(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 569 674**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012 E 12806229 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2785700**

(54) Título: **Agentes de reversión de los anticoagulantes**

(30) Prioridad:

29.11.2011 US 201161564559 P
22.03.2012 US 201261614292 P
02.05.2012 US 201261641698 P
29.06.2012 US 201261666291 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2016

(73) Titular/es:

PEROSPHERE, INC. (100.0%)
20 Kenosia Avenue
Danbury, CT 06810, US

(72) Inventor/es:

STEINER, SOLOMON S.;
LAULICHT, BRYAN E.;
BAKHRU, SASHA H. y
MATHIOWITZ, EDITH

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Agentes de reversión de los anticoagulantes

Campo de la invención

La presente invención desvela compuestos que revierten completa o parcialmente los efectos anticoagulantes de los inhibidores de la coagulación, tales como la heparina no fraccionada ("HNF"), la heparina de bajo peso molecular ("HBPM"), el fondaparinux y otros anticoagulantes que se unen a la antitrombina, así como de los inhibidores directos del Xa y del IIa.

Antecedentes de la invención

La cascada de la coagulación es un proceso fisiológico normal que aspira a prevenir una pérdida significativa de sangre o una hemorragia después de una lesión vascular. Sin embargo hay momentos en los que se forma un coágulo sanguíneo (trombo) cuando no es necesario. Por ejemplo, algunas afecciones de alto riesgo tales como una enfermedad médica aguda, una inmovilización prolongada, una cirugía o el cáncer pueden aumentar el riesgo de desarrollar un coágulo sanguíneo que puede tener potencialmente unas consecuencias significativas tales como una enfermedad cardiovascular aterosclerótica y/o ritmos cardiacos anormales.

La cascada de la coagulación consiste en una serie de etapas en las que una proteasa escinde y subsiguientemente activa la siguiente proteasa de la secuencia. Cada proteasa puede activar varias moléculas de la siguiente proteasa de la serie, amplificando esta cascada biológica. El resultado final de estas reacciones es la conversión del fibrinógeno, una proteína soluble, en filamentos insolubles de fibrina. Junto con las plaquetas, los filamentos de fibrina forman un coágulo sanguíneo estable.

La antitrombina (AT), un inhibidor de la proteasa de serina, es el principal inhibidor plasmático de las proteasas de la coagulación. La AT bloquea la cascada de la coagulación mediante, por ejemplo, la inhibición de la trombina (factor IIa) y del factor X activado (factor Xa). La heparina (heparina no fraccionada) y las heparinas de bajo peso molecular (HBPM; heparina fraccionada) inhiben el proceso de la coagulación mediante la unión a la AT a través de una secuencia de pentasacáridos. Esta unión da lugar a un cambio conformacional en la AT, que acelera su inhibición de los factores IIa, Xa así como de otras proteasas implicadas en la coagulación sanguínea. Una vez disociada, la heparina y la HBPM están libres para unirse a otra molécula de antitrombina e inhibir subsiguientemente más trombina y factor Xa.

La heparina no fraccionada es una mezcla de glucosaminoglucanos (GAG) que tiene propiedades anticoagulantes descubierta en el hígado de perros en 1916 por McLean y Howell en la Johns Hopkins University. Además de la anticoagulación, se ha averiguado que la heparina no fraccionada tiene otras propiedades que incluyen antiinflamación y angiogénesis. Las HBPM son heparinas que consisten en cadenas cortas de polisacáridos, generalmente con un peso molecular menor de 8.000 Da. Tanto la HBPM como la heparina se usan en la prevención de la coagulación sanguínea en el interior del cuerpo, pero se usan en diferentes situaciones en la práctica clínica.

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

La heparina de bajo peso molecular o heparina fraccionada tiene una mayor especificidad por la actividad del factor sanguíneo Xa y del factor IIa que la heparina no fraccionada. Adicionalmente, la HBPM tiene un efecto más reproducible sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), una medida del tiempo de coagulación. La HBPM tiene una menor incidencia de trombocitopenia inducida por heparina (TIH). Debido a que la HBPM tiene una eficacia más predecible y una menor incidencia de efectos adversos tales como la TIH, los pacientes pueden inyectarse por sí mismos la HBPM en casa, aunque a menudo también se usa en el hospital. Por estas razones, las HBPM se han convertido en los anticoagulantes líderes del mercado.

La protamina, una molécula cargada positivamente, puede usarse para revertir la anticoagulación resultante de la administración de una heparina cargada muy negativamente no fraccionada o de una heparina de bajo peso molecular (HBPM). La protamina es un producto natural que se ha asociado con problemas de suministro, que destaca una necesidad de opciones de agentes de reversión adicionales, idealmente sintéticos. La actividad anticoagulante de la HBPM puede ser revertida parcialmente, pero no totalmente, mediante la administración intravenosa de protamina. Se cree que la razón de la reducida actividad reversora de la anticoagulación de la protamina en el caso de la HBPM es debida a una menor afinidad de unión por la fracción de la HBPM en la sangre que la heparina no fraccionada. La protamina debe ser administrada lentamente, debido a los efectos hipotensores y a problemas relacionados con una anafilaxia.

Recientemente algunos agentes anticoagulantes adicionales han comenzado a obtener la aprobación de las autoridades sanitarias. Algunos ejemplos de dichos anticoagulantes incluyen dabigatrán o PRADAXA®, argatrobán o ARGATROBÁN®, rivaroxabán o XARELTO®, apixabán o ELIQUIS®, edoxabán o LIXIANA® y fondaparinux o ARIXTRA®. Estos anticoagulantes impiden que el factor IIa o el factor Xa propaguen la coagulación.

Algunos anticoagulantes, tales como dabigatrán, fondaparinux, rivaroxabán y apixabán, no han sido aprobados como agentes de reversión. El estado actual de la técnica para la reversión del dabigatrán o PRADAXA® es el empleo de carbón vegetal activado para intentar eliminar el dabigatrán de la sangre, y el uso de transfusiones sanguíneas. Aparte de Eerenberg et al. Circulation, 4 de octubre de 2011; 124 (14): 1573-9, Epub 6 del septiembre de 2011, que informan de que en un pequeño ensayo clínico, un concentrado de complejo de protrombina fue capaz de revertir el dabigatrán, pero no el rivaroxabán, no existen datos ni antídotos disponibles clínicamente para la reversión de cualquiera de estos inhibidores del Factor IIa o Xa de la coagulación. Por lo tanto, cuando los pacientes son anticoagulados con estos agentes, los efectos adversos asociados a una sobredosificación, particularmente una hemorragia significativa mortal, son mucho más peligrosos que los efectos secundarios asociados con la administración de una heparina no fraccionada. La ausencia de un agente de reversión limita por lo tanto el uso de estos fármacos.

Por estas razones existe una necesidad clínica amplia y fuertemente no satisfecha de nuevos agentes de reversión de la anticoagulación.

Sumario de la invención

Se han desarrollado inhibidores de la heparina, de fragmentos de heparina, del fondaparinux e inhibidores de otros factores Xa o IIa. La estructura general de los agentes de reversión de los anticoagulantes de interés es: R-Z-R', en la que R y R' son agentes cargados positivamente a un pH fisiológico y pueden ser moléculas iguales o diferentes, y Z es un compuesto anular hidrófobo cíclico o condensado. Más específicamente, el inhibidor está representado por un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

Y-M-X-L-A-L'-X'-M'-Y' (I)

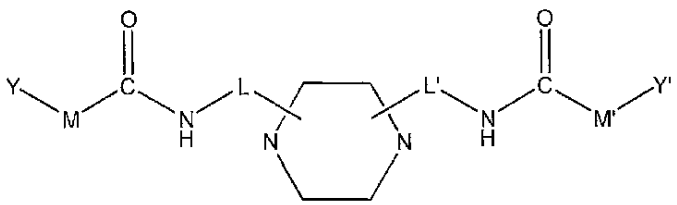
en la que:

A es un anillo carbocíclico o heterocíclico sustituido o no sustituido aromático o no aromático, o una fracción lineal;
L y L' son iguales o diferentes y son conectores;
X y X' son iguales o diferentes y están ausentes o están en un grupo funcional que une el conector L con M y el conector L' con M', respectivamente;
M y M' son iguales o diferentes y están ausentes o son un conector que une X con Y y X' con Y', respectivamente; e
Y e Y' son iguales o diferentes y son una fracción que contiene uno o más átomos o grupos catiónicos o uno o más grupos que se vuelven catiónicos en las condiciones fisiológicas, según se define de forma más precisa en las reivindicaciones.

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

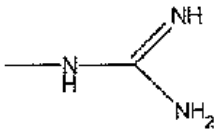
En algunas formas de realización definidas de forma más precisa en las reivindicaciones, A es una fracción heterocíclica. En otras formas de realización, A es una fracción heterocíclica y L y L' son una cadena de alquileno sustituida o no sustituida. En otras formas de realización más, A es una fracción heterocíclica, L y L' son una cadena de alquileno sustituida o no sustituida, y X y X' son NH-C(=O)-. En otras formas de realización más, A es una fracción heterocíclica, L y L' son una cadena de alquileno sustituida o no sustituida, X y X' son NH-C(=O)- y M y M' son una cadena de alquileno sustituida. En otras formas de realización más, A es una fracción heterocíclica, L y L' son una cadena de alquileno sustituida o no sustituida, X es NH-C(=O)-, M y M' son una cadena de alquileno sustituida, e Y e Y' son una fracción de guanidina. En algunas formas de realización en particular, A es un anillo de piperazina 1,4 o 2,5 disustituido.

En una forma de realización de la invención el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

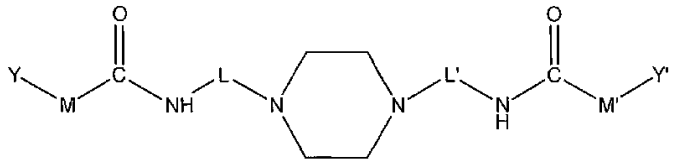


(II)

en la que L y L' son cada uno una cadena de alquileno de C_1 a C_{10} sustituida o no sustituida, en la que M y M' son cada uno una cadena de alquileno de C_1 a C_{10} sustituida o no sustituida y en la que Y e Y' son cada uno



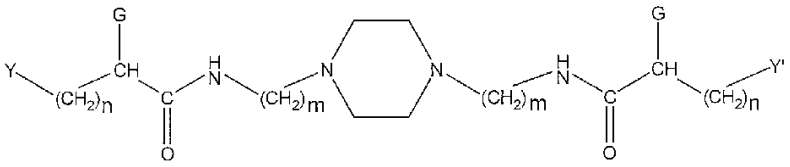
En una forma de realización de la invención el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula III o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(III)

en la que L, L', M, M', Y e Y' son según se describe en el presente documento.

