

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 090**

51 Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61K 31/4164 (2006.01)

A61K 31/435 (2006.01)

A61K 31/4409 (2006.01)

A61K 31/4412 (2006.01)

A61K 31/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2007 E 07864488 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2101760**

54 Título: **Formulaciones de dosis unitaria y métodos para el tratamiento de trombosis con un inhibidor oral del factor Xa**

30 Prioridad:

08.12.2006 US 873792 P
02.07.2007 US 947629 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2013

73 Titular/es:

MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
40 LANDSDOWNE STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:

SINHA, UMA;
HOLLENBACH, STANLEY J. y
ABE, KEITH

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 409 090 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

Formulaciones de dosis unitaria y métodos para el tratamiento de trombosis con un inhibidor oral del factor Xa

5 **Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio según 35 U.S.C. § 119(e) de las solicitudes provisionales de patente estadounidense n.ºs 60/873.792, presentada el 8 de diciembre de 2006, y 60/947.629, presentada el 2 de julio de 2007, e incorporándose ambas al presente documento mediante referencia en su totalidad.

10

Antecedentes de la invenciónCampo de la invención

15 Esta invención se refiere a métodos de inhibición de la coagulación usando una dosis particular de un inhibidor del factor Xa. La invención también se refiere a un ensayo que mide la generación de trombina en sangre para valorar la actividad antitrombótica de un compuesto de prueba.

Estado de la técnica

20

La hemostasia, el control de la hemorragia, se produce mediante medios quirúrgicos o mediante las propiedades fisiológicas de vasoconstricción y coagulación. Aunque las plaquetas y la coagulación sanguínea están implicadas ambas en el restablecimiento de la hemostasia y en enfermedades tromboticas, determinados componentes de la cascada de coagulación son responsables principalmente de la amplificación y aceleración de los procesos implicados en la agregación plaquetaria y la deposición de fibrina que son los acontecimientos principales en la trombosis y la hemostasia.

25

La formación de coágulos implica la conversión de fibrinógeno en fibrina que se polimeriza para formar una red para restablecer la hemostasia tras una lesión. Un proceso similar da como resultado vasos sanguíneos ocluidos en enfermedades tromboticas. La conversión de fibrinógeno en fibrina está catalizada por trombina, el producto final de una serie de reacciones en la cascada de coagulación sanguínea. La trombina también desempeña un papel clave en la activación de las plaquetas, contribuyendo de ese modo a trombosis en condiciones de flujo sanguíneo tanto arterial como venoso. Por estos motivos, se ha postulado que la regulación eficaz de trombina puede conducir a la regulación eficaz de la trombosis. Varias clases de anticoagulantes usados actualmente afectan directa o indirectamente a la trombina (es decir, heparinas no fraccionadas, heparinas de bajo peso molecular, compuestos similares a heparina, pentasacáridos y warfarina). La inhibición directa o indirecta de la actividad de trombina también ha sido el centro de atención de una variedad de anticoagulantes en el desarrollo clínico (revisado por Eriksson y Quinlan, *Drugs* 11: 1411-1429, 2006).

30

35

40

La protrombina, el precursor de la trombina, se convierte en la enzima activa por el factor Xa (fXa). La activación localizada de la generación del factor Xa mediada por el factor tisular/factor VIIa se amplifica por el complejo factor IXa/factor VIIIa y conduce a que la protrombinasa se ensamble en plaquetas activadas. El factor Xa, como parte del complejo de protrombinasa, es la única enzima responsable de la formación sostenida de trombina en la vasculatura. El factor Xa es una serina proteasa, la forma activada de su factor X precursor, y un miembro de los factores de unión a iones calcio, que contienen ácido gamma-carboxiglutámico (GLA), dependientes de vitamina K y de coagulación sanguínea. A diferencia de la trombina, que actúa sobre una variedad de sustratos proteicos incluyendo fibrinógeno y los receptores PAR (receptores activados por proteasas, Coughlin, *J. Thrombosis Haemostasis* 3: 1800-1814, 2005), parece que el factor Xa tiene un único sustrato fisiológico, concretamente protrombina. Puesto que una molécula de factor Xa puede generar más de 1000 moléculas de trombina (Mann, *et al.*, *J. Thrombosis Haemostasis* 1: 1504-1514, 2003), la inhibición directa del factor Xa como modo de inhibición indirecta de la formación de trombina puede ser una estrategia anticoagulante eficaz. Esta afirmación se basa en el papel clave de la protrombinasa en la síntesis de trombina y en el hecho de que la inhibición de protrombinasa tendrá un efecto pronunciado sobre las rutas de coagulación y agregación plaquetaria globales.

45

50

55

Las proteasas activadas tales como factor VIIa, factor IXa o factor Xa tienen escasa actividad proteolítica por sí mismas. Sin embargo, su ensamblaje en complejos dependientes de cofactor, unidos a membrana potencia significativamente su eficacia catalítica. El efecto es más drástico para el factor Xa, en el que aumenta la eficacia en un factor de 10^5 (Mann, *et al.*, *Blood* 76(1):1-16, 1990). Debido a la mayor concentración de los zimógenos presentes en sangre (protrombina 1,4 μM frente a factor Xa 150 nM) y la cinética de activación, es necesario inhibirse una menor cantidad de factor Xa que de trombina para lograr un efecto anticoagulante. También puede encontrarse una prueba indirecta de la hipótesis de superioridad del factor Xa como diana terapéutica en comparación con la trombina en ensayos clínicos para la prevención de trombosis venosa profunda. El fondaparinux, un inhibidor del factor Xa dependiente de antitrombina III, demostró ser superior a enoxaparina (una heparina de bajo peso molecular que inhibe tanto trombina como factor Xa) en cuatro ensayos de cirugía ortopédica (Turpie, *et al.*, *Archives Internal Medicine* 162(16): 1833-1840, 2002). Por tanto, se ha sugerido que los compuestos que inhiben selectivamente el factor Xa pueden ser útiles como agentes de diagnóstico *in vitro*, o para la administración

60

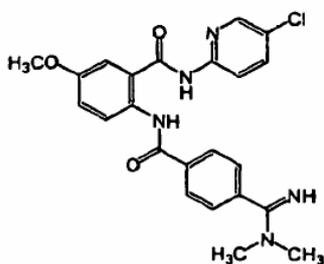
65

terapéutica en determinados trastornos tromboticos, véase por ejemplo, el documento WO 94/13693.

Sumario de la invención

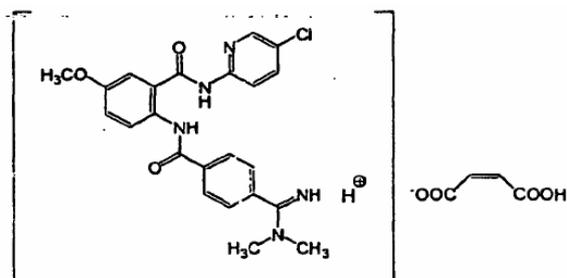
5 El modelado comparativo del grado de cambios en la actividad protrombinasa con respecto a niveles de eficacia antitrombótica han conducido al descubrimiento de la actividad terapéutica en seres humanos de inhibidores del factor Xa. Esta invención se refiere a un método de inhibición de la coagulación en un paciente humano usando una cantidad de inhibición de la coagulación de un inhibidor del factor Xa. Específicamente, un inhibidor directo del factor Xa disponible por vía oral es eficaz para inhibir la coagulación en un paciente humano cuando se administra al
 10 paciente en una cantidad diaria total de entre 0,2 y 2,0 miligramos por kilogramo basándose en el peso total del paciente ("mg/kg"). Se contempla que esta dosis será particularmente eficaz para el inhibidor del factor Xa de fórmula II descrito a continuación.

15 Por consiguiente, la invención proporciona un compuesto para su uso en un método de inhibición de la coagulación en un paciente humano que lo necesite, siendo el compuesto de fórmula II:



II

20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad de inhibición de la coagulación de dicho compuesto en el que la cantidad de inhibición de la coagulación es una dosis diaria total de entre 0,2 y 2,0 mg/kg. Normalmente, la dosis diaria total es de entre 0,2 y 1,5 mg/kg o de entre 0,4 y 1,2 mg/kg. En algunas realizaciones, la sal es una sal de maleato. En una realización, la sal es la sal de maleato que tiene la estructura de fórmula III:



III

25 Esta invención también se refiere a una formulación de dosis unitaria que comprende una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa de fórmula II tal como se definió anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, por ejemplo la sal de fórmula III. La cantidad de inhibición de la coagulación es de entre 0,2 y 2,0 mg/kg, En otras realizaciones, la dosis es de entre 0,2 y aproximadamente 1,5 mg/kg o de entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 1,2 mg/kg.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1A muestra la correlación de la generación de trombina con la razón normalizada internacional (RNI) en pacientes con tratamiento anticoagulante tratados con warfarina. Se midió la generación de trombina a los 10 minutos en muestras de plasma de pacientes que reciben terapia con warfarina estable (n = 137). Los datos de pacientes que reciben terapia con warfarina se presentan como quintiles de los resultados de RNI. Las barras de error muestran errores estándar.

40 La figura 1B muestra la correlación de la generación de trombina con tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) en pacientes con tratamiento anticoagulante tratados con enoxaparina. Se midió la generación de trombina plasmática en 16 pacientes tratados con enoxaparina. Se midieron las unidades anti-fXa mediante el ensayo

COATEST LMW según las instrucciones del fabricante. Se compararon los grupos mediante la prueba de la t de Student.

5 La figura 1C muestra la correlación de la generación de trombina con TTPA en pacientes con tratamiento anticoagulante tratados con heparina no fraccionada (HNF). Se midió la generación de trombina plasmática en 15 pacientes. Se midieron las unidades anti-fXa mediante el ensayo COATEST LMW según las instrucciones del fabricante. Se compararon los grupos mediante la prueba de la t de Student.

10 La figura 2 muestra la inhibición en respuesta a la dosis de trombosis *in vivo* en el modelo de babuino y proporciona evidencias de que el ensayo *in vitro* es predictivo de la actividad antitrombótica *in vivo*. Deposición de plaquetas marcada con indio en la cámara a lo largo del tiempo tras la infusión de vehículo o betrixabán. Se normalizó el número de plaquetas marcadas en la cámara para los recuentos de plaquetas antes de la infusión para animales individuales. Los datos representan la media \pm desviación estándar. Se analizó la deposición de plaquetas a los 140 minutos mediante ANOVA seguido por la prueba de Dunnett posterior. La dosis 3 (26-38 ng/ml) tuvo una disminución significativa en comparación con el control ($P < 0,05$) y la dosis 4 (54-88 ng/ml) tuvo una disminución significativa en comparación con el control (valor de $P < 0,01$).

20 La figura 3 muestra la inhibición en respuesta a la dosis de la generación de trombina en sangre completa de voluntarios humanos sanos. Se trató sangre completa con la concentración establecida (en nM) de betrixabán antes del inicio de la prueba. Se muestran las unidades relativas de fluorescencia que resultan de la escisión del sustrato de trombina marcado.

25 Las figuras 4A y 4B muestran la inhibición en respuesta a la dosis de la generación de trombina en sangre completa de voluntarios humanos sanos. Se trató sangre completa con la concentración establecida de fondaparinux (en nM) antes del inicio de la prueba. El intervalo de concentración de fondaparinux representado en la figura 4B corresponde a los niveles de anticoagulación terapéutica usados en pacientes de cirugía ortopédica y síndrome coronario agudo. Se muestran las unidades relativas de fluorescencia que resultan de la escisión del sustrato de trombina marcado.

30 La figura 5 muestra datos de ensayos *in vitro* realizados con plasma de voluntarios humanos sanos a los que se les administró betrixabán por vía oral. Esto se analiza más a fondo en el ejemplo 8.

35 La figura 6 muestra el porcentaje de pacientes con tromboembolia venosa (TEV) e intervalos de confianza del 95% para betrixabán y enoxaparina tal como se determinaron mediante el estudio en el ejemplo 9 con venografía unilateral entre los días 10 y 14 y para controles históricos de enoxaparina (B y C) de estudios que usan venografía bilateral realizada entre los días 10 y 14 tras cirugía ortopédica (artroplastia total de rodilla). Esto se analiza más a fondo en el ejemplo 9. Los detalles del estudio que corresponden a Enox B se notifican en Blood 102 (11); 2003. Los detalles del estudio que corresponden a Enox C se notifican en la referencia de Lassen *et al.* (J Thromb Haemostasis, 15 de septiembre de 2007).

40 La figura 7 muestra la reducción de la generación de trombina de referencia tras el tratamiento con dosis variables de betrixabán y enoxaparina en el día 2, el alta y el venograma. Se muestra el cambio medio con respecto a las unidades relativas de fluorescencia del nivel inicial (\pm error estándar de la media) en la generación de trombina plasmática, por visita y tratamiento. Los pacientes a los que se les dio el alta en el día 2 también se representan en el valor promedio para ese día del estudio.

50 La figura 8 muestra los cambios en la actividad anti-fXa de las dosis variables de betrixabán y enoxaparina en el día 2, el alta y el venograma. Se muestra la actividad anti-fXa (U/ml) media (\pm error estándar de la media) tal como se midió mediante ensayo COATEST de heparina LMW, por visita y tratamiento. El límite detectable para anti-fXa era de 0,05 U/ml; los valores por debajo del límite detectable se fijaron en 0,025. Los pacientes a los que se les dio el alta en el día 2 también se representan en el valor promedio para ese día del estudio.

55 La figura 9 muestra la concentración de betrixabán en plasma (ng/ml) de las dosis variables de betrixabán en el día 2, el alta y el venograma.

Descripción detallada de la invención

60 Antes de describir las composiciones y los métodos, debe entenderse que la invención no se limita a las metodologías, los protocolos, las líneas celulares, los ensayos y los reactivos particulares descritos, ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento pretende describir realizaciones particulares de la presente invención, y no pretende limitar en modo alguno el alcance de la presente invención tal como expone en las reivindicaciones adjuntas.

65 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados entendidos comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente

documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen a continuación los métodos, dispositivos y materiales preferidos. Todas las publicaciones técnicas y de patente citadas en el presente documento se incorporan como referencia al presente documento en su totalidad. No debe interpretarse nada en el presente documento como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder a tal descripción según la invención anterior.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de cultivo tisular, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición; la serie Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*; la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson *et al.* (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson *et al.* (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5ª edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; patente estadounidense n.º 4.683.195; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Herzenberg *et al.* eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology; Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002)).

