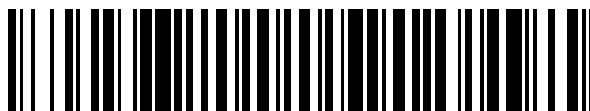


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 251**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2010 E 10701670 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2391893**

54 Título: **Dabigatrán liofilizado**

30 Prioridad:

02.02.2009 EP 09151865

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2014

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (100.0%)
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

STANGIER, JOACHIM

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

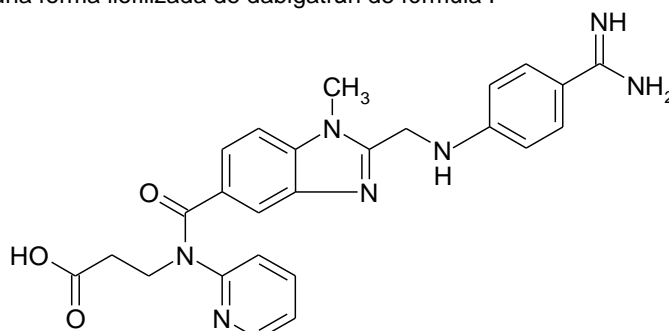
ES 2 525 251 T3

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

Dabigatrán liofilizado

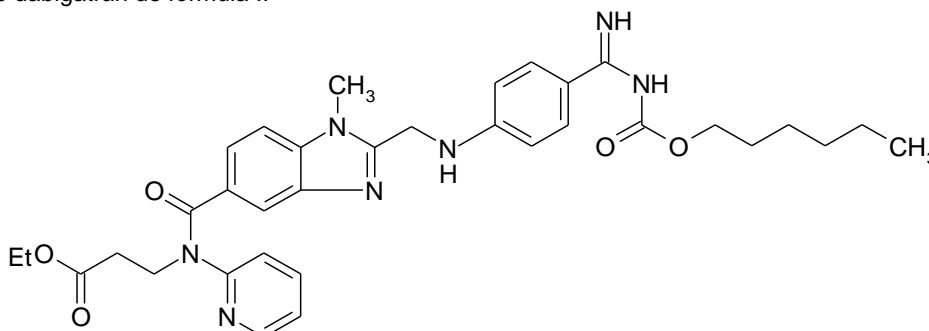
La invención se refiere a una forma liofilizada de dabigatrán de fórmula I



5 a su uso como calibrador en los ensayos para determinar los efectos farmacodinámicos del etexilato de dabigatrán, así como a dichos ensayos. **I**

Antecedentes de la invención

10 El etexilato de dabigatrán de fórmula II



15 es un inhibidor directo oral de la trombina útil en la profilaxis de la tromboembolia en pacientes que se someten a sustitución total de la rodilla o la cadera y también es adecuado para la prevención del accidente cerebrovascular, en particular en pacientes con fibrilación auricular. Aunque no es necesario el seguimiento clínico del etexilato de dabigatrán, sería útil un método de laboratorio fiable para medir los efectos farmacodinámicos del etexilato de dabigatrán. Dicho método podría usarse no solo para el seguimiento de la cinética de la actividad del fármaco en el cuerpo, sino también para ajustar la dosificación y posología del fármaco. Mediante dicho método se podría determinar la concentración de fármaco en el cuerpo del paciente, lo que podría ser útil para evitar la administración de sobredosis. Por lo tanto, el objeto general de la invención es proporcionar un ensayo que sea útil para analizar los efectos farmacodinámicos del etexilato de dabigatrán. **II**

Técnica Anterior

- 25
- Stangier et al. (Clinical Pharmacokinetics, Vol. 47, N° 1 (01-01-2008), páginas 47-59 enseña la determinación de dabigatrán en muestras de sangre mediante LC-MS, que implica un isótopo ¹³C de dabigatrán como patrón interno, para estudiar la farmacocinética y la farmacodinámica de este fármaco.
- 30
- El documento WO 2006/031387 describe reactivos de tromboplastina liofilizados para medir el tiempo de coagulación y vigilar la terapia anticoagulante.
- El documento WO 2001/07921 describe composiciones de plasma liofilizadas y composiciones de plasma que comprenden inhibidores de la coagulación como disolución patrón para uso en la medición de parámetros de la coagulación.