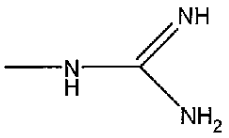
En otra forma de realización más de la invención el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



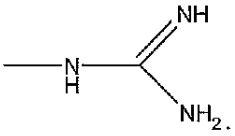
(IV)

en la que Y e Y' son según se describe en el presente documento y n es de 3 a 5, m es de 3 a 6, y G se elige de entre -NH_2 y OH. Más preferiblemente, G es amino.

Otra forma de realización más de la invención el inhibidor es un compuesto representado por cualquiera de las fórmulas II, III o IV, e Y e Y' se eligen independientemente de entre el grupo que consiste en

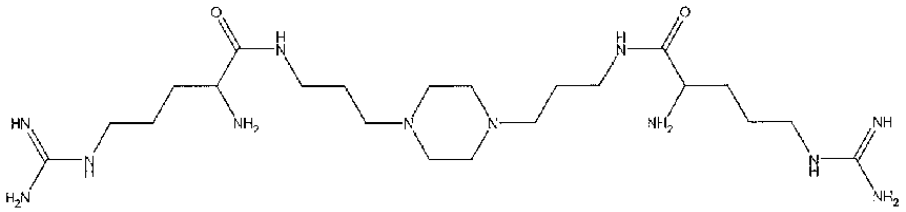


Más preferiblemente G es -NH_2 e Y e Y' son



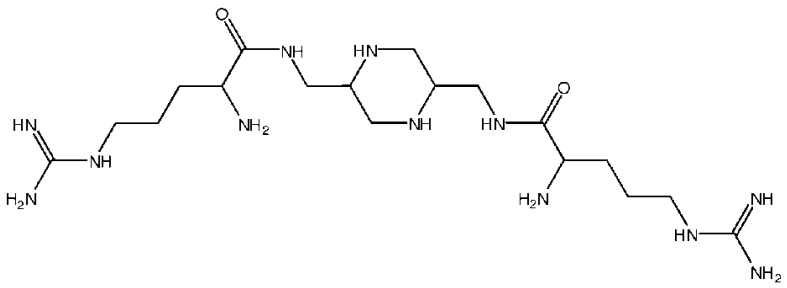
En la forma de realización preferida, el compuesto es di-arginina piperazina (DAP), representado en la fórmula V, o un compuesto relacionado, representado en la fórmula VI, o las sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los compuestos:

(V)



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

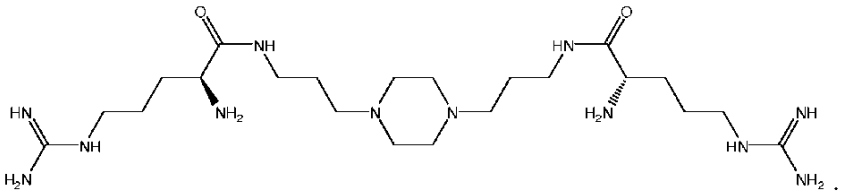
(VI)



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

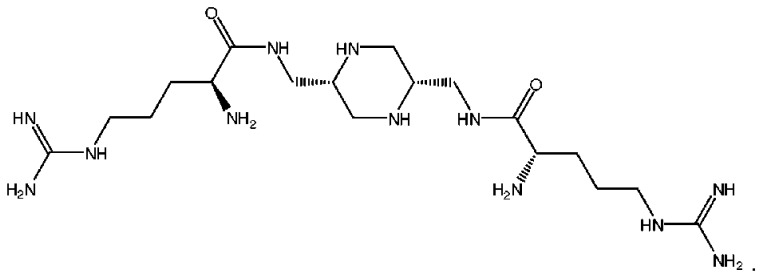
En una forma de realización específica, el compuesto de fórmula V es un estereoisómero según se representa en la fórmula VII:

(VII)



En otra forma de realización específica, el compuesto de fórmula VI es un estereoisómero según se representa en la fórmula VIII:

(VIII)



Los compuestos de la invención pueden administrarse en una composición farmacéutica en forma de una solución acuosa en forma de un bolo y/o de una infusión intravenosa, de una inyección subcutánea o por vía oral. En la forma de realización preferida, los compuestos son administrados mediante una inyección (intravenosa, intramuscular o subcutánea) en un portador tal como agua estéril destilada, solución salina, solución salina tamponada u otro excipiente farmacéuticamente aceptable para inyección. En algunas formas de realización, el inhibidor puede ser administrado por vía oral o en una superficie mucosa (nasal, pulmonar, vaginal, rectal o bucal) o en *depot*.

Los compuestos de la invención pueden ser administrados en una composición farmacéutica al paciente en necesidad de una reversión de la heparina, de la HBPM o de otra anticoagulación mediada por un inhibidor de la trombina, en una cantidad eficaz para restaurar la coagulación y la hemostasia normales. Las composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de la invención son adecuadas para su uso hospitalario o en la reversión no urgente en domicilio. Son administrados al paciente en necesidad de una reversión de la heparina, de la HBPM o de otra anticoagulación mediada por un inhibidor de la trombina en una cantidad eficaz para restaurar la coagulación. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas según se describen en el presente documento también pueden usarse para reducir la actividad de los factores de crecimiento de unión a la heparina y/o para la reversión completa o parcial de una combinación de uno o más de los agentes anticoagulantes Factor IIa y/o Factor Xa.

Por lo tanto, los compuestos de la invención pueden ser para su uso en la reversión completa o parcial del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación. Los compuestos de la invención también pueden usarse como parte de un kit diagnóstico, por ejemplo, un kit diagnóstico para la determinación de la concentración de un anticoagulante en la sangre.

Algunos ejemplos demuestran que la DAP se une directamente al rivaroxabán, al apixabán, a la heparina no fraccionada, al fondaparinux y a la HBPM, revertiendo la actividad anticoagulante. La DAP revertió la anticoagulación de rivaroxabán oral y de HBPM subcutánea *in vivo* medida según el aPTT, y del fondaparinux subcutáneo medida por la actividad del Xa, en ratas. La reversión de la DAP, confirmada por una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de sangre en el ensayo de transección de la cola de rata, fue demostrada para el apixabán, el dabigatrán, el edoxabán y el rivaroxabán. La DAP revertió completamente el apixabán y el rivaroxabán a una proporción entre masa y dosis de aproximadamente 10:1 de DAP:anticoagulante en sangre humana *ex vivo* medida mediante el uso de un kit anti-Xa. La DAP mostró una reversión dependiente de la dosis del apixabán y del rivaroxabán en sangre humana *ex vivo.* La reversión del rivaroxabán en sangre humana completa recién extraída se confirmó mediante mediciones del aPTT *ex vivo.* La DAP no se unió al argatrobán a unas concentraciones de hasta 1:1.000 *in vitro.* La DAP revertió el dabigatrán oral *in vivo* en ratas medido mediante el aPTT. El argatrobán administrado en ratas permanecía anticoagulado después de una dosis IV 200x de la DAP, demostrando que la DAP es segura y que la interacción de reversión es específica para las heparinas y los nuevos anticoagulantes orales. En resumen, los ejemplos demuestran la complejación de la DAP con la heparina y la HBPM, y que la DAP sirve como un excelente agente de reversión para la heparina, los compuestos heparinoides y otros inhibidores de la trombina que incluyen dabigatrán, las heparinas de bajo peso molecular aprobadas, así como rivaroxabán (XARELTO®), fondaparinux (ARIXTRA®), edoxabán (LIXIANA®) y apixabán (ELIQUIS®), según se ensayó en ensayos *in vitro* con sangre humana, en ensayos anti-Xa y del aPTT y/o en un ensayo de transección de cola de rata *in vivo*.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica del flujo térmico frente a la temperatura medido mediante una calorimetría diferencial de barrido (DCS) en la que la DAP se calienta desde -20 ºC hasta 200 ºC ("1" o "primer calor"), se enfría hasta -20 ºC, y se calienta de nuevo hasta 200 ºC ("2" o "segundo calor").

La Figura 2 es una gráfica de la DAP sola, de la HNF sola y de una combinación de DAP-HNF, en función del porcentaje en volumen en comparación con el tamaño (d.nm) medido mediante una dispersión dinámica de la luz (DLS).

La Figura 3 es una gráfica de la DAP sola, de rivaroxabán solo y de DAP-rivaroxabán en unas proporciones de de 1:1 y de 10:1 de DAP:rivaroxabán, en función del volumen (porcentaje) en comparación con el tamaño (d.nm) medido mediante una DLS.

La Figura 4 es una gráfica de la DAP sola, de apixabán solo y de la unión de DAP-apixabán en unas proporciones de de 1:1, de 10:1 y de 100:1, en función del volumen (porcentaje) en comparación con el tamaño (d.nm) medido mediante una DLS.

La Figura 5 es una gráfica de la DAP sola, de fondaparinux solo y de la unión de DAP-fondaparinux en unas proporciones de de 1:1, de 10:1 y de 100:1, en función del volumen (porcentaje) en comparación con el tamaño (d.nm) medido mediante una DLS.

La Figura 6 es una gráfica de la DAP sola, de la HBPM y de la unión de DAP-HBPM en unas proporciones de 1:1, de 1:10 y de 100:1, en función del volumen (porcentaje) en comparación con el tamaño (d.nm) medido mediante una DLS.

La Figura 7 es una gráfica de la DAP sola, de argatrobán solo y de la unión de DAP-argatrobán en unas proporciones de 1:1, 10:1, de 100:1 y de 1.000:1, en función del volumen (porcentaje) en comparación con el tamaño (d.nm) medido mediante una DLS.

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

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

La Figura 10 es una gráfica del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) medido con el tiempo (horas) después de la administración subcutánea de heparina no fraccionada (HNF) a una rata, seguida de la administración intravenosa de 200 mg/kg (100 mg) y de mg/kg (200 mg) de DAP.