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". También debe entenderse, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son meramente a modo de ejemplo y que en la técnica se conocen equivalentes de éstos.

1. Definiciones

Según la presente invención y tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos se definen con los siguientes significados, a menos que se indiquen explícitamente de otro modo.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término "que comprende" o "comprende" signifique que las composiciones y los métodos incluyan los elementos enumerados, pero sin excluir otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir las composiciones y los métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier importancia esencial de la combinación para el propósito establecido. Por tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en el presente documento no excluirá contaminantes traza procedentes del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada con fosfato, conservantes y similares. "Que consiste en" significará que excluye más de elementos traza de otros componentes y etapas del método sustanciales para administrar las composiciones de esta invención o etapas de procedimiento para producir una composición o lograr un resultado pretendido. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

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

El término "muestra de prueba" o "disolución de ensayo" comprende sangre completa o plasma sanguíneo (o bien tratado con anticoagulante o bien no tratado con anticoagulante), factor tisular ("FT"), un sustrato de trombina marcado de manera detectable y un compuesto de prueba. La disolución también puede contener varios disolventes adecuados, tales como dimetilsulfóxido (DMSO). En una realización, la sangre o el plasma en la muestra de prueba o disolución de ensayo no se trata ni titula con enzimas, incluyendo enzimas de veneno de reptiles, tales como Reptilase®. En otra realización, la sangre o el plasma no es rico en plaquetas.

El término "factor tisular" o FT está presente en tejido subendotelial, plaquetas y leucocitos y es necesario para el inicio de la formación de trombina a partir del zimógeno protrombina. FT también se denomina tromboplastina, factor III o CD142. Los FT usados en los métodos de esta invención son preferiblemente FT recombinante humano que está disponible comercialmente de Dade Behring Pharmaceuticals o American Diagnostica, Inc. Los FT usados en los ensayos también pueden ser endógenos o una combinación de endógenos y exógenos.

El término “compuesto de prueba” tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto no peptídico que tiene un peso molecular de menos de 1500 Daltons. Este término también se refiere a restos de sacáridos y de heparinoides pequeños que tienen un peso molecular de menos de 5000 Daltons.

- 5 El término “muestra de control” se refiere a la muestra de prueba o disolución de ensayo en la que el compuesto de prueba está ausente.

10 El término “sangre completa no tratada con anticoagulante” se refiere a sangre recogida de un paciente que no ha recibido terapia de anticoagulación mediante un agente antitrombótico. Esto también se refiere a sangre de un paciente que puede haber recibido terapia de anticoagulación pero ya no se produce ningún beneficio o efecto.

15 El término “sangre completa tratada con anticoagulante” o “plasma tratado con anticoagulante” se refiere a sangre o plasma extraído de pacientes que se han sometido recientemente o están sometiéndose actualmente a terapia anticoagulante. Esto también se refiere a sangre de donantes humanos que se obtiene mediante venopunción y se recoge en un medio que contiene anticoagulante añadido de manera exógena tal como citrato, EDTA o heparina.

20 El término “sustrato de trombina marcado de manera detectable” se refiere a un sustrato de trombina que está marcado mediante cualquier número de marcadores detectables bien conocidos. Estos marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes, marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores electroquimioluminescentes y marcadores radiactivos. En una realización de la invención, el sustrato marcado es Z-Gly-Gly-Arg-AMC, disponible comercialmente de Bachem.

25 El término “actividad antitrombótica” se refiere a la capacidad de los compuestos para inhibir la formación de trombos con efectos aceptables sobre medidas clásicas de parámetros de coagulación, plaquetas y función plaquetaria. Los estados caracterizados por trombosis no deseada incluyen los que afectan a la vasculatura arterial y venosa. Con respecto a la vasculatura arterial coronaria, la formación anómala de trombos caracteriza la ruptura de una placa aterosclerótica establecida que es la causa principal de infarto de miocardio agudo y angina inestable, así como que también caracteriza la formación de trombos coronarios oclusivos que resultan de o bien terapia trombolítica o bien angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP).

30 Con respecto a la vasculatura venosa, la formación anómala de trombos caracteriza el estado observado en pacientes que se someten a cirugía mayor en la extremidades inferiores o la zona abdominal que habitualmente padecen de formación de trombos en la vasculatura venosa que da como resultado un flujo sanguíneo reducido a la extremidad afectada y una predisposición a embolia pulmonar. La formación anómala de trombos caracteriza además la coagulopatía intravascular diseminada que se produce comúnmente en ambos sistemas vasculares durante choque septicémico, determinadas infecciones virales y cáncer, un estado en el que existe un rápido consumo de factores de coagulación y coagulación sistémica, lo que da como resultado la formación de trombos potencialmente mortales que se producen en toda la microvasculatura conduciendo a fallo orgánico extendido.

40 La evidencia de la actividad antitrombótica le proporcionará utilidad en terapia anticoagulante para la prevención de la coagulación de sangre completa almacenada y para prevenir la coagulación en otras muestras biológicas para pruebas o almacenamiento.

45 El término “sales farmacéuticamente aceptables” incluye sales de compuestos derivados de la combinación de un compuesto y un ácido orgánico o inorgánico. Estos compuestos son útiles tanto en forma de base libre como de sal. En la práctica, el uso de la forma de sal es equivalente al uso de la forma de base; las sales de adición tanto de ácido como de base están dentro del alcance de la presente invención.

50 “Sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales que mantienen la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres y que no son indeseables biológicamente o de otra manera, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

60 Las “sales de adición de base farmacéuticamente aceptables” incluyen las derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Se prefieren particularmente las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas que se producen de manera natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperizina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Bases no tóxicas orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

“Propiedad biológica” para los propósitos en el presente documento significa un efector o función antigénica o actividad *in vivo* que se realiza directa o indirectamente por un compuesto de esta invención que se muestra habitualmente mediante ensayos *in vitro*. Las funciones efectoras incluyen la unión a receptores o ligandos, cualquier actividad enzimática o actividad moduladora enzimática, cualquier actividad de unión a portadores, cualquier actividad hormonal, cualquier actividad de promover o inhibir la adhesión de células a una matriz extracelular o a moléculas de la superficie celular o cualquier papel estructural. Las funciones antigénicas incluyen presentar un epítipo o sitio antigénico que puede reaccionar con anticuerpos producidos contra el mismo.

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

2. Métodos de inhibición de la coagulación sanguínea y formulaciones de dosis unitaria

Un aspecto de la invención proporciona métodos de inhibición de la coagulación sanguínea en un paciente humano mediante la administración al paciente de una cantidad de inhibición de la coagulación de un compuesto inhibidor del factor Xa. Este aspecto se refiere al descubrimiento sorprendente de que la dosis unitaria de los compuestos inhibidores del factor Xa dados a conocer en el presente documento requerida para inhibir la coagulación en un primate es menor que la dosis unitaria requerida para obtener niveles similares de inhibición de la coagulación en otros modelos de animales, tales como roedores. Tal como se describe adicionalmente en los ejemplos y las figuras, se demostró esta especificidad de especie en ensayos *in vivo* y mediante prolongaciones *in vitro* del tiempo de protrombina (TP) en plasma de rata, de conejo, de babuino y de ser humano. Se logró un aumento de dos veces del TP a concentraciones de 8,9 μM en rata y 1,6 μM en conejo en comparación con los primates en los que se observó el cambio de dos veces en el TP a 1 μM en babuino y 0,4 μM en seres humanos.

Los compuestos inhibidores del factor Xa son útiles en el tratamiento de estados patológicos en mamíferos que tienen trastornos de coagulación tal como en el tratamiento o la prevención de angina inestable, angina resistente al tratamiento, infarto de miocardio, ataques isquémicos transitorios, accidente cerebrovascular trombótico, accidente cerebrovascular embólico, coagulación intravascular diseminada incluyendo el tratamiento de choque septicémico, trombosis venosa profunda en la prevención de embolia pulmonar o el tratamiento de reoclusión o reestenosis de arterias coronarias sometidas a reperfusión. Además, estos compuestos son útiles para el tratamiento o la profilaxis de aquellas enfermedades que implican la producción y/o acción del complejo factor Xa/protrombina. Esto incluye varios estados trombóticos y protrombóticos en los que se activa la cascada de coagulación que incluyen pero no se limitan a, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, complicaciones tromboembólicas de cirugía y oclusión arterial periférica. Otras enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de compuestos de esta invención incluyen, sin limitación, formación de trombos coronarios oclusivos que resultan de o bien terapia trombótica o bien angioplastia coronaria transluminal percutánea, formación de trombos en la vasculatura venosa, coagulopatía intravascular diseminada, un estado en el que existe un rápido consumo de factores de coagulación y coagulación sistémica que da como resultado la formación de trombos potencialmente mortales que se producen en toda la microvasculatura, lo que conduce a fallo orgánico extendido, accidente cerebrovascular hemorrágico, diálisis renal, oxigenación sanguínea y cateterización cardíaca.

Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona un compuesto para su uso en un método de inhibición de la coagulación en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar al paciente una cantidad de inhibición de la coagulación de un compuesto inhibidor del factor Xa de fórmula II tal como se definió anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,2 y 2,0 mg/kg. El compuesto inhibidor del factor Xa se muestra en la fórmula II, y sales del mismo (tales como de fórmula III) tal como se expone a continuación. En realizaciones adicionales, la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,2 y 1,5 mg/kg; o alternativamente, la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,4 y 1,2 mg/kg; o alternativamente, la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,43 y 1,15 mg/kg; o alternativamente, la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,45 y 0,55 mg/kg. Todavía en otra realización de la invención, la cantidad del compuesto inhibidor del factor Xa administrado a un ser humano es tal que el nivel sérico es de aproximadamente 1 μM o inferior.

Otro aspecto de la invención proporciona las formulaciones de dosis unitaria que comprenden una composición

farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa de fórmula II tal como se definió anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en las que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,2 y 2,0 mg/kg; alternativamente, la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,2 y 1,5 mg/kg; o alternativamente, la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,4 y 1,2 mg/kg; o alternativamente, la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre 0,43 y 1,15 mg/kg; o alternativamente, la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto inhibidor del factor Xa es una dosis diaria total de entre aproximadamente 0,45 y aproximadamente 0,55 mg/kg.

Las formulaciones se describen adicionalmente en la sección titulada "formulaciones."

3. Ensayo de generación de trombina

Se han desarrollado medidas actuales para monitorizar el estado de coagulación (tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), tiempo de protrombina (TP), razón normalizada internacional (RNI), tiempo de coagulación activada (TCA), unidades anti-fXa) para los anticoagulantes existentes (es decir, heparinas y warfarina). Las pruebas disponibles no son lo suficientemente sensibles como para evaluar concentraciones terapéuticas de inhibidores directos de fXa.

Puesto que la verdadera diana de los inhibidores de fXa es el complejo de protrombinasa asociado a membrana, un ensayo que mida la generación de trombina será una medida superior del nivel de anticoagulación logrado en pacientes a los que se les administraron inhibidores directos de fXa. Se usó betrixabán, un inhibidor de fXa biodisponible por vía oral en estadios avanzados de desarrollo clínico (fase II), para validar esta hipótesis. El betrixabán es un inhibidor competitivo, dirigido al sitio activo de fXa humano ($K_i = 117 \text{ pM}$) y muestra una especificidad mayor que 86.000 veces frente a proteasas relacionadas tales como trombina, factor VIIa, factor IXa, proteína C activada, activador del plasminógeno tisular, plasmina y tripsina. El betrixabán es un potente inhibidor del complejo de protrombinasa ($K_i = 801 \text{ pM}$).

Los ensayos conocidos en la técnica, tal como aquellos descritos en Sinha *et al.*, ATVB 2003, 23: 1098-1104, incorporado al presente documento como referencia en su totalidad, pueden distinguirse de los descritos en el presente documento en las etapas adicionales, tales como tratar la sangre con veneno de serpiente o que se requieren materiales o se toman distintas mediciones. Por ejemplo, los ensayos descritos en Sinha *et al.* requerían que el plasma sanguíneo se tratara con Reptilase® para retirar el fibrinógeno o que se usara plasma rico en plaquetas o que se midiera la trombina indirectamente con marcadores tales como complejos trombina-antitrombina III.

Un aspecto descrito en el presente documento proporciona ensayos *in vitro* que son predictivos de si un compuesto tiene actividad antitrombótica *in vivo*. La actividad antitrombótica puede determinarse usando sangre completa midiendo la actividad de trombina. La cantidad de trombina se correlaciona con la actividad de anticoagulación en las figuras 1A, 1B y 1C. Este ensayo se correlaciona además con la actividad de anticoagulación *in vivo* y se analiza más a fondo en la figura 2 y los ejemplos.

Los ensayos implican determinar la actividad de trombina en presencia y ausencia de un compuesto de prueba. En una realización, se prepara una disolución de ensayo. La disolución de ensayo se compone de sangre completa no tratada con anticoagulante, factor tisular (FT) y un sustrato de trombina marcado de manera detectable, tal como Z-Gly-Gly-Arg AMC. Se añade un compuesto de prueba de interés a la disolución de ensayo y se mide la escisión del sustrato de trombina marcado de manera detectable en función del tiempo. Puede variarse el orden de introducción de los componentes en la disolución de ensayo.

También se realiza un ensayo de control con la disolución de ensayo en ausencia de un compuesto de prueba. Una reducción en la actividad de trombina, tal como se indica por una disminución en la escisión del sustrato de trombina, en el ensayo con el compuesto de prueba en relación con el ensayo de control indica que el compuesto de prueba tiene actividad antitrombótica *in vivo*.

Alternativamente, el ensayo no incluye FT añadido de manera exógena. En lugar de eso, se agitó la disolución de ensayo para activar el FT presente de manera endógena en las células en sangre completa.

Alternativamente, la disolución de ensayo se compone de sangre completa tratada con anticoagulante o plasma tratado con anticoagulante en lugar de sangre completa no tratada con anticoagulante.

