroxabán en sangre humana completa recién extraída se confirmó mediante medidas de aPTT *ex vivo*. DAP no se unió a concentraciones de argatrobán de hasta 1:1000 *in vitro*. DAP revirtió al dabigatrán oral *in vivo* en ratas como se midió mediante aPTT. Las ratas a las que se les administró argatrobán permanecieron bajo efectos anticoagulantes luego de una dosis 200x IV de DAP, demostrando que DAP es seguro y que la interacción de reversión es específica para las heparinas y nuevos anticoagulantes orales. En resumen, los ejemplos demuestran la formación de complejos de DAP en heparina y LMWH y que DAP sirve como un excelente agente de reversión para heparina, compuestos similares a heparina y otros inhibidores de trombina incluyendo dabigatrán, heparinas de bajo peso molecular aprobadas, así como también rivaroxabán (XARELTO®), fondaparinux (ARIXTRA®), edoxabán (LIXIANA®) y apixabán (ELIQUIS®), como se analizó en los ensayos *in vitro* con sangre humana, análisis anti-Xa y aPTT y/o *in vivo* en un ensayo de corte transversal de cola de rata.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es una gráfica de flujo de calor con respecto a la temperatura como se midió mediante calorimetría diferencial de barrido (DCS, por sus siglas en inglés) en el que DAP se calienta de -20 °C a 200 °C ("1" o "primer calentamiento"), se enfría a -20 °C y se vuelve a calentar a 200 °C ("2" o "segundo calentamiento").

La **Figura 2** es una gráfica de DAP solo, UFH solo y combinación de DAP-UFH, como una función del porcentaje de volumen comparado con el tamaño (d.nm) como se midió mediante Diseminación de Luz Dinámica (DLS, por sus siglas en inglés).

La **Figura 3** es una gráfica de DAP solo, rivaroxabán solo y DAP-rivaroxabán en relaciones de 1:1 y 10:1, DAP:rivaroxabán, como una función del volumen (porcentaje) comparado con el tamaño (d.nm) como se midió mediante DLS.

La **Figura 4** es una gráfica de DAP solo, apixabán solo y unión de DAP-apixabán en relaciones de 1:1, 10:1 y 100:1, como una función del volumen (porcentaje) comparado con el tamaño (d.nm) como se midió mediante DLS.

La **Figura 5** es una gráfica de DAP solo, fondaparinux solo y unión de DAP-fondaparinux en relaciones de 1:1, 10:1 y 100:1, como una función del volumen (porcentaje) comparado con el tamaño (d.nm) como se midió mediante DLS.

5 La **Figura 6** es una gráfica de DAP solo, LMWH solo y unión de DAP-LMWH en relaciones de 1:1, 10:1 y 100:1, como una función del volumen (porcentaje) comparado con el tamaño (d.nm) como se midió mediante DLS.

10 La **Figura 7** es una gráfica de DAP solo, argatrobán solo y unión de DAP-argatrobán en relaciones de 1:1, 10:1, 100:1 y 1000:1, como una función del volumen (porcentaje) comparado con el tamaño (d.nm) como se midió mediante DLS.

15 La **Figura 8** es una gráfica de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT, segundos) medido sobre tiempo (horas) durante cinco horas luego de la administración subcutánea de 10 mg de bemiparina (LMWH) a una rata. A las cuatro horas del tratamiento, la rata recibió una dosis intravenosa de 200 mg/kg (100mg) de DAP.

20 La **Figura 9** es una gráfica de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT, segundos) medido sobre tiempo (horas) luego de la administración oral de PRADAXA® (dabigatrán) a una rata, seguida de administración intravenosa de 200 y 100 mg/kg (100mg y 50 mg) de DAP.

25 La **Figura 10** es una gráfica de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) medido sobre tiempo (horas) luego de la administración subcutánea de heparina sin fraccionar (UFH) a una rata, seguida de administración intravenosa de 200 mg/kg (100 mg) y 400 mg/kg (200 mg) de DAP.

30 La **Figura 11** es una gráfica de aPTT (segundos) medido sobre tiempo (horas) luego de la administración oral de 5mg/kg de rivaroxabán a una rata, seguida de administración intravenosa de 5 mg/kg (2 mg) de DAP.

35 La **Figura 12** es una gráfica de la concentración de fondaparinux activa ($\mu\text{g/mL}$) medida sobre tiempo (minutos luego de la reversión) luego de una administración subcutánea de 5 mg/kg de fondaparinux a una rata, seguida de administración intravenosa de 200 mg/kg de DAP (es decir, "reversión").

La **Figura 13** es una gráfica de aPTT (segundos) medido sobre tiempo (minutos luego de la reversión) luego de la administración oral de 15.5 mg/kg de PRADAXA® (dabigatrán) a una rata, seguida de administración intravenosa de 100 mg/kg de DAP (es decir, “reversión”).

5

La **Figura 14** es una gráfica del tiempo aPTT (segundos) para 0, 2, 10, 25, 50 y 100 mg de DAP administrado de forma intravenosa.

La **Figura 15** es una gráfica de sangre recolectada (es decir, pérdida de sangre acumulativa) durante 30 minutos en un ensayo de sangrado de corte transversal de cola de rata en ratas que recibieron 2 mg de rivaroxabán y 0 mg de DAP, 2 mg de rivaroxabán y 2.5 mg de DAP, 2 mg de rivaroxabán y 12.5 mg de DAP o dosis de reversión simulada y anticoagulante (“simulación”). Con grupos de tres ratas de la misma edad, 12.5 mg de DAP redujo la pérdida de sangre a niveles de dosis simulada proporcionando una diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.05$) en comparación con ratas que recibieron rivaroxabán solo.

La **Figura 16** es una gráfica de sangre recolectada (es decir, pérdida de sangre acumulativa) durante 30 minutos en un ensayo de sangrado de corte transversal de cola de rata en ratas que recibieron 1.25 mg de apixabán y 0 mg de DAP, 1.25 mg de apixabán y 5 mg de DAP, 1.25 mg de apixabán y 12.5 mg de DAP o dosis de reversión simulada y anticoagulante (“simulación”). Con grupos de tres ratas de la misma edad, 5 mg y 12.5 mg de DAP redujo la pérdida de sangre a niveles de dosis simulada proporcionando una diferencia estadísticamente significativa (** $p < 0.01$) en comparación con ratas que recibieron apixabán solo.

La **Figura 17** es una gráfica de sangre recolectada (es decir, pérdida de sangre acumulativa) durante 30 minutos en un ensayo de sangrado de corte transversal de cola de rata en ratas que recibieron 1.25 mg de edoxabán y 0 mg de DAP, 1.25 mg de edoxabán y 12.5 mg de DAP o dosis de reversión simulada y anticoagulante (“simulación”). Con grupos de tres ratas de la misma edad, 12.5 mg de DAP redujo la pérdida de sangre a niveles de dosis simulada proporcionando una diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0.05$) en comparación con ratas que recibieron edoxabán solo.

35

La **Figura 18** es una gráfica de sangre recolectada (es decir, pérdida de sangre acumulativa) durante 30 minutos en un ensayo de sangrado de corte transversal de cola de rata en ratas que recibieron 15 mg de dabigatrán etexilato y 0 mg de DAP, 15 mg de dabigatrán etexilato y 5 mg de DAP, 15 mg de dabigatrán etexilato y 12.5 mg de DAP o
 5 dosis de reversión simulada y anticoagulante ("simulación"). Con grupos de tres ratas de la misma edad, 12.5 mg de DAP redujo la pérdida de sangre a niveles de dosis simulada proporcionando una diferencia estadísticamente significativa (***) $p < 0.01$ en comparación con ratas que recibieron dabigatrán etexilato solo.

10 La **Figura 19** es una gráfica de aPTT (segundos) medida en sangre humana recién extraída tratada *ex vivo* con 50 microgramos/ml de DAP, 0.25 microgramos/ml de rivaroxabán, 50 microgramos/ml de DAP y 0.25 microgramos/ml de rivaroxabán o solución salina.

15 La **Figura 20** es una gráfica que muestra la concentración de anticoagulante eficaz medida mediante ensayo de actividad anti-factor Xa en plasma humano tratado *ex vivo* con 218 µg/L de rivaroxabán solo o en combinación con 1250 mg/L de DAP y 459 µg/L de rivaroxabán solo o en combinación con 6250 µg/L de DAP.

20 La **Figura 21** es una gráfica que muestra la concentración de anticoagulante eficaz medida mediante ensayo de actividad anti-factor Xa en plasma humano tratado *ex vivo* con 156 µg/L de apixabán solo o en combinación con 1,156 µg/L de DAP y 313 µg/L de apixabán solo o en combinación con 3125 µg/L de DAP.

25 La **Figura 22** es una gráfica que muestra la concentración de anticoagulante eficaz medida mediante ensayo de actividad anti-factor Xa en plasma humano tratado *ex vivo* con 218 µg/L de rivaroxabán solo o en combinación con cantidades en aumento (1.25, 12.5, 125 y 1250 µg/L) de DAP.

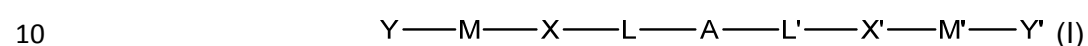
30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Agentes de reversión anticoagulante

35 Se describen agentes de reversión anticoagulante novedosos. Los compuestos de la invención incluyen compuestos que se describen en la presente, así como las sales farmacéuticamente aceptables de estos.

Se han desarrollado inhibidores de heparina, fragmentos de heparina, fondaparinux e inhibidores del factor Xa o factor IIa (por ej., inhibidores del factor IIa o factor Xa orales). La estructura general de los agentes de reversión anticoagulante de interés es: **R-Z-R'**, donde R y R' son agentes cargados positivamente a pH fisiológico y
 5 pueden ser las mismas moléculas o moléculas diferentes y Z es un compuesto de anillo hidrofóbico fusionado o cíclico.

Más específicamente, el inhibidor es un compuesto de la fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de este:



donde:

A es un anillo carbocíclico o heterocíclico, aromático o no aromático, sustituido o
 15 no sustituido o un resto lineal;

L y L' son iguales o diferentes y son enlaces;

X y X' son iguales o diferentes y están ausentes o son un grupo funcional que
 20 une el enlace L a M y el enlace L' a M', respectivamente;

M y M' son iguales o diferentes y están ausentes o son un enlace que une X a Y y X' a Y', respectivamente, y

25 Y e Y' son iguales o diferentes y son un resto que contiene uno o más átomos o grupos catiónicos o uno o más grupos que se vuelven catiónicos en condiciones fisiológicas.

Los compuestos pueden ser simétricos o asimétricos; es decir, uno o más de L, L', X, X', M, M', Y o Y' pueden ser iguales o diferentes. Los compuestos pueden ser
 30 quirales (es decir, contener uno o más centros quirales) o aquirales.

En algunas modalidades, A es un resto heterocíclico. En otras modalidades, A es un resto heterocíclico y L y L' son una cadena de alquileo sustituida o no sustituida.
 35 En aun otras modalidades, A es un resto heterocíclico, L y L' son una cadena de alquileo sustituida o no sustituida y X y X' son -NH-C(=O)-. En aun otras modalidades,

A es un resto heterocíclico, L y L' son una cadena de alquileo sustituida o no sustituida, X y X' son -NH-C(=O)- y M y M' son una cadena de alquileo sustituida. Tal como se usa en la presente, cadena de alquileo es un resto de alquileo divalente que tiene de C₁ a C₁₀, preferentemente de C₃ a C₆ de longitud, y que puede estar sustituido o no sustituido. Los ejemplos de sustituyentes incluyen alquilo, hidroxilo, hidroxilalquilo, amino, aminoalquilo, alcoxi, alquilalcoxi. Tal como se usa en la presente, el término alquilo es un hidrocarburo ramificado o de cadena recta de C₁ a C₁₀, preferentemente C₁-C₆. En aun otras modalidades, A es un resto heterocíclico, L y L' son una cadena de alquileo sustituida o no sustituida, X es -NH-C(=O)- , M y M' son una cadena de alquileo sustituida, e Y e Y' son un resto de guanidina.

En algunas modalidades, A es un anillo heterocíclico, no aromático, tal como piperazina o dicetopiperazina. En otras modalidades, A es un resto lineal, tal como una diamina lineal u otro resto lineal que contiene grupos funcionales reactivos que pueden formar un enlace con X y X', cuando están presentes, o Y e Y'. En algunas modalidades, los enlaces L y L' están unidos a los heteroátomos en el anillo A, tal como los dos átomos de nitrógeno en piperazina. En otras modalidades, el enlace L y L' está unido a átomos que no son heteroátomos en el anillo, como carbono. En modalidades particulares, A es un anillo de piperazina 1,4 o 2,5 disustituido. En algunas modalidades, L y L' y/o M y M' son cadenas de alquileo sustituidas o no sustituidas, tales como $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$, donde n es un entero de 1-10, preferentemente de 1-6, por ej., 1-3. En modalidades particulares, n es 3. En algunas modalidades, L y/o M están ausentes.

X y X' son un grupo funcional que une los enlaces L y L' a Y e Y'. Los ejemplos de grupos funcionales incluyen, de modo no taxativo, ésteres, amidas, carbonatos y cetonas. En modalidades particulares, X y X' son un grupo funcional que es resistente a la hidrólisis simple, tal como un grupo de amida.