La Figura 11 es una gráfica del aPTT (segundos) medido con el tiempo (horas) después de la administración oral de 5 mg/kg de rivaroxabán a una rata, seguida de la administración intravenosa de 5 mg/kg (2 mg) de DAP.

La Figura 12 es una gráfica de la concentración de fondaparinux activo (µg/ml) medida con el tiempo (minutos después de la reversión) después de la administración subcutánea de 5 mg/kg de fondaparinux a una rata, seguida de la administración intravenosa de 200 mg/kg de DAP (es decir, "reversión").

La Figura 13 es una gráfica del aPTT (segundos) medido con el tiempo (minutos después de la reversión) después de la administración oral de 15,5 mg/kg de PRADAXA® (dabigatrán) a una rata, seguida de la administración intravenosa de 100 mg/kg de DAP (es decir, "reversión").

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

La Figura 15 es una gráfica de la sangre recogida (es decir, la pérdida de sangre acumulada) durante 30 minutos en un ensayo de hemorragia por transección de la cola de rata en ratas que reciben 2 mg de rivaroxabán y 0 mg de DAP, 2 mg de rivaroxabán y 2,5 mg de DAP, 2 mg de rivaroxabán y 12,5 mg de DAP, o una dosis ficticia de reversión y de anticoagulante ("ficticia"). En los grupos de tres ratas emparejadas por edades, 12,5 mg de DAP redujeron la pérdida de sangre a los niveles de la dosis ficticia, produciendo una diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0,05$) con respecto a las ratas que sólo recibieron rivaroxabán.

La Figura 16 es una gráfica de la sangre recogida (es decir, la pérdida de sangre acumulada) durante 30 minutos en un ensayo de hemorragia por transección de la cola de rata en ratas que reciben 1,25 mg de apixabán y 0 mg de DAP, 1,25 mg de apixabán y 5 mg de DAP, 1,25 mg de apixabán y 12,5 mg de DAP, o una dosis ficticia de reversión y de anticoagulante ("ficticia"). En los grupos de tres ratas emparejadas por edades, 5 mg y 12,5 mg de DAP redujeron la pérdida de sangre a los niveles de la dosis ficticia, produciendo una diferencia estadísticamente significativa (*** $p < 0,01$) con respecto a las ratas que sólo recibieron apixabán.

La Figura 17 es una gráfica de la sangre recogida (es decir, la pérdida de sangre acumulada) durante 30 minutos en un ensayo de hemorragia por transección de la cola de rata en ratas que reciben 1,25 mg de edoxabán y 0 mg de DAP, 1,25 mg de edoxabán y 12,5 mg de DAP, o una dosis ficticia de reversión y de anticoagulante ("ficticia"). En los grupos de tres ratas emparejadas por edades, 12,5 mg de DAP redujeron la pérdida de sangre a los niveles de la dosis ficticia, produciendo una diferencia estadísticamente significativa (* $p < 0,05$) con respecto a las ratas que sólo recibieron edoxabán.

La Figura 18 es una gráfica de la sangre recogida (es decir, la pérdida de sangre acumulada) durante 30 minutos en un ensayo de hemorragia por transección de la cola de rata en ratas que reciben 15 mg de etexilato de dabigatrán y 0 mg de DAP, 15 mg de etexilato de dabigatrán y 5 mg de DAP, 15 mg de etexilato de dabigatrán y 12,5 mg de DAP, o una dosis ficticia de reversión y de anticoagulante ("ficticia"). En los grupos de tres ratas emparejadas por edades, 12,5 mg de DAP redujeron la pérdida de sangre a los niveles de la dosis ficticia, produciendo una diferencia estadísticamente significativa (*** $p < 0,01$) con respecto a las ratas que sólo recibieron etexilato de dabigatrán.

La Figura 19 es una gráfica del aPTT (segundos) medido en sangre humana recién extraída tratada *ex vivo* con 50 microgramos/ml de DAP, 0,25 microgramos/ml de rivaroxabán, 50 microgramos/ml de DAP y 0,25 microgramos/ml de rivaroxabán o con solución salina.

La Figura 20 es una gráfica que muestra la concentración de anticoagulante eficaz medida mediante un ensayo de actividad del anti-factor Xa en plasma humano tratado *ex vivo* con 218 µg/l de rivaroxabán solo o junto con 1.250 mg/l de DAP y 459 µg/l de rivaroxabán solo o junto con 6.250 µg/l de DAP.

La Figura 21 es una gráfica que muestra la concentración de anticoagulante eficaz medida mediante un ensayo de actividad del anti-factor Xa en plasma humano tratado *ex vivo* con 156 µg/l de apixabán solo o junto con 1.156 µg/l de DAP y 313 µg/l de apixabán solo o junto con 3.125 µg/l de DAP.

La Figura 22 es una gráfica que muestra la concentración de anticoagulante eficaz medida mediante un ensayo de actividad del anti-factor Xa en plasma humano tratado *ex vivo* con 218 µg/l de rivaroxabán, solo o junto con cantidades crecientes (1,25, 12,5, 125 y 1.250 µg/l) de DAP.

Descripción detallada de la invención

I. Agentes de reversión de los anticoagulantes

Se divulgan nuevos agentes de reversión de los anticoagulantes. Los compuestos de la invención incluyen los compuestos descritos en el presente documento, así como las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Se han desarrollado inhibidores de heparina, de fragmentos de heparina, de fondaparinux e inhibidores del factor Xa o del factor IIa (por ejemplo, inhibidores orales del factor Xa o del factor IIa). La estructura general de los agentes de reversión de los anticoagulantes de interés es: R-Z-R', en la que R y R' son agentes cargados positivamente a un pH fisiológico y pueden ser moléculas iguales o diferentes, y Z es un compuesto anular hidrófobo cíclico o condensado.

Según se usa en el presente documento, una cadena de alquileno es una fracción de alqueleno divalente que tiene una longitud de desde C_1 hasta C_{10}, preferiblemente desde C_3 hasta C_6 y que puede estar sustituida o no sustituida. Algunos ejemplos de sustituyentes incluyen alquilo, hidroxilo, hidroxi alquilo, amino, amino alquilo, alcoxi, alquil

alcoxi. Según se usa en el presente documento, el término alquilo es una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada desde C_1 hasta C_{10}, preferiblemente C_1-C_6. En otras forma de realización más, A es una fracción heterocíclica, L y L' son una cadena de alquileno sustituida o no sustituida, X es NH-C(=O)-, M y M' son una cadena de alquileno sustituida, e Y e Y' son una fracción de guanidina.

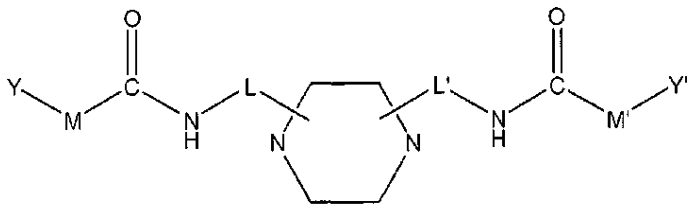
En algunas formas de realización, los conectores L y L' están unidos a los heteroátomos del anillo A, tales como los dos átomos de nitrógeno de la piperazina. En otras formas de realización, el conector L y L' están unidos a átomos distintos a los heteroátomos del anillo, tales como carbono. En algunas formas de realización en particular, A es un anillo de piperazina 1,4 o 2,5 disustituido. En algunas formas de realización, L y L' y/o M y M' son una cadena de alquileno sustituida o no sustituida, tal como $-(CH_2)_n-$, en la que n es un número entero desde 1-10, preferiblemente desde 1-6, por ejemplo, 1-3. En particular formas de realización, n es 3. En algunas formas de realización, L y/o M están ausentes.

Y e Y' son una fracción que contiene uno o más átomos o grupos que son catiónicos o que serán catiónicos en condiciones fisiológicas. Algunos ejemplos identificados de forma más precisa en las reivindicaciones incluyen fracciones de amina y de guanidina, así como fracciones que contienen fósforo, tales como fracciones de alquiltrifenilfosfonio, de tetrafenilfosfonio, de tetrafenilarsonio, de tribencil amonio y de fosfonio. Algunas fracciones catiónicas adicionales incluyen oligómeros y polímeros catiónicos, tales como oligo o polilisina, oligo o poliarginina, polietileno imina N-alquilada, y similares. Otras fracciones catiónicas incluyen cationes lipófilos deslocalizados que contienen entre una y tres unidades de carbimino, sulfimino o fosfinimino según se describe en Kolomeitsev et al., Tet. Let., Vol. 44, nº 33, 5795-5798 (2003).

En algunas formas de realización, el compuesto es un derivado de piperazina, en el que las cadenas laterales de aminoácidos contienen uno o más átomos cargados positivamente o átomos que estarán cargados positivamente en las condiciones fisiológicas. Algunos ejemplos incluyen diarginina piperazina. Otros aminoácidos que están cargados positivamente o que estarán cargados positivamente en las condiciones fisiológicas pueden ser sustituidos por arginina.

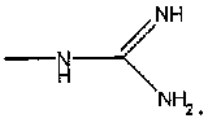
"Heterociclo" o "heterocíclico", según se usa en el presente documento, se refiere a un radical cíclico unido a través de un carbono o un nitrógeno del anillo de un anillo monocíclico o bicíclico que contiene 3-10 átomos en el anillo y preferiblemente desde 5-6 átomos en el anillo, que consiste en carbono y entre uno y cuatro heteroátomos que se eligen cada uno de entre el grupo que consiste en oxígeno no peróxido, azufre y N(R) en la que R está ausente o es H, O, alquilo (C_{1-4}), fenilo o bencilo y que opcionalmente contiene 1-3 dobles enlaces y está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes. Algunos ejemplos de un anillo heterocíclico incluyen, pero no se limitan a, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, benzoisoxazolilo, benzoisotiazolilo, bencimidazolinilo, carbazolilo, 4aH-carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinnolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-b]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizinilo, indolilo, 3H-indolilo, isatinoílo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metilenodioxifenilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxindolilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, piperidonilo, 4-piperidonilo, piperonilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizinilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranoílo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrazolilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo y xantenilo.