Por consiguiente, en el presente documento se describe un ensayo *in vitro* para determinar si un compuesto tiene actividad antitrombótica *in vivo*, que comprende:

a) introducir un compuesto de prueba en una muestra *in vitro* de sangre completa no tratada con anticoagulante que

comprende factor tisular (FT) y un sustrato de trombina marcado de manera detectable para formar una muestra de prueba;

5 b) determinar el nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba monitorizando la escisión del sustrato de trombina marcado de manera detectable en la muestra de prueba en función del tiempo;

10 c) determinar el nivel de actividad de trombina en una muestra de control monitorizando la escisión del sustrato de trombina marcado de manera detectable en la muestra de control en función del tiempo, en el que la muestra de control comprende sangre completa no tratada con anticoagulante que comprende factor tisular (FT) y un sustrato de trombina marcado de manera detectable;

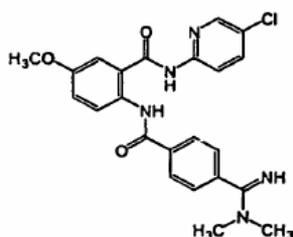
15 d) comparar el nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba y la muestra de control, en el que un menor nivel de actividad de trombina en la muestra de prueba es una indicación de que el compuesto de prueba tiene actividad antitrombótica *in vivo*.

La sangre completa tratada con anticoagulante de a) puede sustituirse o bien por sangre completa no tratada con anticoagulante, o bien por plasma tratado con anticoagulante, o bien por plasma no tratado con anticoagulante.

20 2. Compuestos inhibidores del factor Xa

Se han notificado varios inhibidores del factor Xa como polipéptidos derivados de organismos hematófagos, así como compuestos que no son inhibidores de tipo polipéptido grande. Los inhibidores del factor Xa adicionales incluyen compuestos orgánicos de molécula pequeña, tales como compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno que tienen grupos sustituyentes amidino, en los que dos grupos funcionales de los compuestos pueden unirse al factor Xa en dos de sus sitios activos. Por ejemplo, el documento WO 98/28269 describe compuestos de pirazol que tienen un grupo amidino en el extremo terminal (-C(=NH)-NH₂); el documento WO 97/21437 describe compuestos de bencimidazol sustituidos con un radical básico que están conectados a un grupo naftilo mediante un alqueno de cadena lineal o ramificada, grupo de formación de puente de -C(=O)- o -S(=O)₂-; el documento WO 99/10316 describe compuestos que tienen un grupo 4-fenil-N-alquilamidinopiperidina y 4-fenoxi-N-alquilamidinopiperidina conectado a un grupo 3-amidinofenilo mediante un puente de carboxamida-alquilenamino; y el documento EP 798295 describe compuestos que tienen un grupo 4-fenoxi-N-alquilamido-piperidina conectado a un grupo amidinonaftilo mediante un grupo puente de carboxamida o sulfonamida sustituido o no sustituido. Los inhibidores del factor Xa notificados adicionales incluyen aquéllos que tienen una estructura que comprende un fenil-amidino, fenilo y halofenilo conectado mediante uniones amida (patentes estadounidense n.ºs 6.376.515 y 6.844.367). Otros inhibidores del factor Xa tienen el halo-fenilo sustituido por un halo-piridilo (véanse las patentes estadounidenses n.ºs 6.376.515 B2 y 6.835.739).

En la invención, el inhibidor del factor Xa es un compuesto de fórmula II:



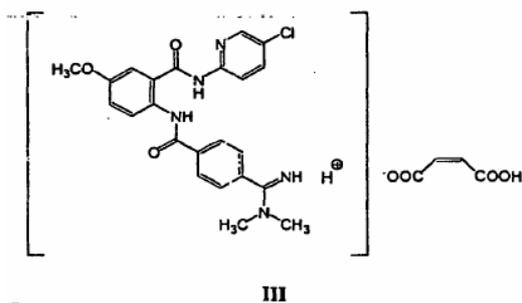
40 II

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los compuestos de fórmula II se dan a conocer como ejemplo 206 en las patentes estadounidenses n.ºs. 6.376.515 y 6.835.739, y incorporándose ambas al presente documento como referencia en su totalidad. El compuesto de fórmula II tiene el nombre genérico de betrixabán y a veces se denomina así a lo largo del documento.

En una realización específica, la sal de un compuesto de fórmula II es una sal de maleato. La sal de maleato se forma protonando uno o más átomos de nitrógeno del compuesto de fórmula II. En una realización, el nitrógeno de amidino (=NH) de la fórmula II se protona (=NH₂⁺) para formar la sal.

50

En una realización, la sal de maleato del compuesto de fórmula II se representa mediante la fórmula III:



Esto también se denomina en el presente documento maleato de betrixabán.

- 5 En otra realización, la sal de fórmula III tiene una forma polimórfica cristalina. En realizaciones preferidas, la forma polimórfica cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo que tiene al menos cuatro y más preferiblemente ocho de las siguientes ubicaciones de picos característicos aproximados: 4,9, 9,7, 13,8, 14,1, 15,2, 17,6, 18,5, 20,8, 21,6, 22,7, 24,1, 26,3, 26,8 grados 2θ . Todavía en otra realización, el patrón de difracción de rayos X de polvo tiene ubicaciones de picos característicos aproximados de 4,9, 9,7, 11,8, 13,8, 14,1, 15,2, 17,6, 18,5, 19,9, 20,8, 21,6, 22,7, 24,1, 25,0, 26,3, 26,8 grados 2θ . La invención contempla que los picos característicos aproximados tendrán una desviación de hasta aproximadamente $\pm 0,2$ grados 2θ . Véase el documento PCT/US2006/43635, presentado el 7 de noviembre de 2006, incorporado al presente documento como referencia en su totalidad, para ver una descripción adicional de sales y polimorfos de sales del compuesto de fórmula II.

15 4. Formulaciones

Una realización de esta invención se refiere a una formulación de dosis unitaria. La formulación de dosis unitaria comprende una composición farmacéutica que comprende un inhibidor del factor Xa de fórmula II tal como se describió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable. El inhibidor del factor Xa está presente en una cantidad de inhibición de la coagulación eficaz que es de entre 0,2 mg/kg y 2,0 mg/kg. En determinadas realizaciones, la dosis se formula para administrarse una vez o dos veces al día, de manera que la cantidad total al día es la cantidad eficaz para la coagulación. En algunas realizaciones, la formulación de dosis unitaria es para administración oral.

25 En el tratamiento de trastornos trombóticos, pueden utilizarse los compuestos y/o las sales de esta invención en composiciones tales como comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar o elixires para administración oral, supositorios, suspensiones o disoluciones estériles o administración de inyectables, y similares, o incorporarse en artículos conformados. El método de administración variará de un sujeto a otro y dependerá de factores tales como el tipo de mamífero que esté tratándose, su sexo, peso, dieta, medicación concurrente, estado clínico global, los compuestos y/o las sales particulares empleados, el uso específico para el que se emplean estos compuestos y/o sales, y otros factores que reconocerán los expertos en las técnicas médicas.

Pueden prepararse cápsulas útiles en la presente invención usando técnicas de encapsulación convencionales y conocidas, tales como las descritas en Stroud *et al.*, patente estadounidense n.º 5.735.105. La cápsula es normalmente una cubierta hueca de forma generalmente cilíndrica que tiene un diámetro y una longitud suficientes de modo que las composiciones de disolución farmacéutica que contienen la dosis apropiada del principio activo caben dentro de la cápsula. El exterior de las cápsulas puede incluir plastificante, agua, gelatina, almidones modificados, gomas, carragenanos y mezclas de los mismos. Los expertos en la técnica apreciarán qué composiciones son adecuadas.

Además del principio activo, los comprimidos útiles en la presente invención pueden comprender cargas, aglutinantes, agentes de compresión, lubricantes, disgregantes, colorantes, agua, talco y otros elementos reconocidos por un experto en la técnica. Los comprimidos pueden ser homogéneos con una única capa en el núcleo, o tener múltiples capas con el fin de producir perfiles de liberación preferidos. En algunos casos, los comprimidos de la presente invención pueden estar recubiertos, tal como con un recubrimiento entérico. Un experto en la técnica apreciará que otros excipientes son útiles en los comprimidos de la presente invención.

Las pastillas para chupar útiles en la presente invención incluyen una cantidad apropiada del principio activo así como cualquier carga, aglutinante, disgregante, disolvente, agente de solubilización, edulcorante, agente colorante y cualquier otro componente que un experto en la técnica apreciará que es necesario. Las pastillas para chupar de la presente invención están diseñadas para disolverse y liberar el principio activo en contacto con la boca del paciente. Un experto en la técnica apreciará que otros métodos de administración son útiles en la presente invención.

Se preparan formulaciones de los compuestos y/o las sales de esta invención para almacenamiento o administración mezclando la sal que tiene un grado de pureza deseado con portadores, excipientes, estabilizantes, etc.

fisiológicamente aceptables, y pueden proporcionarse en formulaciones de liberación sostenida o liberación programada. Se conocen bien en el campo farmacéutico portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., (A.R. Gennaro Ed. 1985). Tales materiales no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, acetato y compuestos y/o sales de ácidos orgánicos, antioxidantes tales como ácido ascórbico, péptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente diez residuos) tales como poliarginina, proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidina, aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol, contraiones tales como sodio y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol.

Las formulaciones de dosificación de los compuestos y/o las sales de esta invención que van a usarse para la administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas estériles tales como membranas de 0,2 micrómetros, o mediante otros métodos convencionales. Las formulaciones se almacenarán normalmente en forma liofilizada o como una disolución acuosa. El pH de las preparaciones de esta invención será normalmente de entre 3 y 11, más preferiblemente de desde 5 hasta 9 y lo más preferiblemente de desde 7 hasta 8. Se entenderá que el uso de determinados excipientes, portadores o estabilizantes anteriores dará como resultado la formación de compuestos y/o sales de polipéptidos cíclicos. Aunque la vía de administración preferida es mediante inyección, se prevén otros métodos de administración tales como por vía intravenosa (en bolo y/o infusión), por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía colónica, por vía rectal, por vía nasal o por vía intraperitoneal, empleando una variedad de formas de dosificación tales como supositorios, pequeños cilindros o gránulos implantados, aerosoles, formulaciones de dosificación oral (tal como comprimidos, cápsulas y pastillas para chupar) y formulaciones tópicas tales como pomadas, gotas y parches dérmicos. Las membranas estériles de esta invención se incorporan de manera deseable en artículos conformados tales como implantes que pueden emplear materiales inertes tales como polímeros biodegradables o siliconas sintéticas, por ejemplo, Silastic, caucho de silicona u otros polímeros disponibles comercialmente.

Los compuestos y/o las sales de la invención también pueden administrarse en forma de sistemas de administración liposomales, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Pueden formarse liposomas a partir de una variedad de lípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Los compuestos y/o las sales de esta invención también pueden administrarse mediante el uso de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, factores de crecimiento, hormonas u otros restos de direccionamiento, a los que se acoplan las moléculas de sal. Los compuestos y/o las sales de esta invención también pueden acoplarse con polímeros adecuados como portadores de fármaco direccionables. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidina, copolímero de pirano, polihidroxi-propil-metacrilamida-fenol, polihidroxietil-aspartamida-fenol o poli(óxido de etileno)-polilisina sustituido con residuos palmitoilo. Además, los compuestos y/o las sales de la invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímeros de poli(ácido láctico y ácido glicólico), poli-épsilon-caprolactona, poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque anfipáticos o reticulados de hidrogeles. Pueden formarse matrices de polímeros semipermeables y polímeros para dar artículos conformados, tales como válvulas, endoprótesis, tubos, prótesis y similares.

5. Preparación de los compuestos

a. Sales del compuesto de fórmula II

El compuesto de fórmula II puede convertirse en sales de diversos ácidos inorgánicos y orgánicos incluyendo, pero sin limitarse a, sal de HCl, lactato, maleato, fenoxiacetato, propionato, succinato, adipato, ascorbato, canforato, gluconato, fosfato, tartrato, citrato, mesilato, fumarato, glicolato, naftaleno-1,5-disulfonato, gentisato y bencenosulfonato. Un experto en la técnica reconocerá que pueden usarse otros ácidos para preparar sales que comprenden el compuesto de fórmula I que son útiles en la presente invención. También se contempla que las sales de la invención pueden convertirse fácilmente en otras sales de la invención.

Varios métodos son útiles para la preparación de las sales descritas anteriormente y los conocen los expertos en la técnica. Por ejemplo, la reacción del compuesto de fórmula II con uno o más equivalentes molares del ácido deseado en un disolvente o mezcla de disolventes en el que la sal es insoluble, o en un disolvente como agua tras lo cual se elimina el disolvente mediante evaporación, destilación o liofilización. Alternativamente, el compuesto de fórmula II puede hacerse pasar por una resina de intercambio iónico para formar la sal deseada o una forma de sal del producto puede convertirse en otra usando el mismo procedimiento general.

Se preparó el compuesto de fórmula II según el procedimiento expuesto a continuación. Se eligió la sal de maleato del compuesto de fórmula II por su excelente cristalinidad, estabilidad térmica e hidrolítica y alta pureza.

b. Betrixabán

5 Puede prepararse el compuesto de fórmula II o betrixabán, según cualquiera de varias metodologías diferentes, o bien a escala de gramos (< 1 kg) o bien a escala de kilogramos (> 1 kg). Se expone un método a escala de gramos a continuación en el ejemplo 2. Se expone otro método a escala de gramos en la patente estadounidense n.º 6.844.367B1, véase el ejemplo 266, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

10 Alternativamente, puede prepararse el compuesto de fórmula II a escala de kilogramos usando el procedimiento expuesto en el ejemplo 2. La formación de la dimetilamidina de fórmula II implica el ataque nucleófilo en un grupo ciano por un amina desprotonada, formándose la amina desprotonada a partir de una amina secundaria y un alquil-litio. Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un radical hidrocarbilo de desde 1 hasta 8 átomos de carbono. Un experto en la técnica reconocerá que la amina desprotonada puede formarse mediante otros métodos, y la formación de la funcionalidad amidina de fórmula II puede prepararse mediante una
15 variedad de otros métodos.