35 Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige específicamente a un método para la determinación cuantitativa del dabigatrán en muestras de sangre. El método comprende la determinación del tiempo de coagulación que se inicia mediante

trombina humana purificada.

- 5 Para determinar las concentraciones de dabigatrán, resultó ser particularmente útil el siguiente principio de ensayo. Para medir la concentración de dabigatrán, se diluye una parte alícuota de la muestra de plasma de ensayo con disolución salina fisiológica. Después se inicia la coagulación por adición de una cantidad constante de trombina humana altamente purificada, en la forma α . El tiempo de coagulación medido es directamente proporcional a la concentración de dabigatrán en la muestra ensayada.
- 10 Con el fin de poder determinar la concentración del principio activo en la muestra de sangre investigada mediante la estrategia mencionada en lo que antecede, es necesario tener una curva de calibración generada que efectúe una correlación entre el tiempo de coagulación y la concentración de dabigatrán en la posible muestra.
- 15 Con el fin de permitir generar dicha curva de calibración, el producto de ensayo tiene que contener patrones de dabigatrán de una concentración definida que se pueden enviar junto con el producto de ensayo. En la presente invención, la expresión "patrón de dabigatrán" también se puede sustituir por la expresión "calibrador de dabigatrán". Dichos patrones tienen que ser estables y la cantidad de fármaco tiene que ser estable cuando el patrón se almacena a -20°C o superior. Los patrones deben poder aplicarse fácilmente en el sistema de ensayo con el fin de asegurar que se puede establecer fácilmente una curva de calibración fiable.
- 20 El compuesto de fórmula I (dabigatrán) es un compuesto que tiende a cristalizar en formas polimórficas diferentes. Además, el compuesto es higroscópico tendiendo, por lo tanto, también a la formación de diferentes formas hidratadas. El compuesto es poco soluble.
- 25 El objeto principal de la invención es proporcionar una forma de dabigatrán que se pueda usar como un calibrador o patrón para establecer una curva de calibración en un ensayo de tiempo de coagulación. La presente invención propone como solución a este problema, que el dabigatrán se transfiera a una forma liofilizada como sigue.
- 30 Una cantidad definida del fármaco dabigatrán se disuelve en ácido acuoso y se diluye con agua. Esta disolución se usa como una disolución madre para preparar las diferentes muestras de calibrador de dabigatrán. Al plasma anticoagulado humano que se ha obtenido de donantes voluntarios sanos (mezcla de plasma humano) de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, se añaden diferentes partes alícuotas de la disolución madre de dabigatrán mencionada en lo que antecede, para dar disoluciones con diferentes concentraciones de dabigatrán. Se transfieren volúmenes específicos de estas disoluciones diferentes a tubos adecuados y se liofilizan hasta sequedad completa en un dispositivo de liofilización adecuado.
- 35 Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento para fabricar dabigatrán liofilizado que comprende las etapas de disolver dabigatrán en disolución acuosa ácida, añadir la disolución al plasma anticoagulado humano y liofilizar la disolución así obtenida.
- 40 La disolución acuosa ácida usada para la disolución del dabigatrán se caracteriza preferiblemente por un $\text{pH} \leq 3$, más preferiblemente ≤ 2 . Los ácidos se seleccionan preferiblemente de entre ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico. Tiene un interés particular el ácido clorhídrico.
- 45 El plasma anticoagulado humano se puede obtener de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente es plasma humano tratado con citrato.
- 50 El dabigatrán liofilizado de acuerdo con la invención se reconstituye fácilmente y, por lo tanto, es útil como calibrador para determinar la concentración de dabigatrán en muestras de sangre. Por lo tanto, la invención se refiere además al dabigatrán liofilizado que se puede obtener de acuerdo con el método mencionado en lo que antecede.
- 55 Además, la invención se refiere al uso del dabigatrán liofilizado de acuerdo con la invención como un agente calibrador en un ensayo. En particular, la invención se refiere al uso del dabigatrán liofilizado de acuerdo con la invención como un agente calibrador en un ensayo de anticoagulación.
- 60 La invención se refiere además, a un ensayo para determinar la concentración de dabigatrán en una muestra de sangre, que comprende el uso de dabigatrán liofilizado como calibrador. La invención se refiere además, al ensayo mencionado antes, caracterizado por que la concentración de dabigatrán se determina por medición del tiempo de coagulación de la muestra de sangre. La invención se refiere además, al ensayo mencionado antes, en el que la coagulación se inicia por adición de una cantidad constante de trombina humana altamente purificada en la forma α .