En una forma de realización de la invención el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula II o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

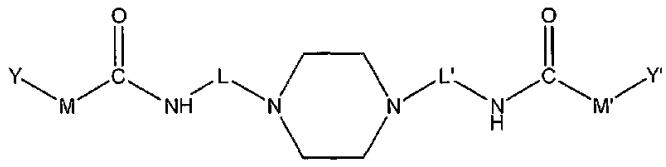


(II)

en la que L y L' son cada uno una cadena de alquileno sustituida o no sustituida desde C_1 hasta C_{10}, en la que M y M' son cada uno una cadena de alquileno sustituida o no sustituida desde C_1 hasta C_{10} y en la que Y e Y' son cada uno



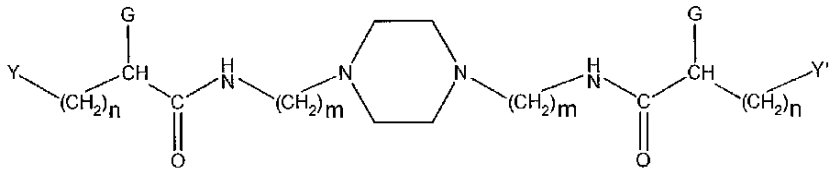
En otra forma de realización de la invención el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula III o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(III)

en la que cada uno de L, L', M, M', Y e Y' son como se han descrito previamente.

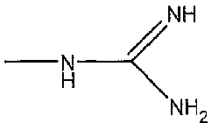
En otra forma de realización más de la invención el inhibidor es un compuesto representado por la fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



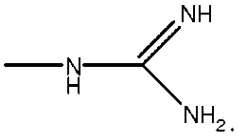
(IV)

en la que Y e Y' son como se han descrito previamente y n es de 3 a 5, m es de 3 a 6 y G se elige de entre -NH_2 y OH. Más preferiblemente, G es amino.

Otra forma de realización más de la invención el inhibidor es un compuesto representado por cualquiera de las fórmulas II, III o IV, e Y e Y' se eligen independientemente de entre el grupo que consiste en

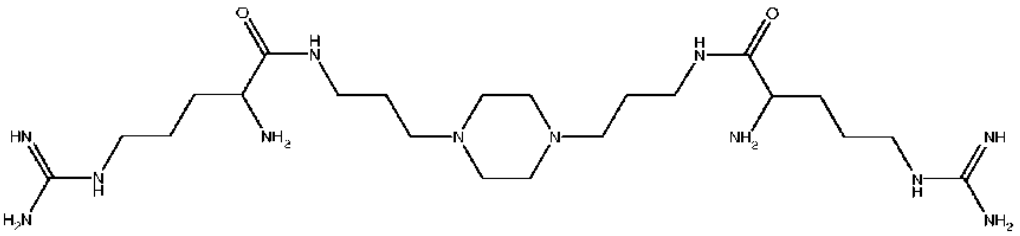


Más preferiblemente G es -NH_2 e Y e Y' son



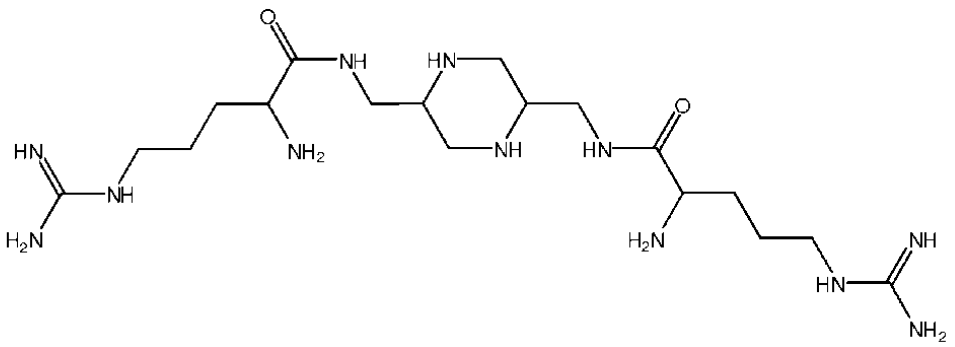
Por lo tanto, en una forma de realización, el compuesto de la invención es di-arginina piperazina ("DAP"), tal como el compuesto de fórmula V, o un compuesto relacionado de fórmula VI, o sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los compuestos:

(V)



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

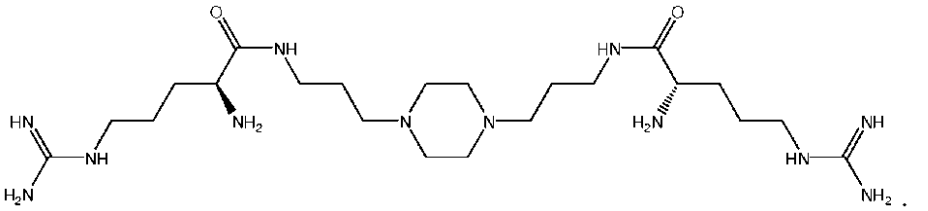
(VI)



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

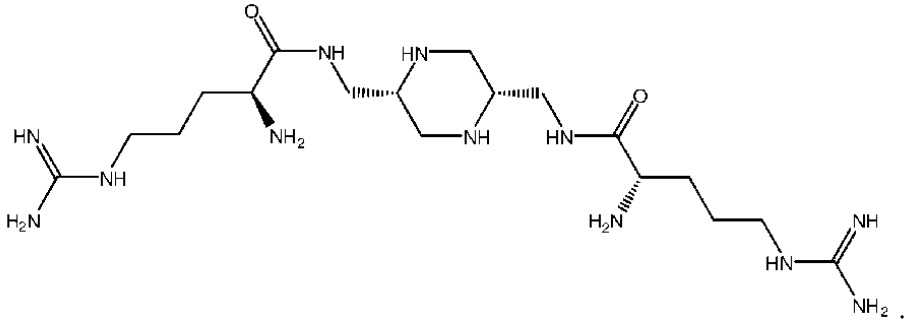
En una forma de realización específica, el compuesto de fórmula V es un estereoisómero según se representa en la fórmula VII:

(VII)



En otra forma de realización específica, el compuesto de fórmula VI es un estereoisómero según se representa en la fórmula VIII:

(VIII)



La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto según se usa en el presente documento significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto parental. Algunas sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de grupos ácidos o básicos presentes en los compuestos de la invención. Algunas sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de clorhidrato, de bromhidrato, de yodhidrato, de nitrato, de sulfato, de bisulfato, de fosfato, de fosfato ácido, de isonicotinato, de acetato, de lactato, de salicilato, de citrato, de tartrato, de pantotenato, de bitartrato, de ascorbato, de succinato, de maleato, de gentisinato, de fumarato, de gluconato, de glucaronato, de sacarato, de formiato, de benzoato, de glutamato, de metansulfonato, de etansulfonato, de benzensulfonato, de p-toluensulfonato y de pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Algunas sales de bases adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio, de calcio, de litio, de magnesio, de potasio, de sodio, de cinc y de dietanolamina.

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

Otro mecanismo de acción propuesto del compuesto de la invención es a través de interacciones físicas débiles tales como puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas con los inhibidores de la coagulación. Los inhibidores orales del Factor IIa y Xa poseen porciones hidrófobas, que pueden provocar una asociación hidrófoba con el compuesto de la invención, por ejemplo, con la DAP.

Por lo tanto, en algunas formas de realización, los compuestos de la invención contienen al menos una fracción cíclica hidrófoba, por ejemplo, una o una combinación de anillos alifáticos o aromáticos, incluyendo anillos condensados. En otras formas de realización, los compuestos de la invención contienen al menos una fracción cíclica hidrófoba y al menos dos fracciones cargadas o parcialmente cargadas positivamente al pH fisiológico.

En algunas formas de realización de la invención, una o ambas de las argininas de los compuestos de las Fórmulas V y VI (o los compuestos de las Fórmulas VII y VIII) están sustituidos con uno o más aminoácidos cargados positivamente, sus derivados o compuestos cargados de forma similar, por ejemplo, lisina, histidina, ornitina. Las argininas de los compuestos de las Fórmulas V y VI o de los aminoácidos cargados positivamente sustituidos por dichas argininas pueden ser aminoácidos naturales (es decir, L-aminoácidos), sus enantiómeros (es decir, D-aminoácidos), o mezclas racémicas u otras mezclas de los mismos. "Enantiómeros" se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

Las definiciones estereoquímicas y las convenciones usadas en el presente documento generalmente siguen el S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y el Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en un plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, se usan los prefijos D y L o R y S para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos D y L o (+) y (-) se emplean para indicar el signo de rotación del plano de la luz polarizada por el compuesto, significando (-) o L que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con el prefijo (+) o D es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto porque son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros a menudo se denomina mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se refiere a una mezcla racémica o a un racemato, que puede producirse cuando no ha habido una estereoselección o una estereoespecificidad en una reacción o un proceso químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, que está desprovista de actividad óptica.

En otras formas de realización de la invención, el compuesto de la invención contiene al menos una fracción hidrófoba cíclica, por ejemplo, una o una combinación de anillos alifáticos y aromáticos, incluyendo anillos condensados. Los compuestos de interés contienen al menos una fracción hidrófoba cíclica y al menos dos fracciones cargadas o parcialmente cargadas positivamente al pH fisiológico.

Debería tenerse una consideración especial en el diseño de los agentes terapéuticos basados en péptidos, dado que dichos agentes pueden causar unas reacciones inmunológicas indeseadas y a menudo graves una vez que se administran a un sujeto. El compuesto de la invención está diseñado para que tenga un peso molecular lo suficientemente bajo como para minimizar los problemas de inmunogenicidad. En una forma de realización, con objeto de evitar la activación de la respuesta inmunitaria, el compuesto está diseñado de forma que su peso molecular sea menor de aproximadamente 5.000 daltons, tal como menor de o de aproximadamente 1.000 daltons, por ejemplo, desde aproximadamente 500 daltons. En una forma de realización, el peso molecular del compuesto es de aproximadamente 512 daltons.

Se prefiere que los compuestos de la invención no se unan ni interfieran de otro modo con la función del ERG, un canal de ión potasio que contribuye a la conductividad eléctrica del corazón. La inhibición de este canal de potasio puede dar lugar a un síndrome de prolongación QT potencialmente mortal y otros candidatos a fármacos por lo demás exitosos han mostrado una unión al ERG humano.