Y e Y' son un resto que contiene uno o más átomos o grupos que son catiónicos o que serán catiónicos en condiciones fisiológicas. Los ejemplos incluyen restos de amina y guanidina así como restos que contienen fósforo, tales como restos de alquiltrifenilfosfonio, tetrafenilfosfonio, tetrafenilarsonio, tribencilamonio y fosfonio. Los restos catiónicos adicionales incluyen oligómeros y polímeros catiónicos, tales como oligo- o polilisina, oligo- o poliarginina, polietilenimina N-alquilada y similares. Otros restos catiónicos incluyen cationes lipofílicos deslocalizados que contienen una a tres

unidades de carbimino, sulfinimo o fosfinimino tal como se describen en Kolomeitsev *et ál.*, *Tet. Let.*, tomo 44, N.º 33, 5795-5798 (2003).

En algunas modalidades, el compuesto es un derivado de piperazina, donde las cadenas laterales de aminoácidos contienen uno o más átomos cargados positivamente o átomos que estarán cargados positivamente en condiciones fisiológicas. Los ejemplos incluyen piperazina diarginina. La arginina puede ser sustituida por otros aminoácidos que están cargados positivamente o estarán cargados positivamente en condiciones.

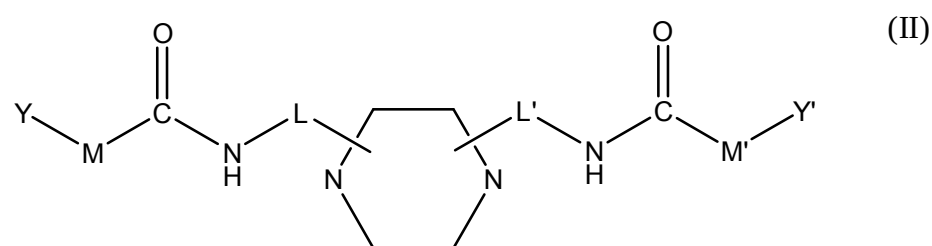
“Aromático”, tal como se usa en la presente, hace referencia a sistemas de anillos heterocíclicos, aromáticos fusionados, heterocíclicos fusionados, biaromáticos o biheterocíclicos de 5 a 12 miembros, preferentemente aromático de 5, 6 y 7 miembros, opcionalmente sustituidos. Definido ampliamente, “Ar”, tal como se usa en la presente, incluye grupos aromáticos de anillo simple de 5, 6 y 7 miembros que pueden incluir entre cero y cuatro heteroátomos, por ejemplo, benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina y similares. También se puede hacer referencia a aquellos grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo como “heterociclos arilo” o “heteroaromáticos”. El anillo aromático se puede sustituir en una o más posiciones del anillo con dichos sustituyentes, tal como se describe anteriormente, por ejemplo, halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, restos aromáticos o heteroaromáticos, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ o similares. El término “Ar” también incluye sistemas de anillo policíclicos con dos o más anillos cíclicos donde dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos (es decir, “anillos fusionados”) donde al menos uno de los anillos es aromático, por ej., el o los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos y/o heterociclos. Los ejemplos de anillo heterocíclico incluyen, de modo no taxativo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, bencisoxazolilo, bencisotiazolilo, bencimidazolinilo, carbazolilo, 4aH carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3 b]tetrahydrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizínilo, indolilo, 3H-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilendioxifenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo,

oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxindolilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, 5 pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizínilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, 10 tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo y xantenilo.

"Heterociclo" o "heterocíclico", tal como se usa en la presente, se refiere a un radical cíclico unido mediante un nitrógeno o carbono de anillo de un anillo monocíclico o bicíclico que contiene de 3 a 10 átomos del anillo y preferentemente de 5 a 6 átomos del anillo, que consiste en carbono y uno a cuatro heteroátomos, cada uno de los cuales se 15 selecciona del grupo que consiste en oxígeno no peróxido, azufre y N(R) donde R está ausente o es H, O, alquilo(C₁₋₄), fenilo o bencilo y que opcionalmente contiene de 1 a 3 dobles enlaces y que está opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes. Los ejemplos de anillo heterocíclico incluyen, de modo no taxativo, bencimidazolilo, 20 benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, bencisoxazolilo, bencisotiazolilo, bencimidazolinilo, carbazolilo, 4aH-carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-b]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, 25 indolinilo, indolizínilo, indolilo, 3H-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilendioxfenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxindolilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, 30 fenoxatinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizínilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, 35 tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo,

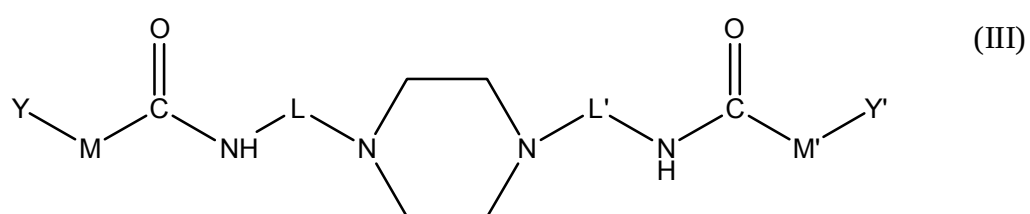
1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo y xantenilo.

En otra modalidad de la invención, el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable de este:



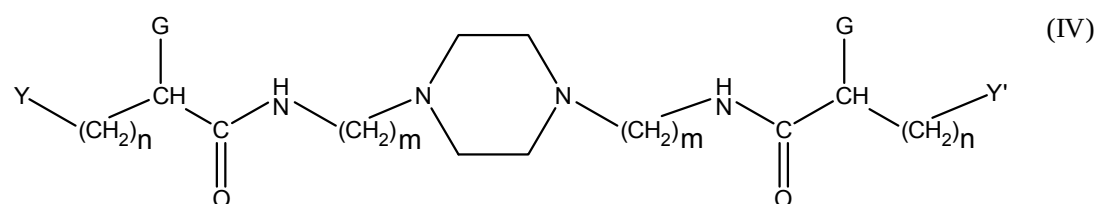
donde cada uno de L, L', M, M', Y e Y' son como se describe anteriormente.

En otra modalidad de la invención, el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula III o una sal farmacéuticamente aceptable de este:



donde L, L', M, M', Y e Y' son como se describe anteriormente.

En aun otra modalidad de la invención, el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

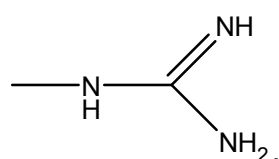


donde Y e Y' son como se describe anteriormente y n es de 3 a 5, m es de 3 a 6 y G se selecciona de -NH₂ y OH. Más preferentemente, G es amino.

En aun otra modalidad de la invención, el inhibidor es un compuesto representado por cualquiera de las fórmulas II, III o IV; Y e Y' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en

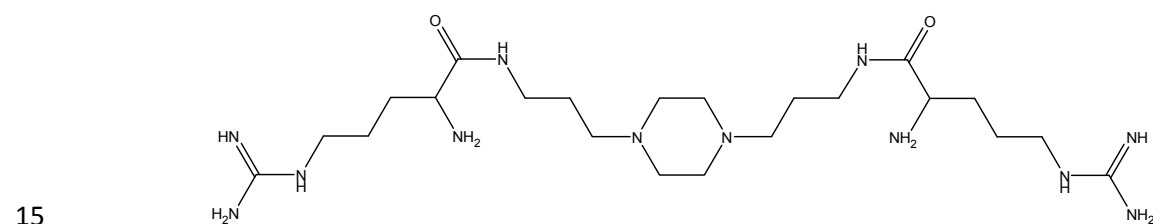


Más preferentemente, G es -NH_2 e Y e Y' son



10 Por lo tanto, en una modalidad, el compuesto de la invención es piperazina diarginina ("DAP"), tal como el compuesto de fórmula V o un compuesto relacionado de fórmula VI o sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos compuestos:

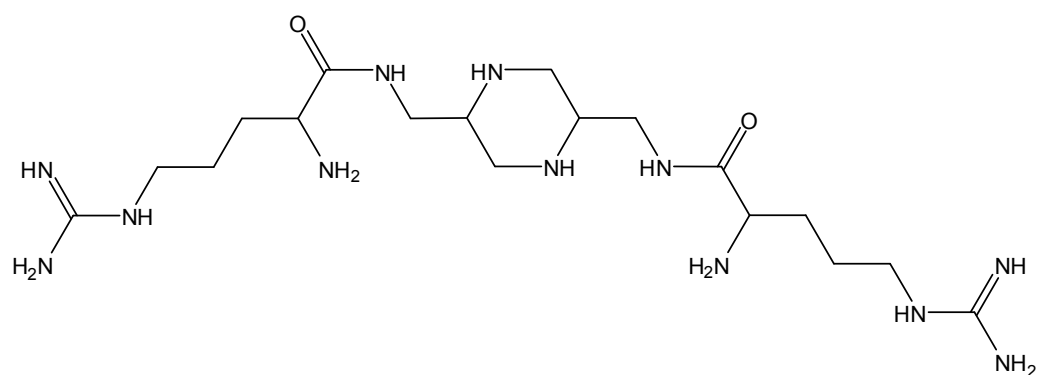
(V)



(3-{4-[3-(2-amino-5-guanidino-pentanoilamino)-propil]-piperazin-1-il}-propil)-amida del ácido 2-amino-5-guanidino-pentanoico; o

20

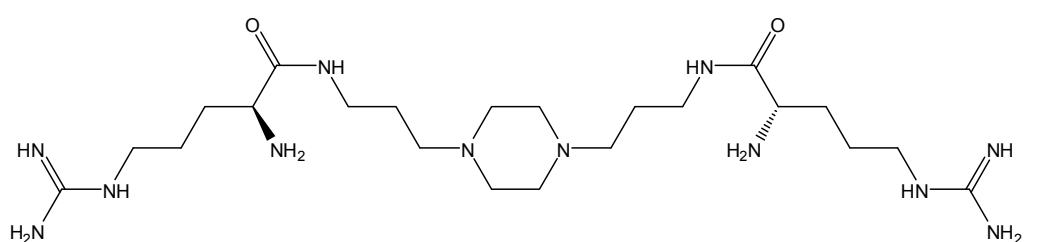
(VI)



{5-[(2-amino-5-guanidino-pentanoilamino)-metil]-piperazin-2-ilmetil}-amida del ácido 2-amino-5-guanidino-pentanoico.

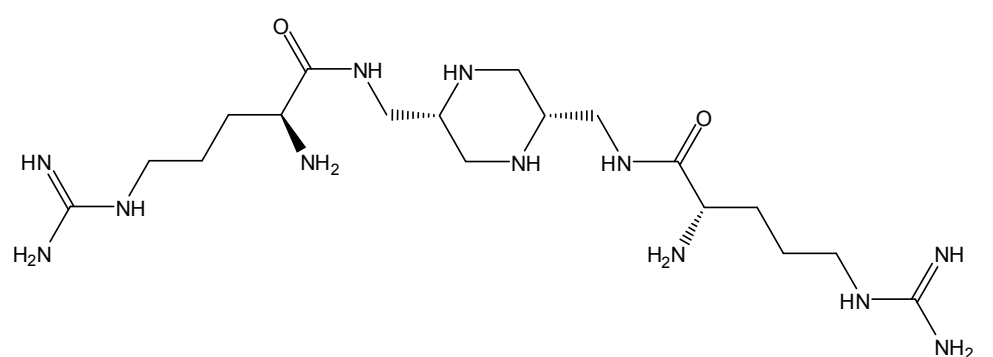
En una modalidad específica, el compuesto de fórmula V es un estereoisómero tal como se ilustra en la fórmula VII:

10 (VII)



En otra modalidad específica, el compuesto de fórmula VI es un estereoisómero tal como se ilustra en la fórmula VIII:

15 (VIII)



La frase "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto, tal como se usa en la presente, significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que

posee la actividad farmacológica deseada del compuesto principal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de grupos ácidos o básicos presentes en compuestos de la invención. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, sales de clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 5 nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Las sales básicas adecuadas incluyen, de 10 modo no taxativo, sales de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, cinc y dietanolamina.

El compuesto de la invención inhibe la actividad de los inhibidores de coagulación. Un mecanismo propuesto de acción del compuesto de la invención es 15 mediante la unión de moléculas cargadas negativamente (por ej., fondaparinux, heparina no fraccionada, LMWH, descritos en la presente). Otros inhibidores de la coagulación (por ej., inhibidores del factor IIa y factor Xa tales como dabigatrán, apixabán, edoxabán y rivaroxabán, descritos en la presente) también poseen cargas negativas; por lo tanto, el compuesto de la invención puede inhibir estos inhibidores de coagulación mediante la 20 neutralización de sus restos cargados negativamente.

Otro mecanismo propuesto de acción del compuesto de la invención es mediante interacciones físicas débiles tales como enlace por puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con los inhibidores de la coagulación. Los inhibidores del 25 factor IIa y Xa oral poseen porciones hidrofóbicas, que pueden ocasionar la asociación hidrofóbica con el compuesto de la invención, por ej., DAP.

Por lo tanto, en algunas modalidades, los compuestos de la invención contienen al menos un resto hidrofóbico cíclico, por ej., uno o una combinación de anillos alifáticos 30 o aromáticos incluyendo anillos fusionados. En otras modalidades, los compuestos de la invención contienen al menos un resto hidrofóbico cíclico y al menos dos restos cargados positivamente o cargados parcialmente a pH fisiológico.