Un disolvente útil para el método de la presente invención tal como se describió anteriormente es un disolvente aprótico tal como tetrahidrofurano (THF), dietil éter, dimetoximetano, dioxano, hexano, metil terc-butil éter, heptano y ciclohexano. Además, la formación de la amina desprotonada puede llevarse a cabo a temperaturas inferiores a
20 10°C. La adición nucleófila de la amina para formar el compuesto de fórmula I también puede llevarse a cabo a temperaturas inferiores a 10°C. Un experto en la técnica reconocerá que los métodos de la presente invención pueden ponerse en práctica usando otros disolventes, reactivos y temperaturas de reacción diversos.

Además, aunque el método de la presente invención para preparar el compuesto de fórmula II a escala de gramos es similar al procedimiento usado en la escala de kilogramos, hay un aumento en la escala de la reacción de más
25 del 3400%. Además, en varias etapas se obtienen aumentos del rendimiento usando cantidades reducidas de los reactivos en exceso. Un experto en la técnica reconocerá que el compuesto de fórmula I puede prepararse mediante otras metodologías químicas tanto a escala de gramos como de kilogramos.

30 **Ejemplos**

A menos que se indique de otro modo, las abreviaturas usados a lo largo de la memoria descriptiva tienen los siguientes significados:

35	Å	=	Angstrom
	% de A	=	porcentaje de área total
	ac.	=	acuoso
40	cm	=	centímetro
	d	=	duplete
45	DSC	=	calorimetría diferencial de barrido
	EDTA	=	ácido etilendiaminotetraacético
	eq.	=	equivalente
50	EtOH	=	etanol
	g	=	gramo
55	HPLC	=	cromatografía de líquidos de alta resolución
	h	=	hora
	Hz	=	Hercio
60	IR	=	infrarrojo
	J	=	constante de acoplamiento
65	kg	=	kilogramo

	kV	=	kilovoltios
	l	=	litro
5	LOD	=	límite de detección
	M	=	molar
	m	=	multiplete
10	mA	=	miliamperio
	Me	=	metil
15	MeO	=	metoxi
	MeOH	=	metanol
	mg	=	miligramo
20	min.	=	minuto
	ml	=	mililitro
25	mm	=	milímetro
	MTBE	=	metil terc-butil éter
	N	=	normal
30	nM	=	nanomolar
	RMN	=	resonancia magnética nuclear
35	s	=	singlete
	SDT	=	sólidos disueltos totales
	ATG	=	análisis termogravimétrico
40	THF	=	tetrahidrofurano
	mM	=	micromolar
45	BID	=	dos veces al día

Ejemplo 1

Preparación de una sal polimórfica cristalina de fórmula III

50 a. Preparación a escala de gramos

En un matraz de fondo redondo de 1500 ml de 3 bocas equipado con un condensador, se cargó el compuesto de base libre de fórmula I (25 g; 1 eq.) y se añadió EtOH/agua 9:1 (500 ml) mientras que se agitaba. Se calentó la suspensión resultante hasta 70°C. Se añadió gota a gota ácido maleico (12,77 g; 2 eq.) como una disolución (100 ml de EtOH/ agua 9:1) y después de que se hubieran añadido 50 ml, la disolución se volvió notablemente más transparente. Tras la adición completa de la disolución de ácido maleico, se mantuvo la temperatura a 80°C durante 5 minutos. Se dejó enfriar lentamente el recipiente hasta 45°C y entonces se añadieron 400 ml de MTBE. Se agitó la disolución durante otras 12 h. Se filtró el precipitado resultante y se secó a vacío. Se recuperó la sal de maleato del compuesto de fórmula I en un rendimiento del 45% (14,2 g).

b. Preparación a escala de kilogramos

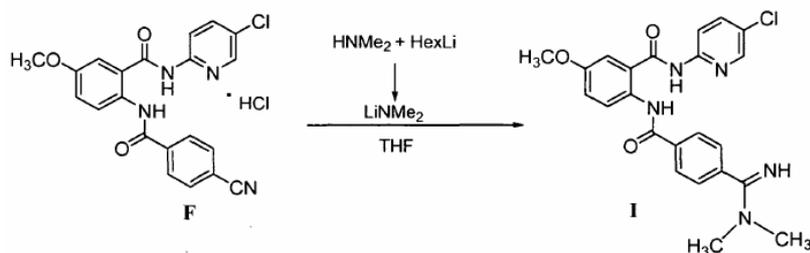
Se cargó el compuesto de fórmula I (24,6 kg) en un reactor GLMS de 760 l (reactor A). Se añadieron ácido maleico (12,7 kg, 2,0 eq.), etanol (445 kg, 18,1 partes) y agua de alta pureza (140 kg, 5,7 partes). Se ajustó la mezcla de reacción a 22°C (19-25°C) y se agitó a esa temperatura durante aproximadamente 1 h, entonces se transfirió a

través de un filtro de pulido a un reactor Hastelloy de 780 l acondicionado (reactor B). Se aclararon con etanol adicional (aproximadamente 45 kg) los conductos y la bomba del reactor A y se continuó al reactor B mediante el filtro de pulido. Se concentró a vacío el filtrado con una temperatura máxima de baño de glicol caliente (para calentar la camisa del reactor) de 45°C, hasta que quedaron aproximadamente 140 l (volumen de 5,7 partes). Se tomaron muestras del contenido del reactor B con RMN en proceso, que mostró que la razón molar de etanol : la sal de maleato del compuesto de fórmula I era de 26. Se cargó agua de alta pureza (49 kg, 2,0 partes) en el reactor B y se reanudó la concentración a vacío hasta que se logró un volumen de recipiente de aproximadamente 140 l (volumen de 5,7 partes). La RMN en proceso indicó que la razón molar de etanol : la sal de maleato del compuesto de fórmula I era de 14. Se cargó de nuevo agua de alta pureza (49 kg, 2,0 partes) y se reanudó la concentración a vacío para obtener un volumen de recipiente de aproximadamente 140 l. La RMN en proceso mostró que la razón molar de etanol : la sal de maleato del compuesto de fórmula I era de 5. Se ajustó la temperatura del contenido del reactor B a 22°C (19-25°C) y se confirmó visualmente la formación de una suspensión. Se agitó la mezcla de reacción a 22°C (19-25°C) durante aproximadamente 2 h, y entonces se filtró en una centrífuga de 30" dotada de una tela filtrante. Se aclararon la bomba y los conductos del reactor B y se continuó a la centrífuga de 30" mediante un filtro de pulido con dos porciones de agua de alta pureza (aproximadamente de 30 kg cada una). Se tomaron muestras de la torta de filtración con HPLC en proceso, que mostró que la pureza del producto era del 99,1% de A, la mayor impureza era del 0,26% de A, y por tanto la recristalización era innecesaria. Se secó a vacío la torta de filtración (33,1 kg) con una temperatura máxima de baño de glicol caliente (para calentar la camisa de la secadora) de 40°C. Tras aproximadamente 30,5 h, el análisis de LOD en proceso indicó un contenido en disolvente del 0%. Se descargó el producto seco (26,4 kg) y se almacenó a 2-8°C. El rendimiento del producto final fue ligeramente superior al esperado, del 85% (50-80% esperado). Se midió la pureza de la sal de maleato mediante la presencia del contenido en amidina hidrolizada tal como se midió mediante HPLC, y se encontró que la pureza era >99%.

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ 3,0 (s, 3H), 3,2 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 7,2 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 7,42 (s, 1H), 7,68 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,95 - 8,15 (m, 2H), 8,12 (m), 8,18 (m, 1H), 8,42 (s, 1H), 9,0 (s, 1H), 11,0 (s, 1H), 11,2 (s, 1H); IR (KBr, cm⁻¹): 3300, 1685, 1600, 1515, 1380, 1270, 1200, 1100, 1050, 880, 800, 710.

Ejemplo 2

30 Preparación del compuesto de fórmula II



35 a. Preparación a escala de gramos

Se preparó una suspensión del compuesto de fórmula F (455 g, 1,0 eq.) en THF (4,67 kg, 10,3 partes) y se ajustó a <10°C. Se preparó dimetilamido de litio tal como sigue: se añadió hexil-litio (2,3 N/hexano, 2,45 l, 5,5 eq.) a una disolución de dimetilamina (2 N/THF, 2,8 l, 5,5 eq.) manteniéndola a <10°C. Se cargó la disolución de dimetilamido de litio en la suspensión que contenía el compuesto de fórmula F manteniendo la temperatura de recipiente de <10°C. Se monitorizó el avance de la reacción mediante HPLC en proceso que confirmó que la cantidad de fórmula F era <1,0% de A. Se preparó una disolución tampón de NaHCO₃ (490 g, 1,1 partes, 5,7 eq.) y Na₂CO₃ (490 g, 1,1 partes, 4,5 eq.) en agua desionizada (6,6 kg, 14,51 partes), y se transfirió la mezcla de reacción anterior a esta disolución acuosa manteniéndola a <5°C. Precipitó el producto y se ajustó la suspensión resultante a 20°C a lo largo de un periodo de 12 h. Se filtró el sólido, y se lavó la torta húmeda resultante con 3,5 kg (7,7 partes) de agua desionizada. Se separó el sólido por filtración usando un filtro de banco de pruebas de vidrio poroso grueso, y se aclaró y se continuó con etanol absoluto (628 g, 1,4 partes) frío (0-5°C). Se secó el producto a 30-35°C. Se obtuvo producto seco en 458 g (rendimiento del 73%).

50 b. Preparación a escala de kilogramos

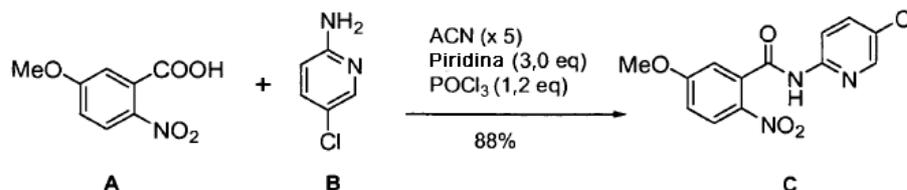
Se preparó una suspensión del compuesto de fórmula F (31,5 kg, 1,0 eq.) en THF (251 kg, 8,0 partes) en un reactor Hastelloy de 780 l (reactor A) y se ajustó a 0°C (de -3 a 3°C). Se cargaron dimetilamina 2 M en THF (161,0 kg, 5,0 eq.) y THF (63 kg, 2 partes) en un reactor GLMS de 1900 l (reactor B) y se ajustó a 0°C (de -3 a 3°C) con agitación máxima. Se cargó lentamente hexil-litio (2,3 M, 97,2 kg, 4,5 eq.) en el reactor B mientras que se mantenía un temperatura máxima de 10°C. Se aclararon con THF (3,2 kg) la bomba y los conductos y se continuó al reactor B. Se ajustó el contenido del reactor B a 0°C (de -3 a 3°C), entonces se transfirió al reactor A mientras que se mantenía

la temperatura del reactor A a $\leq 10^{\circ}\text{C}$. Se aclararon con THF (31,4 kg, 1,0 parte) la bomba y los conductos del reactor B y se continuó. Se ajustó el contenido del reactor A a 0°C (de -3 a 3°C), y se agitó a esta temperatura hasta que la reacción fue completa tal como se verificó mediante HPLC (1-2 h). Tras aproximadamente 1 h de agitación, el análisis de HPLC en proceso indicó que quedaba un 0% de A del material de partida (criterios en proceso: máximo 1% de A). Se ajustó el contenido del reactor A a -5°C (de -8 a -3°C). Se realizó limpieza en-proceso del reactor B con agua. Se cargaron dos disoluciones acuosas preparadas previamente (NaHCO_3 (35,0 kg, 1,1 partes) en agua (236 kg, 7,5 partes) y Na_2CO_3 (35,0 kg, 1,1 partes) en agua (236 kg, 7,5 partes)) en el reactor B y se ajustó a -3°C (de 0 a 6°C). Se transfirió el contenido del reactor A al reactor B a través de un conducto aislado, manteniendo la temperatura del reactor B a de -8°C a un máximo de 5°C . Se aclararon con THF (31,4 kg, 1,0 parte) frío [-5°C (de -8 a -3°C)] la bomba y los conductos del reactor A y se continuó. Se ajustó el contenido del reactor B a 22°C ($19-25^{\circ}\text{C}$) y se agitó durante aproximadamente 3 h. Se confirmó visualmente la formación de suspensión, y se filtró el contenido del reactor B en una centrífuga de 30" dotada con una tela filtrante. Se aclararon la bomba y los conductos del reactor B y se continuó a la centrífuga de 30" dotada con una tela filtrante con agua potable (63 kg, 2 partes). Se transfirió la torta de filtración húmeda (66,5 kg) de vuelta al reactor B y se sometió a un lavado de suspensión con agua potable (1005 kg, 32 partes) a 22°C ($19-25^{\circ}\text{C}$) durante aproximadamente 1 h. Se filtró el producto en la centrífuga de 30" (tras el lavado en proceso y ajuste de una tela filtrante), y se aclararon con agua potable (63 kg, 2 partes) los conductos y la bomba del reactor B y se continuó. Se tomaron muestras del aclarado de agua para la prueba mediante SDT, que se encontró que eran del 0,46%. Se aclararon adicionalmente la bomba, las tuberías y la torta de filtración húmeda del reactor B con etanol (44 kg, 1,39 partes) frío [0°C (de -3 a 3°C)]. Se secó a vacío la torta de filtración húmeda con una temperatura máxima de baño de agua (para calentar la camisa de la secadora) de 35°C . El LOD en proceso era del 0% tras aproximadamente 24 h de secado, y se descargó el producto (24,8 kg) con un rendimiento del 76,7%. La HPLC mostró una pureza del 98%, con impureza desclorada del 1,14%.

