



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 011**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)
C07H 15/26 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06807029 .1**
96 Fecha de presentación : **06.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1991271**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2008**

54 Título: **Inhibidores duales antitrombóticos anticoagulantes que comprenden una marca de biotina.**

30 Prioridad: **10.10.2005 EP 05109403**
25.10.2005 EP 05109962

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2011

73 Titular/es: **N.V. Organon**
Kloosterstraat 6
5349 AB Oss, NL

72 Inventor/es: **De Kort, Martin;**
Van Boeckel, Constant, Adriaan, Anton y
Nicholson, Charles, David

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 362 011 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

Inhibidores duales antitrombóticos anticoagulantes que comprenden una marca de biotina.

- 5 La presente invención hace referencia a nuevos inhibidores duales antitrombóticos que comprenden una marca de biotina, a un procedimiento para su preparación, a las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos como ingredientes activos, así como al uso de dichos compuestos para la fabricación de medicamentos.

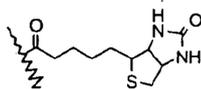
10 El reciente progreso en la investigación de antagonistas de GPIIb/IIIa que tienen un efecto antitrombótico predecible, preferiblemente con una vida media más larga (para lograr niveles constantes de inhibición de la agregación plaquetaria), ha dado como resultado nuevos inhibidores duales antitrombóticos que tienen un perfil farmacológico mixto. Estos nuevos compuestos inhiben dos dianas clave tanto en la cascada de coagulación (factor Xa) como en la ruta de agregación plaquetaria (GpIIb/IIIa) (descrita en el documento EP 1574516).

15 Como medida preventiva, en el campo de la terapia anticoagulante y anti-trombótica, existe la necesidad de un antídoto que sea capaz de neutralizar eficazmente o minimizar la actividad del fármaco anticoagulante o anti-aterotrombótico utilizado. Esto es porque es bien sabido que se puede desencadenar una hemorragia en un paciente en tratamiento por cualquier causa accidental. Adicionalmente, puede ser necesario intervenir quirúrgicamente en un paciente en tratamiento con anti-aterotrombótico o anticoagulante. Además, durante algunos procedimientos quirúrgicos, se pueden utilizar anticoagulantes a una dosis elevada con el fin de prevenir la coagulación de la sangre y es necesario neutralizarlos al finalizar la operación. Adicionalmente, todavía no se encuentran disponibles antídotos clínicamente eficaces en la terapia anti-plaquetaria en la que se utilizan inhibidores de GpIIb/IIIa. Por lo tanto resulta ventajoso tener agentes anti-aterotrombóticos y/o anticoagulantes disponibles que puedan ser neutralizados con el fin de detener la actividad anti-aterotrombótica y/o anticoagulante en cualquier momento.

20 En el documento US 2004/0024197 (WO02/24754) se describe que, en caso de emergencia, se puede reducir parcialmente la actividad anticoagulante de ciertos polisacáridos utilizando avidina, si esos polisacáridos contienen al menos un enlace covalente con biotina o un derivado de biotina.

30 O. Roger et al. en Carbohydrate Polymers 50 (2002) 273-278 comentan la derivatización de carbohidratos por medio de la aminación reductora, incluyendo agentes de biotinilación. La descripción hace referencia a la modificación no selectiva de polisacáridos naturales polidispersos.

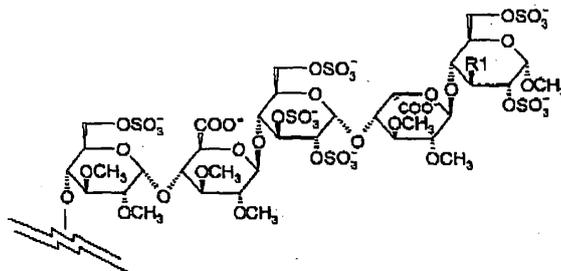
35 La presente invención hace referencia a inhibidores duales neutralizables novedosos derivados de los inhibidores duales descritos en el documento EP 1574516. Se ha descubierto que una cierta "marca" de biotina, que es el grupo



40 también referido en este documento como "BT" (derivado de ácido hexahidro-2-oxo-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-pentanoico, preferiblemente el isómero D(+)) o uno de sus análogos, puede ser anclado a o introducido en la estructura de los compuestos descritos en el documento EP 1574516, dando como resultado inhibidores duales neutralizables.

De este modo, la presente invención hace referencia a compuestos de fórmula (I)

45 oligosacárido-espaciador-antagonista de GpIIb/IIIa (I), donde el oligosacárido es un residuo pentasacárido cargado negativamente de Fórmula B



(B),

donde R1 es OCH₃ u OSO₃⁻, estando compensada la carga por contraiones cargados positivamente;

el espaciador es un residuo conector esencialmente farmacológicamente inactivo;

50 el antagonista de GpIIb/IIIa es un residuo derivado de tirofiban (MK 383); o una de sus sales farmacéuticamente aceptables;

donde el espaciador del compuesto de fórmula I comprende un enlace covalente con una marca de biotina.

Los compuestos de la invención son agentes antitrombóticos eficaces tanto por la inhibición mediada por ATIII-del factor de coagulación Xa como por la inhibición de la agregación plaquetaria suscitando antagonismo en la unión del fibrinógeno a su receptor. Son útiles para tratar y (posiblemente) para prevenir enfermedades trombóticas. Esto incluye numerosos estados trombóticos y protrombóticos en los que se activa la cascada de coagulación, que incluyen – pero no están limitados a – trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, tromboflebitis, oclusión arterial a partir de trombosis o embolia, re-oclusión arterial durante o después de angioplastia, restenosis siguiente a lesión arterial o procedimientos cardiológicos invasivos, trombosis o embolia venosa postoperatoria, apoplejía e infarto de miocardio.

La marca de biotina en los compuestos de la presente invención es rápidamente reconocida por y unida a un antídoto específico, que es la avidina (The Merck Index, Decimosegunda edición, 1996, M.N. 920, páginas 151-152) o estreptavidina, dos proteínas tetraméricas con sus respectivas masas iguales a aproximadamente 66.000 y 60.000 Da que tienen una afinidad muy elevada por la biotina. De este modo, en una situación de emergencia, la acción del inhibidor dual de esta invención puede ser fácilmente neutralizada utilizando avidina o estreptavidina, por ejemplo mediante inyección de una disolución farmacéutica que las contiene. Los análogos de avidina y estreptavidina que tienen elevada afinidad por la biotina se pueden utilizar de un modo similar. El complejo antídoto-inhibidor inactivo resultante es aclarado de la circulación sanguínea.

Se ha descubierto en estudios comparativos con los correspondientes compuestos no biotinilados que la introducción de una marca de biotina en los inhibidores duales no interfiere en su actividad inhibidora de la agregación plaquetaria ni en su potencia anti-Xa mediada por anti-trombina III (AT-III). Además, la administración de avidina o estreptavidina conduce a una neutralización rápida y hasta cuantitativa de la actividad antitrombótica de los compuestos de fórmula I.

Las marcas de biotina, que se pueden utilizar de acuerdo con esta invención, se pueden seleccionar entre, los análogos de biotina mostrados en el catálogo Pierce, 1999-2000, páginas 62 a 81, por ejemplo 6-biotinamidohexanoato, 6-(6-biotinamidohexanamido)hexanoato, y 2-biotinamidoetanotiol, etc. En tales análogos la marca de biotina **BT**, como se ha definido previamente, es una parte característica de la estructura. Otros análogos son por ejemplo las marcas de biotina que están alquiladas en el enlace de biotinamida (donde el alquilo es alquilo C₁-C₄, preferiblemente metilo), que son estables frente a la escisión con biotinidasa, u otras marcas de biotina que comprenden por ejemplo un hidroximetileno, carboxilato, o acetato alfa hacia el enlace de la biotinamida.

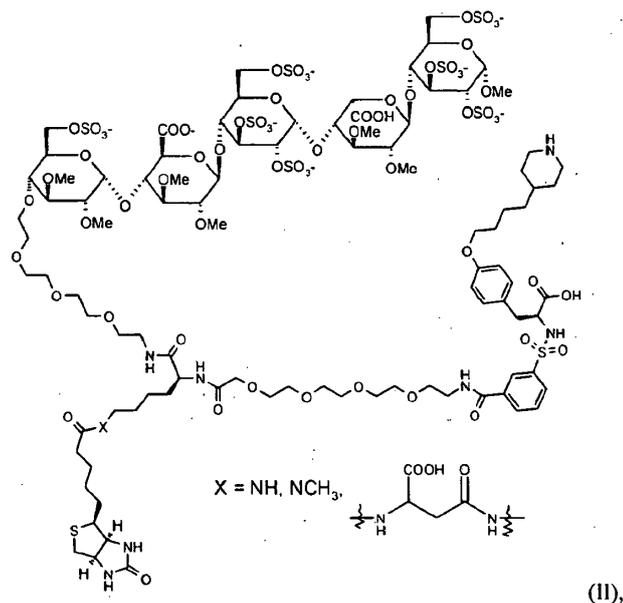
Las marcas de biotina preferidas tienen la fórmula $-(\text{NH-CO})_n-(\text{CH}_2)_p-\text{X-BT}$, donde n es 0 o 1, p es 4 o 5, X = NH, N-alquilo C₁-C₄, -NH-CH(CH₂OH)-CH₂-C(O)-NH-, -NH-CH(CH₃)-CH₂-C(O)-NH-, -NH-CH(COOH)-CH₂-C(O)-NH-, -NH-CH(CH₂COOH)-CH₂-C(O)-NH-, y **BT** se define como antes.

El espaciador es un enlace o un residuo de conexión flexible, esencialmente farmacológicamente inactivo. El término "esencialmente farmacológicamente inactiva" según se utiliza en la presente memoria significa que el espaciador no contiene átomos o grupos que muestran actividad farmacológica *per se* a las dosis a las cuales los compuestos de la invención son terapéuticamente eficaces. De este modo, a las dosis a las cuales los compuestos de la presente invención se utilizan como antitrombóticos, la naturaleza del espaciador no conduce a efectos secundarios farmacológicos demostrables. En las realizaciones preferidas el espaciador es un residuo de conexión esencialmente farmacológicamente inactivo, que tiene preferiblemente de 1 a 50 átomos contados a lo largo de la "cadena principal" del espaciador, sin incluir el oxígeno del residuo oligosacárido. El espaciador puede comprender (algunos) elementos rígidos, tales como estructuras anulares y enlaces insaturados. El espaciador de los compuestos de la invención es preferiblemente flexible. Los espaciadores adecuados pueden ser fácilmente diseñados por un experto en la técnica. Una longitud del espaciador más preferida es de 10 a 35 átomos, en particular de 10 a 8. Por razones de síntesis, los espaciadores más largos se consideran menos adecuados, no obstante, los espaciadores más largos todavía se pueden aplicar con éxito en compuestos de la presente invención. Los espaciadores muy adecuados comprenden al menos un elemento $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$. Los espaciadores más preferidos comprenden, más preferiblemente seis elementos $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})-$. El sitio de anclaje del espaciador con respecto al residuo antagonista de GpIIb/IIIa se puede seleccionar esencialmente de manera arbitraria, siempre que no se anule la actividad antagonista de GpIIb/IIIa. De este modo, el radical carboxilato típicamente presente (opcionalmente esterificado) y el radical alcalino deben permanecer no afectados.

Los compuestos de acuerdo con la invención comprenden un enlace covalente con una marca de biotina.

El compuesto de acuerdo con la invención comprende un enlace covalente con una marca de biotina donde el espaciador del compuesto de fórmula I comprende un enlace covalente con una marca de biotina de fórmula $-(\text{CH}_2)_4-\text{X-BT}$, donde X y **BT** se definen como antes.

Los ejemplos representativos de los inhibidores duales biotinilados de la presente invención tienen las estructuras



y Los compuestos de fórmula II son ejemplos preferidos de esta invención.

5 Un contraión cargado positivamente representa H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Preferiblemente los compuestos de fórmula 1 se encuentran en forma de su sal de sodio.

El término radical alcalino representa cualquier radical alcalino conocido, tal como una amina, amidina, guanidina, piperidina.

10 Con la expresión "a una distancia de 10 a 20 Å entre si" la orientación espacial de los dos grupos con respecto a otro se quiere significar, no solamente medida a lo largo de los enlaces. Las técnicas de modelado bien conocidas se encuentran disponibles para los expertos en la técnica para la determinación de la distancia. (Véase por ejemplo J. Med. Chem. 1994, 37, 2537-2551).

15 El término alquilo C1-C8 representa un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, hexilo y octilo. Metilo y etilo son los grupos alquilo preferidos.

En el término alcoxi C1-C8, el residuo alquilo se define como antes.

20 El término "profármaco" representa un compuesto que es metabolizado en el organismo al compuesto activo, p. ej. un compuesto en el que el radical alcalino (tal como un grupo amino o benzamidino) del residuo antagonista de GPIIb/IIIa del compuesto de fórmula I está protegido, p. ej. por medio de un grupo hidroxilo, alcoxi C₁-C₆ o alcoxi(C₁-C₆)carbonilo. También son ejemplos de profármacos los compuestos de fórmula I, donde el grupo carboxilato del residuo antagonista de GPIIb/IIIa está esterificado.

25

Los solvatos de acuerdo con la invención incluyen los hidratos.