En algunas modalidades de la invención, una o ambas argininas de los 35 compuestos de Fórmulas V y VI (o los compuestos de Fórmulas VII y VIII) están sustituidas por uno o más aminoácidos cargados positivamente, sus derivados o

compuestos cargados de manera similar, por ej., lisina, histidina, ornitina. Las argininas en los compuestos de Fórmulas V y VI o las argininas sustituidas por los aminoácidos cargados positivamente pueden ser aminoácidos de origen natural (es decir, L-aminoácidos), sus enantiómeros (es decir, D-aminoácidos) o mezclas racémicas o de otro tipo de estos. "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles una de la otra.

Las convenciones y definiciones estereoquímicas utilizadas en la presente siguen en general a S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano de la luz polarizada por el plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S se utilizan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro quiral o sus centros quirales. Los prefijos D y L o (+) y (-) se utilizan para designar el signo de rotación de luz polarizada por el plano por el compuesto, donde (-) o L significan que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o D es dexógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, con la excepción de que son imágenes especulares el uno del otro. También se puede hacer referencia a un estereoisómero específico como un enantiómero, y una mezcla de tales isómeros a menudo se denomina mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o un racemato, que puede ocurrir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" hacen referencia a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, sin actividad óptica.

En otras modalidades de la invención, el compuesto de la invención contiene al menos un resto hidrofóbico cíclico, por ej., uno o una combinación de anillos alifáticos y aromáticos incluyendo anillos fusionados. Los compuestos de interés contienen al menos un resto hidrofóbico cíclico y al menos dos restos cargados positivamente o cargados parcialmente a pH fisiológico.

Se debería dar consideración especial al diseño de los agentes terapéuticos basados en péptido, debido a que tales agentes pueden causar reacciones inmunológicas indeseadas y generalmente graves una vez que se administran a un

sujeto. El compuesto de la invención se diseña para tener un peso molecular suficientemente bajo para minimizar los problemas de inmunogenicidad. En una modalidad, para evitar la activación de la respuesta inmunitaria, el compuesto se diseña de forma tal que su peso molecular sea menor que alrededor de 5000 daltons, tal como

5 menor que o alrededor de 1000 daltons, por ej., alrededor de 500 daltons. En una modalidad, el peso molecular del compuesto es de alrededor de 512 daltons.

Es preferible que los compuestos de la invención no se unan, o de otro modo interfieran con la función del ERG, un canal de ion de potasio que contribuye con la

10 conductividad eléctrica del corazón. La inhibición de este canal de potasio puede conducir al síndrome del QT largo potencialmente fatal y algunos fármacos candidatos exitosos de otra manera han exhibido unión a ERG humano.

Además, es preferible que el compuesto de la invención no inhiba o sirva como

15 sustratos para enzimas citocromo p450 (CYP) unidas a la membrana. CYP son las principales enzimas que participan en el metabolismo de fármacos y modulación de la actividad de CYP puede interferir con la depuración y metabolismo de otros fármacos administrados a un sujeto, ocasionando interacciones de fármaco no deseadas.

También preferentemente, los compuestos de la invención no exhiben unión a proteína plasmática significativa *in vitro* (por ejemplo, unión a albúmina). Debido a que los compuestos de la invención están ampliamente no unidos a proteínas plasmáticas, exhiben semividas de corta actividad minimizando el riesgo de sobredosis basada en la

20 acumulación.

25

II. Síntesis de los agentes de reversión anticoagulante

Los compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables descritos en la presente se preparan mediante el uso de una variedad de métodos comenzando por

30 compuestos comercialmente disponibles, compuestos conocidos o compuestos preparados mediante métodos conocidos. Vías sintéticas de ejemplo de uno de los compuestos descritos en la presente (Compuesto de Fórmula V, piperazina diarginina, "DAP") se incluyen en los esquemas a continuación. Los esquemas a continuación también se aplican al compuesto de estereoisómero DAP de Fórmula VII mediante la

35 selección de los compuestos de partida estereoisoméricos adecuados. Otros compuestos de la invención pueden sintetizarse siguiendo un esquema sintético similar.

Los expertos en la técnica entenderán que el orden de los pasos mostrados en la presente puede cambiarse para conservar la funcionalidad en la molécula diana. Los expertos en la técnica también entenderán que para la síntesis pueden ser necesarios varios pasos de protección y desprotección. La necesidad de protección y desprotección, y la selección de grupos protectores adecuados se encuentran, por ejemplo, en Greene y Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, segunda edición, John Wiley & Sons (1991), que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

En algunas modalidades de la presente invención, el grupo protector es un grupo butiloxycarbonilo terciario (Boc). En otras modalidades de la presente invención, el grupo protector es grupo 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf). En otra modalidad, el grupo protector de aminoácidos puede ser, de modo no taxativo, 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo (PMC).

Los grupos protectores se pueden retirar por una variedad de vías. La eliminación del grupo protector comprende, por ej., tratar un compuesto protegido con ácido trifluoroacético (TFA), HCl acuoso o calentar en ácido acético. Debido a que la eliminación de los grupos protectores, por ej., la eliminación de los grupos protectores en condiciones ácidas, puede dar como resultado la producción de especies catiónicas que pueden alquilar los grupos funcionales en la cadena de péptido, se pueden agregar depuradores durante el paso de desprotección para reaccionar con cualquiera de las especies reactivas libres. Los ejemplos de depuradores incluyen, de modo no taxativo, derivados de anisol y derivados de tiol. Por lo tanto, en una modalidad, la eliminación de los grupos protectores comprende tratar un compuesto protegido con TFA y un depurador (por ej., TFA y agua).

Se pueden usar varios solventes, por ej., solventes orgánicos, en los pasos de la síntesis. Los solventes adecuados incluyen, de modo no taxativo, sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano, metanol, etanol, cloruro de metileno, tolueno y acetona. En algunas modalidades, el solvente es DMF.

Se pueden usar agentes de unión de ácido adecuado en los pasos de la síntesis. Estos incluyen, de modo no taxativo, bases orgánicas, tales como, por ejemplo, piridina, trietilamina, trietanolamina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) y diisopropiletilamina (DIEA); y bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidruro de

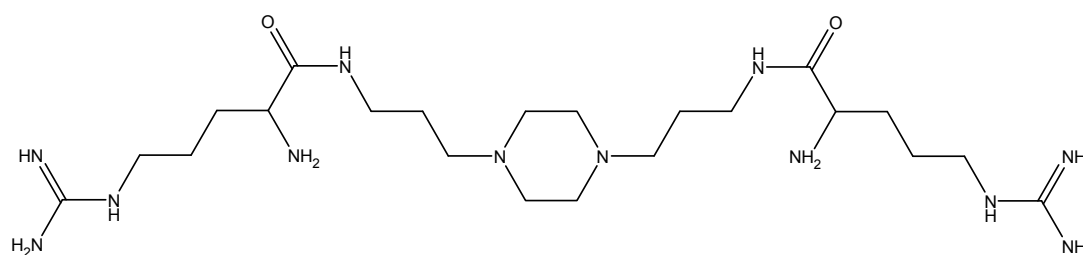
sodio, carbonato de potasio y carbonatos de sodio. En algunas modalidades, el agente de unión ácido es DIEA.

La síntesis puede incluir reactivos de acoplamiento a péptidos. Los reactivos de acoplamiento a péptidos pueden incluir, de modo no taxativo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), carbonildiimidazol (CDI), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), éster de N-hidroxisuccinamida (OSu) activa, O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato (HBTU) y combinaciones de estos. En una modalidad, el reactivo de acoplamiento al péptido es HBTU. En otra modalidad, el reactivo de acoplamiento al péptido es EDC/HOBt. En aun otra modalidad, el reactivo de acoplamiento al péptido es un éster de OSu activo.

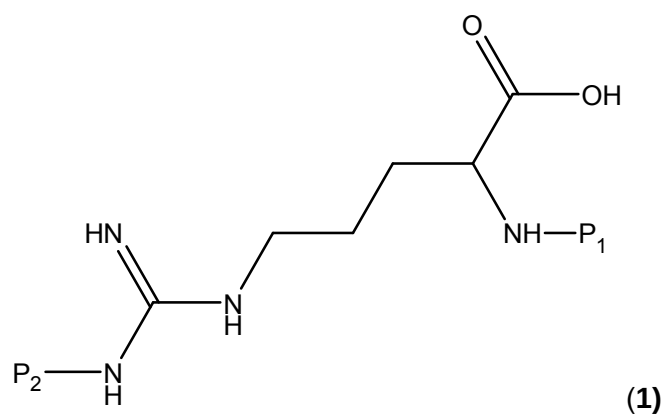
Además, la síntesis puede incluir un paso donde el producto bruto se purifica, por ej., mediante cromatografía en columna. Los productos deseados de cada paso o serie de pasos se pueden separar y/o purificar al grado deseado de homogeneidad por métodos conocidos en la técnica. Típicamente, tales separaciones implican extracción multifase, cristalización a partir de un solvente o mezcla de solventes, destilación, sublimación o cromatografía. La cromatografía puede implicar cualquier cantidad de métodos incluyendo, por ejemplo: métodos y aparatos de cromatografía de fase inversa y fase normal; de exclusión de tamaño; de intercambio de iones; líquida a presión alta, media y baja; cromatografía analítica de pequeña escala; de lecho móvil simulado ("SMB", por sus siglas en inglés) y preparativa de capa fina o gruesa, así como técnicas de cromatografía ultrarrápida y de capa fina de pequeña escala.

En un esquema, el compuesto de Fórmula V (DAP)

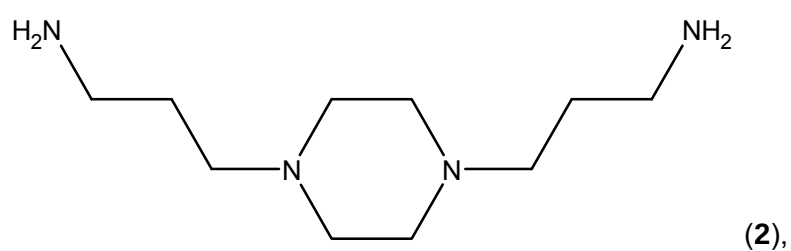
(V)



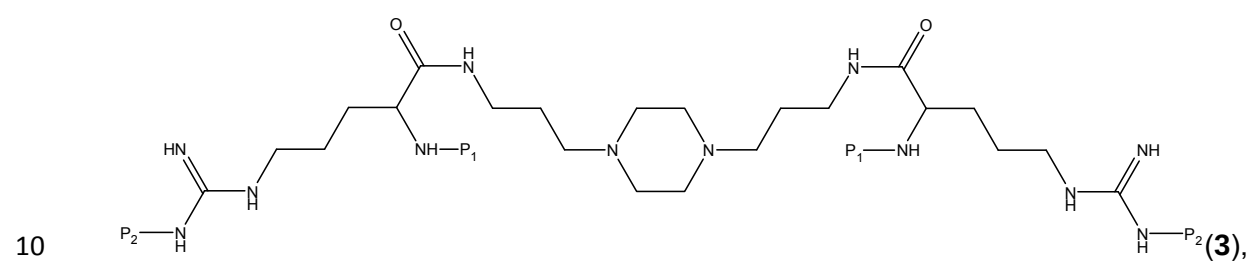
se sintetiza mediante la reacción de equivalentes en exceso (por ej., al menos alrededor de dos equivalentes) del compuesto **1**



con un equivalente del compuesto **2**



en presencia de un reactivo de acoplamiento al péptido, para obtener un compuesto **3**



donde P1 es un grupo protector y P2 es un grupo protector o es un hidrógeno.

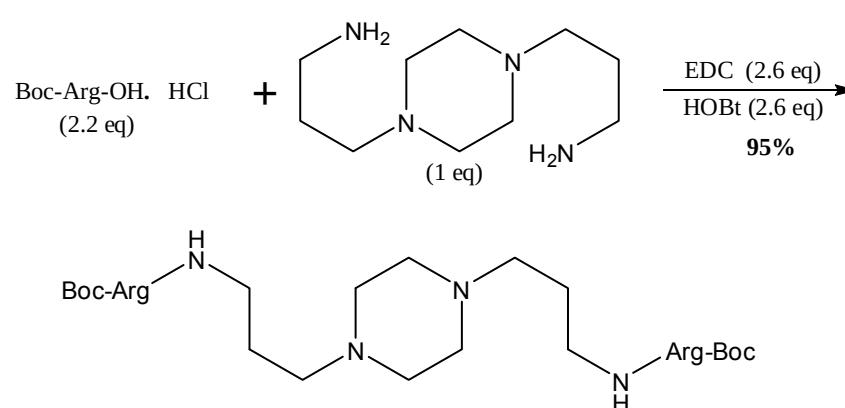
En una modalidad, el reactivo de acoplamiento al péptido es HBTU, EDC/HOBt o un éster de OSu activo. En una modalidad, el grupo protector P1 es Boc. En otra modalidad, el grupo protector P2 es Pbf. En una modalidad diferente, el grupo protector P1 es Boc y P2 es un hidrógeno.

Posteriormente, **3** puede estar purificado. Esta purificación puede implicar varios métodos de cromatografía en columna conocidos en la técnica.