Ejemplo 3

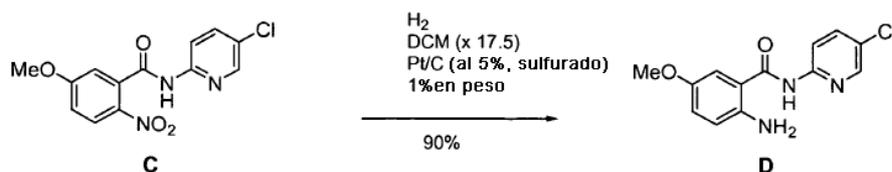
Preparación del compuesto de fórmula F

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



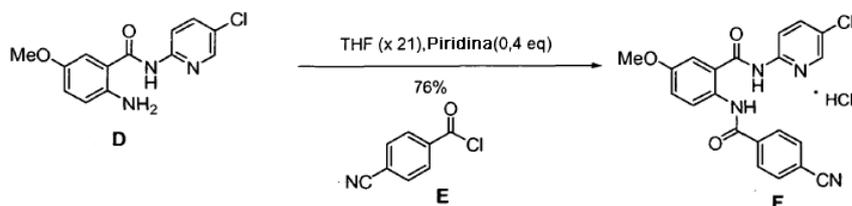
Se cargaron ácido 5-metoxi-2-nitrobenzoico (A) (25,0 kg, 1,0 eq.), 2-amino-5-cloropiridina (B) (16,3 kg, 1,0 eq.) y acetonitrilo (87,5 kg, 3,5 partes) en un reactor GLMS de 380 l. Se ajustó la mezcla de reacción a 22°C ($19-25^{\circ}\text{C}$) y se añadió piridina anhidra (30,0 kg, 3,0 eq.). Se aclararon con acetonitrilo (22,5 kg, 0,9 partes) la bomba y los conductos y se continuó, y se ajustó el contenido del reactor a una temperatura de $19-22^{\circ}\text{C}$. Se cargó oxocloruro de fósforo (23,3 kg, 1,20 eq.) en el contenido del reactor mediante una bomba de dosificación, mientras que se mantenía una temperatura de 25°C ($22-28^{\circ}\text{C}$). Se aclararon con acetonitrilo (12,5 kg, 0,5 partes) la bomba de dosificación y los conductos y se continuó, mientras que se mantenía la temperatura a 25°C ($22-28^{\circ}\text{C}$). La mezcla de reacción se convirtió normalmente de una suspensión a una disolución transparente tras la adición de aproximadamente 1/3 del POCl₃. Al final de la adición, se volvió turbia. Tras completarse la adición, se agitó la mezcla de reacción a 25°C ($22-28^{\circ}\text{C}$) durante aproximadamente 1 h, momento en el que el análisis de HPLC confirmó que la reacción era completa. Se enfrió la disolución hasta 15°C ($12-18^{\circ}\text{C}$) y se cargó lentamente agua potable (156,3 kg, 6,25 partes) mientras que se mantenía una temperatura de reacción de entre 12 y 30°C . Entonces se ajustó la mezcla de reacción a 22°C ($19-25^{\circ}\text{C}$) y se agitó durante aproximadamente 5 h hasta que cesó la exotermia. Se confirmó visualmente la formación de una suspensión y se filtró el contenido del reactor en un filtro de vacío a presión ajustado con una tela filtrante. Se lavaron con dos porciones de agua potable (62,5 kg, 2,5 partes cada una) el reactor, la bomba y los conductos y se continuó al filtro de vacío a presión. El filtrado tenía un valor de pH de 7. Se secó a vacío el producto (41,8 kg) con una temperatura máxima de baño de agua (para calentar la camisa de la secadora) de 50°C . Tras aproximadamente 12 h, el análisis de LOD en proceso indicó un contenido en disolvente del 0,72%. Se descargó el producto seco (C) (34,4 kg) con un rendimiento del 88,2% y una pureza del 99,1% mediante HPLC.

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



5 En un reactor Hastelloy de 780 l, se cargaron el compuesto C (33 kg, 1,0 eq.), platino al 5% sobre carbono (sulfurado, 0,33 kg, 0,010 partes) y diclorometano (578 kg, 17,5 partes). Se empezó agitación y se ajustó el contenido del reactor a 22°C (19-25°C). Se presurizó el reactor con hidrógeno a aproximadamente 30 psi y se calentó cuidadosamente la mezcla de reacción hasta 28°C (25-31°C). Se realizó la hidrogenación del contenido del reactor a aproximadamente 30 psi a 28°C (de 25 a 31°C; máximo de 31°C) hasta que se completó la reacción por HPLC. Tras 16,5 h, se consideró que la reacción era completa tras confirmar la desaparición del material de partida (0,472% de A). Se hizo circular el contenido del reactor a través de un lecho de Celite acondicionado (0,2-0,5 kg de Celite acondicionado con 20-55 kg de diclorometano) preparado en un filtro Sparkler de 8" para retirar el catalizador de platino. Se aclararon con dos porciones de diclorometano (83 kg, 2,5 partes cada una) el reactor y el lecho de Celite y se continuó. Se transfirió el filtrado a y se concentró en un reactor GLMS de 570 l a presión atmosférica hasta aproximadamente 132 l (volumen de 4 partes). Se cargó etanol (69 kg, 2,1 partes) y se continuó la concentración a presión atmosférica hasta aproximadamente 99 l (volumen de 3 partes). La RMN en proceso indicó que el contenido en diclorometano era del 39%. Se cargó de nuevo etanol (69 kg, 2,1 partes) y se continuó de nuevo la concentración hasta aproximadamente 99 l (volumen de 3 partes). La RMN en proceso indicó que el contenido en diclorometano era del 5%. Entonces se ajustó la mezcla de reacción a 3°C (de 0 a 6°C), se agitó durante aproximadamente 1 h, y se filtró la suspensión resultante en un filtro de vacío a presión con camisa ajustado con una tela filtrante. Se aclararon con etanol (26 kg, 0,8 partes) frío [3°C (0-6°C)] el reactor, la bomba y los conductos y se continuó. Se secó a vacío la torta de filtración húmeda (36,6 kg) a 40-50°C con una temperatura máxima de baño de agua (para calentar la camisa de la secadora) de 50°C. El análisis de LOD tras 12,5 h indicó que el contenido en disolvente era del 0,1%. Se descargó el producto seco (D) (26,4 kg) con un rendimiento del 89,5%. La HPLC mostró una pureza del 98,4% de A, con impureza desclorada del 0,083%.

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



30 En un reactor Hastelloy de 780 l, se cargó cloruro de 4-cianobenzoílo (E) (17,2 kg, 1,1 eq.) y THF (92 kg, 3,5 partes). Se agitó el contenido del reactor a 22°C (19-25°C) hasta que todos los sólidos se hubieron disueltos. Se transfirió la disolución resultante a un receptor inferior y se aclaró el reactor con THF (26 kg, 1 parte) y se continuó. Se cargaron el compuesto D (26,4 kg, 1 eq.), THF (396 kg, 15 partes) y piridina (2,90 kg, 0,4 eq.) en un reactor limpio. Se aclararon con THF (34 kg, 1,3 partes) la bomba y los conductos y se continuó. A través de una bomba de dosificación, se cargó la disolución de cloruro de 4-cianobenzoílo/THF en el reactor, manteniendo la temperatura a ≤ 30°C y aclarando con THF (aproximadamente 10 kg) y continuando. Se agitó la suspensión de color amarillo resultante a 22°C (19-25°C) durante aproximadamente 2 h. La HPLC en proceso realizada tras 2 h mostró un contenido en compuesto de fórmula D del 0%, indicando que se ha completado la reacción. Se filtró la suspensión sobre un filtro de vacío a presión ajustado con una tela filtrante. Se aclararon el reactor, la bomba, los conductos y la torta húmeda con tres porciones de etanol (aproximadamente de 15 kg cada una). Se descargó la torta de filtración húmeda (65,4 kg) y se transfirió de vuelta al reactor para el lavado de suspensión con etanol (317 kg, 12 partes) a 22°C (19-25°C) durante aproximadamente 1 h. Se filtró la suspensión sobre el filtro de vacío a presión y se aclararon el reactor, la bomba, los conductos y la torta de filtración húmeda con dos porciones de etanol (aproximadamente de 15 kg cada una) y dos porciones de THF (aproximadamente de 15 kg cada una). Se secó a vacío la torta de filtración húmeda con una temperatura máxima de baño de glicol caliente (para calentar la camisa de la secadora) de 40°C. Tras 14,5 h de secado, el LOD era del 0,75%. Se molió el material secado (tamiz de 0,125") para dar 31,8 kg de producto, que se secó a vacío durante otras 10,5 h. El LOD tras el secado era del 1,8%, y se descargó el producto (31,5 kg) con un rendimiento del 74,8% (60-90% esperado). La HPLC mostró una pureza del 100%.

Ejemplo 4

50 Bioensayo para determinar la actividad antitrombótica

Este ejemplo describe un ensayo *in vitro* para determinar la actividad antitrombótica *in vivo*. Se ha verificado el valor

predictivo del ensayo usando un modelo de babuino *in vivo* establecido descrito a continuación. El compuesto usado en el ensayo se corresponde con un compuesto de fórmula II, o una sal del mismo.

Materiales y métodos

5 Para los estudios *in vitro*, se generó una combinación de plasma a partir de sangre recogida mediante venopunción en citrato de trisodio al 3,2% (1:9 v/v) de un mínimo de diez donantes. El sustrato de trombina específico usado era Z-GGR-AMC (Bachem). Se adquirió factor tisular (Innovin, "FT") de Dade Behring. La IgG de conejo anti-FT humano y FT humano recombinante purificado procedían de American Diagnostica. Los kits COATEST de heparina/heparina
10 LMW eran de Chomogenix. La fuente de los anticoagulantes sometidos a prueba eran tal como sigue: enoxaparina sódica (Aventis Pharmaceuticals), fondaparinux sódico (Glaxo Smith Kline), bivalirudina (The Medicines Company), inhibidor de fXa C921-78 (Betz, A. *et al.* Biochem., 1999; 38-14582-14591); rivaroxabán y razaxabán.

15 Se inició la generación de trombina en la combinación de plasma en ausencia y presencia de diversos anticoagulantes y en pacientes tratados con warfarina mediante la adición de Innovin y calcio. Se midió la generación de trombina mediante la señal continua generada por la escisión del sustrato de trombina a lo largo de un periodo de 10 min. en un lector de fluorescencia FlexStation (Molecular Probes). La señal de fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia máx.-mín.) se presenta como unidades (URF) o unidades arbitrarias (UA) de generación de trombina y se midieron las unidades anti-fXa mediante Coatest. Se llevó a cabo la cuantificación de la
20 concentración de FT en Innovin mediante inmunotransferencia con IgG de conejo anti-FT humano, seguido por densitometría y comparación con FT humano purificado (residuos 1-263, expresados en baculovirus).

25 Para la validación *ex vivo* del ensayo, se recogió plasma de 168 pacientes que recibían terapia de anticoagulación. Los sujetos comprendían pacientes hospitalizados médicamente estables o aquéllos que acudían a una clínica de pacientes ambulatorios y que estaban recibiendo warfarina (sin cambios con respecto a la dosis de warfarina durante aproximadamente 7 días). Sólo se recogió sangre si ya se había previsto la venopunción y la medición rutinaria de pruebas de anticoagulación tradicionales (RNI, TTPA etc.) y no se realizaron más pinchazos con aguja para este estudio. Se recogieron 5 ml adicionales de sangre y se colocaron en tubos tratados con el anticoagulante citrato de sodio. Entonces se centrifugaron la muestras dos veces para recoger la fracción plasmática, y entonces se
30 almacenó rápidamente este plasma a -80°C.

Resultados

35 El ensayo era sensible a anticoagulantes con mecanismos de acción variables. La adición de heparina no fraccionada (HNF) o heparina de bajo peso molecular (LMWH) al plasma de donante sano produce una inhibición dependiente de la dosis en el ensayo. De manera similar, los inhibidores directos de trombina o fXa también provocan una actividad inhibidora proporcional a la dosis. Se muestra el efecto de inhibidores específicos de trombina o factor Xa sobre la generación de trombina plasmática inducida por FT en la tabla 1.

40 Tabla 1

Fármaco	CI ₅₀
Fondaparinux	160 nM
Inhibidor de trombina, bivalirudina	2,4 µg/ml
Inhibidor de trombina, C921-78	17 nM
Inhibidor de trombina, rivaroxabán	180 nM
Inhibidor de trombina, razaxabán	125 nM

45 Este ensayo también es útil para medir la anticoagulación en pacientes con tratamiento anticoagulante tanto a corto plazo como a largo plazo. Las mediciones de TTPA de pacientes tratados con HNF o LMWH se correlacionaban con la inhibición de la generación de trombina. En relación a los marcadores tradicionales de la generación de trombina (TAT y F1.2 tal como se midieron mediante ELISA), este bioensayo proporcionó una correlación superior con respecto a las mediciones de RNI. Se muestran los resultados de las mismas en las figuras 1A, 1B y 1C. Se midió el grado de generación de trombina (UA) a los 10 minutos en muestras de plasma de (a) pacientes tratados con warfarina y se representó gráficamente frente a los valores de RNI de 137 pacientes (figura 1A), (b) pacientes
50 tratados con enoxaparina se representó gráficamente frente a los valores de TTPA de 16 pacientes (figura 1B) y (c) pacientes tratados con heparina no fraccionada (HNF) se representó gráficamente frente a los valores de TTPA de 15 pacientes (figura 1C).

Ejemplo 5

55 Comparación de betrixabán con respecto a fondaparinux

Se llevó a cabo la evaluación en un ensayo de protrombinasa en sangre completa para comparar betrixabán con fondaparinux, un inhibidor indirecto de fXa. Como el fondaparinux, el betrixabán inhibió de manera dependiente de la dosis la actividad protrombinasa mediada por plaquetas en este sistema de prueba.

Materiales y métodos

5 Se llevaron a cabo ensayos amidolíticos para determinar la inhibición de fXa humano purificado y proteasas relacionadas tal como se notificó previamente (Sinha, U *et al.* Eur. J. Pharmacol. 2000; 114:2313-6). Para la determinación de la actividad inhibidora de protrombinasa, se adquirió pretrombina-2 de plasma humano de Haematologic Technologies y se obtuvo el sustrato de trombina Boc-Asp (OBzl)-Pro-Arg-AMC. HCl de Bachem. Se llevaron a cabo los análisis de datos para los parámetros cinéticos derivados usando el software Dynafit (Biokin). El betrixabán mostró una K_i de 0,117 (nM) y una K_i de protrombinasa de 0,801 (nM)

10 Se empleó el ensayo descrito en el ejemplo 4. Se sometió a prueba betrixabán en un modelo de incorporación de dispositivo trombogénico en una fístula arteriovenosa en babuinos (Hanson SR *et al.* J. Clin. Invest. 1993; 92:2003-12). El dispositivo trombogénico de dos componentes mide el crecimiento de trombos sobre un injerto de dacrón y una cámara de expansión usando plaquetas marcadas con ^{111}In y fibrinógeno marcado con ^{125}I . Este modelo se ha usado previamente para estudiar una amplia variedad de anticoagulantes (heparinas no fraccionada y de bajo peso molecular, trombina e inhibidores de fXa).