30 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar modificando opcionalmente los antagonistas de GPIIb/IIIa descritos antes que derivan p. ej., de tirofiban, SR 121566, Ro 435054, RWJ 50042 o SC 54701 (la forma farmacológicamente activa de xemilofiban), lamifiban, o sus análogos, con aminoácidos, peptidomiméticos o grupos funcionales adicionales (p. ej. -COOH, -NH₂, -SH, -OH, -N₃, alquino terminal o similares) utilizando métodos generalmente conocidos en la técnica. Un ejemplo de la síntesis de de semejante análogo de RGD modificado se describe en Bioorganic Chemistry 29, 357-379 (2001), donde se sugiere el compuesto como un vector potencial para

35 la liberación dirigida de fármacos. De acuerdo con la invención, la porción del antagonista de GPIIb/IIIa opcionalmente modificado (a) se acopla directamente a un oligosacárido o (b) se acopla a un oligosacárido-espaciador-residuo o (c) se acopla a un espaciador, que se acopla con posterioridad a un oligosacárido-espaciador-residuo (p. ej. mediante métodos conocidos a partir de los documentos WO 99/65934; WO 01/42262). Se puede utilizar cualquier oligosacárido adecuado para este fin, por ejemplo oligosacáridos conocidos en las publicaciones (p. ej. de los documentos EP 0.454.220 y EP 0.529.715, pero no limitados a esas fuentes) u oligosacáridos asequibles comercialmente. Los oligosacáridos se pueden fosforilar en un momento puntual apropiado mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej. como describen Buijsman, R. et al. (Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999, 9, 2013-2018). El

40

acoplamiento del espaciador al oligosacárido se puede llevar a cabo por ejemplo utilizando los métodos descritos en los documentos EP 0.649.854 o EP 04005343.1.

5 Con respecto al modo en el que la marca de biotina se ancla a los compuestos de fórmula I las publicaciones químicas ofrecen numerosas posibilidades que se pueden utilizar y por medio de las cuales se pueden emplear diferentes conjuntos de grupos protectores bien conocidos por los expertos en la técnica. La marca de biotina, que comprende un grupo reactivo por ejemplo de tipo éster, maleimida, yodoacetilo, o amina primaria activado, reaccionará preferiblemente con un grupo amina funcional, o un grupo funcional tiol, o un grupo funcional ácido carboxílico, o un grupo funcional aldehído, teniendo lugar la reacción de acuerdo con las condiciones descritas en las publicaciones (véase Savage et al., *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*; Pierce Chemical Company, 1992).

15 La marca de biotina se puede introducir por ejemplo por etapas uniéndose primero directamente al residuo del antagonista de GPIIb/IIIa o a través de un grupo funcional amino opcionalmente N-alquilado C1-C4 de una parte del espaciador de fórmula I y/o a través de un grupo funcional amino opcionalmente N-alquilado C1-C4 de parte del espaciador de fórmula I.

20 En otro aspecto de la invención se pueden introducir residuos de aminoácidos opcionalmente N-alquilados o análogos de beta-aminoácidos α -N-sustituídos mediante un acoplamiento peptídico utilizando métodos conocidos en la técnica. El grupo azido es un grupo funcional amino latente adecuado que se puede utilizar en precursores del compuesto de fórmula I para la posterior introducción de la marca de biotina. El acoplamiento peptídico, una etapa procedimental en el método descrito antes para preparar los compuestos de la invención, se puede llevar a cabo mediante métodos comúnmente conocidos en la técnica para el acoplamiento – o la condensación – de fragmentos peptídicos por ejemplo mediante el método de la azida, el método del anhídrido mixto, el método del éster activado, el método de la carbodiimida, o, preferiblemente, bajo la influencia de sales de amonio/uronio como TBTU, especialmente con la adición de compuestos catalíticos y supresores de la racemización como la N-hidroxisuccinimida, el N-hidroxibenzotriazol y el 7-aza-N-hidroxibenzotriazol. Se proporcionan perspectivas generales en *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol 3, E. Gross y J. Meienhofer, eds. (Academic Press, Nueva York, 1981) y *Peptides: Chemistry and Biology*, N. Sewald y H. D. Jakubke (Wiley-VCH, Weinheim, 2002).

30 Las funciones amina presentes en los compuestos pueden ser protegidas durante el procedimiento sintético por medio de un grupo N-protector, que representa un grupo comúnmente utilizado en la química de péptidos para la protección de un grupo α -amino, como el grupo t-butiloxicarbonilo (Boc), el grupo benciloxicarbonilo (Z), el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) o el grupo ftaloilo (Phth), o se pueden introducir desenmascarando un radical azida. Se proporcionan perspectivas generales de los grupos protectores de amino y de los métodos para su eliminación en *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol 3 y *Peptides: Chemistry and Biology*, mencionados antes.

35 Las funciones amidina, si están presentes, se pueden dejar sin proteger en la etapa de acoplamiento, o se pueden proteger utilizando un carbamato tal como aliloxicarbonilo o benciloxicarbonilo. La función amidina se introduce preferiblemente en condiciones suaves utilizando el radical 1,2,4-oxadiazolin-5-ona como precursor.

40 Los grupos ácido carboxílico se pueden proteger por medio de un grupo comúnmente utilizado en la química de péptidos para la protección de un grupo ácido α -carboxílico, tal como un éster t-butílico. Los grupos ácido carboxílico de los antagonistas de GPIIb/IIIa modificado se protegen preferiblemente en forma de un éster bencilico. La eliminación de los grupos protectores puede tener lugar de diferentes maneras, dependiendo de la naturaleza de esos grupos protectores. Normalmente la desprotección tiene lugar en condiciones ácidas y en presencia de captadores o en condiciones reductoras tales como la hidrogenación catalítica.

50 Un requisito previo para la conjugación del antagonista de GPIIb/IIIa con un oligosacárido es la presencia de un grupo de anclaje reactivo ortogonalmente, tal como un grupo carboxilato, que se puede acoplar directamente con un residuo oligosacárido o un derivado de oligosacárido-espaciador o a través de un espaciador con un derivado de oligosacárido-espaciador. Para permitir dicha conjugación, en la mayoría de los casos es necesaria una modificación adicional del antagonista de GPIIb/IIIa.

55 La construcción de las partes integrantes derivadas del espaciador para la síntesis de los compuestos de fórmula I se puede lograr de diferentes maneras utilizando los métodos conocidos en la técnica, ya sea de una manera lineal mediante la introducción por etapas de aminoácidos, sus derivados o peptidomiméticos, ya sea de manera convergente mediante acoplamiento por bloques de los constructos intermedios.

60 Los compuestos de la invención, que pueden existir en forma de una base libre, se pueden aislar de la mezcla de reacción en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden obtener tratando la base libre de fórmula (I) con un ácido orgánico o inorgánico tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, yoduro de hidrógeno, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido maleico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido ascórbico y similares.

Los compuestos de esta invención o los intermedios de los mismos pueden poseer átomos de carbono quirales, y por lo tanto se pueden obtener en forma de un enantiómero puro, o en forma una mezcla de enantiómeros, o en forma de una mezcla que contiene los diastereoisómeros. Los métodos para obtener los enantiómeros puros son bien conocidos en la técnica, p. ej. cristalización de sales que se obtienen a partir de ácidos ópticamente activos y la mezcla racémica, o cromatografía utilizando columnas quirales. Para los diastereoisómeros se pueden utilizar columnas en fase directa o en fase inversa.

Los compuestos de la invención se pueden administrar entéricamente o parenteralmente. La dosis exacta y el régimen de estos compuestos y de las composiciones de los mismos dependerán necesariamente de las necesidades del sujeto individual al cual se está administrando el medicamento, del grado de afección o la necesidad y el criterio del médico. En general la administración parenteral requiere dosis inferiores a las de otros métodos de administración que son más dependientes de la absorción. Sin embargo, las dosificaciones diarias para seres humanos son preferiblemente de 0,0001 a 10 mg por kg de peso corporal, más preferiblemente de 0,001 a 1 mg por kg de peso corporal.

El medicamento manufacturado con los compuestos de esta invención se puede utilizar como coadyuvante en la terapia antitrombótica (aguda). En tal caso, el medicamento se administra con otros compuestos útiles en el tratamiento de dichas dolencias, tales como aspirina, clopidogrel o estatinas. Mezclados con agentes auxiliares farmacéuticamente adecuados, p. ej. como se describe en la referencia habitual, Gennaro et al., Remington's Pharmaceutical Sciences, (18^a ed., Mack Publishing Company, 1990, véase especialmente la Parte 8: Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture) los compuestos pueden ser comprimidos en unidades de dosificación sólidas, tales como píldoras, comprimidos, o pueden ser elaborados en cápsulas o supositorios. Por medio de líquidos farmacéuticamente adecuados los compuestos también pueden ser aplicados en forma de disolución, suspensión, emulsión, p. ej., para su uso como preparación inyectable.

Para elaborar unidades de dosificación, p. ej., comprimidos, se contempla el uso de aditivos convencionales tales como cargas, colorantes, aglutinantes poliméricos y similares. En general se puede utilizar cualquier aditivo farmacéuticamente aceptable que no interfiera en la función de los compuestos activos. Los portadores adecuados con los cuales se pueden administrar las composiciones incluyen lactosa, almidón, derivados de celulosa y similares, o sus mezclas, empleados en las cantidades adecuadas.

Leyendas de las figuras.

Figura 1: Efecto de la avidina sobre la inhibición de la agregación plaquetaria por el compuesto 12. Pre-incubación del compuesto y avidina.

Figura 2: Efecto de la avidina sobre la inhibición de la agregación plaquetaria por el compuesto 10. Pre-incubación del compuesto y avidina.

Figura 3. Efecto de avidina sobre la inhibición de la agregación plaquetaria en cobaya por el compuesto 12 (adición de avidina 9 minutos después de la agregación plaquetaria inducida por ADP).

Figura 4: Efecto de la avidina sobre la inhibición de la agregación plaquetaria por el compuesto 10 (adición de avidina 9 minutos después de la agregación plaquetaria inducida por ADP).

Figura 5. Efecto de la avidina sobre la inhibición de la agregación plaquetaria en seres humanos por el compuesto 17 (adición de avidina 9 minutos después de la agregación plaquetaria inducida por ADP).

Figura 6: Muestra los datos medios después de la administración s.c. de 500 nmoles/kg de compuesto.

Figura 7. Datos medios después de la administración s.c. de 100 nmoles/kg de compuesto.

Figura 8. Muestra los datos medios después de la administración s.c. de 100 nmoles/kg de compuesto. A t=1 h se administró avidina (10 mg/kg) i.v. a las ratas tratadas con el compuesto 10 o 12. Se representa el comportamiento farmacocinético del compuesto 27 (el radical pentasacárido) en ausencia de avidina como comparación.

Figura 9: Datos medios después de la administración s.c. de 500 nmoles/kg de compuesto 10, 17 o 26. A T= 24h se administró avidina (10 mg/kg) i.v. después de lo cual se recogieron muestras de sangre a T=25 y 26h. Para la comparación se normalizaron los valores de 100 nmoles/kg s.c. de compuesto 17 a la dosis de 500 nmoles/kg.

La invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Abreviaturas utilizadas

ADP = adenosina 5'-difosfato

Aq. = acuoso

ATIII = antitrombina III

Bn = bencilo

Boc = *t*-butiloxycarbonilo

DCM = diclorometano

DiPEA = *N,N*-diisopropiletilamina

DMF = *N,N*-dimetilformamida

fmoc = 9-fluorenilmetilcarbamato

NMM = *N*-metilmorfolina

5 Me = metil

sat. = saturado

PRP = plasma rico en plaquetas

PPP = plasma pobre en plaquetas

RT = temperatura ambiente

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

TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

TRAP = péptido agonista del receptor de trombina

Z = benciloxicarbonilo

15

Ejemplo 1

15-*N*-(9-Fluorenilmetiloxicarbonil)-15-aza-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoato de *t*-butilo (2)

20 Se disolvió 15-amino-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoato de *t*-butilo (1) (0,50 g, 1,45 mmoles), que se había preparado como se describe en el documento EP 1574516, en THF (7,5 mL) y H₂O (5 mL). Se añadió disolución de NaOH 4 N hasta que el pH fue de aproximadamente 9. Se añadió *N*-9-fluorenilmetilcarbamatosuccinimida (FmocOSu, 0,54 g, 1,60 mmoles, 1,1 equiv.) en porciones. Después de 10 min. se añadió más disolución de NaOH 4 N para ajustar el pH a aproximadamente 9. Después de 3 h la mezcla de reacción se aciduló con disolución de HCl 1 N a pH 6-7. Se

25 añadió H₂O a la mezcla de reacción que después se extrajo 3 veces con EtOAc. La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. Después de filtrar el disolvente se separó a presión reducida (50 mbares, 50°C). El aceite bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1/0 → 95/5, v/v), para dar el compuesto 2 en forma de un aceite amarillento (0,61 g, 79%). Rf 0,64 (DCM/MeOH, 95/5, v/v).

