



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 876**

51 Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01) **A61K 31/44** (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01) **A61P 9/00** (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01) **A61P 9/06** (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) **A61P 9/12** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09150995 .0**

96 Fecha de presentación : **14.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **2065384**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

54

Título: **Antagonistas tricíclicos del receptor de trombina.**

30

Prioridad: **16.04.2002 US 373072 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.05.2011

73

Titular/es: **SCHERING CORPORATION**
2000 Galloping Hill Road
Kenilworth, New Jersey 07033-0530, US

72

Inventor/es: **Chackalamannil, Samuel;**
Greenlee, William J.;
Wang, Yuguang y
Xia, Yan

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 876 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antagonistas tricíclicos del receptor de trombina

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a la sal bisulfato de un compuesto, como se define en las reivindicaciones adjuntas, a composiciones farmacéuticas que contienen la sal y a su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con trombosis, aterosclerosis, reestenosis, hipertensión, angina de pecho, arritmia, insuficiencia cardiaca, isquemia cerebral, ictus, trastornos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. La invención también se refiere a la combinación de la sal de la invención y a otros agentes cardiovasculares.

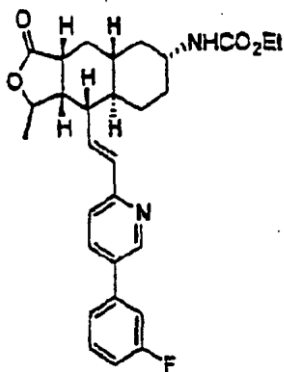
10 Se sabe que la trombina tiene una diversidad de actividades en diferentes tipos de células y se sabe que los receptores de trombina están presentes en dichos tipos de células tales como plaquetas humanas, células vasculares del músculo liso, células endoteliales y fibroblastos. Por lo tanto, es posible que los antagonistas de los receptores de trombina, también conocidos como antagonistas de receptores activados por proteasas (RAP), sean útiles en el tratamiento de trastornos tromboticos, inflamatorios, ateroscleróticos y fibroproliferativos, así como otros trastornos en los que la trombina y su receptor desempeñan una función patológica.

15 Se han identificado péptidos antagonistas de receptores de trombina basándose en estudios de actividad estructural que implican sustituciones de aminoácidos en los receptores de trombina. En Bematowicz y col, J. Med. Chem., vol. 39, págs. 4879-4887 (1996), se desvelan tetra- y pentapéptidos como fuertes antagonistas de receptores de trombina, por ejemplo N-trans-cinnamoil-p-fluoroPhe-p-guanidinoPhe-Leu-Arg-NH₂ y N-trans-cinnamoil-p-fluoroPhe-p-guanidinoPhe-Leu-Arg-Arg-NH₂. También se desvelan, en el documento WO 94/03479
20 publicado el 17 de febrero de 1994, antagonistas peptídicos de receptores de trombina.

En los documentos US 6.063.847, US 6.326.380 y en U.S. N° de Serie 09/880222 (WO 01/96330) y 10/271715 se desvelan antagonistas tricíclicos de receptores de trombina sustituidos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la sal bisulfato del compuesto:



25 La sal de la presente invención es un antagonista del receptor de trombina. La sal puede tener actividad anti-trombótica, anti-agregación plaquetaria, antiaterosclerótica, antireestenótica y/o anti-coagulante. Las enfermedades relacionadas con la trombosis tratadas por la sal de la presente invención incluyen trombosis, aterosclerosis, reestenosis, hipertensión, angina de pecho, arritmia, insuficiencia cardiaca, infarto de miocardio, glomerulonefritis, ictus trombotico y tromboembólico, enfermedades vasculares periféricas, otras enfermedades cardiovasculares, isquemia cerebral, trastornos inflamatorios y cáncer, así como otros trastornos en los que la trombina y su receptor desempeñan una función patológica.

30 Ciertas realizaciones de la presente invención también se refieren a la sal para su uso como un medicamento, en el que la sal se administra junto con uno o más agentes cardiovasculares adicionales para el tratamiento de trombosis, agregación plaquetaria, coagulación, cáncer, enfermedades inflamatorias o trastornos respiratorios. La sal y al menos un agente cardiovascular adicional se administran a un mamífero que necesita dicho tratamiento. En particular, la presente invención se refiere al tratamiento de trombosis, aterosclerosis, reestenosis, hipertensión, angina de pecho, arritmia, insuficiencia cardiaca, infarto de miocardio, glomerulonefritis, ictus trombotico, ictus tromboembólico, enfermedades vasculares periféricas, isquemia cerebral, cáncer, artritis reumatoide, lupus

sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, diabetes, osteoporosis, isquemia renal, ictus cerebral, isquemia cerebral, nefritis, trastornos inflamatorios de los pulmones y del tracto gastrointestinal, obstrucción reversible de las vías respiratorias, asma crónico o bronquitis usando dichas combinaciones. Se contempla que una combinación de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de más de una de las enfermedades enumeradas.