Los grupos protectores de **3** pueden retirarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica para obtener el compuesto de Fórmula V. La desprotección puede lograrse mediante, por ej., la eliminación de los grupos protectores usando ácido trifluoroacético (TFA) y agua, TFA y agua u otro depurador, incluyendo, de modo no taxativo, HCl acuoso o calentamiento en ácido acético.

El compuesto puede purificarse adicionalmente usando un método de cromatografía en columna, tal como cromatografía de intercambio de iones con amortiguadores salinos o HPLC preparativa con ácido trifluoroacético o ácido acético como amortiguador.

En un esquema más específico, el acoplamiento involucra hacer reaccionar al compuesto **1**, donde P1 era Boc y P2 era un hidrógeno (ilustrado como Boc-Arg-OH·HCl a continuación), con el compuesto **2** como se ilustra a continuación:



El producto bruto resultante fue de más del 95 % puro mediante cromatografía de capa fina (TLC).

Posteriormente, el paso de desprotección se llevó a cabo como se ilustra a continuación:

5

10

15

25

Las composiciones farmacéuticas adecuadas, por ej., composiciones para administración oral, se pueden preparar como se describe en las referencias tales como "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman et. ál. (Nueva York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington – The science and practice of pharmacy", 20ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, y "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6ª Edición, Ansel et. ál., (Media, PA: Williams y Wilkins, 1995), que se incorporan en la presente mediante esta referencia, que proporcionan información sobre portadores, materiales (por ej., materiales de recubrimiento), equipos y proceso para preparar comprimidos y cápsulas y formas de dosificación de liberación retrasada de comprimidos, cápsulas y gránulos.

Los ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen, de modo no taxativo, polímeros de celulosa tales como acetato-ftalato de celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa; acetato-ftalato de polivinilo, polímeros y copolímeros de ácido acrílico y resinas metacrílicas que están comercialmente disponibles con el nombre comercial Eudragit® (Roth Pharma, Westerstadt, Alemania), Zein, goma laca y polisacáridos. Además, el material de recubrimiento puede contener portadores convencionales tales como plastificantes, pigmentos, colorantes, deslizantes, agentes de estabilización, formadores de poro y tensioactivos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales presentes en los comprimidos, perlas, gránulos o partículas que contienen fármaco incluyen, de modo no taxativo, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, colorantes, estabilizantes y tensioactivos.

Los diluyentes, también denominados "rellenos", son típicamente necesarios para aumentar el volumen de una forma de dosificación sólida de forma tal que el tamaño de partículas se proporcione para realizar comprimidos o formar perlas y gránulos. Los diluyentes adecuados incluyen, de modo no taxativo, dihidrato de fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, lactosa, sucrosa, manitol, sorbitol, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, cloruro de sodio, almidón seco, almidones hidrolizados, almidón pregelatinizado, dióxido de silicona, óxido de titanio, silicato de aluminio y magnesio y azúcar en polvo.

Se usan aglutinantes para otorgar calidades unidas a una formulación de dosificación sólida y por lo tanto asegurar que un comprimido o perla o gránulo

permanezca intacto luego de la formación de las formas de dosificación. Los materiales aglutinantes adecuados incluyen, de modo no taxativo, almidón, almidón pregelatinizado, gelatina, azúcares (incluyendo sucrosa, glucosa, dextrosa, lactosa y sorbitol), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto, alginato de sodio, celulosa, incluyendo hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa y veegum y polímeros sintéticos tales como copolímeros de ácido acrílico y de ácido metacrílico, copolímeros de ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de aminoalquilo, ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico y polivinilpirrolidona.

10

Se usan lubricantes para facilitar la fabricación de comprimidos. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen, de modo no taxativo, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, behenato de glicerol, polietilenglicol, talco y aceite mineral.

15

Los desintegrantes se usan para facilitar la desintegración de la forma de dosificación luego de la administración y generalmente incluyen, de modo no taxativo, almidón, glicolato sódico de almidón, carboximetilalmidón sódico, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, almidón pregelatinizado, arcillas, celulosa, alginina, gomas o polímeros reticulados, tales como PVP reticulado (Polyplasdone XL de GAF Chemical Corp).

20

Los estabilizadores se utilizan para inhibir o retardar las reacciones de descomposición del fármaco que incluyen, a modo de ejemplo, reacciones oxidativas.

25

Los tensioactivos pueden ser agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos, anfotéricos o no iónicos. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, de modo no taxativo, aquellos que contienen iones de carboxilato, sulfonato y sulfato. Ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen sodio, potasio, amonio de sulfonatos de alquilo de cadena larga y sulfonatos de alquilarilos tales como sulfonato de dodecilbenceno sódico; dialquil sulfosuccinatos de sodio, tales como sulfonato de dodecilbenceno sódico; dialquil sulfosuccinatos de sodio, tales como bis-(2-etiltioxil)-sulfosuccinatos de sodio; y sulfatos de alquilo tal como laurilsulfato de sodio. Los tensioactivos catiónicos incluyen, de modo no taxativo, compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, bromuro de cetrimonio, cloruro de estearil dimetilbencil amonio, polioxietileno y amina de coco. Ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen monoestearato de etilenglicol, miristato de propilenglicol, monostearato de glicerilo,

30

35

estearato de glicerilo, poligliceril-4-oleato, acilato de sorbitán, acilato de sacarosa, laurato PEG-150, monolaurato PEG-400, monolaurato de polioxietileno, polisorbatos, octilfenil éter de polioxietileno, cetil éter PEG-1000, tridecil éter de polioxietileno, butil éter de polipropilenglicol, Poloxamer® 401, estearoil monoisopropanolamida y polioxietileno de amida de sebo hidrogenada. Ejemplos de tensioactivos anfotéricos incluyen N-dodecil-
 5 .beta.-alanina de sodio, N-lauril-.beta.-iminodipropionato de sodio, miristoamfoacetato, betaína lauril y sulfobetaína lauril.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden diseñarse para
 10 proporcionar una liberación retardada, sostenida, pulsátil u otra forma modificada.

Si se desea, los comprimidos, perlas, gránulos o partículas también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, tintes, agente amortiguadores del pH y conservantes.

15 Las formulaciones bioadhesivas también pueden utilizarse para mejorar la absorción o modificar la liberación. Dichas formulaciones son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N° 20060045865 de Jacob, incorporada a la presente mediante esta referencia.

20 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para su administración nasal o pulmonar también pueden ser útiles. Los aerosoles para la administración de agentes terapéuticos en el tracto respiratorio han sido descritos, por ejemplo, Adjei, A. and Garren, J. *Pharm. Res.*, 7: 565-569 (1990); y Zanen, P. y Lamm, J.-W.J. *Int. J. Pharm.*, 114: 111-
 25 115 (1995). El tracto respiratorio comprende las vías respiratorias superiores, incluyendo la orofaringe y la laringe, seguida de las respiratorias inferiores, que incluyen la tráquea seguida de las bifurcaciones hacia los bronquios y bronquiolos. Las vías respiratorias superiores e inferiores se denominan vías respiratorias de conducción. Los bronquiolos terminales luego se dividen en bronquiolos respiratorios que luego conducen a la zona
 30 respiratoria final, los alvéolos o pulmón profundo. Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," en *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313 (1990). El pulmón profundo o los alvéolos es la principal diana de los aerosoles terapéuticos inhalados para la administración sistémica del fármaco.

35

Los fármacos administrados por inhalación pueden presentarse como formulaciones de aerosol líquido.

5 Para las composiciones inyectables (por ej., composiciones intravenosas), el portador es agua estéril destilada, solución salina, solución salina amortiguada u otro excipiente farmacéuticamente aceptable para inyección. Los aditivos pueden incluir conservantes y ácidos o base para ajustar el pH, para alterar la solubilidad o absorción.

10 En una modalidad, donde la composición farmacéutica comprende el compuesto DAP de fórmula V (o su estereoisómero de fórmula VII) y la composición se adaptan para la administración parenteral en una inyección, el compuesto se disuelve en agua con modificadores de la tonicidad y molalidad adecuados (tal como solución salina amortiguada con fosfato). DAP es soluble en agua a más de 100 mg/ml. En una modalidad, DAP se adapta como una solución estéril para administración IV. En un
15 aspecto, la molalidad de la composición farmacéutica en la que se adapta DAP para la administración IV se ajusta a 290 mOsm/L con cloruro de sodio y el pH se ajusta a 7.4 con hidróxido de sodio. Preferentemente, la composición farmacéutica se administra como un bolo intravenoso mediante empuje lento.

20 **IV. Métodos de uso**

La presente invención proporciona un método para revertir total o parcialmente un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación que comprende administrarle a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la
25 invención (por ejemplo, un compuesto de la fórmula I, II, III, IV, V, VI, VII o VIII) o una sal farmacéuticamente aceptable de este. La presente invención también proporciona un método para promover la coagulación en un sujeto que lo necesita, donde el sujeto recibe un inhibidor de la coagulación, que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente
30 aceptable de este. Además, la presente invención proporciona un método para neutralizar o inhibir un inhibidor de la coagulación que comprenden administrarle a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

35 En la presente invención, el inhibidor de la coagulación (también denominado anticoagulante en la presente) es una molécula que inhibe el proceso de la coagulación.

Los inhibidores de la coagulación incluyen, de modo no taxativo, activadores de antitrombina (por ejemplo, heparina sin fraccionar y LMWH), inhibidores del factor IIa e inhibidores del factor Xa.

5 *Heparina:* La heparina es un mucopolisacárido de origen natural que actúa en el cuerpo como un co-factor antitrombina para prevenir la coagulación intravascular. La sustancia se produce por basófilos y mastocitos, los cuales se encuentran en grandes cantidades en el tejido conjuntivo que rodea los capilares, particularmente en los pulmones e hígado. En forma de sal de sodio, la heparina se utiliza terapéuticamente
10 como un anticoagulante.

Heparina de bajo peso molecular: La heparina de bajo peso molecular (LMWH) se fabrica a partir de heparina utilizando diversos métodos de despolimerización, incluyendo despolimerización oxidativa con peróxido de hidrógeno, utilizado en la
15 fabricación de ardeparina (NORMIFLO®); escisión desaminativa con nitrito de isoamilo, utilizada en la fabricación de certoparina (SANDOPARIN®); escisión eliminadora de alcalina beta del éster bencílico de heparina, utilizada en la fabricación de enoxaparina (LOVENOX® y CLEXANE®); despolimerización oxidativa con Cu^{2+} y peróxido de hidrógeno, utilizada en la fabricación de parnaparina (FLUXUM®); escisión eliminadora de
20 beta mediante la enzima heparinasa, utilizada en la fabricación de tinzaparina (INNOHEP® y LOGIPARIN®); escisión desaminativa con ácido nitroso, utilizada en la fabricación de dalteparina (FRAGMIN®), reviparina (CLIVARIN®) y nadroparina (FRAXIPARIN®), que dan como resultado la formación de un residuo de anhidromanosa no natural en la terminal reductora de los oligosacáridos producidos. Esto puede
25 convertirse posteriormente en anhidromanitol utilizando un agente reductor adecuado. Tanto la eliminación de beta enzimática como química da como resultado la formación de un residuo de uronato no saturado no natural (UA) en la terminal no reductora.

 En la Tabla 1 se presenta un resumen de actividades anticoagulantes de diversas
30 LMWH.

Tabla 1: Datos de peso molecular (MW) y actividades anticoagulantes de productos de LMWH actualmente disponibles.

LMWH	Peso molecular promedio	Relación de actividad anti-Xa/anti-IIa
BEMIPARINA	3600	9.7
CERTOPARINA	5400	2.4
DALTEPARINA	6000	2.5
ENOXAPARINA	4500	3.9
NADROPARINA	4300	3.3
PARNAPARINA	5000	2.3
REVIPARINA	4400	4.2
TINZAPARINA	6500	1.6

Adaptado de Gray E. et ál., *Thromb Haemost*, 99: 807-818 (2008).

5

Clínicamente, la LMWH (peso molecular promedio de alrededor de 4.5 kDa) difiere de la heparina (es decir, "heparina sin fraccionar"; peso molecular promedio de alrededor de 15 kDa) en una diversidad de formas: (a) La LMWH requiere dosificación subcutánea menos frecuente para la profilaxis posoperatoria de tromboembolismo venoso; (2) la LMWH requiere una inyección subcutánea una o dos veces al día en pacientes tratados por un tromboembolismo venoso y angina inestable en vez de la infusión intravenosa requerida con la heparina; (3) la LMWH no requiere monitoreo del parámetro de coagulación aPTT; (4) la LMWH representa un menor riesgo de hemorragia; (5) el uso a largo plazo de LMWH representa un menor riesgo de osteoporosis; y (6) la LMWH representa un menor riesgo de trombocitopenia inducida por heparina (un efecto secundario potencial de la administración de heparina). Sin embargo, los efectos anticoagulantes de la heparina generalmente son reversibles con sulfato de protamina, mientras que el efecto de la protamina en la LMWH es limitado. Además, la LMWH tiene un efecto menor en la actividad de la trombina (Factor IIa) en comparación con la heparina, mientras que tanto la LMWH como la heparina tienen efectos similares en la actividad del Factor Xa.