30 Ejemplo 2

15-*N*-(9-Fluorenilmetiloxicarbonilo)-15-aza-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoato (3)

35 Se disolvió el Compuesto 2 en DCM (3,5 mL) y se añadió TFA (3,5 mL) en atmósfera de nitrógeno. Después de 1,5 h de agitación la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Después se separó el exceso de TFA por medio de concentración repetida en tolueno. Se añadió DCM/Et₂O (100 mL, 1/2, v/v) y la solución se lavó con HCl 1 N. La capa de agua se extrajo con DCM/Et₂O (100 mL, 1/2, v/v). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄. Después de filtrar el disolvente se separó a presión atmosférica (50°C). El

40 aceite bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH/AcOH, 99/0/1 → 89/10/1, v/v/v), para dar el compuesto 3. El AcOH restante se separó disolviendo el producto oleoso bruto en DCM/Et₂O (1/2, v/v) y enjuagando con H₂O (3x) y salmuera seguido de secado sobre MgSO₄. Después de filtrar el disolvente se separó a presión atmosférica (50°C) para dar el compuesto 3 en forma de un aceite amarillento (0,37 g, 67%). Rf 0,32 (DCM/MeOH/AcOH, 89/10/1, v/v).

45 Ejemplo 3

t-Butil 15-*N*-(9-Fluorenilmetiloxicarbonil)-15-aza-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil- ϵ -*N*-(benciloxicarbonil)-L-lisina (4)

50 Se disolvió el Compuesto 3 (0,37 mg, 0,77 mmoles) en DCM (18 mL). Se añadieron con posterioridad DIPEA (0,40 μ L, 2,31 mmoles, 3 equiv.) y TBTU (0,25 g, 0,77 mmoles) en atmósfera de N₂ y la disolución se agitó durante 10 min. Después se añadió ϵ -(Z)-L-Lys-OtBu-HCl (0,29 g, 0,77 mmoles) y la mezcla se agitó durante 1.5 h más. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y se enjuagó con H₂O, HCl 0,1 N, disolución saturada de NaHCO₃ y salmuera. La

55 fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró a presión atmosférica. Se efectuó la purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1/0 → 9/1, v/v), para dar el compuesto 4 en forma de un aceite amarillento (0,51 g, 83%). Rf 0,85 (DCM/MeOH, 9/1, v/v). ESI-MS: 792,6 [M+H]⁺, 814,6 [M+Na]⁺, 7364 [M-tBu+H]⁺

60 Ejemplo 4

t-Butil 15-*N*-terc-butiloxicarbonil-15-aza-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil- ϵ -*N*-(benciloxicarbonilo)-L-lisina (5)

Se disolvió el Compuesto 4 (0,26 g, 0,32 mmoles) en THF (5 mL). Se añadió Et₂NH (1 mL) y la disolución se dejó agitando durante 24 h. Se separaron el exceso de Et₂N y el disolvente a presión reducida (50°C). Se añadió tolueno

y se separó a presión reducida (50°C, 65 mbares) para dar el producto N-desprotegido (0,21 g, 0,32 mmoles), Rf 0,23 (DCM/MeOH, 9/1, v/v). ESI-MS: 570,4 [M+H]⁺, 514,4 [M-tBu+H]⁺.

El producto bruto se disolvió en DCM (3 mL). Se añadió Et₃N (0,11 mL) seguido de dicarbonato de di-t-butilo (73 mg, 0,34 mmoles, 1,1 equiv.) en una atmósfera de N₂. Después de agitar durante 5 h la mezcla se añadió a una disolución fría (5°C) de HCl 0,1 N y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó (MgSO₄). Después de filtrar los disolventes se separaron a presión reducida (180 mbares, 50 °C). La purificación se efectuó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 1/0 → 95/5, v/v), para dar un aceite incoloro (0,17 g, 82%).

Rf 0,5 (DCM/MeOH, 9/1, v/v). ESI-MS: 670,6 [M+H]⁺, 692,4 [M+Na]⁺, 570,4 [M-Boc+H]⁺, 514,1 [M-Boc-tBu+H]⁺

Ejemplo 5

15-aza-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil-ε-[D-(+)-biotinil]-L-lisina (6)

Se disolvió el Compuesto 5 (0,23 g, 0,34 mmoles) en EtOH (8 mL) y H₂O (1,2 mL). Después de lavar la disolución con nitrógeno durante 5 minutos, se añadió Pd/C al 10 % (0,11 g). Se hizo pasar hidrógeno a través de la disolución durante 4 h. Se hizo pasar nitrógeno a través de la disolución durante 10 minutos para separar todo el hidrógeno. La mezcla se filtró sobre decalita y se concentró a presión reducida (170 mbares, 50 °C) para dar la N-L-lisina desprotegida intermedia en forma de un aceite incoloro (0,15 g, 81 %). Rf 0,02 (DCM/EtOAc, 9/1, v/v).

Se suspendió D-(+)-biotina (75 mg, 0,31 mmoles) en DCM (7 mL). Se añadieron con posterioridad DiPEA (0,11 mL, 0,62 mmoles, 2 equiv.) y TBTU (0,10 g, 0,31 mmoles) en una atmósfera de N₂ y la disolución se dejó agitando durante 1h. Se añadió una disolución de la ε-N-L-lisina desprotegida intermedia descrita antes en DCM (3 mL) a la mezcla de reacción. La mezcla se dejó agitando durante 16 h. Se añadió H₂O y se extrajo con DCM (3x). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a presión reducida (850 mbares, 50 °C). Se llevó a cabo la purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (elución: DCM/MeOH, 1/0 → 9/1 v/v), para dar un aceite (0,13 g, 60%). Rf 0,48 (DCM/MeOH, 9/1, v/v). ESI-MS: 762,6 [M+H]⁺, 784,6 [M+Na]⁺, 662,4 [M-Boc+H]⁺, 606,4 [M-Boc-tBu+H]⁺. El aceite se disolvió en una disolución de HCl 4 N seco en dioxano (4 mL) y se agitó. Después de 1 hora apareció un aceite insoluble después de lo cual el disolvente se separó a presión reducida (100 mbares, 50°C) para dar el compuesto 6 con un rendimiento cuantitativo. ESI-MS: 606,4 [M+H]⁺, 628,4 [M+Na]⁺.

Ejemplo 6

Bencil N-<3-[-ε-(D-(+)-biotinil)-L-lisina-15-aza-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil]-carbonil}bencenosulfonil]-4-O-(4-(N-benciloxycarbonil-4-piperidinil)-butil)-L-tirosina (8)

El Compuesto 7 (0,10 g, 0,16 mmoles), que había sido preparado como se ha descrito en el documento EP 1574516, se disolvió en DMF (4 mL). Se añadieron con posterioridad DIPEA (56 µL, 0,32 mmoles, 2 equiv.) y TBTU (51 mg, 0,16 mmoles) en atmósfera de N₂ y la disolución se dejó agitando durante 45 minutos. Se disolvió el Compuesto 6 (0,17 mmoles) en DMF (1 mL), DiPEA (28 µL, 0,16 mmoles, 1 equiv.) y se añadió a la mezcla de reacción. La mezcla se dejó agitando durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó con una disolución de HCl 1 N. La fase orgánica se lavó con H₂O (3x), se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró a presión reducida (850 mbares, 50°C). La purificación se efectuó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. (elución: DCM/MeOH/AcOH, 99/0/1 → 79/20/1 v/v), para dar el compuesto 8 (56 mg, 27%). Rf 0,15 (DCM/MeOH, 9/1, v/v). ESI-MS: 1316,6 [M+H]⁺, 1338,8 [M+Na]⁺, 1182,6 [M-Z+H]⁺, 1204,6 [M-Z+Na]⁺, 1314,8 [M-H]⁺

Ejemplo 7

Procedimiento general para la preparación de los compuestos 10, 12, 17 y 26:

El derivado de ácido carboxílico (33 µmoles) (esto es, el compuesto 8, 11, 16 o 25) se secó mediante concentración repetida en DMF seca (2 x 2 mL), se disolvió en DMF (1 mL) y se agitó en presencia de TBTU (11 mg, 33 µmoles) y DiPEA (5,7 µL, 33 µmoles), en atmósfera de N₂. Después de 1h, se añadió el pentasacárido 9 (31 µmoles). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a la temperatura ambiente y se analizó mediante intercambio iónico (Mono-Q) y cromatografía de fase inversa (Luna C18). La mezcla de reacción se concentró (<50°C, 15 mmHg). El producto (bruto) (10 mg/mL en H₂O/t-BuOH, 1/1, v/v) se desprotegió mediante hidrogenación (H₂) sobre Pd/C al 10% (se añadió una cantidad igual en peso con respecto al producto bruto). Después de 16 horas la disolución se desgasificó, se filtró sobre un filtro de HPLC de 0,45 µm y se concentró a presión reducida (<50°C, 15 mm Hg). El producto conjugado se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharose, tampón: H₂O→NaCl 2M), seguido de eliminación de las sales con una columna Sephadex G25 (H₂O) y liofilización.

Ejemplo 8

Sal nonasódica de metil O-2,3-di-O-metil-4-O- \lll 12-N- \lll ^{N⁶}-(D-+)-biotinil]-N-3-[[15-N-(15-aza-1-ceto-3,6,9,12-tetroxa-pentadecil)]-carbonil]-bencenosulfonil>-4-O-{4-(4-piperidinil)-butil}-L-tirosil>-lisil>>-12-aza-3,6,9-trioxa-dodecil>>>-6-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3-di-O-metil-beta-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3,6-tri-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3-di-O-metil-alfa-L-idopiranosil-(1->4)-2,3,6-tri-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosido (10)

Se efectuó la conjugación del ácido carboxílico **8** (37,8 mg, 28,7 μ moles) a pentasacárido **9** (51,7 mg, 27,4 μ moles) [que se puede obtener por medio del acoplamiento del monosacárido derivatizado **5** descrito en el documento WO 01/42262 con el tetrasacárido **48** descrito en el documento US 2004/0024197 utilizando métodos similares a los descritos en estas solicitudes de patente, incluyendo la desprotección y la sulfatación], seguido de purificación y desprotección de acuerdo con el procedimiento general. Se obtuvo el Producto conjugado **10** en forma de un sólido de color blanco, rendimiento 13,6 mg (16%, 2 etapas).

RMN-¹H (D₂O, 600 MHz, HH-COSY): δ 7,85 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,63 (d, 1H), 7,42 (t, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,50 (d, 1H), 5,39 (d, 1H), 5,33 (d, 1H), 5,13 (s ancho, 1H), 5,08 (d, 1H), 4,58 (m, 1H), 4,58 (d, 1H), 4,49 (m, 1H), 4,48 (m, 1H), 4,33 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,28 (dd, 1H), 4,22 (dd, 1H), 4,21 (m, 2H), 4,20 (m, 1H), 4,17 (m, 2H), 4,09 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 4,05 (d, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,96 (s, 2H), 3,89 (m, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,85 (m, 2H), 3,79 (m, 2H), 3,73 (m, 1H), 3,69 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,61-3,51 (m, 26H), 3,60-3,38 (8 x s, 34H), 3,48 (m, 2H), 3,42 (m, 1H), 3,38 (m, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,19 (m, 3H), 2,92-2,2,89 (m, 1H), 2,67 (d, 1H), 2,48 (m, 1H), 2,13 (t, 2H), 1,91 (d, 1H), 1,70 (m, 2H), 1,65-1,37 (m, 5H).

ESI-MS: encontrado: m/z 1381,3 [M+H]²⁺, 1392,3 [M+Na]²⁺, 1402,8 [M+2Na]²⁺, 1413,8 [M+3Na]²⁺, 920,2 [M-3H]³⁻, 927,5 [M-3H+Na]³⁻, 934,5[M-3H+2Na]³⁻, 690,2 [M-4H]⁴⁺, 694,7 [M-4H+Na]⁴⁺.

Ejemplo 9

Sal sódica de metil O-2,3-di-O-metil-4-O- \lll 12-N-3-[[15-N-(15-aza-1-ceto-3,6,9,12-tetroxapentadecil)]-carbonil]-bencenosulfonil>-4-O-{4-(4-piperidinil)-butil}-L-tirosil>-12-aza-3,6,9-trioxa-dodecil>>-6-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3-di-O-metil-beta-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3,6-tri-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3-di-O-metil-alfa-L-idopiranosil-(1->4)-2,3,6-tri-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosido (12)

Se obtuvo el Compuesto **12** acoplando el compuesto **9** (101 mg, 53,9 μ moles) con el compuesto **11** (60,0 mg, 56,6 μ moles), que se había preparado como se describe en el documento EP 1574516, de acuerdo con el procedimiento general. Rendimiento 72 mg (52%).

RMN-¹H (D₂O, 600 MHz, HH-COSY): δ 7,84 (m, 1H), 7,75 (m, 1H), 7,62 (m, 1H), 7,42 (t, 1H), 6,83 (d, 2H), 6,48 (d, 2H), 5,38 (d, 1H), 5,33 (m, 1H), 5,08 (d, 1H), 5,02 (s ancho, 1H), 4,58 (d, 1H), 4,46 (s ancho, 2H), 4,28 (m, 2H), 4,17 (m, 1H), 4,22 (m, 1H), 4,20 (m, 2H), 4,11 (m, 2H), 4,04 (d, 1H), 4,03 (m, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,88 (m, 2H), 3,84 (m, 2H), 3,82 (m, 1H), 3,79 (m, 1H), 3,72 (1H, m), 3,66 (m, 2H), 3,62-3,33 (m, 54H), 3,20 (dd, 1H), 3,18 (m, 1H), 2,92 (m, 2H), 1,92 (m, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,58 (m, 1H), 1,44 (m, 2H), 1,33 (m, 4H).

ESI-MS: m/z 1225,2 [M+5H+2Na]²⁺, 823,8 [M+3Na+3H]³⁻, 816,5 [M+2Na+4H]³⁻, 809,1 [M+Na+5H]³⁻.