Resultados

20 Se observó la inhibición dependiente de la dosis de trombosis venosa en cuatro dosis (0,05, 0,12, 0,21 y 0,49 mg/kg) de betrixabán. Se realizaron mediciones *ex vivo* de la generación de trombina plasmática, TTPA, TP, tiempo de coagulación activada ("TCA") y unidades anti-fXa durante el transcurso temporal. A diferencia de la actividad antitrombótica observada (inhibición del 30 al 89% de la deposición de plaquetas, inhibición del 0 al 87% de la deposición de fibrina), hubo una mínima prolongación de los parámetros de coagulación con el tratamiento con betrixabán. Se presentan los resultados de esto en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Agente	Veces de cambio con respecto al control Media \pm D.E.		
	TCA	TP	TTPA
Control	0,87 \pm 0,09	1,00 \pm 0,04	1,02 \pm 0,03
betrixabán 0,05 mg/kg	1,14 \pm 0,06	1,02 \pm 0,03	1,07 \pm 0,03
betrixabán 0,12 mg/kg	1,14 \pm 0,15	1,05 \pm 0,06	1,07 \pm 0,03
betrixabán 0,21 mg/kg	1,11 \pm 0,04	1,07 \pm 0,03	1,09 \pm 0,08
betrixabán 0,49 mg/kg	1,28 \pm 0,06	1,17 \pm 0,11	1,29 \pm 0,21

30 Las unidades anti-fXa estaban por debajo del límite de cuantificación para las tres dosis más bajas y era de 0,31 unidades/ml a la dosis más alta. No se alteraron los tiempos de hemorragia con plantilla para ninguno de los animales tratados con betrixabán. El parámetro *ex vivo* que se correlacionó con la actividad antitrombótica era la inhibición proporcional a la dosis (coeficiente de correlación $R^2=0,99$) de la generación de trombina plasmática; que oscilaba entre una inhibición del 13% a la dosis más baja y del 72% a la dosis más alta. Por tanto, este nuevo ensayo de protrombinasa predice la actividad antitrombótica *in vivo*.

35 La tabla 3 a continuación proporciona la inhibición en respuesta a la dosis de trombosis *in vivo* en el modelo de babuino. La tabla 3 también proporciona la actividad anti-fXa en muestras de plasma de babuino durante la infusión del compuesto de control o de prueba.

40 Tabla 3

Grupo administrado	Intervalo de concentración plasmática de betrixabán (ng/ml)	% de inhibición de la deposición de plaquetas	% de inhibición de la formación de fibrina
Control	0	0,00	0,00
1	7-10	29,71	-0,38
2	13-21	44,20	37,50
3	26-38	65,22	71,97
4	54-88	88,77	87,12

45 La figura 2 proporciona evidencias adicionales de que el ensayo *in vitro* es predictivo de la actividad antitrombótica *in vivo*. Específicamente, la figura 2 muestra la inhibición en respuesta a la dosis de trombosis *in vitro* en el modelo de babuino. Deposition de plaquetas marcadas con ^{111}In a lo largo del tiempo en la cámara venosa durante la infusión de betrixabán (n=3 a cada dosis). Se les infundió vehículo a los animales control (n=4).

Las figuras 3, 4A y 4B muestran la inhibición de la generación de trombina iniciada por factor tisular en sangre completa humana por betrixabán en comparación con fondaparinux. Se cuantificó la actividad de trombina mediante la escisión del sustrato fluorogénico. Se midió la respuesta a la dosis de la inhibición de la generación de trombina

mediante la adición de cantidades variables de betrixabán y fondaparinux a sangre completa de once donantes sanos. Se muestran las mediciones de unidades relativas de fluorescencia (URF) de donantes representativos.

Este estudio mostró las características *in vitro* e *in vivo* de betrixabán como un potente inhibidor de fXa humano purificado y del complejo de protrombinasa. Específicamente, había una especificidad mayor que 86.000 veces frente a proteasas humanas relacionadas tales como trombina y proteína C activada. También había una inhibición dependiente de la dosis de la generación de trombina iniciada por factor tisular en sangre completa humana y una inhibición dependiente de la dosis de trombosis en curso en un modelo de primate de trombosis arteriovenosa sin prolongación de los parámetros de coagulación ni el tiempo de hemorragia. Por tanto, en comparación con las mediciones de coagulación convencionales, este ensayo fue más predictivo de la eficacia *in vivo* en el modelo animal.

Ejemplo 6

La inhibición de protrombinasa y factor Xa no soluble predice la eficacia de inhibidores de fXa en un modelo *in vivo* de trombosis venosa profunda (TVP)

Se diseñó este ejemplo para probar la hipótesis de que la potencia de inhibidores de fXa frente a fXa incorporado en el complejo de protrombinasa predecirá eficacia antitrombótica *in vivo*. Se sometieron a prueba ocho inhibidores de fXa de cuatro series químicas estructuralmente distintas con una gama de actividades frente a fXa para determinar su capacidad para inhibir el complejo de enzima protrombinasa en plasma humano. Se usó la generación de trombina y la posterior escisión de un sustrato específico de trombina como medida de la actividad protrombinasa, definiéndose la actividad inhibidora como la concentración de inhibidor requerida para producir una prolongación de 2 veces en el tiempo hasta la producción máxima de trombina (retardo 2x). También se determinaron tiempos TP de conejo *in vitro*. Se determinaron tiempos de protrombina (TP) de conejo *in vitro* mediante la adición de tromboplastina a plasma de conejo. Se valoró la inhibición en el modelo de TVP de conejo tal como se describió previamente (Hollenbach *et al.*, *Thromb. Haemost.* 1994; 71:357) y se relacionó con las concentraciones plasmáticas de fármaco.

30 *Materiales y métodos*

Se sintetizaron compuestos (Zhu *et al.*; *Curr. Top. Med. Chem.* 2001; 2:101-119; Betz *et al.* *Biochem.*, 1999; 36:14582-91)). Se midió la concentración de compuesto requerida para inhibir la actividad amidolítica de fXa humano soluble purificado (*Haematologic Technologies*) en un 50% (Cl₅₀) siguiendo la formación de p-nitroanilina a partir del sustrato peptídico Z-D-Arg-Gly-Arg pNA (Diapharma) a 405 nm en un lector de placas Spectramax (Molecular Devices) (Sinha *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 395:51-59). Se valoró la formación de trombina por protrombinasa en plasma pobre en plaquetas humano combinado tratado con Reptilase® midiendo la p-nitroanilina a 405 nm tras la escisión del sustrato peptídico de trombina Pefachrome TG (Pentapharm) (Sinha *et al.*, *ATVB*; 2003; 23:1098-1104). Se registró la concentración de compuesto que provocó un aumento de dos veces en el tiempo de generación máxima de trombina como la concentración de retardo 2x. Se determinó la eficacia antitrombótica frente a trombosis venosa de conejo midiendo la acreción de trombos sobre un hilo de algodón colocado en la vena cava mediante un catéter insertado en la vena femoral izquierda. Se expresó la disminución en el peso de trombo tras una infusión de dos horas del compuesto en relación al control de vehículo (Hollenbach *et al.*, *Thromb. Haemost.* 1994; 71:357).

Se midieron las concentraciones de fármaco en plasma de conejo mediante CL-EM/EM. Se midieron los tiempos de protrombina de conejo usando tromboplastina C plus (Dade) en un temporizador de coagulación automatizado (ACL 3000, Instrumentation Laboratory) (Sinha, *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 2000; 395:51-59).

50 *Resultados*

Todos los compuestos inhibieron fXa soluble en un 50% a concentraciones menores que 10 nM. Sin embargo, el orden jerárquico de las potencias para la inhibición de fXa soluble eran diferentes de las requeridas para inhibir el complejo de protrombinasa. Se muestran los resultados en la tabla 4.

Tabla 4

N.º	Clase de compuesto	Cl ₅₀ de fXa (nM)	Retardo 2x de protrombinasa (µM)	Concentración plasmática en TVP (µM)	Inhibición de trombosis (%)	Cambio 2x en TP de conejo (µM)
1	Cetotiazol	0,5	0,18	0,06	94	7
2	Antranilamida	1,3	0,22	1,14	37	2,7
3	Antranilamida	0,7	0,24	1,65	47	1,7
4	Antranilamida	0,4	0,25	1,04	47	1,0

5	Antranilamida	0,8	0,34	3,39	41	1,5
6	naftalenopirazol	4,4	0,92	5,2	11	4,7
7	1,2-Bencenodiamina	3,5	1,35	4,6	19	8,8
8	Isoxazol	8,2	1,66	9,2	0	64

También hubo una escasa correlación entre el valor de retardo 2x para la inhibición de protrombinasa y la concentración requerida para alcanzar un cambio 2x en el TP de conejo ($R^2 = 0,57$). Ni las actividades de inhibición de fXa ni el cambio en el TP de conejo predijeron actividad en modelo de trombosis venosa profunda (TVP) *in vivo*. Por el contrario, los compuestos pudieron dividirse ampliamente en 3 niveles de eficacia para la inhibición del crecimiento de trombos *in vivo* dependiendo de su potencia en el ensayo de protrombinasa *in vitro*. El compuesto 1 tenía el valor de retardo 2x más bajo de 0,18 μM y era el inhibidor más potente de trombosis *in vivo* con una inhibición del 94% a una concentración plasmática de 65 nM. El segundo grupo de compuestos, con valores de retardo 2x en el ensayo de protrombinasa que oscilaban entre 0,22 y 0,34 μM , inhibió la formación de trombos *in vivo* en del 37 al 47% a concentraciones plasmáticas que oscilaban entre 1,04 y 3,39 μM . Los compuestos en la tercera categoría eran los inhibidores de protrombinasa menos potentes (valores de retardo 2x mayores que 0,92 μM) y no pudieron inhibir trombosis *in vivo* ni siquiera a concentraciones plasmáticas de 9,2 μM . Estos datos muestran que el valor de retardo 2x obtenido en el ensayo de protrombinasa, y la no inhibición de fXa soluble ni prolongación del tiempo TP de conejo, es lo más predictivo de eficacia del inhibidor de fXa en el modelo de TVP de conejo *in vivo*.

Dadas las limitaciones de los anticoagulantes actuales, la posición del factor Xa (fXa) en la convergencia de las rutas tanto extrínseca como intrínseca de coagulación sanguínea le ha convertido en una diana atractiva para el desarrollo de nuevas terapias. Con respecto a la investigación de la relación estructura-actividad (SAR) de inhibidores de fXa potenciales, los ensayos que miden la inhibición de la actividad proteasa de fXa en fase de disolución son un punto de partida evidente. Sin embargo, la capacidad de los compuestos para inhibir fXa purificado, soluble no es un verdadero reflejo de la interacción entre inhibidor y enzima *in vivo*. Esto se debe a que la mayor contribución de fXa al proceso de coagulación se produce cuando se combina con el factor Va como parte del complejo de protrombinasa con lo que se aumenta la actividad proteasa 300.000 veces en relación con fXa en fase de disolución. Este aumento de la actividad de fXa en el complejo de protrombinasa es más difícil de inhibir, por tanto cualquier valoración de la potencia anti-fXa de un compuesto debe incluir una evaluación de la inhibición de protrombinasa. Puede medirse la actividad protrombinasa en plasma pobre en plaquetas (PPP) y, en estas condiciones, también se tiene en cuenta el efecto de la unión a proteínas plasmáticas en la potencia del compuesto. Otro modo más directo de valorar el efecto de compuestos sobre el proceso de anticoagulación es mediante el uso de ensayos de coagulación *in vitro* tales como el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA).

Ejemplo 7

Evaluación del bioensayo en el estudio de dosis múltiples ascendentes

La figura 5 muestra los datos de ensayos *in vitro* realizados con plasma de voluntarios humanos sanos a los que se les administró betrixabán por vía oral. Nueve sujetos recibieron cada uno cápsulas de fármaco de 40, 80 ó 120 mg cada 12 horas durante diez días consecutivos. Los sujetos control (12) se trataron con placebo o fármaco control no anticoagulante. Se evaluaron las muestras de plasma obtenidas de los sujetos en el ensayo biológico *in vitro* de generación de trombina iniciada por factor tisular. También se analizaron las muestras de plasma para determinar la concentración de fármaco usando cromatografía de líquidos de alta resolución con espectrometría de masas en tándem. Los resultados muestran una correlación en respuesta a la dosis entre concentración de fármaco en plasma de betrixabán y la inhibición de la generación de trombina en el ensayo biológico.

Ejemplo 8

Concentraciones terapéuticas humanas de betrixabán

Se realizaron ensayos de generación de trombina tal como se describió en el ejemplo 4, con compuestos añadidos *ex vivo* a sangre completa humana. Se determinaron los valores de TP y TTPA en diversas especies a partir de compuestos añadidos a plasma pobre en plaquetas. Se procesaron las muestras en un instrumento ACL 3000plus (Coulter), se determinó el TP usando tromboplastina C plus Dade® y se determinó TTPA usando reactivo de TTP activado por FS Dade® Actin®.

Betrixabán y fondaparinux, un inhibidor indirecto de fXa, inhibieron ambos significativamente la generación de TAT y F1.2 en sangre completa humana. En comparación con un nivel terapéutico de fondaparinux (200 nM), betrixabán (200 nM) era más potente en la supresión de ambos marcadores de generación de trombina.

Materiales y métodos

Se evaluaron dosis múltiples de betrixabán en tres modelos de animales. El primer modelo, que midió la acreción de coágulos sobre hilos de algodón colocados en la vena cava abdominal de conejo, comparó la inhibición de la masa de trombo por betrixabán con respecto a la de dosis inferiores a las terapéuticas de enoxaparina (una heparina LMW).