Además, se prefiere que el compuesto de la invención no inhiba ni sirva como sustrato de las enzimas del citocromo p450 (CYP) unidas a membrana. Las CYP son las principales enzimas implicadas en el metabolismo de los fármacos, y la modulación de la actividad del CYP puede interferir en el aclaramiento y el metabolismo de otros fármacos administrados a un sujeto, provocando interacciones farmacológicas no deseadas.

También preferiblemente, los compuestos de la invención no muestran una significativa unión a las proteínas plasmáticas *in vitro* (por ejemplo, una unión a la albúmina). Debido a que los compuestos de la invención están muy poco unidos a las proteínas plasmáticas, muestran unas semividas de actividad corta que minimizan el riesgo de una sobredosis por acumulación.

II. Síntesis de los agentes de reversión de los anticoagulantes

Los compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento se preparan mediante el uso de una diversidad de métodos partiendo de compuestos disponibles comercialmente, de compuestos conocidos o de compuestos preparados mediante métodos conocidos. Algunos ejemplos de rutas sintéticas hacia uno de los compuestos descritos en el presente documento (el compuesto de Fórmula V, di-arginina piperazina, "DAP") están incluidos en los siguientes esquemas. Los siguientes esquemas también son aplicables al estereoisómero del compuesto DAP de Fórmula VII mediante la selección de los apropiados compuestos estereoisómeros de partida. Otros compuestos de la invención pueden ser sintetizados siguiendo un esquema sintético similar. Los expertos en la materia comprenden que el orden de las etapas mostrado en el presente documento puede ser modificado para acomodar la funcionalidad en la molécula objetivo. Los expertos en la materia también entienden que pueden requerirse diversas etapas de protección y de desprotección para la síntesis. La necesidad de una protección y de una desprotección y la selección de los grupos protectores apropiados se encuentran, por ejemplo, en Greene and Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, segunda edición, John Wiley & Sons (1991), que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

En algunas formas de realización de la presente invención, el grupo protector es el grupo butiloxicarbonilo terciario (Boc). En otras formas de realización de la presente invención, el grupo protector es el grupo 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf). En otra forma de realización, el grupo protector de aminoácido puede ser, pero no se limita a, 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo (PMC).

Los grupos protectores pueden ser eliminados mediante diversas rutas. La eliminación del grupo protector comprende, por ejemplo, el tratamiento del compuesto protegido con ácido trifluoroacético (TFA), con HCl acuoso o un calentamiento en ácido acético. Debido a que la eliminación de los grupos protectores, por ejemplo, la eliminación de los grupos protectores en condiciones ácidas, puede dar como resultado la producción de especies catiónicas que pueden alquilar los grupos funcionales de la cadena peptídica, pueden añadirse capturadores durante la etapa de desprotección para que reaccionen con cualquiera de las especies reactivas libres. Algunos ejemplos de capturadores incluyen, pero no se limitan a, agua, derivados de anisol y derivados de tiol. Por lo tanto, en una forma de realización, la eliminación de los grupos protectores comprende el tratamiento del compuesto con TFA y con un capturador (por ejemplo, con TFA y agua).

Pueden usarse diversos disolventes, por ejemplo, disolventes orgánicos, en las etapas de la síntesis. Algunos disolventes apropiados incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido, dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano, metanol, etanol, cloruro de metileno, tolueno y acetona. En algunas formas de realización, el disolvente es DMF.

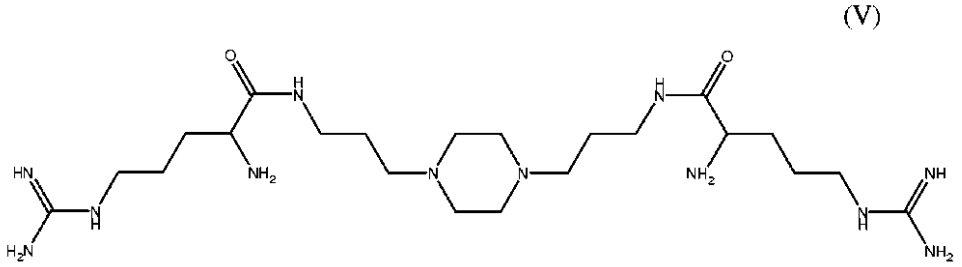
En las etapas de la síntesis pueden usarse agentes de unión ácida adecuados. Estos incluyen, pero no se limitan a, bases orgánicas, tales como, por ejemplo, piridina, trietilamina, trietanolamina, 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) y diisopropiletilamina (DIEA); y bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidruro de sodio, carbonato de potasio y carbonato de sodio. En algunas formas de realización, el agente de unión ácida es DIEA.

La síntesis puede incluir reactivos de acoplamiento peptídico. Los reactivos de acoplamiento peptídico pueden incluir, pero no se limitan a, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxibenzotriazol (HOBt), carbonildiimidazol (CDI), diciclohexilcarbodiimida (DCC), éster activo de N-hidroxisuccinamida (OSu), hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU) y combinaciones de los mismos. En una forma de realización, el reactivo de acoplamiento peptídico es HBTU. En otra forma de realización, el reactivo de acoplamiento peptídico es EDC/HOBt. En otra forma de realización más, el reactivo de acoplamiento peptídico es un éster activo de OSu.

Adicionalmente, la síntesis puede incluir una etapa en la que se purifica un producto en bruto, por ejemplo, mediante una cromatografía en columna. Los productos deseados de cada etapa o serie de etapas pueden ser separados y/o purificados hasta el grado de homogeneidad deseado mediante las técnicas habituales de la materia. Normalmente

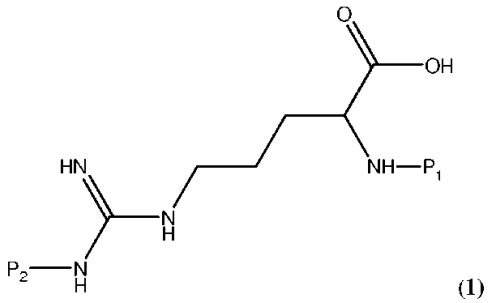
dichas separaciones implican una extracción multifásica, una cristalización en un disolvente o en una mezcla disolvente, una destilación, una sublimación o una cromatografía. Una cromatografía puede implicar varios métodos que incluyen, por ejemplo: en fase inversa y en fase normal; de exclusión por tamaños; de intercambio iónico; métodos y aparatos de cromatografía líquida a alta, media y baja presión; analítica a pequeña escala; de lecho móvil simulado (SMB) y una cromatografía preparativa en capa fina o gruesa, así como técnicas a pequeña escala de cromatografía en capa fina y ultrarrápida.

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



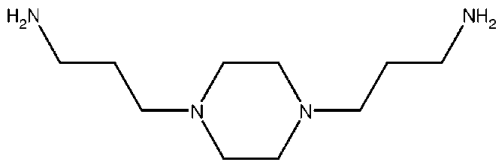
(V)

es sintetizado mediante la reacción de un exceso de equivalentes (por ejemplo, al menos aproximadamente dos equivalentes) del compuesto **1**



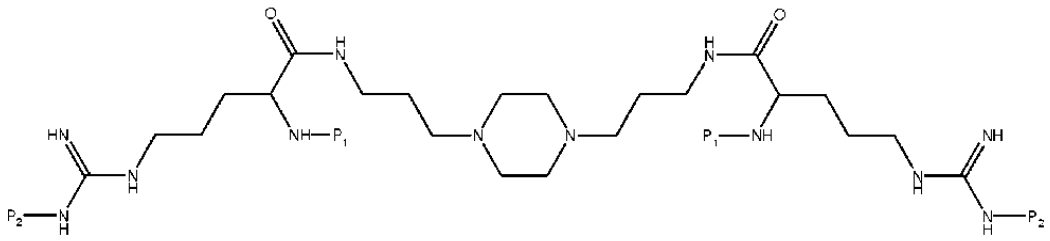
(1)

con un equivalente del compuesto **2**



(2),

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



(3),

en la que P1 es un grupo protector y P2 es un grupo protector o es un hidrógeno.

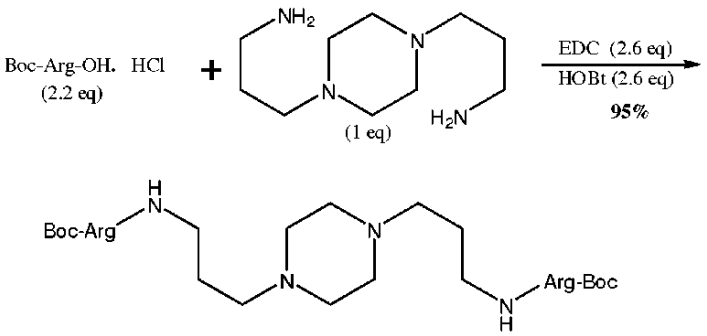
En una forma de realización, el reactivo de acoplamiento peptídico es HBTU, EDC/HOBt o un éster activo de OSu. En una forma de realización, el grupo protector P1 es Boc. En otra forma de realización, el grupo protector P2 es Pbf. En una forma de realización diferente, el grupo protector P1 es Boc y P2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

Posteriormente, 3 puede ser purificado. Esta purificación puede implicar varios métodos de cromatografía en columna conocidos en la materia.

Los grupos protectores de 3 pueden ser eliminados mediante diversos métodos conocidos en la materia con objeto de obtener el compuesto de Fórmula V. La desprotección puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la eliminación de los grupos protectores mediante el uso de ácido trifluoroacético (TFA) y agua, de TFA y agua o de otro capturador, incluyendo, pero no se limita a, HCl acuoso un calentamiento en ácido acético.

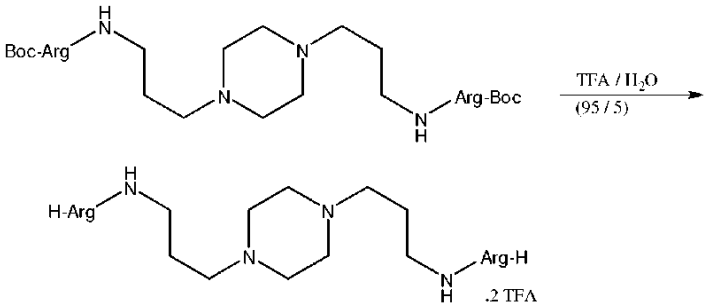
El compuesto puede ser purificado adicionalmente mediante el uso de un método de cromatografía en columna, tal como una cromatografía de intercambio iónico con tampones salinos, o una HPLC preparativa con ácido trifluoroacético o ácido acético como tampón.