Ejemplo 10**Alfa-benciléster de [D-(+)-biotinil]-L-aspartato (14)**

A una suspensión de D-Biotina (2,0 g, 8,19 mmoles) en DMF (52 mL) se le añadió pentafluorofenol (1,6 g, 15,6 mmoles) seguido de DCC (2,5 g, 12,3 mmoles). La mezcla de reacción se dejó agitando, en atmósfera de nitrógeno, durante la noche a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción siguió siendo una suspensión y se separó por filtración y se concentró. El residuo se recogió en Et₂O y se agitó durante varios minutos después de lo cual la suspensión se filtró y se secó a vacío para dar un sólido de color blanco (2,58 g) ESI-MS: 411 [M+H]⁺. Se añadió el sólido se disolvió en DMF (90 mL) y Et₃N (1,24 mL, 8,82 mmoles, 1,4 equiv.). Se añadió H-Asp-OBn en porciones en forma de sólido. Después de aproximadamente 15 min la mezcla de reacción se volvió claro y se dejó agitando 2 horas más. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se añadió agua seguido de MeOH (3:1). El sólido formado se separó por filtración, se lavó con Et₂O y se secó a vacío para dar el compuesto **14** en forma de un sólido de color blanco (2,92 g, 77 %) ESI-MS: 450 [M+H]⁺.

Ejemplo 11**N-15-Aza-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil- ϵ -N-[D-(+)-biotinil]-L-aspartil alfa-bencil éster>-L-lisina (15)**

El Compuesto **13** (3,60 g, 6,72 mmoles, 1,07 equiv.), que se había obtenido como se ha descrito antes para la síntesis del compuesto **6**, y el compuesto **14** (2,92 g, 6,30 mmoles) se disolvió en DMF (80 mL). Se añadió DiPEA (2,2 mL, 12,6 mmoles, 2 equiv.) en atmósfera de nitrógeno, seguido de TBTU (2,53 g, 7,88 mmoles, 1,25 equiv.). La

mezcla de reacción se dejó agitando durante la noche, después de lo cual el disolvente se separó a presión reducida. La purificación se completó utilizando HPLC (ACN/H₂O) para dar un aceite de color amarillento (2,31 g). ESI-MS: 967 [M+H]⁺. La desprotección se llevó a cabo en DCM/TFA (1:1, 60 mL) mientras se agitaba durante 2 h a la temperatura ambiente. Se añadió DCM (150 mL) y los disolventes se separaron calentando (45°C, presión atmosférica). Este procedimiento se repitió 3x y estuvo seguido de una concentración repetida en tolueno (3x). El Compuesto 15 se recogió en forma de un sólido de color amarillento (3,29 g, 30%). ESI-MS: 811 [M+H]⁺

Ejemplo 12

ε-N-(D-+)-biotinil-beta-L-aspartil)-N-3-[[15-N-(15-aza-1-ceto-3,6,9,12-tetroxapentadecil)]-carbonil]-bencenosulfonil>-4-O-(4-(4-piperidinil)-butil)-L-tirosil>-L-lisina (16)

A una disolución de 7 (1,41 g, 1,94 mmoles) en DMF (50 mL), se añadió DiPEA (1,0 mL, 5,8 mmoles, 3 equiv.), en atmósfera de nitrógeno, seguido de TBTU (685 mg, 2,1 mmoles, 1,1 equiv.) y se dejó agitando durante 1h. Después se añadió una disolución de 15 en DMF (20 mL) y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el producto bruto se purificó mediante HPLC (ACN/H₂O/TFA) para dar un sólido de color amarillento (783 mg, 26%). ESI-MS: 1522 [M+H]⁺

Ejemplo 13

Sal decasódica de metil 2,3-di-O-metil-4-O-<<<12-N-<<ε-N-(D-+)-biotinil-beta-L-aspartil)-N-3-[[15-N-(15-aza-1-ceto-3,6,9,12-tetroxa-pentadecil)]-carbonil]-bencenosulfonil>-4-O-(4-(4-piperidinil)-butil)-L-tirosil>-L-lisil>>-12-aza-3,6,9-trioxa-dodecil>>>-6-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3-di-O-metil-beta-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3,6-tri-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3-di-O-metil-alfa-L-idopiranosil-(1->4)-2,3,6-tri-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosido (17)

Se logró básicamente la síntesis del Compuesto 17 de acuerdo con el procedimiento general. De este modo, a una disolución de 16 (768 mg, 0,505 mmoles) en DMF (50 mL), se le añadió DiPEA (106 µL, 0,61 mmoles, 1,2 equiv.), seguido de TBTU (178 mg, 0,56 mmol, 1,1 equiv.) en nitrógeno. Después de agitar la disolución durante 1 h, se añadió el Compuesto 9 (906 mg, 0,48 mmoles) y se continuó agitando durante 16h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se purificó sobre Q-Sepharose (H₂O → NaCl 2M). La eliminación de las sales se llevó a cabo sobre Sephadex-G25 para dar un aceite claro (1,5 g). El aceite se disolvió en H₂O (37 mL) y t-BuOH (37 mL), y se añadió Pd/C al 10% (670 mg) en atmósfera de nitrógeno. Se hizo pasar hidrógeno a través de la disolución durante 16h. Después de eliminar el catalizador Pd/C mediante filtración se purificó de nuevo el compuesto sobre Q-Sepharose y se eliminaron las sales sobre Sephadex-G25 para dar el compuesto 17 con un rendimiento de 465 mg (34%).

RMN H¹ (D₂O, 600 MHz, HH-COSY): δ 7,94 (m, 1H), 7,86 (t, 1H), 7,71 (m, 1H), 7,52 (t, 1H), 6,93 (d, 1H), 6,58 (d, 1H), 5,45 (d, 1H), 5,42 (d, 1H), 5,18 (s ancho, 1H), 5,15 (d, 1H), 4,56 (m, 1H), 4,33-4,41 (m, 2H), 4,30-4,21 (m, 4H), 4,13-4,05 (m, 4H), 3,89-3,96 (m, 5H), 3,87-3,82 (m, 3H), 3,81-3,70 (m, 7H), 3,69-3,60 (m, 39H), 3,59-3,48 (m, 131-1), 3,47-3,35 (m, 8H), 3,30-3,24 (m, 3H), 3,11 (t, 2H), 3,06-2,93 (m, 4H), 2,79-2,73 (m, 2H), 2,60-2,52 (m, 2H), 2,26 (t, 2H), 2,01-1,96 (m, 2H), 1,81-1,74 (m, 3H), 1,71-1,25 (m, 20H). ESI-MS: m/z 1481,9 [M+4Na-4H]²⁻, 1471,0 [M+3Na-3H]²⁻, 980,7 [M+3Na-3H]³⁻M+Na+5H]³⁻

Ejemplo 14

ε-N-Metil-ε-N-trifluoroacetil-L-lisina (19)

Se disolvió el Compuesto 18 (1,26 g, 3,2 mmoles) en DMF (15 mL) y se añadió K₂CO₃ (2,2 g, 16 mmoles, 5 equiv.) seguido de yoduro de metilo (1,6 mL, 25,6 mmoles, 8 equiv.). La disolución se calentó La disolución se calentó a 100°C y se agitó durante 24 h en un matraz sellado. La mezcla de reacción se enfrió y se diluyó con EtOAc. El sólido resultante se filtró, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (DCM/MeOH, 95/5) para dar un aceite (1,18 g) que se disolvió en una mezcla de DCM (5 mL) y TFA (5 mL) y que se agitó durante 1 h. Después el disolventes se separó a presión reducida y el producto bruto se concentró en tolueno (3x) para dar el compuesto 19 (1,57 g, 87%) ESI-MS: m/z 271,2 [M+H]⁺

Ejemplo 15

Metil 15-azido-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil-ε-N-metil-ε-N-trifluoroacetil-L-lisina (21)

Se acoplaron el Compuesto 19 (1,57 g, 2,16 mmoles) y 20 (0,60 g, 2,16 mmoles), que se había preparado mediante desprotección del correspondiente derivado éster t-butílico descrito en el documento EP 1574516, como se describe para la síntesis del compuesto 4 para dar el compuesto 21 con un rendimiento del 86 % (980 mg, 1,85 mmoles). ESI-MS: m/z 530,2 [M+H]⁺, 552,2 [M+Na]⁺

Ejemplo 16**15-Azido-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil-ε-N-metil-L-lisina (22)**

Se disolvió el Compuesto **21** (0,98 g, 1,85 mmoles) en THF (6 mL), se añadió LiOH 1 N (6 mL) y la disolución resultante se agitó durante 2 horas a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición de HCl 1N y con posterioridad se concentró a presión reducida para dar el compuesto **22** bruto desprotegido que se utilizó sin purificación adicional en la siguiente reacción. ESI-MS: m/z 420,2 [M +H]⁺

Ejemplo 17**15-Azido-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil-ε-N-[D-(+)-biotinil]-ε N-metil-L-lisina (23)**

Se acopló el Compuesto **22** (1,85 mmoles, bruto) a D-(+)-biotina (0,54 g, 2,22 mmoles, 1,2 equiv.) como se ha descrito antes para la preparación del compuesto **6** para el derivado de lisina biotinilado **23** que se utilizó sin purificación en la siguiente reacción. ESI-MS: m/z 646,4 [M +H]⁺, 668,6 [M+Na]⁺

Ejemplo 18**15-Aza-3,6,9,12-tetroxa-pentadecanoil-ε-N-[D-(+)-biotinil]-ε N-metil-L-lisina (24)**

Se disolvió el Compuesto **23** (1,85 mmoles, bruto) en t-BuOH (50 mL) y H₂O (50 mL). Se añadió Pd/C al 10% (750 mg) en atmósfera de nitrógeno. El hidrógeno se condujo a través de la disolución durante aproximadamente 4 h. Se separó el Pd/C mediante filtración sobre Decalite y se lavó con EtOH. Los disolventes se separaron a presión reducida (50 mbares, 50°C) para dar el compuesto **24** bruto en forma de un aceite (>100%, disolvente residual). ESI-MS: m/z 620,4 [M +H]⁺

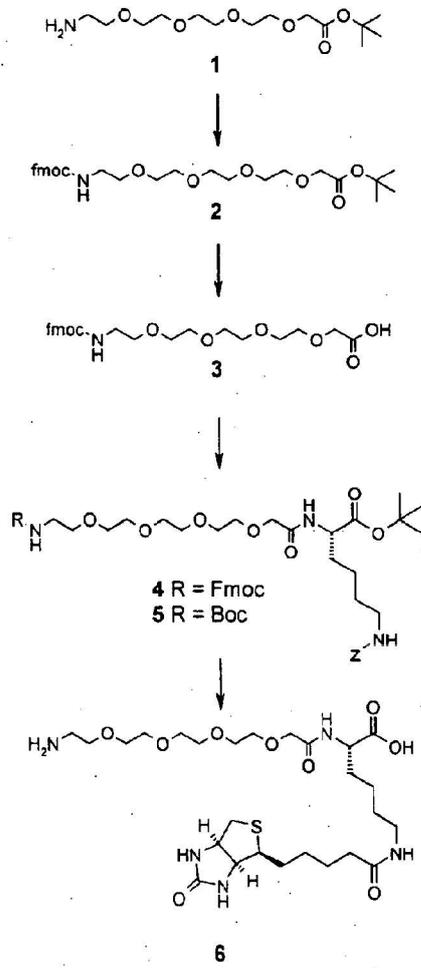
Ejemplo 19**Bencil N-<3-[-ε-(D-(+)-biotinil-ε-N-metil)-L-lisina-15-aza-3,6,9,12-tetroxapentadecanoil]-carbonil]-bencenosulfonil>-4-O-{4-(N-benciloxicarbonil-4-piperidinil)-butil}-L-tirosina (25)**

Se realizó el acoplamiento del compuesto **24** (0,58 g, 0,93 mmoles, bruto) al compuesto **7** (0,50 g, 0,68 mmoles) como se ha descrito antes para la síntesis del compuesto **8**. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice y la HPLC preparativa dieron el derivado de lisina ε-N-metilado **25** con un rendimiento de 77 mg (8,5% a lo largo de las últimas cuatro etapas empezando con el compuesto **21**). ESI-MS: m/z 1330,6 [M +H]⁺