- 5 Una composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de la sal y al menos un agente cardiovascular adicional en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se contempla adicionalmente que la combinación de la invención puede proporcionarse como un kit que comprende, en un envase individual, la sal en una composición farmacéutica, y al menos una composición farmacéutica separada que comprende un agente cardiovascular.

10 **Descripción detallada:**

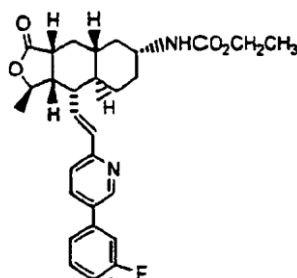
Como se usa anteriormente, y en toda la memoria descriptiva, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique en contra, tienen los siguientes significados:

"Sujeto" incluye tanto animales mamíferos como no mamíferos.

"Mamífero" incluye seres humanos y otros animales mamíferos.

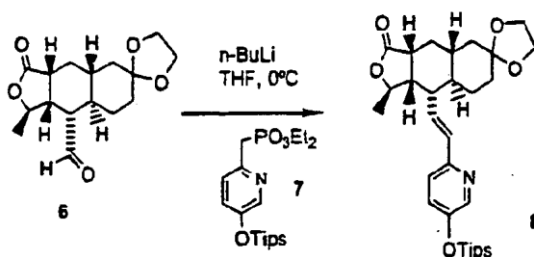
- 15 Lo siguiente son ejemplos para preparar el compuesto reivindicado. En los ejemplos, se usan las siguientes abreviaturas: Et (etilo); Me (metilo); Pr (propilo); Ac (acetilo); ta (temperatura ambiente); PTLC (cromatografía preparativa de capa fina); THF (tetrahidrofurano); TBAF (fluoruro de tetra-*n*-butilamonio); Tips (triiisopropilsililo); y Tf (trifluorometanosulfonilo).

Ejemplo 2



20

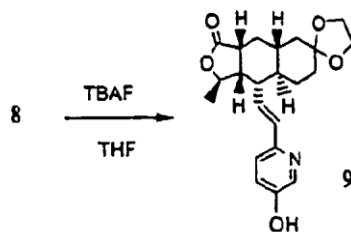
Etapa 1:



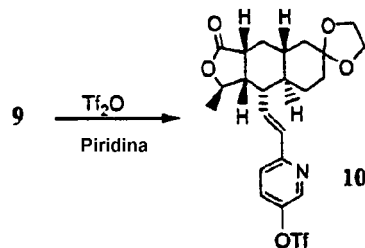
25

El fosfonato **7**, descrito en el documento US 6.063.847, (3,27 g, 8,1 mmol) se disolvió en THF (12 ml) y se enfrió a 0°C seguido de la adición de *n*-BuLi 2,5 M (3,2 ml, 8,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 10 min y se calentó hasta la ta. A la mezcla de reacción se le añadió una solución del aldehído **6**, descrito en el documento US 6.063.847, en THF (12 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min. El tratamiento acuoso convencional seguido de cromatografía en columna (EtOAc al 30-50% en hexano) proporcionó el producto **8**. RMN ¹H (CDCl₃): δ 0,92-1,38 (m, 31H), 1,41 (d, J = 6 Hz, 3H), 1,40-1,55 (m, 2H), 1,70-1,80 (m, 2H), 1,81-1,90 (m, 2H), 2,36 (m, 2H), 2,69 (m, 1H), 3,89 (m, 4H), 4,75 (m, 1H), 6,28-6,41 (m, 2H), 7,05-7,15 (m, 2H), 8,19 (s a, 1H).

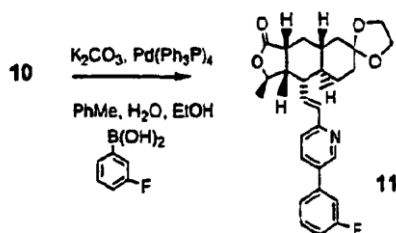
30

Etapa 2:

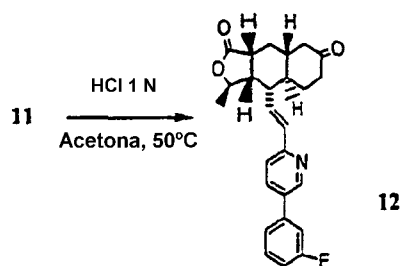
5 El compuesto **8** (2,64 g, 4,8 mmol) se disolvió en THF (48 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C seguido de la adición de TBAF 1 M (4,8 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 5 min seguido de tratamiento acuoso convencional. La cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexano) proporcionó el producto **9** (1,9 g, 100%). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,15-1,55 (m, 6H), 1,41 (d, J = 6 Hz, 3H), 1,70-1,82 (m, 3H), 1,85-1,90 (m, 1H), 2,36 (m, 2H), 2,69 (m, 1H), 3,91 (m, 4H), 4,75 (m, 1H), 6,18-6,45 (m, 2H), 7,19 (s a, 2H), 8,19 (s a, 1H).