En un esquema más específico, el acoplamiento implica la reacción del compuesto 1, en el que P1 era Boc y P2 era un hidrógeno (representado a continuación como Boc-Arg-OH-HCl), con el compuesto 2 según se representa a continuación:



El producto en bruto resultante tenía una pureza mayor del 95 % mediante una cromatografía en capa fina (TLC).

Posteriormente, se llevó a cabo la etapa de desprotección según se representa a continuación:



El producto desprotegido se purificó mediante una HPLC preparativa mediante el uso de un tampón de ácido acético al 1 %. Se observó una pureza del producto > 98 %. El TFA residual se eliminó con una baja cantidad de resina DOWEX. El peso molecular de la DAP (el compuesto de Fórmula V) es de 512,4, y el compuesto sintetizado de acuerdo con el anterior esquema mostró el siguiente pico primario mediante una espectroscopía de masas:

$$[M + H]^+ = 513,4.$$

III. Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos descritos en el presente documento. Dicha composición puede contener, además del compuesto de la invención, un portador o un excipiente farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que es compatible con las características físicas y químicas del principio activo y que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del principio activo. Las composiciones pueden contener diversos diluyentes, filtros, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la materia. Las características del portador dependerán de la vía de administración, y generalmente son bien conocidas en la materia.

La composición farmacéutica de la invención puede estar adaptada para una administración enteral-una administración de la composición en la que la composición es absorbida a través del tracto digestivo, por ejemplo, una ingestión oral, una administración rectal. En otras formas de realización, la composición farmacéutica de la

invención puede estar adaptada para una administración parenteral-un administración de la composición en la que la composición es introducida a través de una vía distinta al tracto digestivo, por ejemplo, una vía intravenosa, subcutánea, cutánea, nasal, pulmonar, vaginal, bucal.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas, por ejemplo, las composiciones para una administración oral, pueden ser preparadas según se describe en referencias tales como "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman et al. (Nueva York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington-The science and practice of pharmacy", 20ª ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000 y "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6ª edición, Ansel et al., (Media, PA: Williams y Wilkins, 1995), incorporadas al presente documento como referencia, que proporcionan información sobre portadores, materiales (por ejemplo, materiales de recubrimiento), equipos y procesos para la preparación de comprimidos y de cápsulas, y de formas de dosificación de liberación retardada de comprimidos, cápsulas y gránulos.

Algunos ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, polímeros de celulosa tales como acetato ftalato de celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, ftalato de hidroxipropil metil celulosa y acetato succinato de hidroxipropil metil celulosa; acetato ftalato de polivinilo, polímeros y copolímeros del ácido acrílico y resinas metacrílicas que están disponibles en el mercado con el nombre comercial Eudragit® (Roth Pharma, Westerstadt, Alemania), ceína, goma laca y polisacáridos. Adicionalmente, el material de recubrimiento puede contener portadores convencionales tales como plastificantes, pigmentos, colorantes, deslizantes, agentes estabilizantes, formadores de poros y tensioactivos.

Algunos excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales presentes en los comprimidos, las microesferas, los gránulos o las partículas que contienen el fármaco incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, colorantes, estabilizantes y tensioactivos.

Normalmente son necesarios diluyentes, denominados también "agentes de relleno", para aumentar el volumen de una forma de dosificación sólida, de forma que se proporcione un tamaño práctico para la compresión en comprimidos o para la formación de microesferas y gránulos. Algunos diluyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato dicálcico dihidratado, sulfato de calcio, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, cloruro de sodio, almidón seco, almidones hidrolizados, almidón pregelatinizado, dióxido de silicio, óxido de titanio, aluminosilicato de magnesio y azúcar en polvo.

Los ligantes se usan para impartir cualidades cohesivas a una forma de dosificación sólida, y asegurar por lo tanto que un comprimido o una microesfera o un gránulo permanece intacto después de la formación de las formas de dosificación. Algunos materiales aglutinantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidón, almidón pregelatinizado, gelatina, azúcares (incluyendo sacarosa, glucosa, dextrosa, lactosa y sorbitol), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas tales como de acacia, de tragacanto, alginato de sodio, celulosa, incluyendo hidroxipropilmetil celulosa, hidroxipropil celulosa, etil celulosa y veegum, y polímeros sintéticos tales como copolímeros del ácido acrílico y del ácido metacrílico, copolímeros del ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de aminoalquilo, ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico y polivinilpirrolidona.

Los lubricantes se usan para facilitar la elaboración del comprimido. Algunos ejemplos de lubricantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, behenato de glicerol, polietilenglicol, talco y aceite mineral.

Los disgregantes se usan para facilitar la disgregación o "ruptura" de la forma de dosificación después de la administración, y generalmente incluyen, pero no se limitan a, almidón, glucolato sódico de almidón, carboximetil almidón sódico, carboximetil celulosa sódica, hidroxipropil celulosa, almidón pregelatinizado, arcillas, celulosa, alginina, gomas o polímeros reticulados, tales como PVP reticulada (Polyplasdone XL de GAF Chemical Corp).

Los estabilizantes se usan para inhibir o retardar las reacciones de descomposición del fármaco que incluyen, a modo de ejemplo, reacciones oxidantes.

Los tensioactivos pueden ser agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos, anfóteros o no iónicos. Algunos agentes tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que contienen iones carboxilato, sulfonato y sulfato. Algunos ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen alquil sulfonatos de cadena larga de sodio, de potasio, de amonio, y alquil aril sulfonatos tales como dodecilbencensulfonato de sodio; dialquilsulfosuccinatos de sodio, tales como dodecilbencensulfonato de sodio; dialquilsulfosucinatos de sodio, tales como bis-(2-etiltioxil)-sulfosuccinato de sodio; y sulfatos de alquilo tales como lauril sulfato de sodio. Algunos tensioactivos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, bromuro de cetrimonio, cloruro de estearildimetilbencil amonio, polioxietileno y amina de coco. Algunos ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen monoestearato de etilenglicol, miristato de propilenglicol, monoestearato de glicerilo, estearato de glicerilo, poligliceril-4-oleato, acilato de sorbitano, acilato de sacarosa, laurato de PEG-150, monolaurato de PEG-400, monolaurato de polioxietileno, polisorbatos, polioxietilén octilfenil éter, PEG-1000 cetil éter, polioxietilén tridecil éter, polipropilenglicol butil éter, Poloxamer® 401, estearoil monoisopropanolamida y polioxietilén amida de sebo hidrogenada. Algunos ejemplos de tensioactivos anfóteros

incluyen N-dodecil-.beta.-alanina de sodio, N-lauril-.beta.-iminodipropionato de sodio, miristoanfoacetato, lauril betaína y lauril sulfobetaína.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar diseñadas para proporcionar una liberación retardada, sostenida, pulsátil o modificada de otro modo.

Si se desea, los comprimidos, las microesferas, los gránulos o las partículas también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, colorantes, agentes tamponantes del pH y conservantes.

También pueden usarse formulaciones bioadhesivas para mejorar la captación o modificar la liberación. Dichas formulaciones son conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 20060045865 de Jacob, incorporada al presente documento como referencia.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para una administración por vía nasal o pulmonar también pueden ser útiles. Se han descrito aerosoles para la administración de agentes terapéuticos en el tracto respiratorio, por ejemplo, en Adjei, A. y Garren, J. Pharm. Res., 7: 565-569 (1990); y en Zanen, P. y Lamm, J.-W. J. Int. J. Pharm., 114: 111-115 (1995). El tracto respiratorio engloba las vías superiores, que incluyen la orofaringe y la laringe, seguido por las vías inferiores, que incluyen la tráquea, seguido de bifurcaciones en bronquios y bronquiolos. Las vías superiores e inferiores se denominan vías de conducción. Los bronquiolos terminales se dividen después en bronquiolos respiratorios que después dan lugar a la zona respiratoria final, los alveolos o pulmón profundo. Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract", en Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6: 273-313 (1990). El pulmón profundo, o alveolos, es el objetivo principal de los aerosoles terapéuticos inhalados para la administración sistémica de fármacos.

Los fármacos administrados por inhalación pueden presentarse en forma de formulaciones líquidas en aerosol.

Para las composiciones inyectables (por ejemplo, las composiciones intravenosas), el portador es agua destilada estéril, solución salina, solución salina tamponada u otro excipiente para inyección farmacéuticamente aceptable. Algunos aditivos pueden incluir conservantes y ácidos o bases para ajustar el pH, para alterar la solubilidad o la captación.

En una forma de realización, en la que la composición farmacéutica comprende el compuesto DAP de fórmula V (o su estereoisómero de fórmula VII) y la composición está adaptada para su administración parenteral en una inyección, el compuesto se disuelve en agua con la tonicidad apropiada y modificadores de la molalidad (tales como solución salina tamponada con fosfato). La DAP es soluble en agua a más de 100 mg/ml. En la una forma de realización, la DAP está adaptada en forma de una solución estéril para su administración IV. En un aspecto, la molalidad de la composición farmacéutica en la que la DAP está adaptada para su administración IV se ajusta a 290 mOsm/l con cloruro de sodio, y el pH se ajusta a 7,4 con hidróxido de sodio. Preferiblemente la composición farmacéutica se administra en forma de un bolo intravenoso de introducción lenta.

IV. Métodos de uso

La presente invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en la reversión completa o parcial del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación en un sujeto (por ejemplo, un compuesto de fórmula II, III, IV, V, VI, VII o VIII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En la presente invención, el inhibidor de la coagulación (también denominado en el presente documento anticoagulante) es una molécula que inhibe el proceso de coagulación. Algunos ejemplos de inhibidores de la coagulación incluyen, pero no se limitan a, activadores de la antitrombina (por ejemplo, heparina no fraccionada y HBPM), inhibidores del factor IIa e inhibidores del factor Xa.