En otro objeto de la invención, se proporciona un kit de ensayo que contiene el calibrador dabigatrán de acuerdo con la invención. Por consiguiente, la invención se refiere, además, a un ensayo para determinar la concentración de dabigatrán en una muestra de sangre, que comprende el uso de dabigatrán liofilizado obtenido de acuerdo con el método mencionado en lo que antecede.

5 La invención se refiere además, a un kit que consiste en un ensayo para determinar la concentración de dabigatrán en una muestra de sangre junto con dabigatrán liofilizado obtenido de acuerdo con el método mencionado en lo que antecede.

10 La invención se refiere además, al kit mencionado antes en el que el ensayo para determinar la concentración de dabigatrán en una muestra de sangre comprende un reactivo 1 que es un plasma anticoagulado humano y un reactivo 2 que comprende trombina humana altamente purificada en la forma α . En otra realización preferida, el kit contiene el reactivo 1 y el reactivo 2 en forma liofilizada.

15 Con las muestras de dabigatrán liofilizadas de concentraciones conocidas está disponible un sistema de control de calidad. La medición del tiempo de coagulación de la muestra de control de calidad y la posterior determinación de la concentración de dabigatrán correspondiente usando la curva de calibración permite la determinación de la exactitud del ensayo. La exactitud del ensayo se evalúa por comparación de la concentración diana conocida de la muestra de control de calidad de dabigatrán y la concentración calculada de esta muestra de control de calidad usando el tiempo de coagulación y la curva de calibración.

20 Por lo tanto, en otra realización la invención se refiere al uso del dabigatrán liofilizado de acuerdo con la invención, para determinar la exactitud de un ensayo. En particular, la invención se refiere al uso del dabigatrán liofilizado de acuerdo con la invención, para determinar la exactitud de un ensayo de anticoagulación.

25 Los Ejemplos que se dan a continuación sirven para ilustrar la presente invención con más detalle.

Materiales y Métodos:

30 Los ensayos de coagulación cronométricos se llevaron a cabo con dos coagulómetros de bola Behnk CL4 (Behnk Elektronik, Alemania). Este equipo se usó conforme a las instrucciones de operación del fabricante.

35 El kit de ensayo del inhibidor de trombina usado en el ensayo de acuerdo con la invención, está disponible en el comercio. Lo fabrica HYPHEN BioMed, Francia, y se puede obtener en el comercio como ensayo de inhibidores de trombina Hemoclot[®]. Los componentes del kit que se usan en la presente invención son los siguientes 2 reactivos:

Reactivo 1: mezcla de plasma normal tratada con citrato, liofilizada

Reactivo 2: trombina cálcica humana altamente purificada (en forma alfa) estabilizada con aditivos y liofilizada.

40 El comportamiento del ensayo de coagulación con muestras plasmáticas de dabigatrán se evaluó con el programa de evaluación del método analítico "Analyse-it" para Excel, Versión 2.09, Software Analyse-it, Ltd. PO Box 103, Leeds LS27 7WZ Inglaterra, Reino Unido.