Etapa 3:

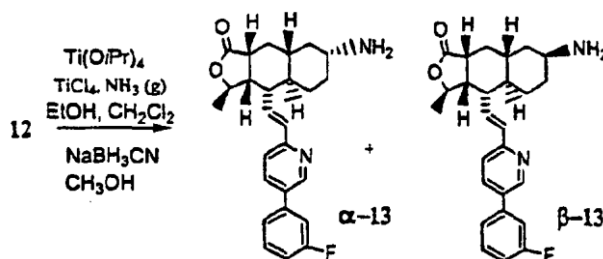
10 A una solución del compuesto **9** (250 mg, 0,65 mmol) en piridina (5 ml) enfriada a 0°C se le añadió Tf₂O (295 µl, 2,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a ta. El tratamiento acuoso convencional seguido de cromatografía en columna proporcionó el producto **10** (270 mg, 80%). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,15-1,55 (m, 6H), 1,41 (d, J = 6 Hz, 3H), 1,70-1,82 (m, 3H), 1,85-1,90 (m, 1H), 2,36 (m, 2H), 2,69 (m, 1H), 3,91 (m, 4H), 4,75 (m, 1H), 6,42-6,68 (m, 2H), 7,25 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 8,49 (d, J = 2,8 Hz, 1H).

Etapa 4:

20 El compuesto **10** (560 mg, 1,1 mmol), ácido 3-fluorofenil borónico (180 mg, 1,3 mmol) y K₂CO₃ (500 mg, 3,6 mmol) se mezclaron con tolueno (4,4 ml), H₂O (1,5 ml) y EtOH (0,7 ml) en un tubo cerrado herméticamente. En una atmósfera de N₂, se añadió Pd(PPh₃)₄ (110 mg, 0,13 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 2 h en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se enfrió a ta, se vertió a EtOAc (30 ml) y se lavó con agua (2 x 20 ml). La solución de EtOAc se secó con NaHCO₃ y se concentró a presión reducida, dando un residuo. La separación por TLC preparativa del residuo (EtOAc al 50% en hexano) proporcionó el producto **11** (445 mg, 89%). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,15-1,59 (m, 6H), 1,43 (d, J = 6 Hz, 3H), 1,70-1,79 (m, 2H), 1,82 (m, 1H), 1,91 (m, 2H), 2,41 (m, 2H), 2,69 (m, 1H), 3,91 (m, 4H), 4,75 (m, 1H), 6,52-6,68 (m, 2H), 7,15 (m, 1H), 7,22 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,44 (m, 1H), 7,81 (m, 1H), 8,77 (d, J = 1,2 Hz, 1H).

Etapa 5:

5 El compuesto **11** (445 mg, 0,96 mmol) se disolvió en una mezcla de acetona (10 ml) y HCl 1 N (10 ml). La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 1 h. El tratamiento acuoso convencional seguida de separación por TLC preparativa (EtOAc al 50% en hexano) proporcionó el producto **12** (356 mg, 89%). RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,21-1,45 (m, 2H), 1,47 (d, J = 5,6 Hz, 3H), 1,58-1,65 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 2,18-2,28 (m, 2H), 2,35-2,51 (m, 5H), 2,71 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 6,52-6,68 (m, 2H), 7,15 (m, 1H), 7,22 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,44 (m, 1H), 7,81 (m, 1H), 8,77 (d, J = 1,2 Hz, 1H).

Etapa 6:

10

15 El compuesto **12** (500 mg, 4,2 mmol) se disolvió en EtOH (40 ml) y CH₂Cl₂ (15 ml) y se burbujeó NH₃ (g) en la solución durante 5 min. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C seguido de la adición de Ti(OiPr)₄ (1,89 ml, 6,3 mmol). Después de agitar a 0°C durante 1 h, se añadió TiCl₄ 1 M (6,3 ml, 6,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 45 min y se concentró a sequedad a presión reducida. El residuo se disolvió en CH₃OH (10 ml) y se añadió NaBH₃CN (510 mg, 8 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a ta. La mezcla de reacción se vertió a NaOH 1 N (100 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). La fase orgánica se combinó y se secó con NaHCO₃. La retirada del disolvente y la separación por PTLC (NH₃ 2 M al 5% en CH₃OH/CH₂Cl₂) proporcionaron β-**13** (salpicadura 1, 30 mg, 6%) y α-**13** (salpicadura 2, 98 mg, 20%). β-**13**: RMN ¹H (CDCl₃): δ 1,50-1,38 (m, 5H), 1,42 (d, J = 6 Hz, 3H), 1,51-1,75 (m, 5H), 1,84 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 2,45 (m, 1H), 3,38 (s a, 1H), 4,78 (m, 1H), 6,59 (m, 2H), 7,15 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,36 (m, 1H), 7,42 (m, 1H), 7,82 (m, 1H), 8,77 (d, J = 2 Hz, 1H). α-**13**: RMN ¹H (CDCl₃): δ 0,95 (m, 2H), 1,02-1,35 (m, 6H), 1,41 (d, J = 6 Hz, 3H), 1,82-1,95 (m, 4H), 2,37 (m, 2H), 2,69 (m, 2H), 4,71 (m, 1H), 6,7 (m, 2H), 7,11 (m, 1H), 7,25 (m, 2H), 7,38 (m, 1H), 7,42 (m, 1H), 7,80 (m, 1H), 8,76 (d, J = 1,6 Hz, 1H).

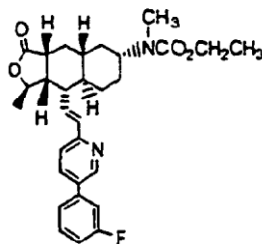
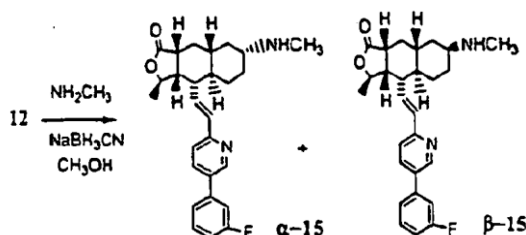
20

Etapa 7:

25 El compuesto α-**13** (300 mg, 0,71 mmol) se disolvió en CH₂Cl₂ (10 ml) seguido de la adición de Et₃N (0,9 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió cloroformiato de etilo (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 1 h. La mezcla de reacción se separó directamente por TLC preparativa (EtOAc/hexano, 1:1), dando el compuesto del título (**14**) (300 mg, 86%). EM m/z 493 (M+1). EMAR Calc. para C₂₉H₃₄N₂O₄F (M+1): 493,2503, observado 493,2509.

Ejemplo 2A

30 Compuesto de N-metilo para comparación

**Etapa 1:**

El compuesto **12** (130 mg, 0,31 mmol) se disolvió en CH_3NH_2 2,0 M en CH_3OH (5 ml, 10 mmol). Después de agitar a ta durante 5 min, se añadió NaCNBH_3 (40 mg, 0,62 mmol). La mezcla de reacción se agitó a ta durante una noche. La retirada del disolvente seguida de separación por PTLC (NH_3 1 M al 7% en $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) proporcionó β -**15** (salpicadura 1, 20 mg, 15%) y α -**15** (salpicadura 2, 25 mg, 19%). β -**15**: RMN ^1H (CDCl_3): δ 1,15-1,25 (m, 5H), 1,42 (m, 3H), 1,42-1,61 (m, 2H), 1,75-1,90 (m, 3H), 2,25-2,45 (m, 2H), 2,41 (s, 3H), 2,70 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 4,75 (m, 1H), 6,51-6,61 (m, 2H), 7,11 (m, 1H), 7,23-7,27 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,80 (m, 1H), 8,76 (d, J = 2,4 Hz, 1H). α -**15**: RMN ^1H (CDCl_3): δ 0,90 (m, 2H), 1,10-1,35 (m, 5H), 1,41 (d, J = 5,6 Hz, 3H), 1,82-2,01 (m, 4H), 2,36 (m, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,55-2,65 (br s, 1H), 2,71 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 6,51-6,63 (m, 2H), 7,08 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,34 (m, 1H), 7,42 (m, 1H), 7,81 (m, 1H), 8,76 (d, J = 2,0 Hz, 1H).

Etapa 2:

El compuesto α -**15** (25 mg, 0,06 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (5 ml) seguido de la adición de Et_3N (0,2 ml). La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió clorocarbonato de etilo (0,1 ml). La mezcla de reacción se agitó a ta durante 1 h. La mezcla de reacción se separó directamente por TLC preparativa ($\text{EtOAc}/\text{hexano}$, 1:1), dando el compuesto del título (25 mg, 85%). EM m/z 507 (M+1). EMAR Calc. para $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{F}$ (M+1): 507,2659, observado 507,2652.

Para preparar las composiciones farmacéuticas a partir de la sal de la invención, los vehículos inertes farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, obleas y supositorios. Los polvos y comprimidos pueden comprender de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 95 por ciento de principio activo. Se conocen en la técnica vehículos sólidos adecuados, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar o lactosa. Pueden usarse comprimidos, polvos, obleas y cápsulas como formas de dosificación sólidas para la administración oral. Pueden encontrarse ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables y procedimientos de fabricación para diversas composiciones en A. Gennaro (ed.), *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª Edición, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, (2000).