El segundo modelo comparó la capacidad de betrixabán para mantener la permeabilidad de los vasos en condiciones de flujo arterial en trombosis inducida por FeCl₃ en la arteria carótida de rata con respecto a la conseguida mediante enoxaparina o clopidogrel (un agente antiplaquetario).

El tercer modelo investigó la inhibición de la deposición de plaquetas marcadas con ¹¹¹In sobre injertos de dacrón y cámaras de expansión colocadas en fístulas arteriovenosas femorales en babuinos. En todos los modelos sometidos a prueba, se administraron betrixabán y enoxaparina como infusiones i.v. y se administró clopidogrel por vía oral durante tres días. Se midieron el TP y TTPA *ex vivo* en todos los modelos. Los modelos abarcan criterios rigurosos de trombosis arterial y venosa y betrixabán produjo actividad antitrombótica en respuesta a la dosis en cada uno de los tres modelos. La eficacia de betrixabán se comparó de manera favorable con los niveles inferiores a los terapéuticos de enoxaparina y clopidogrel.

Se determinó la eficacia en trombosis venosa de conejo midiendo la acreción de trombos sobre hilos de algodón colocados en la vena cava mediante un catéter insertado en la vena femoral izquierda, tal como se describe por Hollenbach *et al.*, *Thromb. Haemost.* 1994; 71:357-362, incorporado al presente documento como referencia en su totalidad. Se expresó la disminución en el peso de trombo tras una infusión de dos horas del compuesto en relación con el control de vehículo. Véase también Sinha, *et al.*, *Eur. J. Pharmacology.* 395:51-59 (2000), incorporado al presente documento como referencia en su totalidad.

Se adaptó el modelo de FeCl₃ de rata de Kurz, K.D. *et al. Thromb. Res.* 1990; 60(4):269-280, incorporado al presente documento como referencia en su totalidad, utilizando la arteria carótida izquierda. Se aplicó una estenosis de la arteria con una ligadura de seda que reducía el flujo sanguíneo en un 50% con una lesión por aplastamiento ligera seguido por la aplicación de FeCl₃ al 50% en la duración del experimento. Se monitorizó el flujo sanguíneo mediante sonda de flujo Doppler pulsado y se registró durante 90 minutos tras la aplicación de FeCl₃. Se administraron enoxaparina y betrixabán por vía i.v. Se administró clopidogrel por vía oral una q.d. durante 3 días.

Se realizó el modelo de babuino en la Universidad de Salud y Ciencia de Oregón siguiendo los procedimientos descritos por Hanson, S.R. *et al. J. Clin. Invest.* 1993; 92:2003-2012, incorporado al presente documento como referencia en su totalidad. Brevemente, se induce trombosis mediante dos dispositivos trombogénicos diferentes incorporados dentro de una fístula arteriovenosa (A-V) femoral extracorpórea. El modelo arterial utiliza un entorno de tensión de alta cizalladura para promover la formación de trombos sobre un injerto de dacrón. El modelo venoso utiliza un entorno de tensión de baja cizalladura para promover la formación de trombos en una cámara de expansión. Se marcan previamente las plaquetas y la fibrina con ¹¹¹In y ¹²⁵I-fibrinógeno para medir la deposición de plaquetas y la acumulación de fibrina, respectivamente.

Resultados

Sorprendentemente, a diferencia de los modelos de roedores, se obtuvo eficacia en primates a una dosis mucho menor con una prolongación mínima del TP. También se demostró la especificidad de especie mediante prolongaciones *in vitro* de TP y TTPA en plasma de rata, conejo, babuino y ser humano. Se logró un cambio 2X del TP a concentraciones de 8,9, 1,6, 1 y 0,4 μM respectivamente. Los datos indican que las dosis de betrixabán que inhiben la generación de trombina en sangre humana y que proporcionan anticoagulación similar al babuino al que se le administró 0,05-0,49 mg/kg pueden ser suficientes para prevenir la trombosis venosa en seres humanos. el modelado comparativo de los grados de cambio en el TP con respecto a los niveles de eficacia antitrombótica también conduce a predecir que puede lograrse actividad terapéutica en seres humanos para betrixabán sin cambios concurrentes en los parámetros de coagulación *ex vivo*. Se presentan los datos en la tabla 5.

Tabla 5

Modelo de trombosis	de	Agente, dosis	Actividad antitrombótica	Veces de cambio de TTPA	Veces de cambio de TP
Vena cava de conejo		betrixabán, 3 mg/kg	inhibición del 76%	2,22	2,34
		Enoxaparina, 2,2 mg/kg	inhibición del 96%	2,06	1,01
Carótida de rata		betrixabán, 19,1 mg/kg	permeabilidad del 90%	1,69	2,20
		Enoxaparina, 7,6 mg/kg	permeabilidad del 70%	3,49	1,19
		Clopidogrel, 3 mg/kg/día	permeabilidad del 80%	1,03	1,01

Arteriovenosa de babuino	betrixabán, 0,49 mg/kg	inhibición del 90% (venosa) inhibición del 32% (arterial)	1,29	1,17
---------------------------------	------------------------	--	------	------

Ejemplo 9

5 Comparación de betrixabán con enoxaparina en un ensayo aleatorizado para la prevención de acontecimientos tromboembólicos venosos tras artroplastia total de rodilla

10 Esto estudio incluyó 215 pacientes que se sometieron a artroplastia total de rodilla (ATR) que se aleatorizaron en un razón de 2:2:1 a o bien dosis por vía oral de 15 mg o 40 mg de betrixabán dos veces al día o bien 30 mg de enoxaparina (Enox) administrada por vía subcutánea dos veces al día durante de 10 a 14 días. El estudio era ciego con respecto a la dosis de 15 frente a 40 mg, pero no con respecto a betrixabán frente a Enox. El criterio primario de valoración de eficacia era la incidencia de tromboembolia venosa ("TEV") (trombosis venosa profunda sintomática o asintomática en un venograma unilateral obligatorio o embolia pulmonar sintomática) del día 10 al 14. Los criterios de valoración de seguridad incluían la incidencia de hemorragias no mayores clínicamente significativas y mayores a lo largo del día tras la venografía. Todos los criterios de valoración de hemorragia y de eficacia se adjudicaron por un comité de adjudicación central independiente, ciego.

Materiales y métodos

20 Se administró el betrixabán en este estudio en cápsulas de gelatina. Las cápsulas contenían maleato de betrixabán, dextrosa monohidratada y estearato de magnesio.

25 Se tomó la dosis inicial de betrixabán de 6 a 8 horas tras la cirugía y dos veces al día (BID) a partir de entonces. Se administró enoxaparina por vía subcutánea de 12 a 24 horas tras la cirugía y cada 12 horas (q 12 h) a partir de entonces. Se continuó el tratamiento durante de 10 a 14 días a menos que se hubiera cumplido un criterio de detención especificado en el protocolo. Tras el alta del hospital, los pacientes se autoadministraron la medicación del estudio. La última dosis de la medicación del estudio se administró la mañana de la venografía obligatoria programada de la pierna operada (día 10 a 14).

30 Se obtuvieron muestras de sangre para la valoración de las concentraciones de fármaco en plasma y las mediciones farmacodinámicas en la exploración, de 1 a 4 horas tras la administración de la dosis de la mañana de la medicación de estudio en el día 2, en el día del alta y antes del venograma obligatorio en el día 10 a 14. Se analizaron las muestras de plasma para determinar betrixabán usando cromatografía de líquidos de alta resolución con espectrometría de masas en tándem. Se validó el método para un intervalo de 0,100-50,0 ng/ml, basándose en el análisis de 0,2 ml de plasma. Se realizó la cuantificación usando un curva patrón de calibración generada a partir de análisis de regresión por mínimos cuadrados ponderados.

40 Se midió la anticoagulación mediante un ensayo de inhibición de la generación de trombina tal como se analizó en el ejemplo 4 y la actividad anti-Xa además del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), el tiempo de protrombina (TP) y la razón normalizada internacional (RNI). Se adaptó el ensayo de unidades anti-Xa del kit COATEST de heparina LMW (Diapharma) y se modificó a un formato de placa de 96 pocillos. En este ensayo, se sometieron a ensayo patrones y muestras de paciente por duplicado y el límite de cuantificación era de 0,05 U anti-Xa/ml. Se inició la generación de trombina mediante la adición de factor tisular (Innovin, Dade Behring) y calcio al plasma del paciente tratado con el anticoagulante citrato (0,1 ml). Se midió la formación de trombina por la escisión de un sustrato específico de trombina (Z-GGR-AMC, Bachem) a lo largo de un periodo de 10 minutos. Se midieron las unidades relativas de fluorescencia en un lector de fluorescencia FlexStation (Molecular Devices) y se usaron para la cuantificación de la generación de trombina. Se sometieron a ensayo todas las muestras de plasma de pacientes por triplicado y se notificó la inhibición de la generación de trombina como el cambio con respecto a las unidades relativas de fluorescencia del nivel inicial para cada individuo.

50 *Resultados*

55 Se observó un efecto dependiente de la dosis y de la concentración de betrixabán sobre la inhibición de la generación de trombina y los niveles de anti-fXa. 175 pacientes (81,4%) tuvieron una valoración de la eficacia y seguridad tal como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

Resultados primarios de eficacia y seguridad	15 mg de betrixabán BID	40 mg betrixabán BID	30 mg de Enox BID
% de TEV (CI del 95%)	20 (12-32)	15 (8-27)	10 (3-23)
% de hemorragias mayores (CI del 95%)	0 (0-4)	0 (0-4)	2 (0-12)

Hemorragias no mayores clínicamente significativas	0 (0-4)	2 (0-8)	5(1-16)
--	---------	---------	---------

5 La figura 6 muestra las tasas de TEV y los intervalos de confianza del 95% para betrixabán y enoxaparina tal como se determinaron en este estudio con venografía unilateral entre los días 8 y 10 y para los controles históricos de enoxaparina a partir de estudios que usan venografía bilateral realizada entre los días 10 y 14 tras la ATR. La figura 9 representa las concentraciones de betrixabán en plasma tras la segunda dosis (día 2), en el alta y en el momento de la venografía. Tal como se esperaba dada la larga semivida de betrixabán, las concentraciones de fármaco medias aumentaron tras algunas de las primeras dosis y parecieron alcanzar un estado estacionario en el alta (mediana del día 4) para ambos grupos de betrixabán. El betrixabán mostró un efecto dependiente de la dosis y dependiente de la concentración sobre la inhibición de la generación de trombina y los niveles de anti-Xa (figuras 7 y 10 8). El efecto de 15 mg de betrixabán sobre la inhibición de la generación de trombina fue similar al observado con enoxaparina mientras que el efecto observado con 40 mg de betrixabán era más pronunciado. Por el contrario, el efecto observado sobre la actividad anti-Xa fue similar para 40 mg de betrixabán y para enoxaparina y menor con 15 mg de betrixabán. El tratamiento con betrixabán no afectó apreciablemente a otros parámetros de coagulación (es decir, TTPA, TP y RNI).

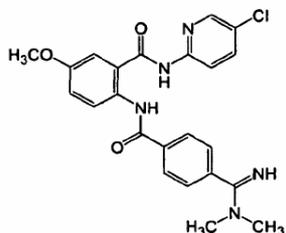
15 El betrixabán era eficaz en la prevención de TEV tras ATR y era seguro y se toleraba bien.

20 Debe entenderse que aunque se ha descrito la invención junto con las realizaciones anteriores, se pretende que la descripción y los ejemplos anteriores ilustren y no limiten el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

REIVINDICACIONES

1. Formulación de dosis unitaria que comprende una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto de fórmula II:

5



II

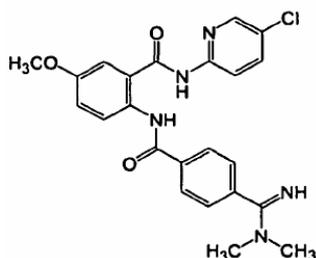
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto es una dosis diaria total de entre 0,2 y 2,0 mg/kg.

10

2. Formulación de dosis unitaria según la reivindicación 1, en la que la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto es una sal de maleato.

3. Compuesto para uso en un método de inhibición de la coagulación en un paciente humano que lo necesite, siendo el compuesto de fórmula II:

15



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad de inhibición de la coagulación de dicho compuesto, en el que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto es una dosis diaria total de entre 0,2 y 2,0 mg/kg.

20

4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto es una sal de maleato.

25

5. Compuesto según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, administrándose el compuesto al paciente una vez al día.

6. Compuesto según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, administrándose el compuesto al paciente dos veces al día.

30

7. Compuesto según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, administrándose el compuesto al paciente tres veces al día.

8. Formulación de dosis unitaria según la reivindicación 1 ó 2, o compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en los que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto es una dosis diaria total de entre 0,2 y 1,5 mg/kg.

35

9. Formulación de dosis unitaria según la reivindicación 1 ó 2, o compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en los que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto es una dosis diaria total de entre 0,4 y 1,5 mg/kg.

40

10. Formulación de dosis unitaria según la reivindicación 1 ó 2, o compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en los que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto es una dosis diaria total de entre 0,4 y 1,2 mg/kg.

45

11. Formulación de dosis unitaria según la reivindicación 1 ó 2, o compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en los que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto es una dosis diaria total

de entre 0,43 y 1,15 mg/kg.

5 12. Formulación de dosis unitaria según la reivindicación 1 ó 2, o compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en los que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto es una dosis diaria total de entre 0,45 y 0,55 mg/kg.

13. Formulación de dosis unitaria según la reivindicación 1 ó 2, o compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en los que la cantidad de inhibición de la coagulación del compuesto produce un nivel sérico del compuesto de 1 μM o inferior cuando se administra a un ser humano.