A) Preparación de calibradores de dabigatrán liofilizado

45 Se disuelven 5,55 mg de dabigatrán de fórmula I en 200 μ L de HCl 1 M y se diluyen en agua ultrapura para dar un volumen final de 50 mL. Esta solución madre de dabigatrán 111 μ g/mL se almacena a 4°C. El plasma humano tratado con citrato de donantes voluntarios sanos (mezcla de plasma humano) se usa para la preparación de calibradores de dabigatrán. Se diluyen partes alícuotas de la disolución madre de dabigatrán en mezcla de plasma humano tratado con citrato para dar disoluciones con diferentes concentraciones finales de dabigatrán, dabigatrán 100, 500, 1500 y 2000 nM.

50 Se transfieren partes alícuotas de 500 μ L de volumen de la mezcla de plasma humano con dabigatrán 100, 500, 1500 o 2000 nM a tubos de polipropileno y se liofilizan usando una centrifuga de vacío Christ Alpha RVC, Typ CMC-2 hasta sequedad completa durante aproximadamente 8 horas (presión: 3 mbar). Los calibradores de dabigatrán liofilizados se almacenan a -20°C.

B) Preparación de patrones (curva de calibración)

60 Se añade a cada vial de los calibradores de dabigatrán obtenidos de acuerdo con la etapa A de dabigatrán 0 (blanco), 100, 500, 1500 y 2000 nM, 0,5 mL de agua ultrapura. Se mezclan suavemente. Se incuban durante 15 min a temperatura ambiente.

El plasma calibrador debe diluirse 1:8, por ejemplo, 100 μ L de patrón y 700 μ L de NaCl fisiológico.

Se añaden con pipeta 50 μ L de muestra de calibrador a las cubetas del coagulómetro (determinación por

duplicado).

Se mide cada calibrador como se describe en el "procedimiento de medición".

C) Preparación de Reactivos:

5 Se calcula el volumen necesario de reactivos para la cantidad diaria de muestras. Se disuelve cada vial de reactivo 1 y 2 en 1 mL de agua ultrapura; se mezclan suavemente, se incuban durante 15 min a temperatura ambiente.

Estabilidad de los reactivos preparados:

10	Reactivo 1:	+18 - +25°C	24 h
		+2 - +8°C	48 h
		-20°C	2 meses
	Reactivo 2:	+18 - +25°C	24 h
		+2 - +8°C	48 h
15		-20°C	2 meses

D) Recogida y preparación de muestras de plasma:

20 Se recogen muestras de sangre en anticoagulante citrato trisódico 0,109 M (proporción 9:1 de sangre/citrato). Se decanta el líquido sobrenadante del plasma después de una centrifugación de 20 min a 2,5 g.

Estabilidad del plasma:	+18 - +25°C	8 h
	+2 - +8°C	24 h
	≤-20°C	hasta 6 meses

25 Se descongelan las muestras a +37°C durante un máximo de 45 min. Las muestras descongeladas se mantienen a temperatura ambiente. El plasma de muestra debe diluirse 1:8, por ejemplo, 100 µL de muestra y 700 µL de NaCl fisiológico.

E) Procedimiento de medición

30 El siguiente procedimiento de medición se realiza primero con las muestras de calibrador preparadas de acuerdo con la etapa B. Después de la preparación de la curva de calibración, las muestras de plasma preparadas de acuerdo con la etapa D se miden de manera correspondiente.