Heparina: la heparina es un mucopolisacárido natural que actúa en el cuerpo como un cofactor de la antitrombina para impedir la coagulación intravascular. La sustancia es producida por los basófilos y los mastocitos, que se encuentran en gran cantidad en el tejido conectivo que rodea los capilares, particularmente en los pulmones y en el hígado. En forma de la sal de sodio, la heparina se usa terapéuticamente como anticoagulante.

Heparina de bajo peso molecular: la heparina de bajo peso molecular (HBPM) se elabora a partir de la heparina mediante el uso de varios métodos de despolimerización, que incluyen una despolimerización oxidante con peróxido de hidrógeno, usada en la elaboración de la ardeparina (NORMIFLO®); una escisión desaminativa con nitrito de isoamilo, usada en la elaboración de la certoparina (SANDOPARIN®); una escisión alcalina beta-eliminativa del éster de bencilo de la heparina, usada en la elaboración de la enoxaparina (LOVENOX® y CLEXANE®); una despolimerización oxidante con Cu^{2+} y peróxido de hidrógeno, usada en la elaboración de la parnaparina (FLUXUM®); una escisión beta-eliminativa mediante la enzima heparinasa, usada en la elaboración de la tinzaparina (INNOHEP® y LOGIPARIN®); una escisión desaminativa con ácido nitroso, usada en la elaboración de la dalteparina (FRAGMIN®), de la reviparina (CLIVARIN®) y de la nadroparina (FRAXIPARIN®), que da como

resultado la formación de residuos no naturales de anhidromanosa en el terminal reductor de los oligosacáridos producidos. Esta puede convertirse posteriormente en anhidromanitol mediante el uso de un agente reductor adecuado. Tanto la beta-eliminación química como la enzimática dan como resultado la formación de un residuo de uronato no natural insaturado (UA) en el terminal no reductor.

En la Tabla 1 se presenta un sumario de las actividades anticoagulantes de varias HBPM.

Tabla 1: datos del peso molecular (PM) y de las actividades anticoagulantes de los productos de HBPM disponibles actualmente.

HBPM	Peso molecular medio	Proporción de actividad anti-Xa/anti-IIa
BEMIPARINA	3.600	9,7
CERTOPARINA	5.400	2,4
DALTEPARINA	6.000	2,5
ENOXAPARINA	4.500	3,9
NADROPARINA	4.300	3,3
PAARNPARINA	5.000	2,3
REVIPARINA	4.400	4,2
TINZAPARINA	6.500	1,6
Adaptado de Gray E. et al., Thromb Haemost, 99: 807-818 (2008).		

Clínicamente, la HBPM (peso molecular medio de aproximadamente 4,5 kDa) difiere de la heparina (es decir, "heparina no fraccionada"; con un peso molecular medio de aproximadamente 15 kDa) de varias formas: (a) la HBPM requiere una administración subcutánea menos frecuente para la profilaxis postoperatoria de un tromboembolismo venoso; (2) la HBPM requiere una inyección subcutánea una o dos veces al día en los pacientes tratados por un tromboembolismo venoso y angina inestable en lugar de la infusión intravenosa requerida con la heparina; (3) la HBPM no requiere un control del parámetro de la coagulación aPTT; (4) la HBPM presenta un menor riesgo de hemorragia; (5) el uso largo plazo de la HBPM presenta un menor riesgo de osteoporosis; y (6) la HBPM presenta un menor riesgo de trombocitopenia inducida por heparina (un potencial efecto secundario de la administración de heparina). Sin embargo, los efectos anticoagulantes de la heparina son normalmente reversibles con sulfato de protamina, mientras que el efecto de la protamina sobre la HBPM es limitado. Además, la HBPM tiene menos efecto sobre la actividad de la trombina (Factor IIa) en comparación con la heparina, mientras que tanto la HBPM como la heparina tienen un efecto similar sobre la actividad del Factor Xa.

Trombina y otros inhibidores del factor IIa o Xa: algunos ejemplos de inhibidores de la trombina (Factor IIa) y del factor Xa incluyen anticoagulantes tales como dabigatrán (PRADAXA®), rivaroxabán (XARELTO®), apixabán (ELIQUIS®), edoxabán (LIXIANA®), fondaparinux (ARIXTRA®) y argatrobán (ARGATROBÁN®).

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

El rivaroxabán, un inhibidor del factor Xa, es el principio activo de XARELTO® y tiene el nombre químico 5-cloro-N-({(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinil)fenil]-1,3-oxazolidin-5-il}metil)-2-tiofencarboxamida. El rivaroxabán es un enantiómero (S) puro. XARELTO® es un inhibidor del factor Xa biodisponible por vía oral que bloquea selectivamente el sitio activo del factor Xa y que no requiere un cofactor (tal como la antitrombina III) para su actividad.

El apixabán o ELIQUIS® es 1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-4,5-dihidropirazolo[5,4-c]piridin-3-carboxamida. Es un inhibidor en directo del factor Xa administrado por vía oral aprobado en Europa y que actualmente está experimentando ensayos en fase III en los Estados Unidos para la prevención del tromboembolismo venoso.

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

ARIXTRA® es fondaparinux sódico. Es un inhibidor sintético y específico del Factor X activado (Xa). El fondaparinux sódico es metil O-2-desoxi-6-O-sulfo-2-(sulespumaino)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-O-β-D-glucopiranuronosil-(1→4)-O-2-desoxi-3,6-di-O-sulfo-2-(sulespumaino)-a-D-glucopiranosil-(1→4)-O-2-O-sulfo-a-L-idopiranuronosil-(1→4)-2-

desoxi-6-O-sulfo-2-(sulespumaino)-α-D-glucopiranósido, sal decasódica. La fórmula molecular del fondaparinux sódico es $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ y su peso molecular es de 1.728. A continuación se proporciona la fórmula estructural:

La actividad antitrombótica del fondaparinux sódico es el resultado de la inhibición selectiva mediada por la antitrombina III (ATIII) del Factor Xa. Al unirse selectivamente a la ATIII, el fondaparinux sódico potencia (aproximadamente 300 veces) la neutralización innata del Factor Xa por parte de la ATIII. La neutralización del Factor Xa interrumpe la cascada de la coagulación sanguínea, y por lo tanto inhibe la formación de trombina y el desarrollo de un trombo. El fondaparinux sódico no inactiva la trombina (Factor II activado) y no tiene ningún efecto conocido sobre la función de las plaquetas. A la dosis recomendada, el fondaparinux sódico no afecta a la actividad fibrinolítica ni al tiempo de hemorragia. La farmacodinamia/farmacocinética del fondaparinux sódico deriva de las concentraciones plasmáticas del fondaparinux cuantificadas a través de la actividad anti-factor Xa. El fondaparinux sólo puede usarse para calibrar el ensayo anti-Xa (los patrones internacionales de heparina o de HBPM no son apropiados para este uso). Como resultado, la actividad del fondaparinux sódico se expresa como miligramos (mg) del calibrador de fondaparinux. La actividad anti-Xa del fármaco aumenta con una concentración creciente del fármaco, alcanzando los valores máximos en aproximadamente tres horas. El fondaparinux sódico, administrado mediante una inyección subcutánea, es absorbido rápidamente y completamente (la biodisponibilidad absoluta es del 100 %). En los pacientes en tratamiento con fondaparinux sódico, con una inyección de 2,5 mg, una vez al día, la concentración plasmática pico en estado estacionario es, de media, de entre 0,39 y 0,50 mg/l, y se alcanza aproximadamente 3 horas después de la dosis. En estos pacientes, la concentración plasmática mínima en el estado estacionario es de entre 0,14 y 0,19 mg/l. En los pacientes con una trombosis venosa profunda sintomática y con una embolia pulmonar en tratamiento con fondaparinux sódico, una inyección de 5 mg (peso corporal < 50 kg), de 7,5 mg (peso corporal de entre 50 y 100 kg) y de 10 mg (peso corporal > 100 kg) una vez al día, las dosis ajustadas según el peso corporal, proporciona unos picos en el estado estacionario medios y unas concentraciones plasmáticas mínimas similares en todas las categorías de pesos corporales. La concentración plasmática pico media en el estado estacionario está en el intervalo de entre 1,20 y 1,26 mg/l. En estos pacientes, la concentración plasmática mínima media en el estado estacionario está en el intervalo de entre 0,46 y 0,62 mg/l.

ARGATROBÁN® es un inhibidor sintético directo de la trombina (Factor IIa), derivado de la L-arginina. El nombre químico del ARGATROBÁN® es el ácido 1-[5-[(aminoiminometil)amino]-1-oxo-2-[[(1,2,3,4-tetrahidro-3-metil-8-quinolinil)sulfonil]amino]pentil]-4-metil-2-piperidincarboxílico monohidratado. La fórmula molecular del ARGATROBÁN® es $C_{23}H_{36}N_6O_5S \cdot H_2O$. Su peso molecular es de 526,66. ARGATROBÁN® es un inhibidor directo de la trombina que se une reversiblemente al sitio activo de la trombina. ARGATROBÁN® no requiere el cofactor antitrombina III para su actividad antitrombótica. ARGATROBÁN® es administrado mediante inyección y ejerce sus efectos anticoagulantes mediante la inhibición de las reacciones catalizadas o inducidas por la trombina, incluyendo la formación de la fibrina; la activación de los factores de la coagulación V, VIII y XIII; la activación de la proteína C; y la agregación de las plaquetas.

Un efecto anticoagulante es cualquier efecto de un inhibidor de la coagulación (por ejemplo, heparina, HBPM, inhibidor del Factor Xa, inhibidor del Factor IIa) que es el resultado de su bloqueo de la propagación de las cascadas de la coagulación. Algunos ejemplos no limitantes de efectos anticoagulantes incluyen la regulación por aumento de la actividad de la antitrombina, la disminución de la actividad del Factor Xa, la disminución de la actividad del Factor IIa, un aumento en la pérdida de sangre y cualquier otra condición en la que la actividad o las concentraciones de los factores de coagulación estén alteradas de tal forma que se inhiba la formación de un coágulo sanguíneo.