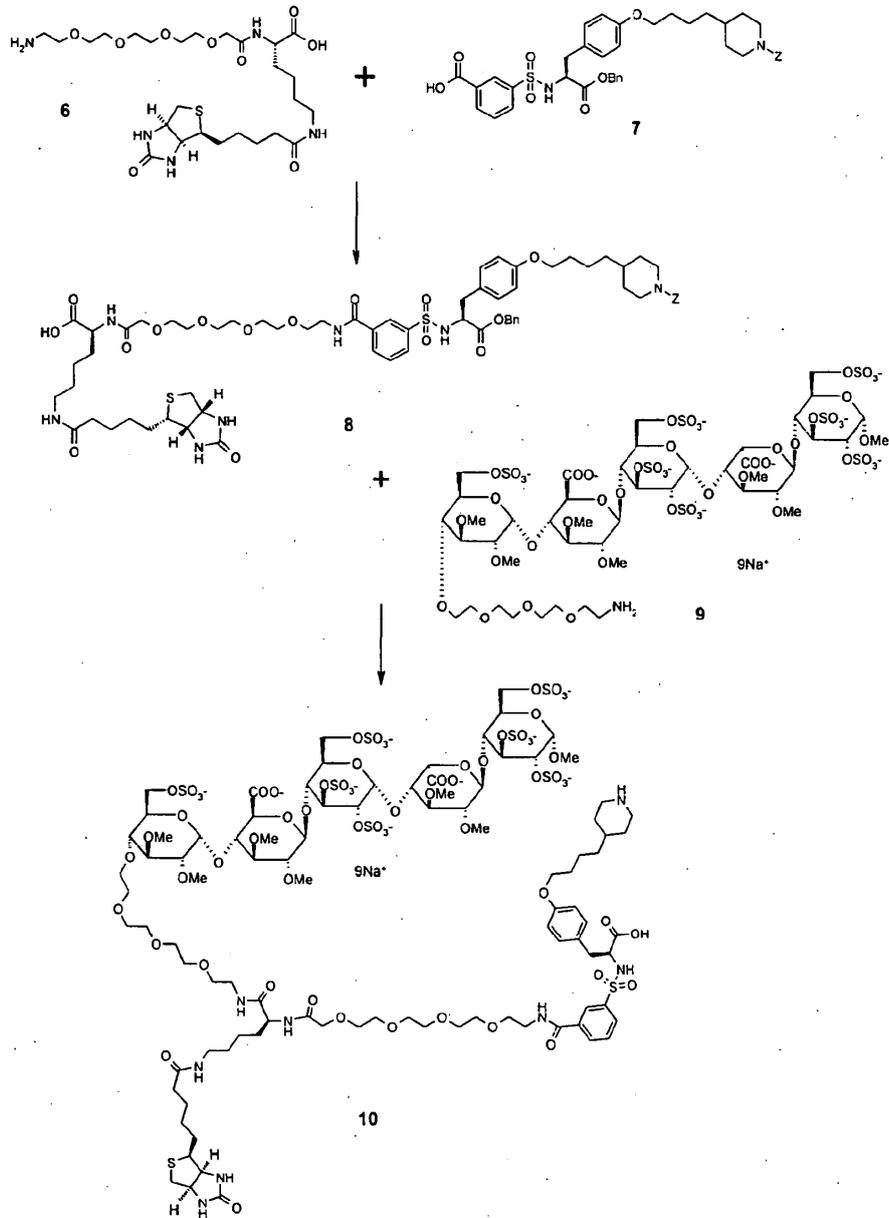
Ejemplo 20**Sal nonasódica de metil O-2,3-di-O-metil-4-O-<<<12-N-<<N⁶-(D-(+)-biotinil-ε-N-metil)-N-<-{[15-N-(15-aza-1-ceto-3,6,9,12-tetroxa-pentadecil)]-carbonil}-bencenosulfonil>-4-O-{4-(4-piperidinil)-butil}-L-tirosil>-lisil>>-12-aza-3,6,9-trioxa-dodecil>>>-6-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3-di-O-metil-beta-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3,6-tri-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosil-(1->4)-O-2,3-di-O-metil-alfa-L-idopiranosil-(1->4)-2,3,6-tri-O-sulfo-alfa-D-glucopiranosido (26)**

Se acopló el compuesto **25** (77 mg, 58 μmoles) al derivado pentasacárido **9** (0,10 g, 55 μmoles) como se describe en el procedimiento general. La purificación y la eliminación de las sales del producto bruto como se describe en el procedimiento general estuvo seguida de la liofilización para dar el producto diana conjugado **26** con un rendimiento de 50 mg (27%). ESI-MS: m/z 2762,5 [M +H]⁺

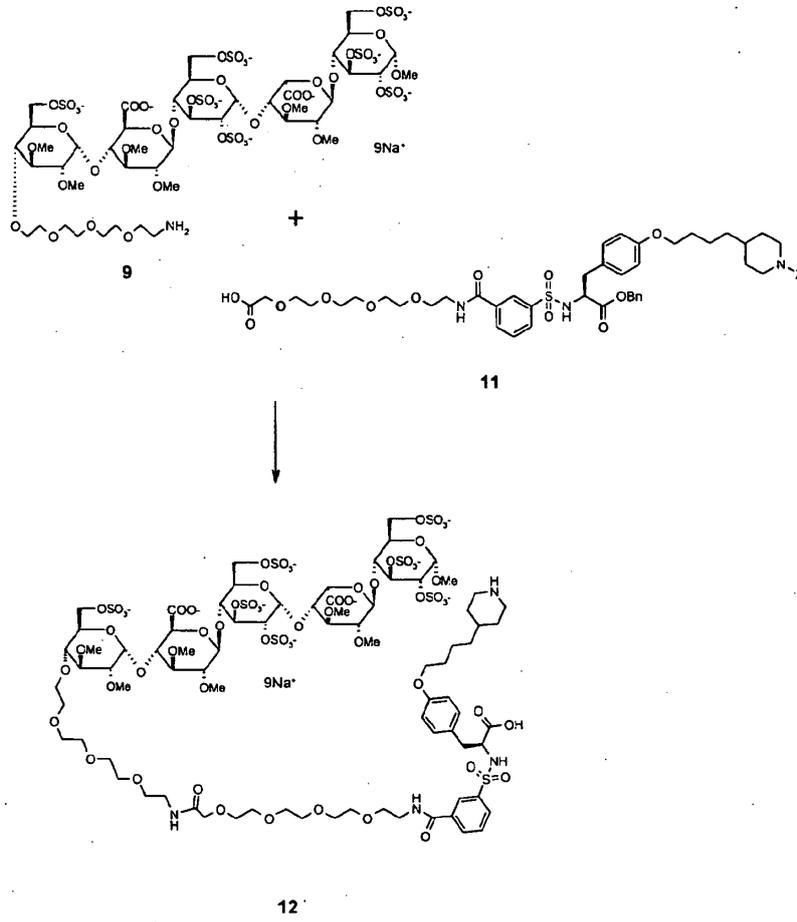
Esquema 1a



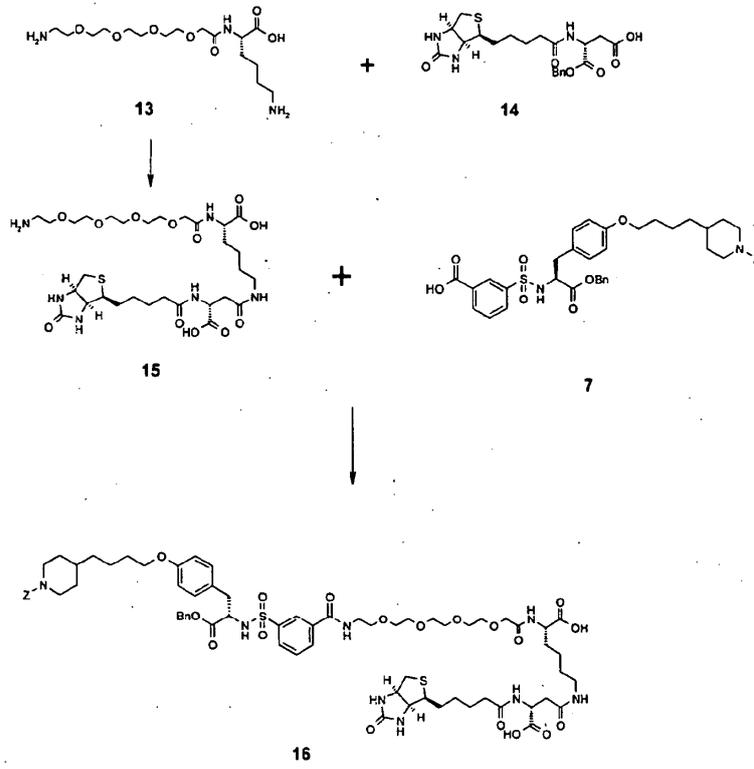
Esquema 1b



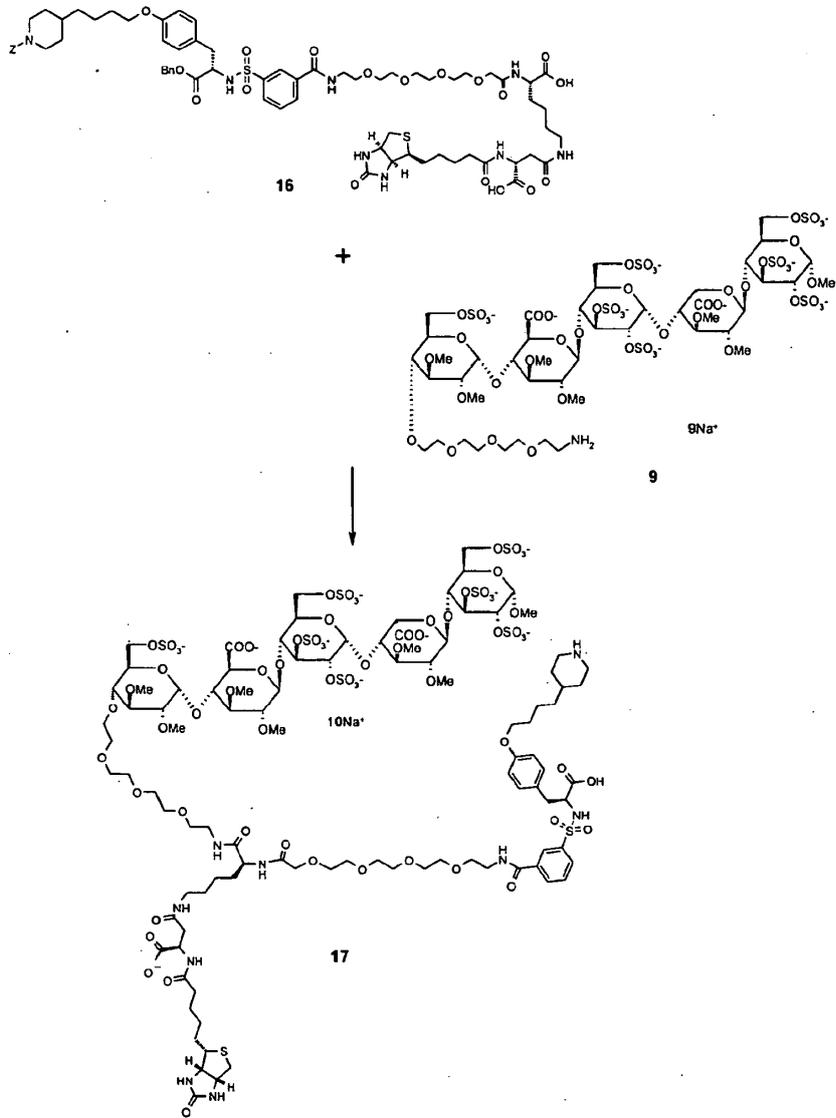
Esquema 2



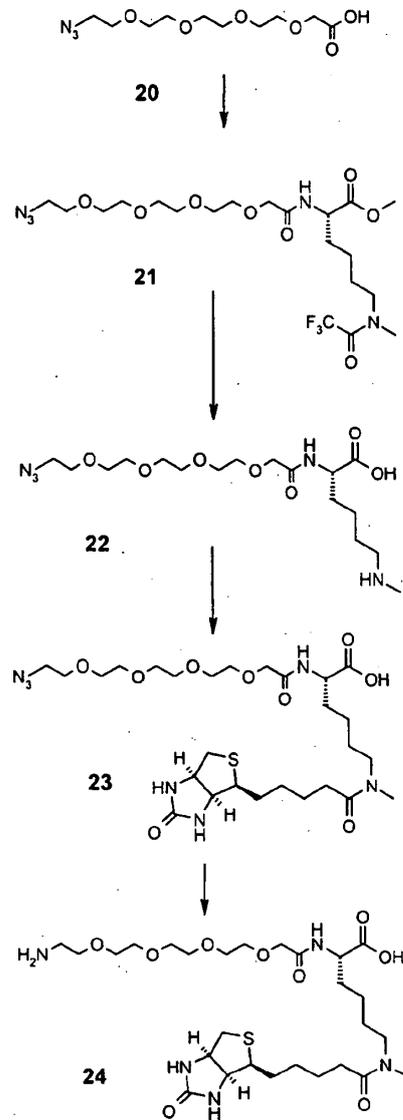
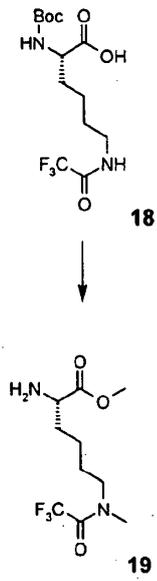
Esquema 3a