35 Se mezclan las muestras (calibrador o plasma) por agitación suave. Se transfieren 50 µL de cada muestra de plasma (obtenida de acuerdo con la Etapa B o D) a 2 cubetas (cada muestra se mide por duplicado). Se añaden con pipeta 100 µL de Reactivo 1 (preincubado a 37°C) a la cubeta. Al mismo tiempo, se inicia un periodo de incubación de 1 minuto activando un temporizador. Al final del tiempo de incubación, se añaden 100 µL de Reactivo 2 (preincubado a 37°C) a la cubeta. Se inicia un cronómetro. Se mide el tiempo hasta que se detiene la rotación de la bola en el coagulómetro de bola Behnk CL4 (tiempo de coagulación [s]). El software del instrumento calcula el tiempo de coagulación medio [s] de la medición por duplicado. El resultado de ambas determinaciones y el tiempo de coagulación medio se documentan en papel impreso.

F) Generación de la curva de calibración:

45 Los tiempos de coagulación obtenidos por medición de las muestras de calibrador con 0 (muestra en blanco), 100, 500, 1500 y 2000 nM (son posibles intervalos de concentraciones más amplios y concentraciones adicionales, por ejemplo, de 250 nM) se representan gráficamente frente a la concentración de calibrador de dabigatrán en una gráfica de dispersión usando un programa de hoja de cálculo (MS Excel o similar). Se establece una curva de calibración por análisis de regresión lineal simple.

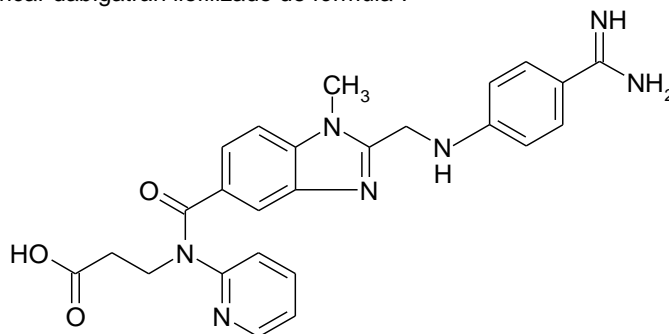
50 A modo de ejemplo, en la figura 1 se representa una curva de calibración basada en los patrones de dabigatrán con concentraciones de 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 nM, respectivamente.

55 Determinando el tiempo de coagulación, la concentración de dabigatrán correspondiente en una muestra de plasma se puede determinar directamente a partir de la línea de calibración.

60 Con muestras de dabigatrán liofilizado de concentraciones definidas, por ejemplo, de 100, 500 y 1500 nM, está disponible un sistema de control de calidad. La medición del tiempo de coagulación de la muestra de control de calidad y la posterior determinación de la concentración de dabigatrán correspondiente usando la curva de calibración permite la determinación de la exactitud del ensayo. La exactitud del ensayo se evalúa por comparación de la concentración diana conocida de la muestra de control de calidad de dabigatrán y la concentración calculada de esta muestra de control de calidad usando el tiempo de coagulación y la curva de calibración.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para fabricar dabigatrán liofilizado de fórmula I



- 5 que comprende las etapas de disolver dabigatrán en disolución acuosa ácida, añadir la disolución a plasma anticoagulado humano y liofilizar la disolución así obtenida.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la disolución acuosa ácida usada para la disolución de dabigatrán tiene un pH \leq 3.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la disolución acuosa ácida se prepara usando ácidos seleccionados de entre ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido tartárico y ácido maleico.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la disolución acuosa ácida se prepara usando ácido clorhídrico.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el plasma anticoagulado humano es plasma humano tratado con citrato o plasma anticoagulado con EDTA.
- 20 6. El dabigatrán liofilizado que se puede obtener de acuerdo con el procedimiento según una de las reivindicaciones 1-5.
7. Uso de dabigatrán liofilizado según la reivindicación 6 como un agente calibrador.
- 25 8. Uso según la reivindicación 7, como un agente calibrador en un ensayo de anticoagulación.
9. Ensayo para determinar la concentración de dabigatrán en una muestra de sangre, que comprende el uso de dabigatrán liofilizado según la reivindicación 6.
- 30 10. Ensayo según la reivindicación 9, caracterizado porque la concentración de dabigatrán se determina por medición del tiempo de coagulación de la muestra de sangre.
- 35 11. Ensayo según la reivindicación 10, caracterizado porque la coagulación se inicia por adición de una cantidad constante de trombina humana altamente purificada en la forma α .
- 40 12. Un kit para determinar la concentración de dabigatrán en una muestra de sangre en un ensayo según las reivindicaciones 9 a 11, que comprende dabigatrán según la reivindicación 6.
13. Un kit según la reivindicación 12 para uso en el ensayo según las reivindicaciones 9 a 11 que comprende un reactivo 1 que es plasma anticoagulado humano y un reactivo 2 que comprende trombina humana altamente purificada en la forma α .
- 45 14. Un kit según la reivindicación 13, en el que el reactivo 1 es plasma anticoagulado humano, y el reactivo 2 que comprende trombina humana altamente purificada en la forma α están liofilizados.
15. Uso del dabigatrán liofilizado según la reivindicación 6, para determinar la exactitud de un ensayo.
16. Uso según la reivindicación 15, para determinar la exactitud de un ensayo de anticoagulación.