Trombina y otros inhibidores del Factor IIa o Xa: Ejemplos de trombina (Factor IIa) e inhibidores del factor Xa incluyen anticoagulantes tales como dabigatrán (PRADAXA®), rivaroxabán (XARELTO®), apixabán (ELIQUIS®), edoxabán (LIXIANA®), fondaparinux (ARIXTRA®) y argatroban (ARGATROBAN®).

5

El nombre químico del anticoagulante oral PRADAXA®, dabigatrán etexilato mesilato, un inhibidor directo de trombina, es β -Alanina, metanosulfonato del éster etílico de N-[[2-[[[4-[[[(hexiloxi)carbonil]amino]iminometil]fenil]amino]metil]-1-metil-1H-benzimidazol-5-il]carbonil]-N-2-piridinilo. Dabigatrán y sus acil glucurónidos son inhibidores de trombina directos, competitivos. Debido a que la trombina (Factor IIa, proteasa serina) permite la conversión de fibrinógeno en fibrina durante la cascada de coagulación, su inhibición previene el desarrollo de un trombo.

Rivaroxabán, un inhibidor del factor Xa, es el ingrediente activo en XARELTO®, y tiene el nombre químico 5-Cloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinil)fenil]-1,3-oxazolidin-5-il)metil)-2-tiofencarboxamida. Rivaroxabán es un enantiómero (S) puro. XARELTO® es un inhibidor del factor Xa biodisponible oralmente que bloquea de manera selectiva el sitio activo del factor Xa y no requiere un co-factor (tal como Anti-trombina III) para su actividad.

20

Apixabán o ELIQUIS® es 1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-4,5-dihidropirazolo[5,4-c]piridin-3-carboxamida. Es un inhibidor del factor Xa directo administrado oralmente aprobado en Europa y actualmente en pruebas clínicas de fase III en los Estados Unidos para la prevención del tromboembolismo venoso.

25

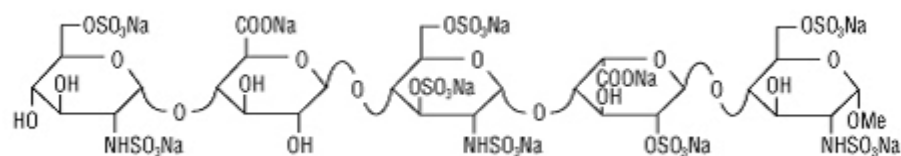
Edoxabán o LIXIANA® es N'-(5-cloropiridin-2-il)-N-[(1S,2R,4S)-4-(dimetilcarbamoil)-2-[(5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3]tiazolo[5,4-c]piridin-2-carbonil)amino]ciclohexil]oxamida. Edoxobán es un inhibidor del factor Xa directo y ha sido aprobado en Japón para su uso en la prevención del tromboembolismo venoso.

30

ARIXTRA® es fondaparinux sódico. Es un inhibidor sintético y específico del Factor X (Xa) activado. El fondaparinux sódico es sal de decasodio O-2-desoxi-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-glucopira-nuronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-desoxi-3,6-di-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-O-sulfo- α -L-idopiranuronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2-desoxi-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranosido de metilo. La fórmula

35

molecular del fondaparinux sódico es $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ y su peso molecular es 1728. La fórmula estructural se proporciona a continuación:



5

La actividad antitrombótica del fondaparinux sódico es el resultado de la inhibición selectiva del Factor Xa mediada por la antitrombina III (ATIII). Al unirse de forma selectiva a ATIII, el fondaparinux sódico potencia (alrededor de 300 veces) la neutralización innata del Factor Xa mediante ATIII. La neutralización del Factor Xa interrumpe la cascada de coagulación sanguínea y por lo tanto inhibe la formación de trombina y el desarrollo de trombos. El fondaparinux sódico no inactiva la trombina (Factor II activado) y no tiene un efecto conocido sobre la función de las plaquetas. En la dosis recomendada, el fondaparinux sódico no afecta la actividad fibrinolítica o tiempo de hemorragia. La farmacodinámica/farmacocinética del fondaparinux sódico se deriva de las concentraciones de fondaparinux en el plasma cuantificadas mediante la actividad anti-factor Xa. Puede utilizarse solo fondaparinux para calibrar el ensayo anti-Xa. (Los estándares internacionales de heparina o LMWH no son apropiados para este uso.) Como resultado, la actividad del fondaparinux sódico se expresa en miligramos (mg) del calibrador de fondaparinux. La actividad anti-Xa del fármaco aumenta aumentando la concentración de fármaco, alcanzando valores máximos en aproximadamente tres horas. El fondaparinux sódico administrado mediante inyección subcutánea se absorbe rápida y totalmente (la biodisponibilidad absoluta es del 100%). En pacientes en tratamiento con inyección de fondaparinux sódico de 2.5 mg, una vez al día, la concentración en plasma pico en estado estacionario es, promedialmente, de 0.39 a 0.50 mg/L y se alcanza aproximadamente 3 horas después de la dosis. En estos pacientes, la concentración de plasma mínima en estadio estacionario es de 0.14 a 0.19 mg/L. En pacientes con trombosis venosa profunda sintomática y embolia pulmonar en tratamiento con inyección de fondaparinux sódico de 5 mg (peso corporal <50 kg), 7.5 mg (peso corporal de 50 a 100 kg) y 10 mg (peso corporal >100 kg) una vez al día, las dosis ajustadas al peso corporal proporcionan picos en estado estacionario promedio y concentraciones en plasma mínimas similares en todas las categorías de peso corporal. El pico promedio de concentración en plasma en estado estacionario se encuentra en el intervalo de 1.20 a

1.26 mg/L. En estos pacientes, la concentración en plasma mínima promedio en estado estacionario se encuentra en el intervalo de 0.46 a 0.62 mg/L.

ARGATROBAN® es un inhibidor de trombina directo sintético (Factor IIa),
 5 derivado de L-arginina. El nombre químico de ARGATROBAN® es monohidrato del ácido
 1-[5-[(aminoiminometil)amino]-1-oxo-2-[[[1,2,3,4-tetrahidro-3-metil-8-
 quinolinil)sulfonyl]amino]pentil]-4-metil-2-piperidincarboxílico. La fórmula molecular de
 ARGATROBAN® es $C_{23}H_{36}N_6O_5S \cdot H_2O$. Su peso molecular es 526.66. ARGATROBAN®
 es un inhibidor de trombina directo que se une de forma reversible al sitio activo de la
 10 trombina. ARGATROBAN® no requiere el co-factor antitrombina III para la actividad
 antitrombótica. ARGATROBAN® se administra mediante inyección y produce sus efectos
 anticoagulantes al inhibir reacciones catalizadas por trombina o inducidas por trombina,
 incluyendo formación de fibrina; activación de los factores de coagulación V, VIII y XIII;
 activación de la proteína C; y agregación plaquetaria.

15

Un efecto anticoagulante es cualquier efecto de un inhibidor de la coagulación
 (por ejemplo, heparina, LMWH, inhibidor del Factor Xa, inhibidor del Factor IIa) que da
 como resultado el bloqueo de la propagación de las cascadas de coagulación. Ejemplos
 no taxativos de efectos anticoagulantes incluyen la regulación por incremento de la
 20 actividad de la antitrombina, disminución de la actividad del Factor Xa, disminución de la
 actividad del Factor IIa, aumento de pérdida sanguínea y cualquier otras afección donde
 la actividad o concentraciones de los factores de coagulación se alteran de tal forma que
 inhiben la formación de coágulos de sangre.

25

La actividad de un inhibidor de la coagulación (es decir, sus efectos
 anticoagulantes) puede medirse mediante una diversidad de métodos, incluyendo, de
 modo no taxativo, un ensayo de actividad anti-factor Xa cromogénico, ensayo de tiempo
 de tromboplastina parcial activada, tiempo de protrombina, ensayo de sangrado (por
 ejemplo, ensayo de sangrado de la cola de la rata), tromboelastografía, ensayo de
 30 generación de trombina, ensayo del veneno de la víbora de Russell diluido, tiempo de
 coagulación con ecarina, tiempo de coagulación con caolín, tasa normalizada
 internacional (INR, por sus siglas en inglés), prueba de fibrinógeno (Clauss), tiempo de
 trombina (TCT, por sus siglas en inglés), tiempo de mezclado y tiempo de lisis de
 euglobulina. Estos métodos ayudan a determinar diversos parámetros de anticoagulación
 35 y son conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, en algunas modalidades, la

anticoagulación puede monitorearse mediante uno o una combinación de los ensayos enumerados anteriormente.

El ensayo anti-factor Xa mide directamente la actividad anti-factor Xa. La metodología detrás de un ensayo anti-factor Xa es que el plasma del paciente se agrega a una cantidad conocida de exceso de factor Xa y exceso de antitrombina. Si un inhibidor del factor Xa se encuentra presente en el plasma del paciente, reducirá la actividad enzimática del factor Xa. La cantidad de factor Xa residual es inversamente proporcional a la cantidad de agente anti-Xa en el plasma. La cantidad de factor Xa residual se detecta agregando un sustrato cromogénico que imita el sustrato natural del factor Xa, haciendo que el factor Xa residual lo escinda, liberando un compuesto de color que puede detectarse mediante un espectrofotómetro. Las deficiencias de antitrombina en el paciente no afectan el ensayo, debido a que se proporcionan cantidades en exceso de antitrombina en el ensayo. Los resultados se proporcionan en concentración de anticoagulante en unidades/mL de antifactor Xa, de tal forma que los valores altos indican niveles altos de anticoagulación y los valores bajos indican niveles bajos de anticoagulación.

El ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es un ensayo que mide cuánto tiempo demora la sangre en coagularse. Se recogen muestras de sangre para la medición directa o en tubos con oxalato y citrato para detener la coagulación por calcio hasta que pueda realizarse el ensayo. En el ensayo, se mezclan un fosfolípido, un activador (sílice, celite, caolín, ácido elágico, etc.) y calcio con el plasma para inducir la coagulación. El ensayo mide el tiempo hasta que se forma un trombo (coágulo).

El ensayo de sangrado de cola de rata o ensayo de corte transversal de cola de rata es un ensayo que mide la pérdida de sangre, por ejemplo, pérdida de sangre después de la administración del fármaco. En una modalidad, donde el efecto del compuesto de la invención (por ejemplo, DAP) está siendo analizado, en el T_{máx} del anticoagulante, DAP se administra de forma intravenosa. Después de 20 minutos, las colas de las ratas se cortan transversalmente aproximadamente a 1mm de la punta, se colocan en solución salina a temperatura ambiente y se recoge sangre durante 30 minutos y se pesa.

Los ensayos utilizados para medir la actividad de los inhibidores de la coagulación pueden utilizarse en el laboratorio o la clínica para medir la reversión de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, por ejemplo, la reversión de un

efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación debido a la administración de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención. Por lo tanto, en una modalidad, los ensayos se utilizan para medir la reversión total o parcial de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación (tal como heparina, LMWH, inhibidor del Factor IIa e inhibidor del Factor Xa).

Una reversión total de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación ocurre al neutralizar la actividad anticoagulante. En una modalidad, una reversión total de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, según se mide mediante el ensayo de actividad anti-Xa, ocurre cuando la concentración de anticoagulante se lleva a menos de la concentración eficaz mínima (MEC, por sus siglas en inglés) para la anticoagulación. MEC, como se usa en la presente, es la cantidad menor del fármaco (por ejemplo, inhibidor de la coagulación) requerida para un efecto terapéutico. En otra modalidad, una reversión total de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, como se mide mediante el ensayo aPTT, ocurre cuando el aPTT vuelve dentro de alrededor del 10% del punto de referencia. Un punto de referencia, como se usa en la presente, se refiere a un aPTT en ausencia de inhibidores de la coagulación.

En muchos casos, la anticoagulación seguirá siendo deseada, pero a un grado menor. Por lo tanto, se indicará una reversión parcial de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación. La reversión parcial de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, según se midió mediante el ensayo de actividad anti-Xa, ocurre cuando la concentración de anticoagulante se lleva a menos de la concentración de anticoagulante en ausencia de un agente de reversión de anticoagulación (por ejemplo, un compuesto de la invención), pero permanece por arriba de la MEC para la anticoagulación. Por lo tanto, en algunas modalidades, la reversión parcial de un efecto anticoagulación de inhibidores de la coagulación ocurre cuando la concentración del anticoagulante es menor que alrededor de cuatro veces la MEC, preferentemente alrededor de dos veces la MEC, más preferentemente menor que alrededor de dos veces la MEC (por ejemplo, alrededor de la MEC). La reversión parcial de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, según se midió mediante ensayo aPTT, ocurre cuando el aPTT se reduce a menos de la medida en ausencia de un agente de reversión de anticoagulación (por ejemplo, un compuesto de la invención), pero permanece por arriba del punto de referencia. Por lo tanto, en algunas modalidades, la reversión parcial de un efecto anticoagulación de inhibidores de la coagulación ocurre cuando la medida de aPTT se reduce a menos que alrededor de cuatro veces el punto de

referencia, preferentemente alrededor de dos veces el punto de referencia, más preferentemente menos que alrededor de dos veces el punto de referencia. Generalmente, el grado y duración de la reversión de la anticoagulación es determinada por el médico o veterinario.