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Como un ejemplo pueden mencionarse soluciones de agua o propilenglicol-agua para inyección parenteral o adición de edulcorantes u opacificantes para soluciones, suspensiones y emulsiones orales. Las preparaciones en forma líquida también pueden incluir soluciones para la administración intranasal.

Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir soluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un gas inerte comprimido, por ejemplo nitrógeno.

También se incluyen preparaciones en forma sólida que están destinadas a transformarse, inmediatamente antes del uso, en preparaciones en forma líquida para la administración oral o parenteral. Dichas formas líquidas incluyen

soluciones, suspensiones y emulsiones.

La sal de la invención también puede administrarse por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas puede estar en forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones y pueden incluirse en un parche transdérmico de tipo matriz o depósito como es habitual en la técnica para este fin.

5 Preferentemente la sal se administra por vía oral.

Preferentemente, la preparación farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias adecuadamente dimensionadas que contienen cantidades apropiadas del componente activo, por ejemplo, una cantidad eficaz para conseguir el fin deseado.

10 La dosis diaria de la sal de la presente invención, para el tratamiento de una enfermedad o afección indicada anteriormente, es de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg. Para un peso corporal promedio de 70 kg, el nivel de dosificación es, por lo tanto, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 700 mg de fármaco por día, proporcionándose en una sola dosis o en 2-4 dosis divididas.

15 La cantidad y frecuencia de administración de la sal de la presente invención se regulará de acuerdo con el criterio del médico tratante considerando factores tales como edad, afección y estatura del paciente así como la gravedad de los síntomas que van a tratarse.

20 Otras realizaciones de la invención incluyen la administración de la sal junto con al menos un agente cardiovascular adicional. El agente cardiovascular adicional contemplado es uno que difiere de la sal en su composición atómica o disposición. Los agentes cardiovasculares adicionales que pueden usarse en combinación con los compuestos novedosos de la presente invención incluyen fármacos que tienen actividad antitrombótica, de agregación antiplaquetaria, antiaterosclerótica, antireestenótica y/o anticoagulante. Dichos fármacos son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la trombosis, que incluyen trombosis, aterosclerosis, reestenosis, hipertensión, angina de pecho, arritmia, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, glomerulonefritis, ictus trombótico y tromboembólico, enfermedades periféricas vasculares, otras enfermedades cardiovasculares, isquemia cerebral, trastornos inflamatorios y cáncer, así como otras enfermedades en las que la trombina y su receptor desempeñan una función patológica. Los agentes cardiovasculares adecuados se seleccionan del grupo que consisten en inhibidores de la biosíntesis de tromboxano A2 tales como aspirina; antagonistas de tromboxano tales como seratrodist, picotamida y ramatrobán; inhibidores de adenosina difosfato (ADP) tales como clopidogrel; inhibidores de ciclooxigenasa tales como aspirina, meloxicam, rofecoxib y celecoxib; antagonistas de angiotensina tales como valsartan, telmisartan, candesartan, irbesartan, losartan y eprosartan; antagonistas de endotelina tales como tezosentan; inhibidores de la fosfodiesterasa tales como milrinona y enoximona; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) tales como captopril, enalapril, enalaprilat, espirapril, quinapril, perindopril, ramipril, fosinopril, trandolapril, lisinopril, moexipril y benazapril; inhibidores de endopeptidasa neutros tales como candoxatril y ecadotril; anticoagulantes tales como ximelagatran, fondaparín y enoxaparín; diuréticos tales como clorotiazida, hidroclorotiazida, ácido etacrínico, furosemida y amilorida; inhibidores de la agregación plaquetaria tales como abciximab y eptifibatide; y antagonistas de GP IIb/IIIa.

30

35

Los tipos preferidos de fármacos para su uso en combinación con la sal de la presente invención son inhibidores de la biosíntesis de tromboxano A2, inhibidores de ciclooxigenasa y antagonistas de ADP. Para su uso en las composiciones, se prefiere especialmente, la aspirina y el bisulfato de clopidogrel.

40 Cuando la presente invención comprende una combinación de la sal y otro agente cardiovascular, los dos componentes activos pueden coadministrarse simultánea o secuencialmente, o puede administrarse una sola composición farmacéutica que comprenda la sal y otro agente cardiovascular en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los componentes de la combinación pueden administrarse individualmente o juntos en cualquier forma de dosificación convencional tal como una cápsula, comprimido, polvo, oblea, suspensión, solución, supositorio, pulverización nasal, etc. La dosificación del agente cardiovascular puede determinarse a partir del material publicado y puede variar de 1 a 1000 mg por dosis.