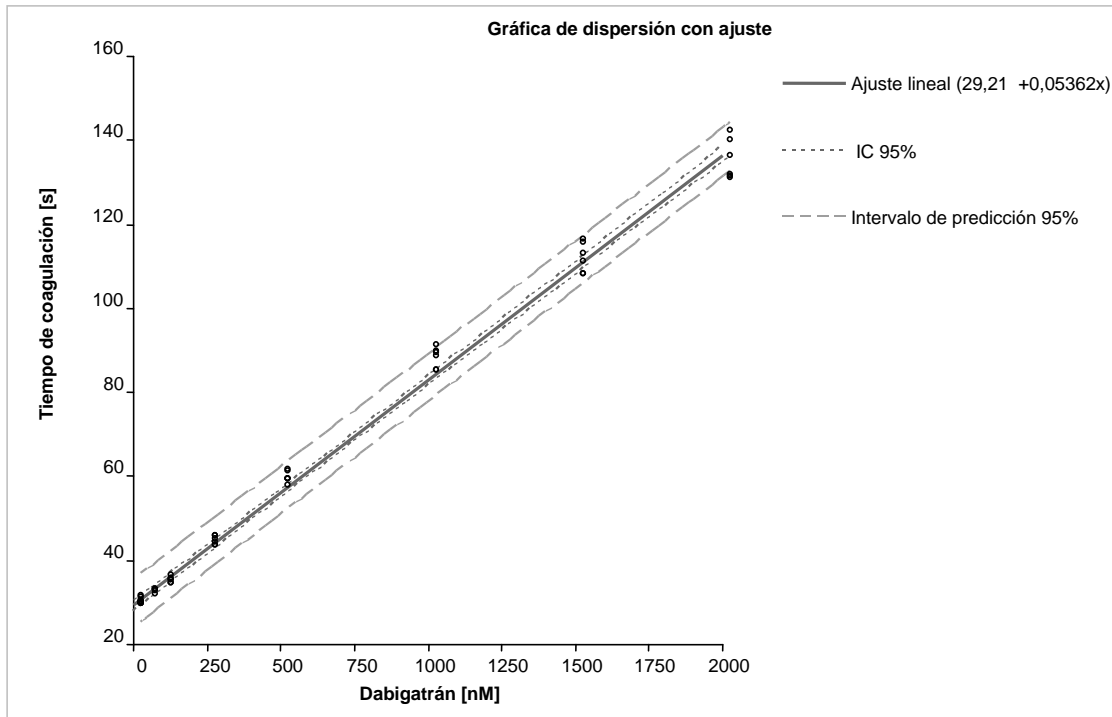


Figura 1: Curva de calibración de dabigatrán (0 - 2000 nM) con recta de regresión lineal, intervalo de confianza de 95% para la recta de regresión lineal, y el intervalo de predicción de 95%