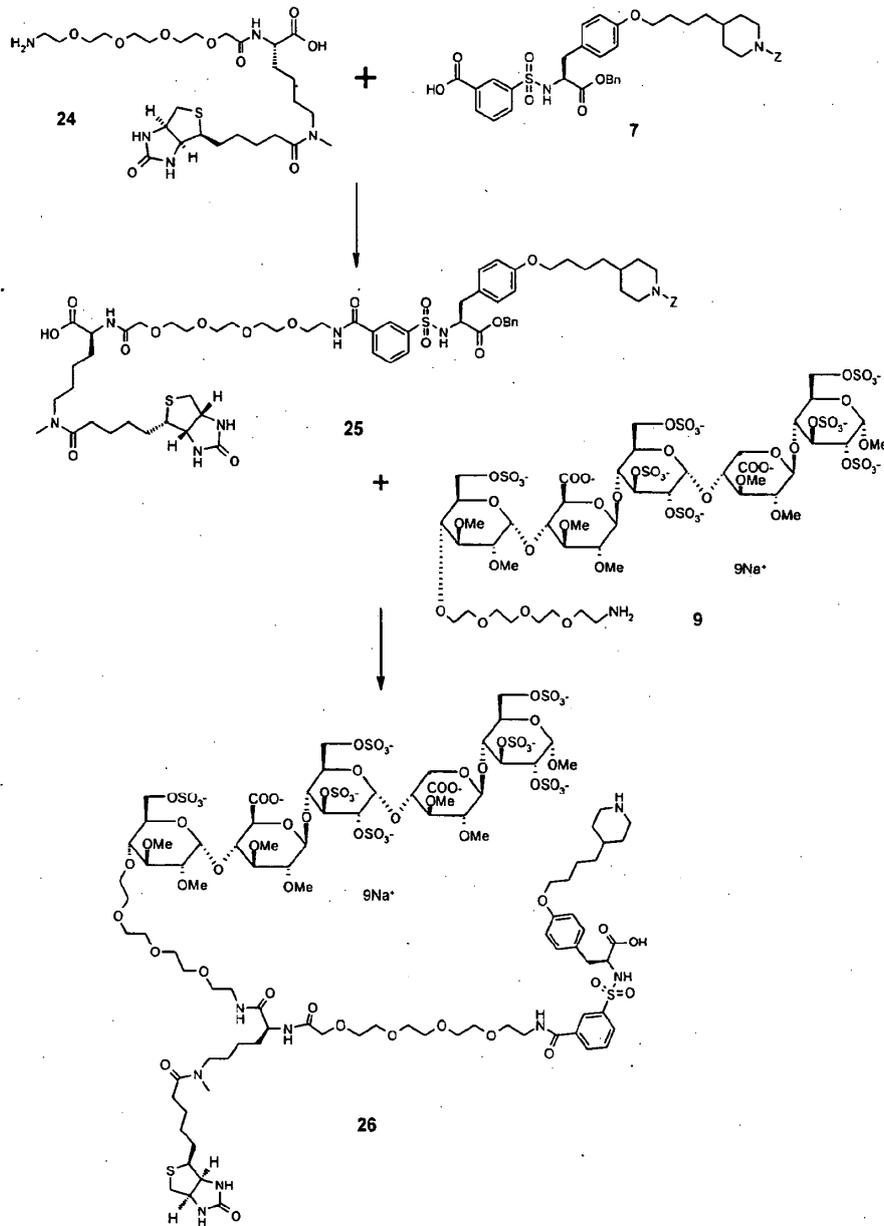
Esquema 3b



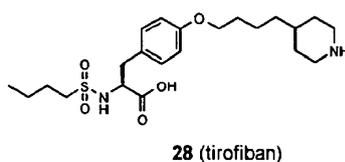
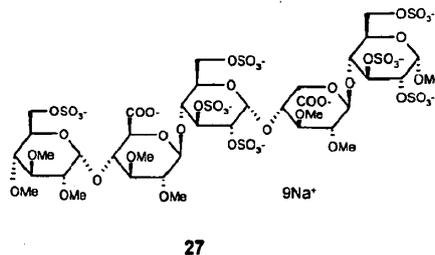
Esquema 4a



Esquema 4b



Compuestos de referencia



Ejemplo 21

5 Farmacología

1.1 Ensayo in vitro para determinar la inhibición de la agregación plaquetaria en cobayas inducida por ADP

La adición de difosfato de adenosina (ADP) a plasma rico en plaquetas (PRP) de ser humano o de cobaya in vitro induce agregación plaquetaria. Esta agregación se puede evaluar midiendo el cambio en la densidad óptica (DO) del PRP. El siguiente ensayo in vitro se utilizó para evaluar el compuesto de ensayo para determinar la interferencia con la agregación inducida por ADP de las cobayas.

15 Materiales

Plasma rico en plaquetas (PRP): Se extrae sangre de flujo libre de un voluntario sano o una cobaya y se recoge en 0,1 volúmenes de citrato de sodio.2H₂O, 3,8% en H₂O destilada (p/v). La concentración final es citrato de sodio al 0,38%. La sangre citratada se centrifuga a 1.600 N/kg (160 g, i.e., 900 rpm en Hettich Rotanta/AP a la temperatura ambiente. Al cabo de 15 minutos la centrifugación se interrumpe quitando el freno, y se recoge el sobrenadante (=PRP). Se utiliza inmediatamente una disolución de nueva aportación de ADP (grado analítico), 50 μM en NaCl al 0,9% en agua MQ.

En este análisis, el tirofiban (AGGRASTAT® (MSD) adquirido en forma de un producto concentrado de 0,25 mg/mL para su infusión i.v.) inhibe la agregación plaquetaria humana inducida por ADP 5 μM en 50% a una concentración de 30 - 60 nM (CI50).

Equipo

- 30 1. Contador de células sanguíneas Sysmex modelo KX-21.
2. Lector Labsystems iEMS Reader MF con un filtro a 620 nm, un aparato de sacudimiento orbital ajustado a 1000 rpm y una temperatura constante de 37°C. La absorción se mide con el programa Labsystems iEMS.
3. Sistema de recogida de sangre de 600 mL con aguja, art P4203 (NPBI).
- 35 4. Microplacas de fondo plano de 96 pocillos (Greiner Labortechnik).

Procedimiento

Las plaquetas en el sobrenadante (PRP) se cuentan utilizando un contador de células sanguíneas Sysmex y el sobrenadante se diluye con PPP (plasma pobre en plaquetas) para obtener un PRP que contiene aproximadamente 400.000 ± 50.000 pl^t/mL. El PRP se debe estabilizar a la temperatura ambiente durante al menos 20 min pero no más de 3 h.

Se pipetea 150 μL de PRP en un pocillo de la microplaca. Se añaden 30 μL de compuesto de ensayo a un intervalo de concentraciones (7 concentraciones por compuesto) o se añade vehículo y la microplaca se coloca en el lector

5 Labsystems iEMS Reader MF a 37 °C. La densidad óptica (DO₆₂₀) se mide después a 620 nm. Después de sacudir durante 2 minutos en el lector (1.000 rpm), la DO se mide para el segundo tiempo. Esto es para verificar la estabilidad de las plaquetas (ausencia de agregación plaquetaria espontánea). A continuación, se añaden 20 µL de una disolución 50 µM de ADP y la DO se mide cinéticamente cada minuto a lo largo de 14 minutos a 620. Entre dos mediciones, la placa se está sacudiendo durante 40 segundos a 1.000 rpm. Cada compuesto de ensayo se investiga en al menos 2 experimentos utilizando PRP de voluntarios diferentes.

Evaluación de la respuesta

10 La DO media a cada concentración de compuesto (incluyendo el vehículo) se calcula a t= 0 min y t = 10 min. El porcentaje de inhibición a cada concentración se calcula utilizando la fórmula:

15
$$100 \% - \frac{(\text{DO del compuesto a } t = 0 \text{ min.} - \text{DO del compuesto a } t = 10 \text{ min.})}{(\text{DO del vehículo a } t = 0 \text{ min.} - \text{DO del vehículo a } t = 10 \text{ min.})} \times 100\%$$

20 La CI50 del compuesto de ensayo es la concentración a la cual la agregación plaquetaria inducida por ADP se reduce en 50%. Para esto, los valores del porcentaje de inhibición se trazan frente a la concentración de compuesto y la CI50 se calcula utilizando Graphpad Prism 3.0 (con pendiente variable).

1.2 Ensayo in vitro para determinar la inhibición de la agregación plaquetaria humana inducida por TRAP

25 La adición del péptido agonista del receptor de trombina (TRAP) a plaquetas humanas o de cobaya lavadas (PLL) in vitro induce agregación plaquetaria. Esta agregación se puede determinar midiendo la densidad óptica de las PLL. El ensayo in vitro descrito en la presente memoria se utiliza para analizar la actividad de un compuesto de ensayo para inhibir la agregación inducida por TRAP de human plaquetas. Se utiliza un lector de microplaca para medir la actividad de varios compuestos simultáneamente.

30 **Materiales**

***Composición del tampón de Watson:**

NaCl	7,83 g (134 mmoles)
KCl	0,22 g (2,9 mmoles)
NaHCO ₃	1,01 g (12 mmoles)
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,06 g (0,34 mmoles)
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,20 g (1 mmoles)
Glucosa	0,90 g (5 mmoles)
HEPES	1,19 g (5 mmoles)
H ₂ O a	1 L

35 El pH se ajusta a 7,4 con tampón TNP NaOH (1 mol/L).

***Composición del tampón TNP:**

Trometamina (Tris)	6,057 g (50 mmoles)
NaCl	5,844 g (100 mmoles)
PEG6000	3,0 g
H ₂ O to 1 L	

40 El pH de la disolución se ajusta a 7,4 a 37 °C con HCl (10 mol/L).

***Solución de PGI₂:**

5 Una disolución de partida de prostaglandina I₂ de 1 mg/mL en KOH (1 mol/L) se almacena a -20 °C. Se prepara inmediatamente antes de su uso una disolución de 5 µg/mL NaCl enfriado con hielo (9,0 g/L).

***Plasma rico en plaquetas (PRP):**

10 Se extrae sangre de flujo libre de un voluntario sano o una cobaya y se recoge en 0,1 volúmenes de citrato de sodio.2H₂O, 3.8% en agua MQ (p/v). La concentración final es citrato de sodio al 0,38%. La sangre citratada se centrifuga a 1.600 N/kg (160 g) en una centrífuga Hettich Rotanta/AP a la temperatura ambiente. Al cabo de 15 minutos la centrifugación se interrumpe quitando el freno. Y se recoge el sobrenadante (=PRP) y se diluye con plasma pobre en plaquetas para obtener una suspensión que contiene aproximadamente 400 000 plaquetas/mL.

***Plasma pobre en plaquetas (PPP):**

15 La sangre citratada se centrifuga a aproximadamente 20000 N/kg durante 10 minutos a temperatura ambiente y el PPP se transvasa.

***Plaquetas lavadas (PLL):**

20 Se añade una alícuota de 1 µL de disolución de PGI₂ a 1 mL de PRP y después de eso se centrifuga a 20000 N/kg durante 10 minutos a la temperatura ambiente. El plasma se transvasa y se añade tampón de Watson que contiene 5 ng/mL de PGI₂ al sedimento plaquetario y las plaquetas se resuspenden en el volumen original agitando suavemente con una varilla de plástico. La suspensión de plaquetas se centrifuga de nuevo a 20000 N/kg. Las plaquetas se resuspenden en tampón de Watson con el fin de obtener una suspensión que contiene aproximadamente 400 000 plaquetas/mL.

***Solución de TRAP:**

30 Se disuelve TRAP en H₂O para proporcionar una disolución que contiene 50 µmol/L. Se tiene que preparar diariamente una solución de nueva aportación. Para todas las soluciones acuosas se utiliza H₂O ultrapura (calidad Milli-Q).

35 *Fibrinógeno Humano (Kordia/ERL, art nr: polvo FIB 2): Se disuelven 0,5 g de polvo de fibrinógeno en 50 mL de agua MQ a vacío. Esta disolución de partida se almacena en alícuotas de 100 µL a -20 °C. Inmediatamente antes de su uso, se prepara una disolución de 0,5 mg/mL en solución salina.

40 En este análisis, el tirofiban (AGGRASTAT® (MSD)) adquirido en forma de un producto concentrado a 0,25 mg/mL para infusión i.v.) inhibe la agregación plaquetaria humana inducida por TRAP 5 µM en 50% a una concentración final de 30 - 60 nM (CI₅₀).

Procedimiento

45 La concentración de PLL se cuenta en un contador de células sanguíneas Sysmex y la suspensión se diluye con tampón de Watson para obtener una concentración de aproximadamente 400.000 plt/mL. Antes de su uso se permite estabilizar el PLL a la temperatura ambiente durante al menos 20 min pero no más de 3-4 horas.

50 Se pipetea 150 µL de PLL en un pocillo de una microplaca. Se añaden 15 µL de la disolución de compuesto de ensayo o vehículo y 15 µL de la disolución de fibrinógeno y la microplaca se coloca en el lector de microplaca a 37 °C. A continuación, la densidad óptica (DO) se mide a 405 nm y después de sacudir durante 2 minutos en el lector, se mide de nuevo la DO₄₀₅ para verificar la estabilidad de las plaquetas (ausencia de agregación plaquetaria espontánea). Se añaden 20 µL de disolución de TRAP 50 µM y se mide cinéticamente la DO₄₀₅ cada min durante 14 min a 405 nm. Entre dos mediciones, la placa se sacude durante 40 segundos a 1.000 rpm. Para la determinación de la CI₅₀ de un compuesto de ensayo, cada compuesto se investiga en al menos 2 experimentos utilizando PLL de diferentes voluntarios.

Evaluación de las respuestas:

60 La DO media de cada concentración (incluyendo vehículo) se calcula a t= 0 min y t = 10 min. El porcentaje de inhibición a cada concentración se calcula utilizando Microsoft Excel con la fórmula:

$$100 \% - \frac{(\text{DO del compuesto a } t = 0 \text{ min.} - \text{DO del compuesto a } t = 10 \text{ min.})}{(\text{DO del vehículo a } t = 0 \text{ min.} - \text{DO del vehículo a } t = 10 \text{ min.})} \times 100\%$$

Las concentraciones del compuesto se trazan frente al porcentaje de inhibición. La CI50 se calcula utilizando Graphpad Prism 3.0 (con pendiente variable). La CI50 del compuesto de ensayo es la concentración a la que la agregación plaquetaria inducida por TRAP se reduce en 50%.