5

Tal como se usa en la presente, "sujeto que lo necesita" es un sujeto que necesita la reversión de anticoagulación ya sea aguda o planificada, por ejemplo, un sujeto que sufre de una sobredosis de anticoagulante, un sujeto que sufre una hemorragia (por ejemplo, hemorragia inducida por traumatismo o hemorragia espontánea en el tracto
10 GI o en otro lado), un sujeto que requiere una intervención quirúrgica planificada, un sujeto que se somete a un procedimiento invasivo o no invasivo que requiere una biopsia, un sujeto que se somete a un procedimiento donde un error en el procedimiento puede generar el riesgo de hemorragia si el sujeto se mantiene bajo los efectos de anticoagulantes, un sujeto que requiere anestesia espinal o epidural. "Sujeto que lo
15 necesita" puede ser un paciente en el cual la presencia de un inhibidor del factor directo (Factor Xa, Factor IIa y/o antitrombina) produce o es probable que produzca efectos hemorrágicos. Por lo tanto, "sujeto que lo necesita" puede ser un sujeto que recibe terapia anticoagulación (por ejemplo, un sujeto que recibe heparina, LMWH, inhibidor del Factor IIa, inhibidor del Factor Xa) para, por ejemplo, la prevención de apoplejía, procedimientos
20 cardíacos quirúrgicos y de diagnóstico, arritmias cardíacas, prevención de trombosis venosa profunda (DVT, por sus siglas en inglés), embolia pulmonar, prevención general de la formación de coágulos de sangre patológica.

"Sujeto que lo necesita", tal como se usa en la presente, es un animal. "Sujeto
25 que lo necesita", incluye, de modo no taxativo, un ser humano, ratón, rata, cobayo, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, mono, chimpancé, babuino o mono rhesus. En una modalidad, "sujeto que lo necesita" es un mamífero. En otra modalidad, "sujeto que lo necesita" es un ser humano.

30 Tal como se usa en la presente, "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de agente de reversión de anticoagulación (por ejemplo, un compuesto de la invención descrito en la presente) que es eficaz, al administrar dosis individuales o múltiples (por ejemplo, bolo y/o dosis de mantenimiento) a un sujeto, para neutralizar o inhibir (revertir total o parcialmente) un efecto anticoagulante de un inhibición de la
35 coagulación o para promover la coagulación.

En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz es una dosis de un agente de reversión de anticoagulación que se encuentra entre 0.01 y 10000 veces la dosis de anticoagulante en peso. En otro aspecto, el agente de reversión de la anticoagulación se administra en una relación de dosis-masa de entre alrededor de 1:1 y 1000:1 de agente de reversión de anticoagulación a anticoagulante, por ejemplo, 100:1 de agente de reversión de anticoagulación a anticoagulante, tal como 10:1 de agente de reversión de anticoagulación a anticoagulante. En una modalidad del presente método, una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de reversión de anticoagulación puede administrarse mediante una vía de administración subcutánea, intramuscular o intravenosa. Por ejemplo, puede administrarse de forma intravenosa como una solución estéril. En otra modalidad, una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de reversión de anticoagulación se administra mediante vía oral, nasal o pulmonar o a una región mucosa (boca, recto o vagina).

La cantidad terapéuticamente eficaz del agente de reversión de anticoagulación (es decir, el compuesto de la invención) variará típicamente de alrededor de 0.001 mg/kg a alrededor de 1 g/kg de peso corporal por día; en otra modalidad, de alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 600 mg/kg de peso corporal por día; en otra modalidad, de alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 250 mg/kg de peso corporal por día; en otra modalidad, de alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 400 mg/kg de peso corporal por día; en otra modalidad, de alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 200 mg/kg de peso corporal por día; en otra modalidad, de alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal por día; en una modalidad, de alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 25 mg/kg de peso corporal por día; en otra modalidad, de alrededor de 0.1 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal por día; en otra modalidad, de alrededor de 0.001 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal por día; en otra modalidad, de alrededor de 0.001 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal por día; y en otra modalidad, de alrededor de 0.001 mg/kg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal por día. Los ensayos de coagulación estándar (como los que se describen en la presente) y otros ensayos *in vitro* pueden utilizarse para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz.

En algunos aspectos de la invención, el compuesto de la invención puede administrarse conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. En una modalidad, el al menos un agente terapéutico adicional puede ser vitamina K, que se utiliza típicamente para corregir las deficiencias de coagulación inducidas por los compuestos de warfarina.

La presente invención también proporciona un ensayo de diagnóstico para determinar la concentración de anticoagulante en la sangre. Como se muestra en Ejemplo 13 más adelante, DAP demuestra una tendencia que responde a la dosis al revertir rivaroxabán *ex vivo* en el plasma humano utilizando un ensayo cromogénico anti-factor Xa con aprobación 510k. Por lo tanto, el compuesto de la invención, por ejemplo, DAP, puede utilizarse en un ensayo de diagnóstico para determinar la concentración de un anticoagulante, por ejemplo, un inhibidor del Factor Xa, en la sangre. En dicho ensayo, el compuesto de la invención, por ejemplo, DAP, puede utilizarse en conjunto con los reactivos de kit actualmente disponibles o como un sustrato de unión directo reemplazando los factores sintéticos presentes en los kits actualmente disponibles. En una modalidad, el ensayo de diagnóstico puede comprender el compuesto de la invención (por ejemplo, DAP) como un sustrato de unión, donde el compuesto de la invención se une a un anticoagulante en una muestra de sangre y la actividad residual del factor de coagulación (por ejemplo, Factor Xa) se cuantifica para determinar la concentración del anticoagulante en la muestra. En otra modalidad, el ensayo de diagnóstico puede comprender el compuesto de la invención (por ejemplo, DAP) conjugado a micropartículas magnéticas, donde el compuesto de la invención puede unirse a un anticoagulante en una muestra de sangre para quitar el anticoagulante de la muestra o concentrarlo. El ensayo cromogénico basado en DAP o en sitio de atención de la invención puede ayudar a determinar los niveles de anticoagulante en los sujetos, lo cual actualmente es una necesidad clínica significativa no satisfecha debido a que los diagnósticos actuales no pueden determinar las concentraciones en sangre de inhibidores directos con gran exactitud.

De manera adicional, la presente invención proporciona un ensayo, por ejemplo, DAP, un ensayo cromogénico, para determinar la concentración del compuesto de la invención, por ejemplo, DAP, requerida para revertir el anticoagulante presente en la sangre. En una modalidad, el ensayo utiliza DAP como agente de unión directo para diversos anticoagulantes.

La invención también proporciona un ensayo, por ejemplo, un ensayo cromogénico, para determinar la cantidad del compuesto de la invención, por ejemplo, DAP, en la sangre. Dicho ensayo puede utilizar concentraciones predeterminadas de un anticoagulante.

La presente invención también proporciona un kit de diagnóstico que incorpora un ensayo de diagnóstico descrito anteriormente en la presente. Por lo tanto, en una modalidad, el kit se utiliza para determinar la concentración de anticoagulante en la sangre. El kit puede contener otros componentes, embalaje, instrucciones, reactivos y/u otro material para ayudar a determinar la concentración del anticoagulante (por ejemplo, inhibidor del Factor Xa) o DAP y para asistir en la utilización del kit. De manera adicional, el kit puede utilizarse para determinar si existe una combinación de warfarina y otro anticoagulante ya que la warfarina no será afectada por el compuesto de la invención, mientras que otros anticoagulantes se revertirán.

10

Como se demuestra en los ejemplos a continuación, un compuesto de la invención (por ejemplo, DAP) es capaz de unirse a la heparina, inactivándola *in vivo*. Por lo tanto, además de sus efectos sobre la coagulación, un compuesto de la invención también puede utilizarse para privar a los tejidos de las actividades bioquímicas de la heparina. Por ejemplo, otras moléculas de unión a la heparina han demostrado la capacidad de reducir el factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor del crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y otros factores del crecimiento que se unen a heparina. La privación de VEGF y FGF ha demostrado ser útil en la terapia anti-cáncer, convirtiendo a los compuestos de la invención en posibles candidatos para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar, prevenir o mejorar un cáncer en un sujeto, que comprende administrarle a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

25

Como se demuestra en los ejemplos, un compuesto de la invención, DAP, se unió a XARELTO®, ELIQUIS®, ARIXTRA® y LMWH *in vitro* según se midió mediante diseminación de luz dinámica (DLS). DAP revirtió ARIXTRA® y LMWH administrados de forma subcutánea *in vivo*. DAP revirtió XARELTO®, ELIQUIS®, PRADAXA®, LIXIANA®, heparina sin fraccionar y bemiparina *in vivo*. DAP administrado de forma intravenosa en dosis de 100mg/kg, 250mg/kg y 400mg/kg a ratas no mostró efectos adversos. DAP se encontraba biodisponible oralmente en ratas. DAP no exhibió unión a ERG humano, no inhibió ni sirvió como sustrato de enzimas CYP y no se unió de forma perceptible a ninguna proteína plasmática (no se muestran los datos). Además, DAP parece tener una semivida de eliminación corta, ya que la anticoagulación inducida por PRADAXA® volvió en 20-30 minutos después de una dosis por bolo intravenoso de DAP en ratas. Además,

35

DAP fue estable cuando se esterilizó (sobrevivió calentamiento hasta 200 °C) y cuando se almacenó como un polvo liofilizado a 4 °C durante más de un año. En la Tabla 2 se presenta un resumen de la reversión de anticoagulante mediante DAP.

5 Tabla 2: Reversión de anticoagulante

Nombre comercial	Nombre genérico	Compañía	Factor de sangre inhibido	Vía de administración:	Se une a DAP	Agentes de reversión
Lovenox® Hibor®	Enoxaparina Bemiparina	Sanofi, Sandoz/ Momenta, Rovi	~80-90% Xa, ~10-20% IIa	Inyección s.c.	X	Protamina* & DAP
Arixtra®	Fondaparinux	GSK	Xa	Inyección s.c.	X	DAP
Eliquis®	Apixabán	Pfizer, BMS	Xa	Oral	X	DAP
Xarelto®	Rivaroxabán	Bayer, Janssen, J&J	Xa	Oral	X	DAP
Argatroban®	Argatroban	GSK	IIa	s.c. Inyección	--	Ninguno
Pradaxa®	Dabigatrán etexilato	Boehringer Ingelheim	IIa	MTD oral	X	DAP

*La protamina revierte parcialmente las heparinas de bajo peso molecular.

Tabla 3: Correlación *in vitro in vivo*

Nombre genérico del fármaco	Relación molar de unión a DLS [DAP/fármaco]	Relación molar de reversión [DAP/fármaco]	Medida <i>in vivo</i>	Factor/es de sangre inhibidos	Vía de administración
Rivaroxaban	9	3*	Ensayo de sangrado	Xa	Oral
Apixaban	10	8*	Ensayo de sangrado	Xa	Oral
Fondaparinux	3	130	Kit Xa	Xa	Inyección s.c.
Bemiparina	7	140	aPTT	~80-90% Xa, ~10-20% IIa	Inyección s.c.
Argatroban	N/D	N/D	aPTT	IIa	Inyección s.c.

Asume biodisponibilidades orales del 60% para rivaroxabán, 50% para apixabán y 5% para adabigatrán; asume 100% de biodisponibilidad para anticoagulantes inyectables.

5 En la Tabla 3 se presenta un resumen de la correlación *in vitro-in vivo* del tratamiento con DAP. Se calcula la relación molar de unión a DLS dividiendo la relación de masa menor de DAP a anticoagulante que muestra unión significativa, definida como una asociación en solución salina tamponada con fosfato sobre 50nm en diámetro aparente, mediante la relación de peso molecular de DAP y el anticoagulante. Los pesos
10 moleculares utilizados en los cálculos fueron 512Da (DAP), 436Da (rivaroxabán), 460Da (apixabán), 1.7kDa (fondaparinux), 3.6kDa (bemiparina), 628Da (dabigatrán) y 509Da (ARGATROBAN®). La relación molar de la reversión se calculó de manera similar utilizando la mínima dosis de reversión *in vivo* de DAP necesaria para lograr la reversión según se midió mediante el ensayo de sangrado por corte transversal de cola de rata, kit
15 anti-Xa cromogénico o mediante tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Para el ensayo de sangrado, el anticoagulante se consideró revertido si la pérdida de sangre durante un período de 30 minutos después del corte transversal a la cola, con la cola cortada sumergida en solución salina a temperatura ambiente, se encontraba dentro del 25% del control (sin administración de anticoagulante). Como se midió mediante el kit Xa,
20 la reversión se logró cuando la concentración anticoagulante eficaz se llevó a menos de la concentración eficaz mínima (MEC) para anticoagulación. Como se midió mediante aPTT, se consideró que se logró la reversión cuando un aPTT de rata bajo los efectos de anticoagulante volvía a dentro del 10% del punto de referencia. En el caso de fondaparinux, aunque 200 mg/kg de DAP fue la menor dosis administrada *in vivo*, los
25 datos *in vitro* indican que dosis de reversión significativamente menores son posibles.

El contenido total de todas las referencias, solicitudes de patente y patentes citadas en toda la solicitud se incorporan a la presente mediante esta referencia.