FIG. 1A

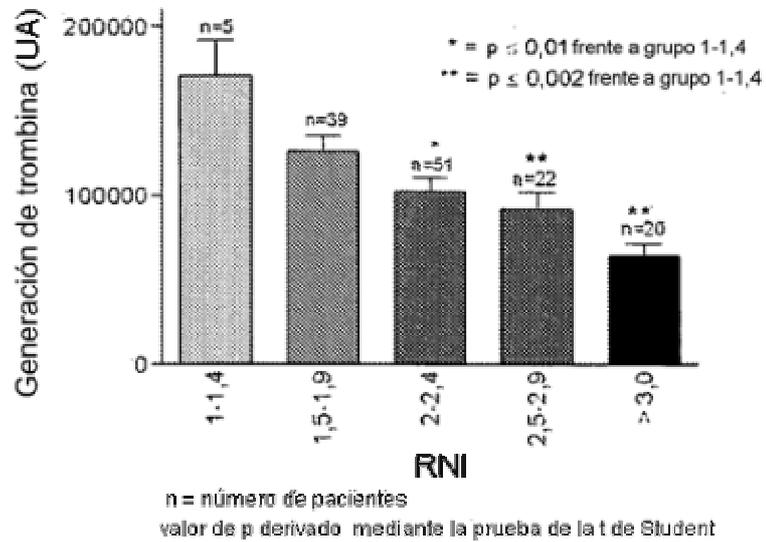


FIG. 1B

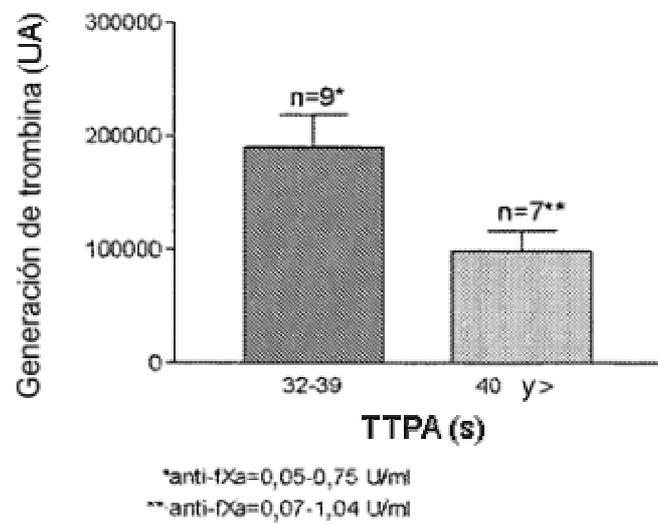


FIG. 1C

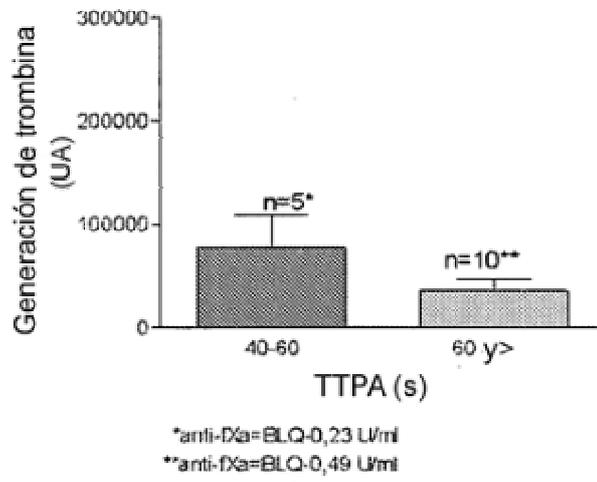


FIG. 2

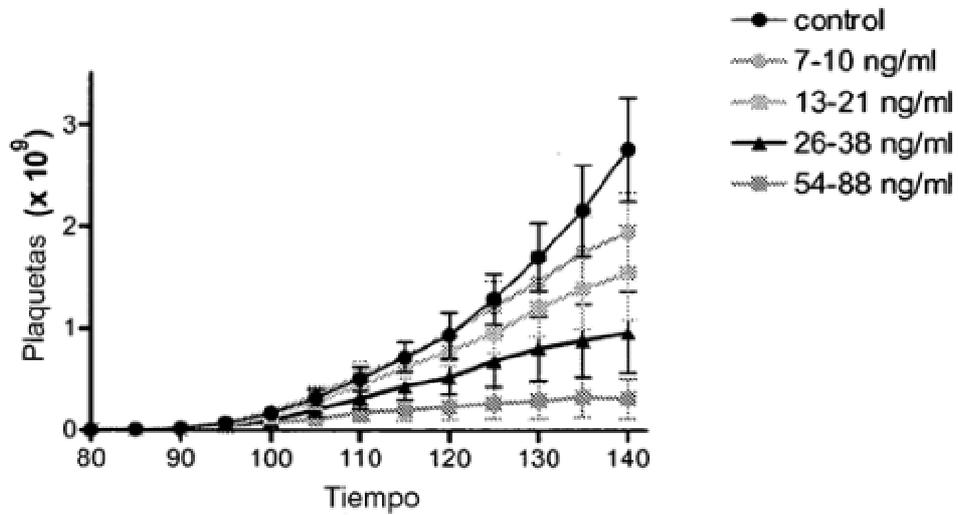


FIG. 3

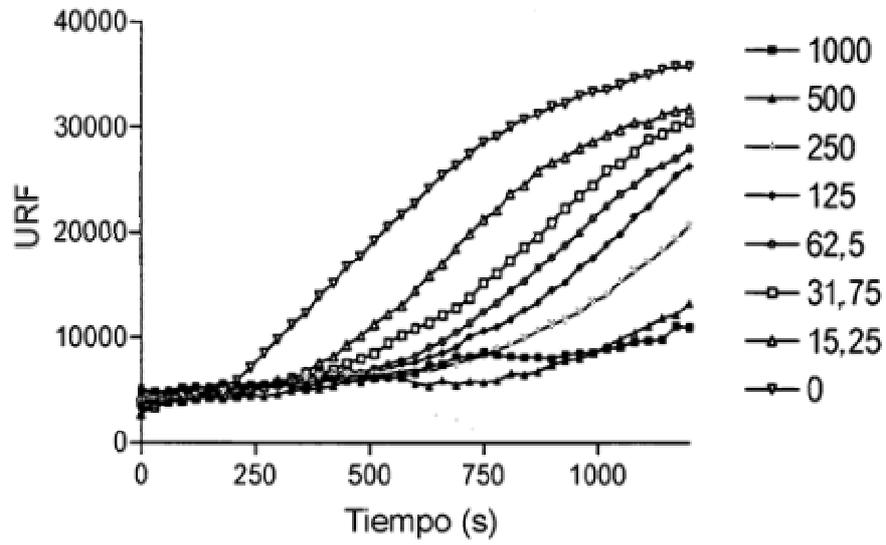


FIG. 4A

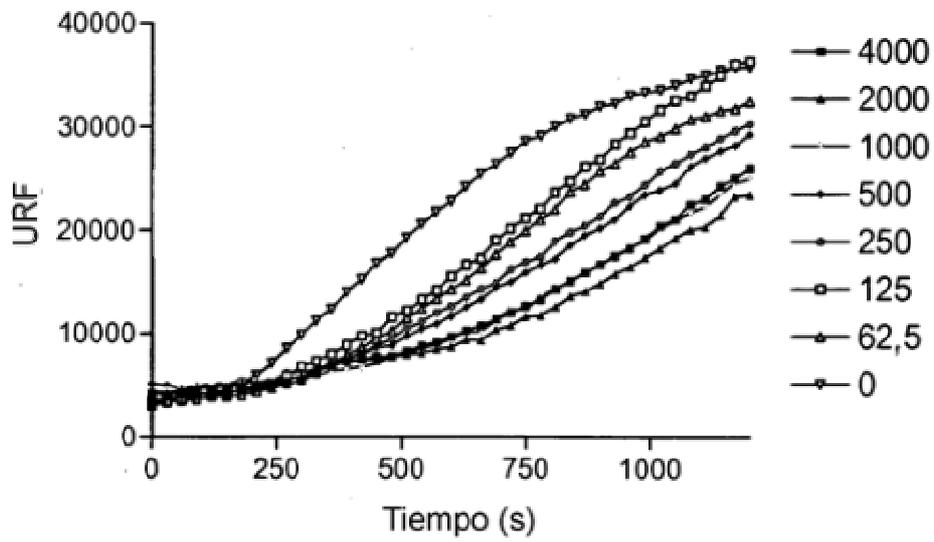


FIG. 4B

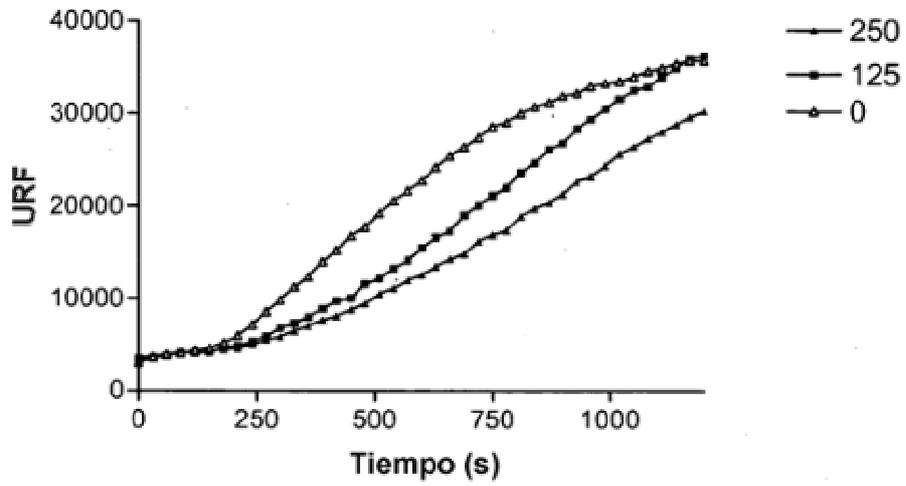


FIG. 5

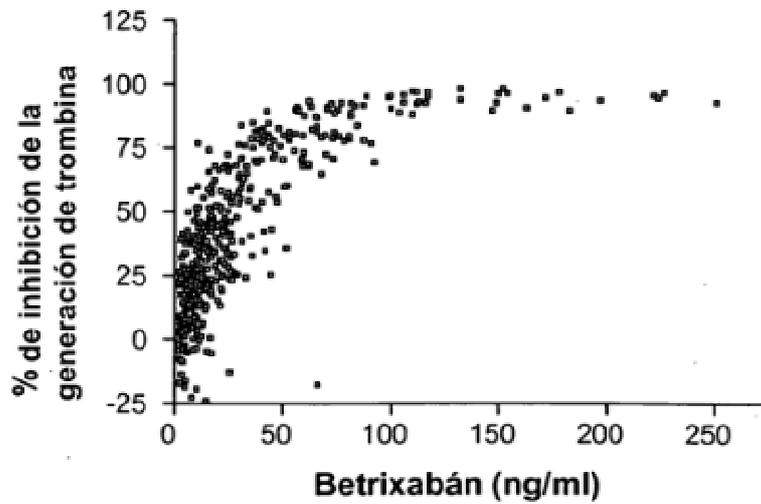


FIG. 6

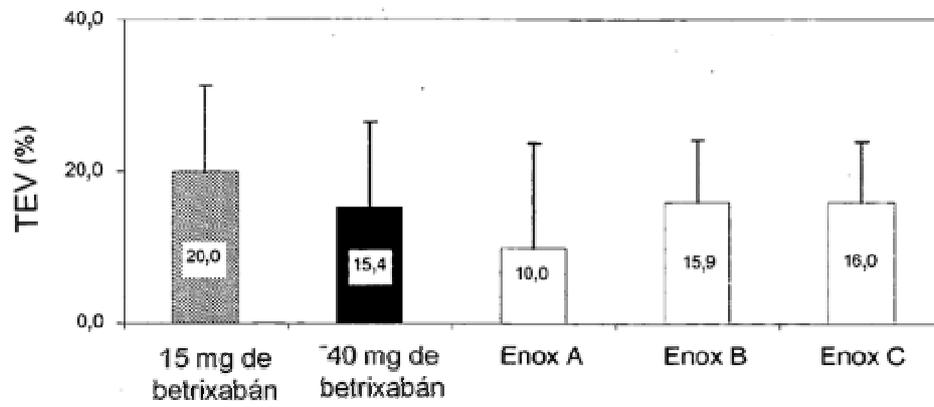


FIG. 7

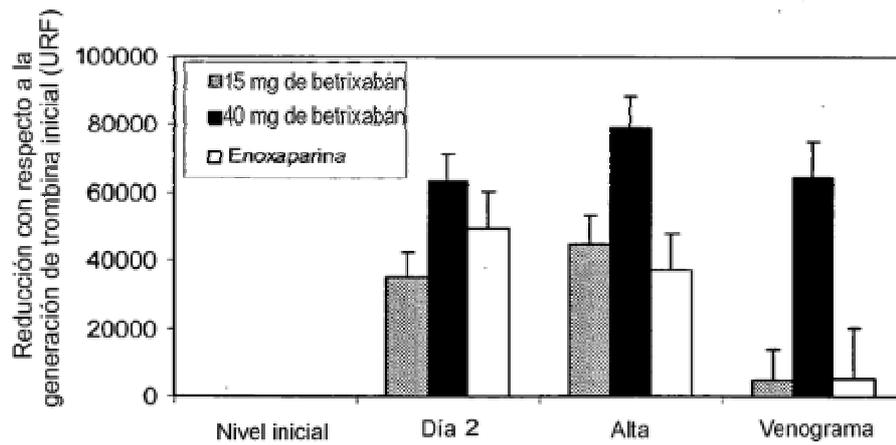


FIG. 8

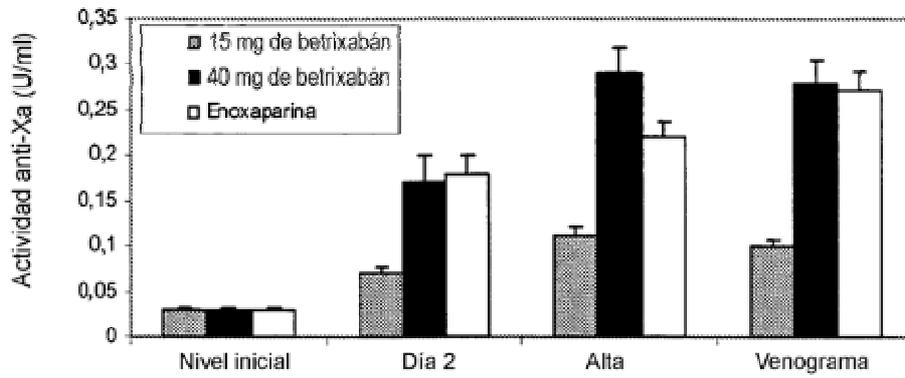


FIG. 9