1.3 Ensayo in vitro para la determinación de la actividad anti-factor Xa en plasma humano

La actividad anti-factor Xa de los compuestos sometidos a ensayo en plasma humano se midió amidolíticamente con S2222 (Chromogenix, Chromogenics Ltd, Molndal, Sweden) utilizando el método descrito por Teien y Lie. (Teien AN, Lie M. Evaluation of an amidolytic heparin analysis method increased sensitivity by adding purified antithrombin III. Thromb. Res. 1977, 10: 399-410). La actividad anti-Xa se expresa en U/μmol después de la comparación de la actividad amidolítica con una curva de calibración de heparina convencional.

Tabla 1. Resumen de las actividades antitrombóticas in vitro

Compuesto	Anti-Xa U/μmol en Plasma humano pH 7,4	Inhibición de la agregación plaquetaria humana (ADP) CI50 (nm)	Inhibición de la agregación plaquetaria humana (TRAP) CI50 (nm)	Inhibición de la agregación plaquetaria en cobayas (ADP) CI50 (nm)
28	-	43	41	493
27	1268	-	-	-
12	1392	92	65	127
10	927	74	72	225
17	1411	49	74	66

2.1 Neutralización In vitro de la actividad antitrombótica

A. Neutralización In vitro de la inhibición de la agregación plaquetaria

(pre-incubación de compuesto con avidina)

Como se ha realizado en el protocolo anteriormente descrito para la agregación plaquetaria inducida por ADP. La agregación se llevó a cabo en presencia de compuesto **12** 225 nM o compuesto **10** 450 nM, concentraciones a las cuales se logra la inhibición máxima de la agregación plaquetaria en cobayas. Antes de inducir la agregación plaquetaria en cobayas mediante la adición de ADP, el compuesto y la avidina (de clara de huevo, Sigma) a diferentes concentraciones se pre-incubaron durante 2 minutos a la temperatura ambiente (Figuras 1 y 2).

B. Neutralización In vitro de la inhibición de la agregación plaquetaria

(después de la adición retardada de avidina)

Como se ha realizado en el protocolo anteriormente descrito para la agregación plaquetaria inducida por ADP. La agregación se realizó en presencia de compuesto **12** 225 nM o compuesto **10** 450 nM, concentraciones a las cuales se logra la inhibición máxima de la agregación plaquetaria humana. Al cabo de 7 minutos se interrumpió la detección de la agregación plaquetaria y se añadió avidina (de clara de huevo, Sigma) a diferentes concentraciones a t=9 min. En 1 minuto se resumió la detección de la agregación plaquetaria (Figuras 3 y 4).

En la Figura 5, se muestra el efecto de la avidina sobre la inhibición de la agregación plaquetaria humana por medio del compuesto **17** (adición de avidina 9 minutos después de la agregación plaquetaria inducida por ADP).

Conclusión: la administración de avidina a un análisis de agregación plaquetaria en cobayas que contenía el compuesto **10** da como resultado la restauración inmediata de la agregación plaquetaria (= neutralización de la actividad anti-GPIIb/IIIa, antitrombótica), mientras que la actividad inhibidora del compuesto **12** antitrombótico equivalente no biotinilado no se puede restaurar. La administración de avidina al compuesto **17** conduce a la restauración completa de la agregación plaquetaria humana.

3.1 Farmacocinéticas

Las propiedades farmacocinéticas de los compuestos **10**, **12**, **17** y **27** se estudiaron en ratas Wistar macho de 300 - 400 gr. Las ratas se anestesiaron mediante inhalación de una mezcla de O_2/N_2O /isoflurano, después de lo cual se canuló la vena yugular derecha. Al día siguiente las ratas se trataron s.c. con dosis de 100 o 500 nmol/kg. Después de la administración s.c., se tomaron muestras de sangre a varios intervalos de tiempo. A continuación la sangre se centrifugó, después de lo cual el plasma se transvasó y se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración del compuesto sometido a ensayo se midió amidolíticamente con S2222 (Chromogenix, Chromogenics Ltd, Molndal, Sweden) por medio de la determinación de la actividad anti-Xa basada en el método de Teien y Lie en las muestras de plasma obtenidas frente a una curva de calibración que fue elaborada a partir de la disolución de partida del propio compuesto sometido a ensayo. (Teien AN, Lie M. Evaluation of an amidolytic heparin analysis method increased sensitivity by adding purified antithrombin III. Thromb. Res. 1977, 10: 399-410). La concentración en las muestras se expresó en nmol/mL y los parámetros cinéticos se calcularon con el modelo no compartimentado de WinNonlin. (Figuras 6 y 7)

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos después de la administración s.c. del compuesto **10** o **12** (500 nmol/kg) en rata. Experimento realizado con n = 3/tratamiento.

	Compuesto 10	Compuesto 12
	Media \pm e.t.m	Media \pm e.t.m
Tmax (h)	1,3	2,5
Cmax (nmol/mL)	4,5 \pm 0,4	5,0 \pm 0,4
T1/2 eli (h)	10,7 \pm 1,5	9,3 \pm 0,2
AUCinf (h.nmol/mL)	76,2 \pm 2,8	75,3 \pm 3,2
Vz (mL/kg)	103 \pm 9 9	90 \pm 5 5
Cl (mL/h/kg)	6,6 \pm 0,3	6,7 \pm 0,3

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos después de la administración s.c. del compuesto **12**, **17**, o **27** (100 nmol/kg) en rata. Experimento realizado con n = 3/tratamiento.

	Compuesto 12 (inhibidor dual de referencia)	Compuesto 17	Compuesto 27 (pentasacárido de referencia)
	Media \pm e.t.m	Media \pm e.t.m	Media \pm e.t.m
Tmax (h)	1,3	1,7	0,9
Cmax (nmol/mL)	1,26 \pm 0,02	1,24 \pm 0,01	0,92 \pm 0,05
T1/2 eli (h)	9,8 \pm 0,4	10,4 \pm 0,5	12,6 \pm 0,8
AUCinf (h.nmol/mL)	16,8 \pm 0,5	15,9 \pm 0,9	11,5 \pm 0,6
Vz (mL/kg)	84 \pm 2	95 \pm 6 6	159 \pm 11
Cl (mL/h/kg)	6,0 \pm 0,2	6,3 \pm 0,3	8,8 \pm 0,5

Se concluye que dentro de la variabilidad del experimento los compuestos **10**, **12**, **17** y **27** muestran el mismo comportamiento farmacocinético en ratas.

3.2 Farmacocinéticas – Experimento de neutralización:

Las ratas se trataron con el compuesto **10**, **12**, o **27** a una dosis de 100 nmol/kg s.c. A t=1 h, se tomó una muestra de sangre y se administraron i.v. 10 mg/kg de Avidina (de clara de huevo, Sigma) a las ratas tratadas con el compuesto **10** o **12**. Se tomaron muestras de sangre a 0,5 - 1 - 3 - 6 y 23 horas con posterioridad. La sangre se trató como se describe en el experimento farmacocinético y la concentración de las muestras se determinó midiendo la actividad anti-Xa (residual). (Figura 8)

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos después de la administración s.c. de 100 nmol/kg de compuesto **10** o **12** y avidina (10 mg/kg) a t= 1 h. Experimento realizado con n = 3/tratamiento.

	Compuesto 10 (+ avidina a t= 1h)	Compuesto 12 (+ avidina a t= 1h) (inhibidor dual de referencia)
	Media ± e.t.m	Media ± e.t.m
Tmax (h)	1,0	1,3
Cmax(nmol/mL)	1,03 ± 0,1	1,21 ± 0,08
T1/2 eli(h)	0,9 ± 0,05	11,7 ± 1,1
AUCinf(h.nmol)/mL)	1,6 ± 0,2	15,7 ± 0,4
Vz(mL/kg)	82 ± 6	107 ± 7
Cl(mL/h/kg)	61,7 ± 5,6	6,4 ± 0,2

5 Se concluye que después de la administración s.c. del compuesto **10** (100 nmol/kg), la actividad antitrombótica determinada midiendo la actividad anti-Xa (residual) se puede neutralizar por medio de la administración de 10 mg/kg i.v. de avidina. La neutralización del compuesto **10** por medio de la avidina se refleja en la fuerte reducción de T1/2 eli total, la fuerte reducción de AUCinf total y el fuerte aumento de Cl en comparación con el compuesto **12**. Además, el comportamiento farmacocinético del compuesto **12** equivalente no biotinilado no resulta afectado por la adición de avidina (también cuando se compara con el pentasacárido **27** de referencia que muestra un perfil similar).
10 Lo último confirma que la neutralización está asociada con la presencia de la marca de biotina y que no afecta al comportamiento farmacocinético del inhibidor dual.

15 En un experimento separado el compuesto **10**, **17** o **26** se administró a una dosis de 500 nmol/kg s.c. después de lo cual la sangre se recogió a las 24 horas. A continuación se administraron 10 mg/kg de avidina intravenosamente y la sangre se recogió a las 25 y 26 horas. (Figura 9)

20 Tabla 5. Niveles de plasma después de la administración s.c. de 500 nmol/kg del compuesto **10**, **17** y **26** a las 24 horas y las 2 horas después de la administración de avidina (10 mg/kg i.v.) a t= 24h. Experimento realizado con n = 3/tratamiento, los valores se proporcionan como la media ± etm.

	Compuesto 10 (nmol/mL)	Compuesto 17 (nmol/mL)	Compuesto 26 (nmol/mL)
T = 24h	0,733 ± 0,033	0,666 ± 0,093	1,071 ± 0,058
	avidina a T=24u05 en todos los casos		
T=26h	0,185 ± 0,045	0,112 ± 0,035	0,361 ± 0,026
% de reducción	75%	83%	66%

25 Se concluye que en las 2 horas siguientes a la administración de la avidina (10 mg/kg) la concentración de plasma de los compuestos **10**, **17** y **26** se redujo en 75, 83 y 66%, respectivamente. El experimento se realizó 24h después de la administración s.c. de los compuestos biotinilados, lo que revela que el conector entre el radical biotina y el compuesto antitrombótico es estable en vivo.

4. Neutralización en vivo de la actividad antitrombótica

30 Una infusión intravascular de una suspensión de colágeno induce la agregación plaquetaria y ocasiona trombocitopenia transitoria en ratas. Este ensayo se utiliza para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo sobre la gravedad de la trombocitopenia inducida por colágeno en ratas.

35 En el primer experimento se trataron s.c. cobayas macho con el compuesto **10** a una dosis de 75 nmol/kg o vehículo a las 4 horas de la infusión de colágeno. En un segundo experimento se administraron s.c. los compuestos **12** y **17** a una dosis de 100 nmol/kg en el mismo momento. Las cobayas macho se anestesiaron por medio de la administración i.m. de Cetamina + Sedamun (90 + 10 mg/kg, respectivamente). Al cabo de 15 minutos se sacó mediante disección una de las arterias carótidas comunes y se canuló con una cánula PE 50 (Clay Adams). Se recogieron dos muestras de sangre de 0,5 mL en viales de plástico que contenían 25 µL de una disolución 0,20 M de Na₂EDTA. La cánula se conectó a continuación a una jeringa que contenía 0,25 mg/mL de una suspensión de
40

colágeno (Hormon Chemie, Munich, West Germany, diluido con tampón isotónico de pH 2,8). Esta suspensión se administró a través de una infusión de 225 µL durante 30 segundos. A continuación la jeringa se desconectó y se tomaron 2 muestras de sangre de 0,5 mL a los 85 y 95 segundos después del comienzo de la infusión del colágeno. A continuación los animales se eutanzaron después de lo se contó el número de plaquetas por muestra con un contador de células sanguíneas Sysmex modelo KX-21. En caso de utilizar avidina, se administraron i.v. 10 mg/kg de avidina a t= 4 h después de la administración s.c. del compuesto **10**, **12** o **17** después de lo cual el colágeno se infundió en 5 minutos.

Después del recuento del número de plaquetas en las muestras de sangre recogidas se calcula el descenso del número de plaquetas por medio de la división del número medio de plaquetas de las muestras de sangre obtenidas a t= 85 y 95 segundos por el valor medio de las muestras de sangre obtenidas a t= 0. El ensayo se llevó a cabo con n = 4.