45

La expresión "uno o más agentes cardiovasculares adicionales" significa que, en combinación con la sal, pueden administrarse de uno a tres fármacos adicionales; preferentemente, se administra un compuesto adicional en combinación con la sal. Los agentes cardiovasculares adicionales pueden administrarse secuencial o simultáneamente con respecto a la sal.

50

Cuando la sal y los otros agentes cardiovascular se administran como composiciones individuales, estas pueden proporcionarse en un kit incluido en un solo envase, un recipiente que comprende la sal en un vehículo farmacéuticamente aceptable y un envase distinto que incluye otro agente cardiovascular en un vehículo

farmacéuticamente aceptable, presentándose la sal y el otro agente cardiovascular en cantidades de manera que la combinación sea terapéuticamente eficaz. Un kit es ventajoso para administrar una combinación cuando, por ejemplo, los componentes deben administrarse a diferentes intervalos de tiempo o cuando están en diferentes formas de dosificación.

- 5 La actividad de la sal puede determinarse mediante los siguientes procedimientos.

Procedimiento de ensayo *in vitro* para antagonistas de receptor de trombina:

Preparación de [³H]ha TRAP

10 Se suspendieron A(pF-F)R(ChA)(hR)(I₂-Y)-NH₂ (1,03 mg) y Pd/C al 10% (5,07 mg) en DMF (250 µl) y diisopropiletilamina (10 µl). Se unió el recipiente a la línea de tritio, se congeló en nitrógeno líquido y se evacuó. Después se añadió gas de tritio (342 mCi) al matraz, que se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez completada la reacción, se eliminó el exceso de tritio y se diluyó la solución de péptido en reacción con DMF (0,5 ml) y se filtró para eliminar el catalizador. La solución en DMF recogida del péptido en bruto se diluyó con agua y se liofilizó para eliminar el tritio inestable. El péptido sólido se redisolvió en agua y se repitió el proceso de liofilización. El péptido tritiado ([³H]ha TRAP) se disolvió en 0,5 ml de TFA acuoso al 0,1% y se purificó por HPLC usando las siguientes condiciones: columna, Vydac C18, 25 cm x 9,4 mm I.D.; fase móvil, (A) TFA al 0,1% en agua, (B) TFA al 0,1% en CH₃CN; gradiente, (A/B) de 100/0 a 40/60 durante 30 min; caudal, 5 ml/min; detección, UV a 215 nm. La pureza radioquímica de [³H]ha TRAP fue de 99% tal como se analizó por HPLC. Se obtuvo un lote de 14,9 mCi a una actividad específica de 18,4 Ci/mmol.

Preparación de membranas de plaquetas

20 Se prepararon membranas de plaquetas usando una modificación del procedimiento de Natarajan y col. (Natarajan y col., Int. J. Peptide Protein Res., vol. 45, págs. 145-151 (1995) a partir de 20 unidades de concentrados de plaquetas obtenidas del North Jersey Blood Center (East Orange, N.J.) en el curso de 48 horas desde la recogida. Todas las etapas se realizaron a 4 °C en condiciones de seguridad contra riesgos biológicos aprobadas. Las plaquetas se centrifugaron a 100 x g durante 20 minutos a 4 °C para eliminar los eritrocitos. Los sobrenadantes se decantaron y se centrifugaron a 3000 x g durante 15 minutos hasta sedimentar las plaquetas. Las plaquetas se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, hasta un volumen total de 200 ml y se centrifugó a 4400 x g durante 10 minutos. Esta etapa se repitió dos veces más. Las plaquetas se resuspendieron en Tris-HCl 5 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM hasta un volumen final de aproximadamente 30 ml y se homogeneizaron con 20 impulsos en un homogeneizador Dounce. Las membranas se sedimentaron a 41.000 x g, se resuspendieron en 40-50 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, ditiotreitolo 0,1 mM, se congelaron 10 ml de alícuotas en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C. Para completar la preparación de las membranas, las alícuotas se descongelaron, se agruparon y se homogeneizaron con 5 impulsos en un homogeneizador Dounce. Las membranas se sedimentaron y se lavaron 3 veces en trietanolamina-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM y se resuspendieron en 20-25 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, EGTA 1 mM y DMSO al 1%. Las alícuotas de las membranas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C. Las membranas fueron estables durante al menos 3 meses. 20 unidades de concentrados de plaquetas produjeron típicamente 250 mg de proteína de membrana. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo de Lowry (Lowry y col., J. Biol. Chem., vol. 193, págs. 265-275 (1951)).