30 EJEMPLOS

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no taxativos. Estos ejemplos se establecen para ayudar en el entendimiento de la invención, pero no se pretende, y no debe interpretarse, que limiten su alcance de ninguna manera.
35 Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de los métodos convencionales que son conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplo 1: Análisis de estabilidad *in vitro* de diarginina piperazina ("DAP")*Materiales y métodos*

5 Una sal de acetato de DAP se preparó como se describe en la presente. Como se describe en estos ejemplos, DAP sólido o en polvo se refiere a la sal de acetato, mientras que DAP en solución se refiere a la base libre ya que la sal se ioniza en solución acuosa. Como se describe en estos ejemplos, el compuesto de DAP utilizado fue el compuesto de la Fórmula VII.

10

El DAP en polvo se analizó para determinar la estabilidad térmica de dos formas. El DAP se almacenó a 4°C durante 7 meses antes de su uso. De manera adicional, el DAP sólido se analizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) calentándolo de -20 °C a 200 °C, nuevamente a -20 °C y nuevamente a 200 °C.

15

Resultados

El DAP en polvo se mantuvo estable a 4 °C durante más de 12 meses. Los resultados de DSC se muestran en la **Figura 1**. El segundo calentamiento ("2") mostró un comportamiento térmico similar al primer calentamiento ("1"), indicando que DAP sobrevivió al calentamiento repetido a 200 °C. Estos hallazgos indican que DAP puede sobrevivir el calentamiento a temperaturas mayores a las necesarias para la esterilización.

20

Ejemplo 2: Unión de DAP a heparina y LMWH

25

Materiales y métodos

Se utilizó diseminación de luz dinámica (DLS) para evaluar la asociación de 1 mg/ml de heparina sin fraccionar y 1 mg/ml de bemiparina (LMWH; HIBOR®), sola o en combinación con 100 mg/ml de DAP en agua (relaciones de masa de 100:1 de DAP a heparina o LMWH).

30

Resultados

35 DAP se asoció físicamente en agua con tanto la heparina sin fraccionar (**Figura 2**) como la LMWH (no se muestra) para formar asociaciones físicas que aumentan el

diámetro aparente. Cuando las soluciones de DAP se mezclaron con soluciones de LMWH o heparina sin fraccionar, formaron partículas debido a sus interacciones físicas, lo cual apoya la teoría de que DAP podía revertir la anticoagulación por heparina y LMWH asociándose físicamente con estas moléculas.

5

Ejemplo 3: Unión de DAP a anticoagulantes según se mide mediante DLS

Materiales y métodos

- 10 Rivaroxabán (XARELTO®) solo, DAP solo y combinaciones de DAP:rivaroxabán en relaciones de masa de 1:1 y 10:1 se agregaron a una solución acuosa y se analizaron mediante diseminación de luz dinámica (DLS) para evaluar la asociación de DAP y rivaroxabán. Un experimento similar se llevó a cabo en apixabán (ELIQUIS®) solo, DAP solo y combinaciones de DAP:apixabán en relaciones de masa de 1:1, 10:1 y 100:1.
- 15 Fondaparinux (ARIXTRA®) solo, DAP solo y combinaciones e fondaparinux:DAP en relaciones de masa de 1:1, 10:1 y 100:1 se analizaron de forma similar. También se analizaron LMWH (bemiparina; HIBOR®), sola, DAP solo y combinaciones de LMWH:DAP en relaciones de masa de 1:1, 10:1 y 100:1. La concentración de LMWH analizada fue 0.1 mg/ml. Por lo tanto, a 1:1, se analizaron 0.1 mg/ml de DAP, a 10:1, se
- 20 analizó 1 mg/ml y a 100:1, se analizaron 10 mg/ml de DAP.

- De manera adicional, se analizaron dabigatrán solo, DAP solo y combinaciones de dabigatrán:DAP en relaciones de masa de 1:1, 10:1, 100:1, 1000:1 y 10000:1 de DAP. De manera adicional, se analizaron ARGATROBAN® solo, DAP solo y combinaciones de
- 25 argatroban:DAP en relaciones de masa de 1:1, 10:1, 100:1 y 1000:1.

Resultados

- Los resultados se muestran en la **Figura 3** para rivaroxabán; **Figura 4** para
- 30 apixabán; **Figura 5** para fondaparinux (ARIXTRA®), **Figura 6** para LMWH; y **Figura 7** para argatroban. Cada figura muestra picos individuales que representan a DAP y el anticoagulante solo en solución acuosa. Cuando el anticoagulante se mezcló con DAP en relaciones de masa suficientemente altas, se observó un cambio en el tamaño. En este ensayo, incluso un pequeño aumento en el tamaño indica la interacción física entre los
- 35 dos; sin embargo, solo los cambios significativos en el diámetro aparente se utilizan para

evaluar la correlación *in vitro in vivo*. El diámetro aparente es una medida del grado de interacción.

Ejemplo 4: Reversión con DAP de anticoagulación mediante LMWH *in vivo*.

5

Materiales y métodos

A una rata macho albina que pesaba 470 g se le administraron 10 mg de bemiparina (una sobredosis de LMWH) mediante inyección subcutánea. Se midió un tiempo aPTT durante el transcurso de cinco horas. Cuatro horas después de la administración de LMWH, la rata recibió una dosis intravenosa de 200 mg/kg de DAP (100mg de DAP).

Resultados

15

Luego de la administración de LMWH, el aPTT aumentó de 53 a 246 segundos durante el transcurso de cuatro horas. La administración intravenosa de 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP) llevó el tiempo aPTT por debajo del punto de referencia en 60 minutos (**Figura 8**).

20

Ejemplo 5: Reversión con DAP de la anticoagulación mediante Dabigatrán (PRADAXA®) *in vivo*; un estudio de sobredosis

Materiales y métodos

25

A una rata macho albina que pesaba 430 g se le administraron 40 mg/kg de PRADAXA® (20 mg de PRADAXA®; sobredosis de PRADAXA®) mediante sonda oral.

Aproximadamente 2 horas después del tratamiento con PRADAXA®, se administraron 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP) como una inyección en bolo intravenosa. Aproximadamente 2 horas después, a la rata se le administró una dosis de 100 mg/kg de DAP (50mg de DAP). Después de otra hora, a la rata se le administró otra dosis de 100 mg/kg de DAP (50 mg de DAP). Se midió el aPTT durante el transcurso de todo el tratamiento.

35

Resultados

Los resultados se muestran en las **Figuras 9 y 13**. 2 horas después de la administración de PRADAXA®, el aPTT aumentó de 43 a 81 segundos, mostrando una importante anti-coagulación. 100 mg de DAP se administraron como una inyección en bolo, lo que disminuyó el aPTT a menos del punto de referencia en 25 minutos. 2 horas después, el aPTT había vuelto a subir a 79 segundos y se le administró una dosis de 50 mg de DAP a la rata. En 30 minutos, el aPTT se llevó por debajo del punto de referencia. Ambas veces, después de 60 minutos de la administración de DAP, los niveles de aPTT volvieron a superar el punto de referencia. Después de la segunda dosis de DAP, el aPTT aumentó a 53 segundos. Se administró una tercera dosis de DAP, 100 mg/kg de DAP (50 mg de DAP) de forma intravenosa y el aPTT disminuyó hasta el punto de referencia en 20 minutos. La **Figura 13** demuestra un experimento similar donde, después de la administración de 15.5 mg/kg de PRADAXA®, el aPTT volvió al valor normal en alrededor de 30 minutos después de iniciar el tratamiento con 100 mg/kg de DAP.

Ejemplo 6: Reversión con DAP de anticoagulación mediante heparina sin fraccionar ("UFH") *in vivo*.

Materiales y métodos

A una rata macho albina que pesaba 515 g se le administraron 10 mg/kg de heparina sin fraccionar (5 mg de UFH) mediante inyección subcutánea.

Se administraron 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP) como dos inyecciones en bolo intravenosas después de la administración de UFH. Posteriormente, a la rata se le administró una dosis de 400mg/kg de DAP (200mg de DAP). Se midió el aPTT durante el transcurso de todo el tratamiento.

Resultados

Como se demuestra en la **Figura 10**, el tiempo aPTT aumentó significativamente de 28 a 102 segundos en el transcurso de una hora después de la administración de heparina. Se administraron 100 mg de DAP de forma intravenosa lo que llevó el tiempo aPTT a 48 segundos en 20 minutos. En 1 hora, el aPTT aumentó a 120 segundos, luego

se administraron otros 100mg de DAP de forma intravenosa. En 15 minutos, el aPTT se disminuyó hasta 47 segundos. En 1 hora, el aPTT aumentó a 96 segundos, luego se administró una dosis de 200mg de DAP de forma intravenosa. 10 minutos después, el aPTT disminuyó a 33 segundos.

5

Ejemplo 7: Reversión con DAP de anticoagulación mediante Rivaroxabán (XARELTO®) *in vivo*.

Materiales y métodos

10

Se administraron 5 mg/kg de rivaroxabán (XARELTO®) oralmente a ratas. Después de cuatro horas, se administraron 5 mg/kg de DAP (2 mg de DAP) de forma intravenosa. El aPTT se midió a los cero, 15, 30, 45, 60 y 240 minutos, antes de la administración de DAP. El aPTT volvió a medirse a alrededor de 5, 10, 25, 35, 45, 60, 120 y 240 minutos después de la administración de DAP.

15

Resultados

Los resultados se muestran en la **Figura 11**. DAP revirtió eficazmente la anticoagulación de rivaroxabán (XARELTO®) *in vivo* en ratas.

20

Ejemplo 8: Reversión con DAP de anticoagulación mediante Fondaparinux (ARIXTRA®) *in vivo*.

Materiales y métodos

25

Se administraron 5 mg/kg de fondaparinux de manera subcutánea a ratas. Se administraron 200 mg/kg de DAP de manera intravenosa después de 2 horas. La actividad se midió mediante ensayo de Factor Xa cromogénico con aprobación 510k (Biophen) a los 10, 20, 30 y 60 minutos después de la administración de DAP.

30

Resultados

La **Figura 12** demuestra la reversión mediada por DAP de la anticoagulación por fondaparinux a los 10 minutos de la administración.

35

Ejemplo 9: El DAP intravenoso no tiene influencia sobre el aPTT

Materiales y métodos

5 Se administraron 0, 2, 10, 25, 50 o 100 mg de DAP de forma intravenosa a ratas CD macho de mismo peso y se midió el aPTT.

Resultados

10 Los resultados que se muestran en la **Figura 16** demuestran que el DAP administrado de forma intravenosa no tuvo influencia sobre el aPTT en forma dependiente de la dosis en ausencia de anticoagulantes. Las barras de error representan el error estándar de siete mediciones de aPTT promediadas durante 90 minutos.

15 **Ejemplo 10: Reversión con DAP de anticoagulación en un modelo de corte transversal en cola de rata.**

20

Materiales y métodos

25 Se les administraron 2 mg de rivaroxabán a tres ratas. Una rata recibió una reversión simulada que no contenía DAP, la segunda recibió 2.5 mg de DAP y la tercera recibió 12.5 mg de DAP. Una cuarta grapa recibió anticoagulante y dosis de reversión simuladas ("simulado"). 20 minutos después de la dosis de reversión, las colas se cortaron transversalmente 1 mm de la punta, se colocaron en solución salina a temperatura ambiente y se recogió la pérdida de sangre durante 30 minutos y luego se pesó.

30

Los mismos procedimientos se utilizaron con 1.25 mg de apixabán (ELIQUIS®) solo o en combinación con 5 o 12.5 mg de DAP; con 15.5 mg de dabigatrán etexilato (PRADAXA®) solo o en combinación con 5 o 12.5 mg de DAP; y con 5 mg de edoxabán (LIXIANA®) solo o en combinación con 12.5 mg de DAP.

Resultados

Los resultados se muestran en la **Figura 15** para rivaroxabán, en la **Figura 16** para apixabán, en la **Figura 17** para edoxabán y en la **Figura 18** para dabigatrán etexilato. El ensayo de sangrado de corte transversal de cola de rata es análogo a la situación clínica en la cual se necesita la reversión de anticoagulante agudo. Los resultados muestran que DAP revirtió de forma eficaz la actividad anticoagulante llevando a un resultado estadísticamente significativo en la pérdida de sangre en comparación con ratas que recibieron solo anticoagulante.

10

Ejemplo 11: Reversión con DAP de anticoagulación mediante Rivaroxabán (XARELTO®) en sangre humana recién extraída *Ex Vivo*.

Materiales y métodos

15

Se extrajo sangre humana de un voluntario. Se agregó rivaroxabán a 0.25 µg/ml solo o combinado con 50 µg/ml de DAP. Los controles contenían 50 µg/ml de DAP o solución salina. Se midió el aPTT a los dos minutos de la recolección de sangre.

20

Resultados

La **Figura 19** demuestra que la administración de DAP llevó a la reversión de la anticoagulación inducida por rivaroxabán en sangre humana recién extraída, según se midió mediante aPTT. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos independientes.

25

Ejemplo 12: Reversión con DAP de anticoagulación mediante rivaroxabán y apixabán en plasma humano *Ex Vivo*

Materiales y métodos

30

Se agregaron 218 µg/L o 459 µg/L de rivaroxabán a plasma humano, con o sin 1250 µg/L o 6250 µg/L de DAP, respectivamente. De manera similar, se agregaron 156 µg/L o 313 µg/L de apixabán a plasma humano, con o sin 1156 µg/L o 3125 µg/L de DAP, respectivamente. El efecto de DAP en la anticoagulación se midió mediante ensayo cromogénico anti-factor Xa con aprobación 510k de Biophen. Las concentraciones de rivaroxabán se determinaron mediante comparación con los estándares de calibración de

35

plasma, mientras que las concentraciones de apixabán se infirieron de diluciones de solución madre ya que los estándares de calibración todavía no se encuentran disponibles.