Tabla 6. Recuentos de plaquetas después de la administración del compuesto **10** (75 nmol/kg) con o sin avidina en un modelo en vivo (cobaya) basado en la agregación plaquetaria inducida por colágeno

Tratamiento	Núm. de plaquetas	Núm. de plaquetas	% restante de plaquetas	% de inhibición
(75 nmol/kg)	t= 0	t= 90 seg		
Grupo de control	390 ± 23	158 ± 42	39,2 ± 7,6	0
Compuesto 10	386 ± 31	328 ± 18	85,3 ± 2,5	76 ± 4
Compuesto 10 + avidina	384 ± 20	152 ± 26	40,4 ± 7,8	2 ± 13

Tabla 7. Recuentos de plaquetas después de la administración del compuesto **12** o **17** (100 nmol/kg s.c.) con o sin avidina en un modelo en vivo (cobaya) basado en la agregación plaquetaria inducida por colágeno

Tratamiento	Núm. de plaquetas	Núm. de plaquetas	% restante de plaquetas	% de inhibición
(100 nmol/kg)	t=0	t=90 seg		
Grupo de control	391 ± 12	192 ± 13	49.0 ± 3.9	0
Compuesto 12	426 ± 6	360 ± 7	84,5 ± 2,2	70 ± 4
Compuesto 12 + avidina	379 ± 6	329 ± 11	86,5 ± 1,7	74 ± 3 3
Compuesto 17	424 ± 11	348 ± 7	82,5 ± 2,0	66 ± 4
Compuesto 17 + avidina	367 ± 16	181 ± 12	46,5 ± 7,8	-5 ± 15

Después de una dosis de 75 nmol/kg s.c. de compuesto **10** o 100 nmol/kg s.c. del compuesto **12** o **17**, los compuestos inhibieron la agregación plaquetaria inducida por colágeno en más de 66% a las 4 horas de la administración. La administración de 10 mg/kg de avidina inmediatamente antes de la infusión de colágeno ocasionó una neutralización inmediata y cuantitativa de la actividad inhibidora de los compuestos **10** y **17**, pero no del compuesto **12**, el compuesto que carece de radical biotina. Estos resultados muestran que la neutralización de las actividades antiplaquetarias mediadas por anti-GPIIb/IIIa de los compuestos **10** y **17** únicamente está mediada por la marca de biotina y está basada en una unión específica a la avidina. Por otra parte, la comparación de la reducción relativa de los recuentos de plaquetas efectuada por los compuestos **10**, **12** y **17** revela que la marca de biotina no interfiere en la actividad antiplaquetaria intrínseca de los inhibidores duales.

Farmacología adicional

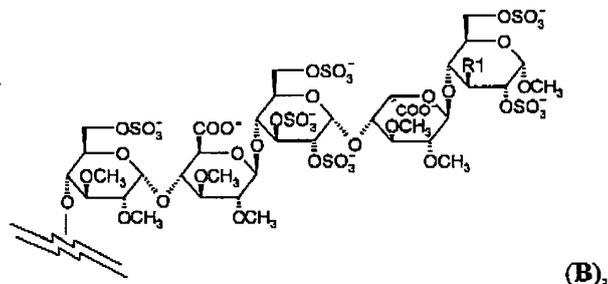
Una hemorragia dependiente de la dosis, inducida en cobayas después de la administración del compuesto **17**, se detuvo inmediatamente por medio de la administración de avidina (i.v. 10 mg/kg).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto antitrombótico de fórmula I

5 oligosacárido-espaciador-antagonista de GpIIb/IIIa (I),

donde el oligosacárido es un residuo de pentasacárido cargado negativamente de Fórmula B

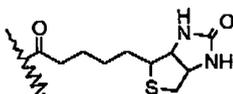


10 donde R1 es OCH₃ u OSO₃, estando compensada la carga por contraiones cargados positivamente;
 el espaciador es un residuo conector esencialmente farmacológicamente inactivo;
 el antagonista de GpIIb/IIIa es un residuo derivado de tirofiban (MK 383);
 15 donde el espaciador del compuesto de fórmula I comprende un enlace covalente con una marca de biotina.

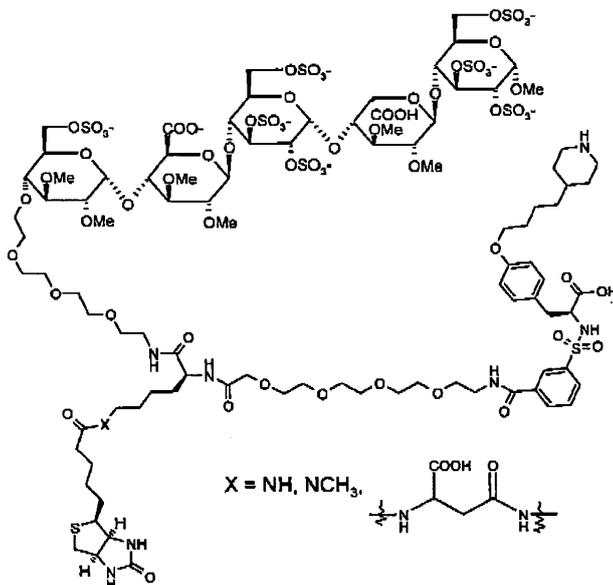
2. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, donde el espaciador tiene una longitud de 1 a 50 átomos.

20 3. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el espaciador comprende al menos un elemento -(CH₂CH₂O)-.

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el espaciador del compuesto de fórmula I
 comprende un enlace covalente con un análogo de biotina de fórmula -(CH₂)₄-X-BT, donde X =NH, N(1-4C)alquil,
 25 NH-CH(CH₂OH)-CH₂-C(O)-NH, NH-CH(CH₃)-CH₂-C(O)-NH, NH-CH(COOH)-CH₂-C(O)-NH o NH-CH(CH₂COOH)-
 CH₂-C(O)-NH, y donde BT es la marca

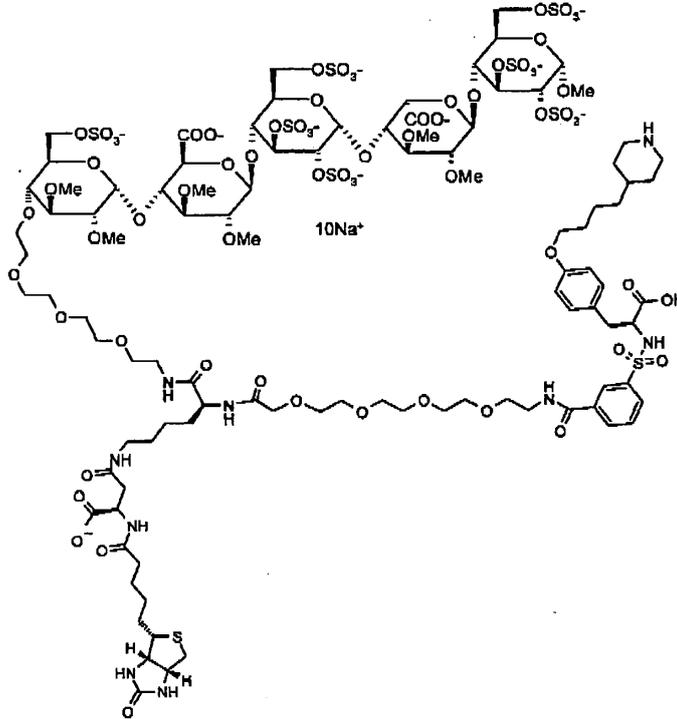


5. El compuesto de la reivindicación 4, que es



6. El compuesto de la reivindicación 5, que está en forma de su sal de sodio.

7. El compuesto de la reivindicación 5, que es



5

8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y agentes auxiliares farmacéuticamente adecuados

10 9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en terapia.

10. El uso del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la trombosis u otras enfermedades relacionadas con la trombina.

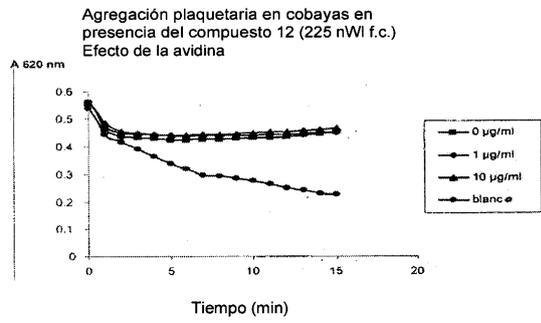


Figura 1

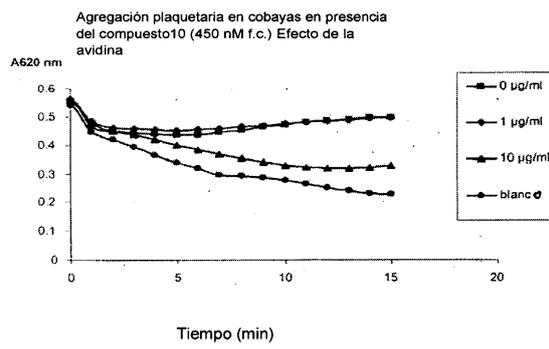
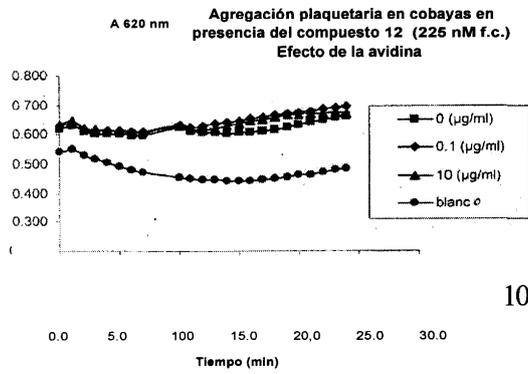


Figura 2



10

Figura 3

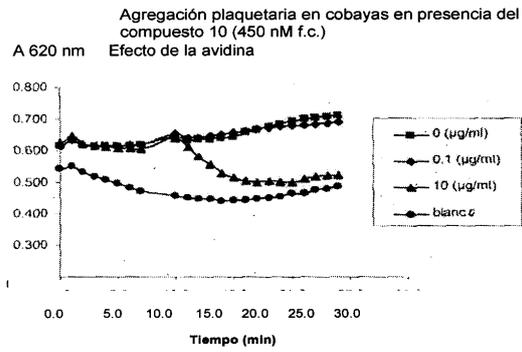


Figura 4

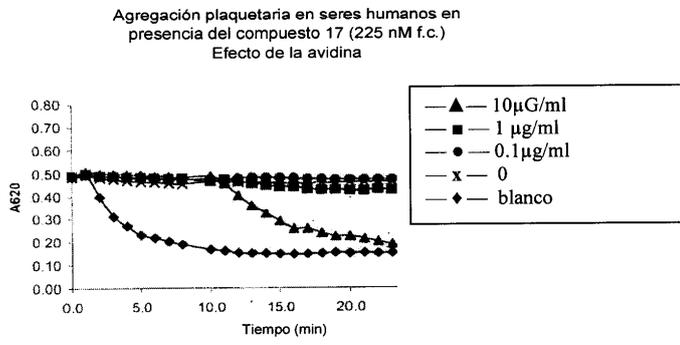


Figura 5

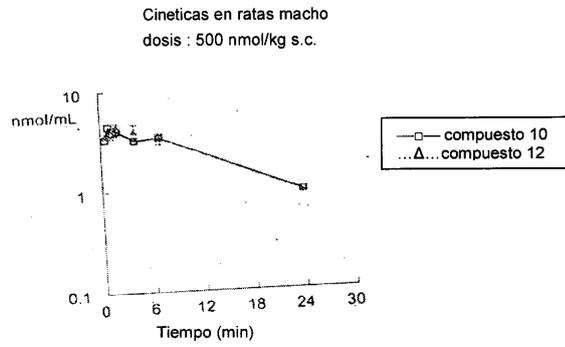


Figura 6

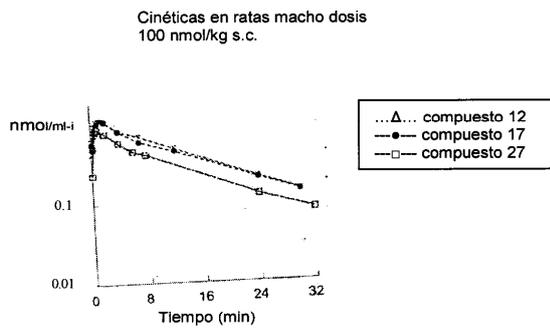


Figura 7

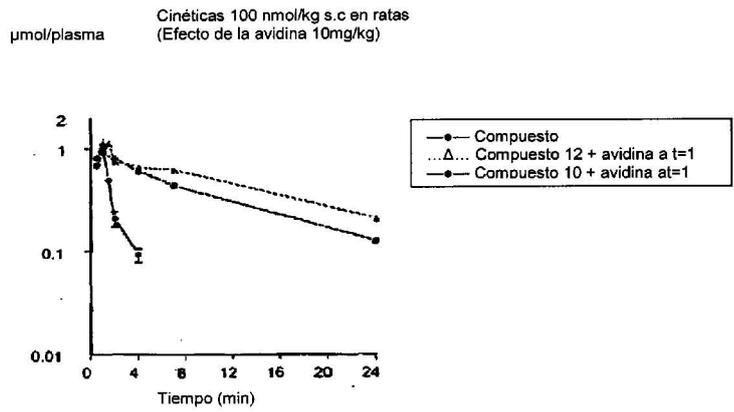


Figura 8

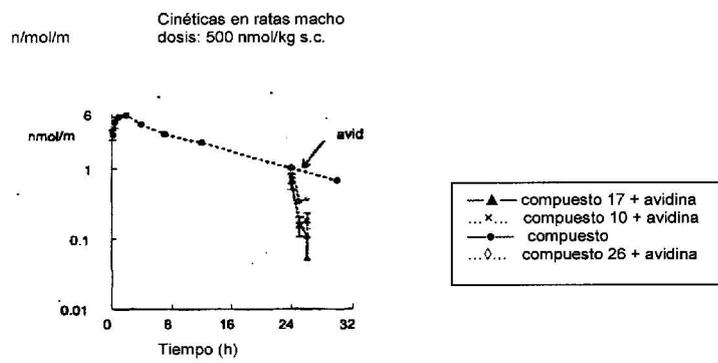


Figura 9