Ensayo de unión de alto rendimiento de radioligando de receptor de trombina

40 Se exploraron antagonistas de receptor de trombina usando una modificación del ensayo de unión de radioligando de receptor de trombina de Ahn y col. (Ahn y col., Mol. Pharmacol., vol. 51, págs. 350-356 (1997)). El ensayo se realizó en placas Nunc de 96 pocillos (Cat. N° 269620) a un volumen de ensayo final de 200 µl. Las membranas de plaqueta y el [³H]ha TRAP se diluyeron hasta 0,4 mg/ml y 22,2 nM, respectivamente, en tampón de unión (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, EGTA 1 mM, BSA al 0,1%). Adicionalmente, se diluyeron soluciones de reserva (10 mM en 100% e DMSO) de compuestos de ensayo en DMSO al 100%. A menos que se indique otra cosa, a cada pocillo se añadieron 10 µl de soluciones del compuesto diluido y 90 µl de radioligando (una concentración final de 10 nM en DMSO al 5%) y se comenzó la reacción por adición de 100 µl de membranas (40 µg proteína/pocillo). La unión no se inhibió significativamente con DMSO al 5%. Los compuestos se ensayaron en tres concentraciones (0,1, 1 y 10 µM). Las placas se cubrieron y se mezclaron con cuidado con agitación vorticial en una agitadora de placa de valoración Lab-Line durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas en filtro Packard UniFilter GF/C se sumergieron durante al menos 1 hora en polietileneimina al 0,1%. Las membranas incubadas se recogieron usando un Colector Universal Packard FilterMate y se lavaron rápidamente cuatro veces y se enfriaron con 300 µl de Tris-HCl 50 mM enfriado con hielo, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, EGTA 1 mM. Se añadió un cóctel de escintilación (25 µl) MicroScint 20 a cada pocillo y se realizó un recuento de las placas en un contador de escintilación de microplaca Packard TopCount. La unión específica se definió como la unión total menos la unión no específica observada en presencia de un exceso de haTRAP no marcado (50 µM). El % de Inhibición a través del compuesto de la unión de

[³H]ha TRAP a receptores de trombina se calculó según la siguiente relación:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\text{Unión Total} - \text{Unión en presencia de un compuesto de ensayo}}{\text{Unión total} - \text{unión no específica}} \times 100$$

Después se determinaron los valores de afinidad (K_i) usando la siguiente fórmula:

$$K_i = \frac{CI_{50}}{1 + \left[\frac{\text{concentración de radioligando}}{\text{afinidad } (K_D) \text{ de radioligando}} \right]}$$

5 Por lo tanto, un valor menor de K_i indica mayor afinidad de unión.

Materiales

La compañía AnaSpec Inc. (San José, CA) realizó la síntesis adaptada de A(pF-F)R(ChA)(hR)Y-NH₂ y A(pF-F)R(ChA)(hR)(I₂-Y)-NH₂. La pureza de estos péptidos fue >95 %. Se adquirió gas tritio (97%) de EG Mound, Miamisburg Ohio. A continuación se cargó el gas y se almacenó en un Trisorber IN/US Systems Inc.. Se obtuvo un cóctel de escintilación MicroScint 20 de Packard Instrument Co.

Protocolo para la agregación de plaquetas ex vivo en sangre entera de cinomolgo

Administración de fármaco y extracción de sangre:

Se permite la adaptación de monos cinomolgos conscientes sentados en sillas durante 30 min. Se inserta un catéter de aguja en la vena braquial para administrar por infusión los fármacos de ensayo. Se inserta otro catéter de aguja en la otra vena braquial o safena y se usa como muestra de sangre. En los experimentos en los que el compuesto se administra por vía oral solamente se usa un catéter. Se recoge una muestra de sangre de referencia (1-2 ml) en tubos vacutainer que contienen un inhibidor de trombina CVS 2139 (100 µg/0,1 ml de solución salina) como anticoagulante. Después se administra el fármaco por vía intravenosa durante un periodo de 30 min. Se extraen muestras de sangre (1 ml) a 5, 10, 20, 30 min durante y 30, 60, 90 min después de terminar la infusión del fármaco. En experimentos PO, a los animales se les administra la dosis con el fármaco usando una cánula esofágica. Se extraen muestras de sangre a 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 min después la administración de la dosis. Se usaron 0,5 ml de sangre para la agregación de sangre entera y los otros 0,5 ml se usaron para determinar la concentración en plasma del fármaco o sus metabolitos. La agregación se realiza inmediatamente después de extraer la muestra de sangre como se describe a continuación.