5 Resultados

Para ambas concentraciones de rivaroxabán y apixabán, DAP regresó la concentración anticoagulante eficaz a menos de la concentración eficaz mínima. La **Figura 20** muestra los resultados para rivaroxabán y la **Figura 21** muestra los resultados para apixabán.

Ejemplo 13: Reversión con DAP dependiente de la dosis de anticoagulación mediante rivaroxabán en plasma humano *Ex Vivo*

15 Materiales y métodos

Se agregaron 218 µg/L de rivaroxabán a plasma humano solos o en combinación con 1.25, 12.5, 125 o 1250 µg/L de DAP. La actividad del Factor Xa se midió mediante ensayo cromogénico anti-factor Xa con aprobación 510k de Biophen. Las concentraciones de rivaroxabán se determinaron mediante comparación con estándares de calibración de plasma.

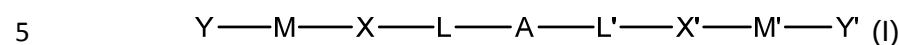
Resultados

La **Figura 22** demuestra que DAP fue eficaz en la reversión dependiente de la dosis de la anticoagulación mediante rivaroxabán en plasma humano, como se demostró mediante su efecto en la concentración de rivaroxabán (medido mediante el ensayo de actividad del Factor Xa).

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula I



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, donde:

10 A es un anillo carbocíclico o heterocíclico, aromático o no aromático, sustituido o no sustituido o un resto lineal;

L y L' son iguales o diferentes y son enlaces;

15 X y X' son iguales o diferentes y están ausentes o son un grupo funcional que une el enlace L a M y el enlace L' a M', respectivamente;

M y M' son iguales o diferentes y están ausentes o son un enlace que une X a Y y X' a Y', respectivamente; y

20 Y e Y' son iguales o diferentes y son un resto que contiene uno o más átomos o grupos catiónicos o uno o más grupos que se vuelven catiónicos en condiciones fisiológicas.

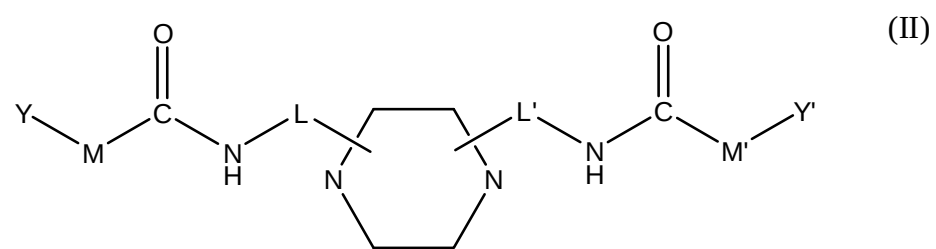
25 2. El compuesto de la reivindicación 1, donde A es un anillo heterocíclico no aromático o un resto lineal y donde el anillo o el resto lineal contiene grupos funcionales reactivos que pueden formar un enlace con X y/o X', cuando está presente, o Y y/o Y'.

30 3. El compuesto de la reivindicación 2, donde A es una piperazina o dicetopiperazina.

35 4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde X y X', cuando están presentes, son un grupo funcional que une el enlace L a Y y el enlace L' a Y', respectivamente, y donde el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en ésteres, amidas y cetonas.

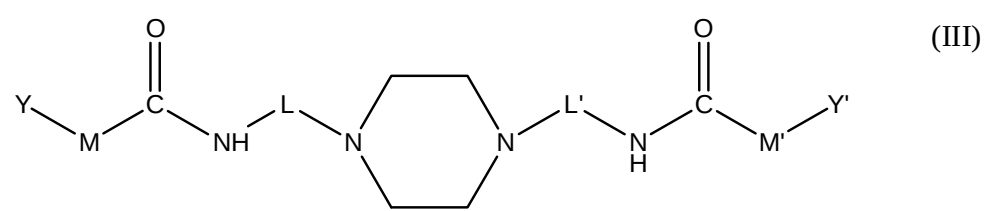
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde L y/o L' es una cadena de alquileo sustituida o no sustituida que tiene de C₁ a C₆.

6. El compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto está representado por la fórmula II:



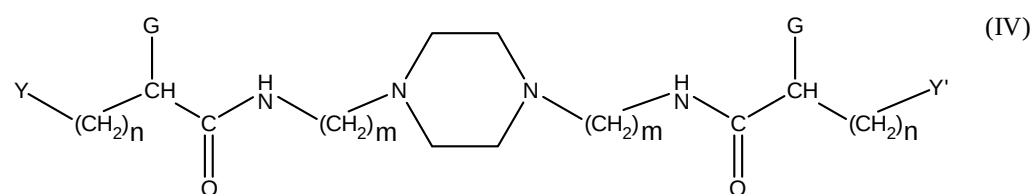
o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

7. El compuesto de la reivindicación 6, donde el compuesto está representado por la fórmula III:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

8. El compuesto de la reivindicación 7, donde el compuesto está representado por la fórmula IV:

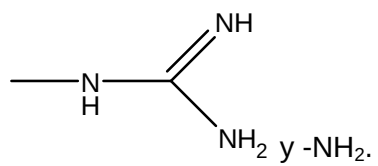


o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde n es de 3 a 5, m es de 3 a 6 y G se selecciona de -NH₂ y OH.

9. El compuesto de la reivindicación 8, en donde G es amino.

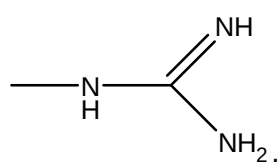
10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde Y e Y' se seleccionan independientemente de

5



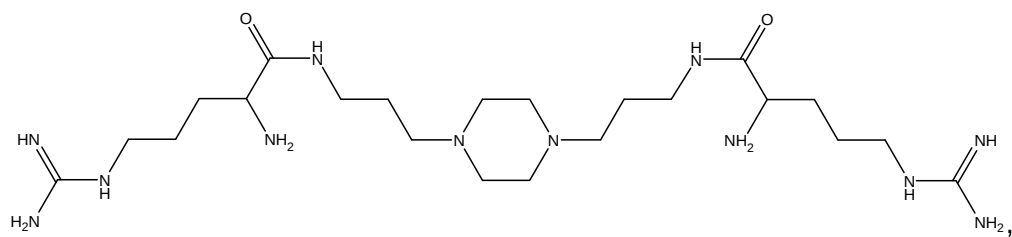
11. El compuesto de la reivindicación 10, donde Y e Y' es

10



12. Un compuesto de la fórmula V

15

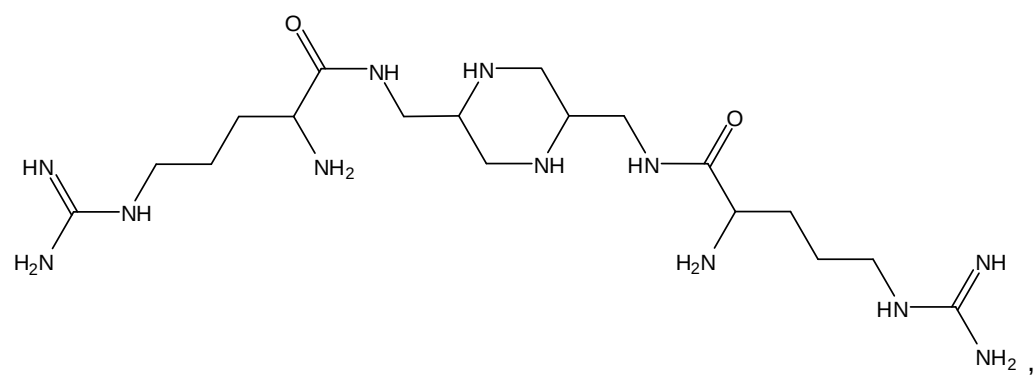


o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

13. Un compuesto de la fórmula VI

20

(VI)

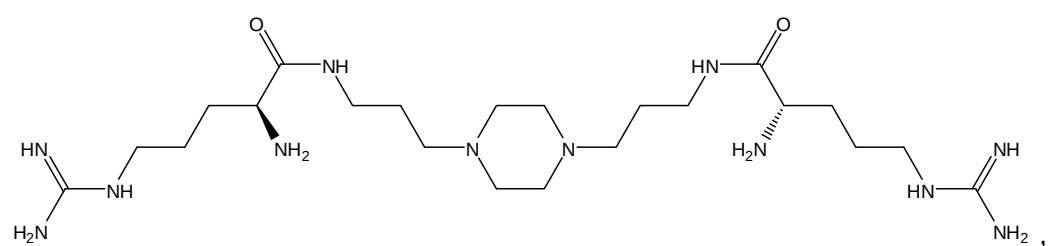


o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

14. Un compuesto de la fórmula VII

5

(VII)

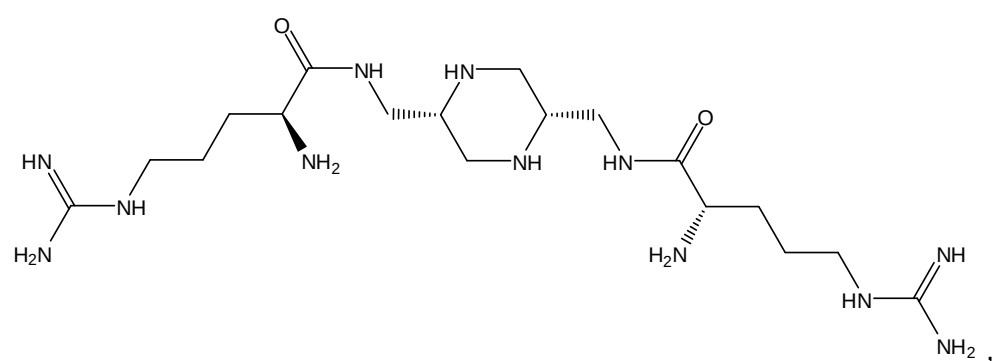


o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

10

15. Un compuesto de la fórmula VIII

(VIII)



15

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

16. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un portador farmacéuticamente aceptable.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, donde la composición se adapta para administración entérica.

5 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, donde la composición se adapta para administración oral.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, donde la composición se adapta para administración parenteral.

10 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, donde la composición se adapta para administración intravenosa o subcutánea.

15 21. Un método para revertir total o parcialmente un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

20 22. El método de la reivindicación 21, donde el inhibidor de la coagulación se selecciona del grupo que consiste en una heparina sin fraccionar, heparina de bajo peso molecular (LMWH), inhibidor del Factor IIa e inhibidor del Factor Xa.

23. El método de la reivindicación 22, donde el inhibidor de la coagulación es un inhibidor del factor Xa.

25 24. El método de la reivindicación 23, donde el inhibidor del factor Xa se selecciona del grupo que consiste en rivaroxabán, apixabán, edoxabán y fondaparinux.

25. El método de la reivindicación 21, donde el sujeto es un mamífero.

30 26. El método de la reivindicación 25, donde el sujeto es un ser humano.

27. El método de la reivindicación 21, donde la reversión total o parcial de un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación se mide mediante ensayo de actividad anti-factor Xa.

35

28. El método de la reivindicación 21, donde el sujeto que lo necesita es un sujeto en el cual se indica la reversión aguda o planificada de anticoagulación.

29. El método de la reivindicación 28, donde el sujeto en el cual se indica la reversión de anticoagulación aguda o planificada es un sujeto que sufre de una sobredosis de anticoagulante, un sujeto que sufre una hemorragia, un sujeto que requiere una intervención quirúrgica planificada, un sujeto que se somete a un procedimiento invasivo o no invasivo que requiere una biopsia, un sujeto que se somete a un procedimiento donde un error en el procedimiento puede dar como resultado una hemorragia si el sujeto se mantiene bajo efectos anticoagulantes o un sujeto que requiere anestesia espinal o epidural.

30. El método de la reivindicación 28, donde el sujeto que lo necesita es un sujeto que recibe anticoagulación para la prevención de una apoplejía, procedimientos cardíacos quirúrgicos y de diagnóstico, arritmias cardíacas, prevención de trombosis venosa profunda (DVT), embolia pulmonar o generalmente para la prevención de la formación de coágulos de sangre patológica.

31. El método de la reivindicación 22, donde el inhibidor de la coagulación es una LMWH, y donde la LMWH se selecciona del grupo que consiste en bemiparina, certoparina, dalteparina, enoxaparina, nadroparina, parnaparina, reviparina y tinzaparina.

32. El método de la reivindicación 21, donde el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este se administra en una relación dosis-masa de entre alrededor de 0.01:1 a alrededor de 1000:1 del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de este a anticoagulante.

33. El método de la reivindicación 32, donde el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de este se administra en una relación dosis-masa de entre alrededor de 10:1 del compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable de este a anticoagulante.

34. El método de la reivindicación 21, donde el método comprende administrar al menos un agente terapéutico adicional.

35. El método de la reivindicación 34, donde el al menos un agente terapéutico adicional es la vitamina K.

36. Un kit de diagnóstico que comprende el compuesto de cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 15.

37. El kit de la reivindicación 36, donde el kit se utiliza para determinar una concentración de anticoagulante en sangre.