Agregación de sangre entera:

Se añade una muestra de sangre de 0,5 ml a 0,5 ml de solución salina y se calienta a 37°C en un agregómetro de sangre entera Chronolog. Simultáneamente, se calienta el electrodo de impedancia en solución salina a 37°C. La muestra de sangre se coloca con una varilla de agitación en el pocillo de bloque de calentamiento, el electrodo de impedancia se coloca en la muestra de sangre y se inicia el programa informático de recogida. El programa informático se deja procesar hasta estabilizar la línea de referencia y después se realiza una comprobación de calibración a 20 Ω. 20 Ω equivale a 4 bloques del gráfico producido por el programa informático. Se añade el agonista (haTRAP) con una pipeta de volumen ajustable (5-25 µl) y se registra la curva de agregación durante 10 minutos. La agregación máxima en 6 minutos después de la adición del agonista es el valor registrado.

Procedimiento de agregación de plaquetas in vitro

Se realizaron estudios de agregación de plaquetas de acuerdo con el procedimiento de Bednar y col. B., Condra, C., Gould, R.J., y Connolly, T.M., Throm. Res., vol. 77, págs. 453-463 (1995)). Se obtuvo sangre de sujetos humanos sanos, que no habían tomado ninguna aspirina durante al menos 7 días, por punción en la vena usando ACD como anticoagulante. Se preparó plasma rico en plaquetas por centrifugación a 100 x g durante 15 minutos a 15 grados C. Las plaquetas se centrifugaron a 3000 x g y se lavaron dos veces en solución salina tamponada que contenía EGTA 1 mM y 20 µg/ml de apirasa para inhibir la agregación. La agregación se realizó a temperatura ambiente en solución salina tamponada complementada con 0,2 mg/ml de fibrinógeno humano. El compuesto de ensayo y las plaquetas se preincubaron en placas de fondo plano de 96 pocillos durante 60 minutos. La agregación se inició por adición de haTRAP 0,3 µM o 0,1 U/ml de trombina y la mezcla se sometió a agitación vorticial rápidamente usando un agitador de placa de titulación Lab Line (velocidad 7). El porcentaje de agregación se controló aumentando la transmitancia de la luz a 405 nm en una lectora de Placa Spectromax.

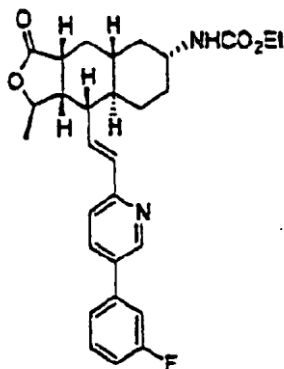
Procedimiento antitumor *in vivo*

Se realizan ensayos en el modelo de carcinoma de mama humano en ratones desnudos de acuerdo con el procedimiento descrito en S. Even-Ram y col., *Nature Medicine*, 4, 8, págs. 909-914 (1988).

5 La sal de la presente invención es sorprendentemente activa en el modelo de ensayo de agregación de plaquetas *ex vivo*. En estos estudios, el compuesto de Ejemplo 2 de la presente invención, después de la administración oral a dosis de 0,1 mg/kg, inhibió completamente la agregación de plaquetas inducida por péptido activador de receptor de trombina añadido exógenamente durante un periodo de 24 horas. Incluso después de 48 horas, se mantuvo aproximadamente un 65% de la inhibición de la agregación de plaquetas. En cambio, se estudiaron análogos de N-
10 alquil carbamato, Ejemplos 1A, 2A y 13 del documento US 6.063.847, en condiciones similares usando una dosis de 0,5 mg/kg, un aumento 5 veces mayor que la dosis del compuesto del Ejemplo 2. En estas condiciones, los compuestos N-alquilo no demostraron ninguna inhibición significativa de la agregación de plaquetas en diversos puntos de tiempo.

REIVINDICACIONES

1. La sal bisulfato del compuesto:



2. La sal bisulfato de la reivindicación 1, para su uso como un medicamento.

3. La sal bisulfato de la reivindicación 1, para su uso en la inhibición de receptores de trombina en un mamífero.

5 4. La sal bisulfato de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de trombosis, aterosclerosis, reestenosis, hipertensión, angina de pecho, arritmia, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, glomerulonefritis, ictus trombótico, ictus tromboembólico, enfermedad vascular periférica, trastornos inflamatorios, isquemia cerebral o cáncer.

5. La sal bisulfato de la reivindicación 4, para su co-administración con un agente cardiovascular adicional.

10 6. La sal bisulfato de la reivindicación 5, en la que el agente cardiovascular adicional se selecciona entre el grupo que consiste en inhibidores de la biosíntesis de tromboxano A₂, antagonistas de GP IIb/IIIa, antagonistas de tromboxano, inhibidores de adenosina difosfato, inhibidores de ciclooxigenasa, antagonistas de angiotensina, antagonistas de endotelina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, inhibidores de endopeptidasa neutra, anticoagulantes, diuréticos e inhibidores de la agregación plaquetaria.

15 7. La sal bisulfato de la reivindicación 6, en la que el agente cardiovascular adicional es aspirina o bisulfato de clopidogrel.