La actividad de un inhibidor de la coagulación (es decir, sus efectos anticoagulantes) puede medirse mediante diversos métodos que incluyen, pero no se limitan a, un ensayo de la actividad cromogénica anti-factor Xa, un ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada, del tiempo de protrombina, un ensayo de hemorragia (por ejemplo, un ensayo de hemorragia de la cola de rata), una tromboelastografía, un ensayo de generación de trombina, un ensayo del veneno de la víbora de Rusel, un tiempo de coagulación de ecarina, un tiempo de coagulación de caolín, una Proporción Normalizada Internacional (INR), un ensayo del fibrinógeno (Clauss), un tiempo de trombina (TCT), un tiempo de mezcla y un tiempo de lisis de euglobulina. Estos métodos ayudan en la determinación de varios parámetros de la anticoagulación y son conocidos por los expertos en la materia. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la anticoagulación puede ser controlada mediante uno o una combinación de los ensayos indicados anteriormente.

El ensayo anti-factor Xa mide directamente la actividad anti-factor Xa. La metodología subyacente en un ensayo anti-factor Xa es la adición del plasma del paciente a una cantidad conocida de un exceso de factor Xa y un exceso de antitrombina. Si hay presente un inhibidor del factor Xa en el plasma del paciente, reducirá la actividad enzimática del factor Xa. La cantidad del factor Xa residual es inversamente proporcional a la cantidad de agente anti-Xa en el

plasma. La cantidad de factor Xa residual es detectada mediante la adición de un sustrato cromógeno que simula el sustrato natural del factor Xa, haciendo que el factor Xa residual lo escinda, liberando un compuesto coloreado que puede ser detectado por un espectrofotómetro. Las deficiencias en antitrombina en el paciente no afectan al ensayo, debido a las cantidades un exceso de antitrombina que se proporcionan en la reacción. Los resultados se proporcionan en concentración de anticoagulante en unidades/ml de anti-factor Xa, de forma que unos valores elevados indican unos altos niveles de anticoagulación, y unos valores bajos indican unos bajos niveles de anticoagulación.

El ensayo del tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) es un ensayo que mide cuánto tarda en formarse un coágulo sanguíneo. Se recogen muestras de sangre para una medición directa o en tubos con oxalato y citrato para detener la coagulación con calcio antes de que se lleve a cabo el ensayo. En el ensayo se mezclan un fosfolípido, un activador (sílice, celita, caolín, ácido elágico, etc.) y calcio en el plasma para inducir la coagulación. El ensayo mide el tiempo hasta que se forma un trombo (coágulo).

El ensayo de hemorragia de la cola de rata o el ensayo de transección de la cola de rata es un ensayo que mide la pérdida de sangre, por ejemplo, la pérdida de sangre después de la administración de un fármaco. En una forma de realización, cuando se está ensayando el efecto del compuesto de la invención (por ejemplo, la DAP), en el T máx del anticoagulante se administra la DAP por vía intravenosa. Después de 20 minutos se transectan las colas de las ratas aproximadamente a 1 mm de la punta, se colocan en suero salino a la temperatura ambiente y se recoge la sangre durante 30 minutos y se pesa.

Los ensayos usados para la medición de la actividad de los inhibidores de la coagulación pueden usarse en el laboratorio o en la práctica clínica para medir la reversión del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, por ejemplo, la reversión del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación debida a la administración de una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención. Por lo tanto, en una forma de realización, los ensayos se utilizan para la medición del la reversión completa o parcial del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación (tal como heparina, HBPM, inhibidor del Factor IIa e inhibidor del Factor Xa).

Una reversión completa del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación se produce tras la neutralización de la actividad anticoagulante. En una forma de realización, una reversión completa del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, medida mediante el ensayo de actividad anti-Xa, se produce cuando la concentración del anticoagulante se lleva por debajo de la concentración eficaz mínima (CEM) para la anticoagulación. La CEM, según se usa en el presente documento, es la menor cantidad de fármaco (por ejemplo, de un inhibidor de la coagulación) requerida para un efecto terapéutico. En otra forma de realización, una reversión completa del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, medida mediante el ensayo del aPTT, se produce cuando el aPTT vuelve hasta aproximadamente el 10 % del basal. Un basal, según se usa en el presente documento, se refiere al aPTT en ausencia de inhibidores de la coagulación.

En muchos casos todavía puede desearse una anticoagulación, pero en menor grado. Por lo tanto, estará indicada una reversión parcial del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación. Una reversión parcial del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, medida mediante el ensayo de actividad anti-Xa, se produce cuando la concentración de anticoagulante se lleva por debajo de la concentración de anticoagulante en ausencia de un agente de reversión de la anticoagulación (por ejemplo, un compuesto de la invención), pero permanece por encima de la CEM para la anticoagulación. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la reversión parcial de un efecto anticoagulante de los inhibidores de la coagulación se produce cuando la concentración del anticoagulante es menor de aproximadamente cuatro veces la CEM, preferiblemente de aproximadamente dos veces la CEM, más preferiblemente menor de aproximadamente dos veces la CEM (por ejemplo, aproximadamente a la CEM). La reversión parcial del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación, medida mediante un ensayo del aPTT, se produce cuando el aPPT se reduce por debajo de la medición en ausencia de un agente de reversión de la anticoagulación (por ejemplo, un compuesto de la invención) pero por encima del basal. Por lo tanto, en otras formas de realización, la reversión parcial de un efecto anticoagulante de los inhibidores de la coagulación se produce cuando la medición del aPTT se reduce por debajo de aproximadamente cuatro veces el basal, preferiblemente aproximadamente dos veces el basal, más preferiblemente menor de aproximadamente dos veces el basal. Generalmente, la magnitud y la duración de la reversión de la anticoagulación son determinadas por el médico o el veterinario.

Según se usa en el presente documento, un "sujeto en necesidad del mismo" es un sujeto en necesidad de una reversión de la anticoagulación aguda o planificada, por ejemplo, un sujeto que padece una sobredosis de un anticoagulante, un sujeto que padece una hemorragia (por ejemplo, una hemorragia inducida por un traumatismo o una hemorragia espontánea en el tracto GI o en cualquier otra parte), un sujeto que requiere una intervención quirúrgica planificada, un sujeto que experimenta un procedimiento invasivo o no invasivo que requiere una biopsia, un sujeto que experimenta un procedimiento en el que un error en el procedimiento puede presentar riesgo de hemorragia si el sujeto permanece anticoagulado, un sujeto que requiere anestesia espinal o epidural. Un "sujeto en necesidad del mismo" puede ser un paciente en el que la presencia de un inhibidor directo de un factor (Factor Xa, Factor IIa y/o antitrombina) está produciendo o es probable que produzca unos efectos de hemorragia. Por lo tanto,

el "sujeto en necesidad del mismo" puede ser un sujeto que recibe una terapia de anticoagulación (por ejemplo, un sujeto que recibe heparina, HBPM, inhibidor del Factor IIa o inhibidor del Factor Xa) para, por ejemplo, la prevención de una apoplejía, una cirugía cardiaca y procedimientos diagnósticos, arritmias cardíacas, la prevención de una trombosis venosa profunda (TVP), una embolia pulmonar, la prevención en general de la formación de coágulos sanguíneos patológicos.

Un "sujeto en necesidad del mismo", según se usa en el presente documento, es un animal. Un "sujeto en necesidad del mismo" incluye, sin limitación, un ser humano, un ratón, una rata, un cobaya, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, un mono, un chimpancé, un babuino o un mono rhesus. En una forma de realización, un "sujeto en necesidad del mismo es un mamífero. En otra forma de realización, un "sujeto en necesidad del mismo" es un ser humano.

Según se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente de reversión de la anticoagulación (por ejemplo, un compuesto de la invención descrito en el presente documento), que es eficaz, tras la administración de una dosis única o de múltiples dosis (por ejemplo, dosis en bolo y/o de mantenimiento) a un sujeto, para neutralizar o inhibir (revertir completa o parcialmente) un efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación o para promover la coagulación.

En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz es una dosis de un agente de reversión de la anticoagulación que está entre 0,01 y 10.000 veces la dosis del anticoagulante en peso. En otro aspecto, el agente de reversión de la anticoagulación es administrado a una proporción entre dosis y masa de entre aproximadamente 1:1 y 1.000:1 entre el agente de reversión de la anticoagulación y el anticoagulante, por ejemplo, de 100:1 entre el agente de reversión de la anticoagulación y el anticoagulante, tal como de 10:1 entre el agente de reversión de la anticoagulación y el anticoagulante. En una forma de realización del presente método, una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de reversión de la anticoagulación puede ser administrada mediante una vía de administración subcutánea, intramuscular o intravenosa. Por ejemplo, puede ser administrada por vía intravenosa en forma de una solución estéril. En otra forma de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de reversión de la anticoagulación es administrada por vía oral, nasal o pulmonar, o en una región mucosa (boca, recto o vagina).

La cantidad terapéuticamente eficaz del agente de reversión de la anticoagulación (es decir, del compuesto de la invención) variará normalmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día; en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 600 mg/kg de peso corporal por día; en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal por día; en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal por día; en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal por día; en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día; en una forma de realización, desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal por día; en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día; en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día; y en otra forma de realización, desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por día. Pueden usarse los ensayos de coagulación habituales (como los descritos en el presente documento) y otros ensayos *in vitro* para la determinación de la cantidad terapéuticamente eficaz.

En algunos aspectos de la invención, el compuesto de la invención puede ser administrado conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. En una forma de realización, el al menos un agente terapéutico adicional puede ser la vitamina K, que normalmente se usa para corregir las deficiencias en la coagulación inducidas por los compuestos de warfarina.

La presente invención también proporciona un ensayo diagnóstico para la determinación de la concentración de un anticoagulante en la sangre. Según se muestra en el siguiente Ejemplo 13, la DAP muestra una tendencia sensible a la dosis en la reversión del rivaroxabán *ex vivo* en plasma humano mediante el uso de un ensayo cromogénico de 510k anti-factor Xa aclarado. Por lo tanto, el compuesto de la invención, por ejemplo, la DAP, puede usarse en un ensayo diagnóstico para la determinación de la concentración de un anticoagulante, por ejemplo, de un inhibidor del Factor Xa, en la sangre. En dicho ensayo, el compuesto de la invención, por ejemplo, la DAP, puede usarse junto con los reactivos disponibles actualmente o en forma de un sustrato de unión directa que sustituye a los factores sintéticos presentes en los kits disponibles actualmente. En una forma de realización, el ensayo diagnóstico puede comprender el compuesto de la invención (por ejemplo, la DAP) como un sustrato de unión, en el que el compuesto de la invención se une a un anticoagulante en una muestra de sangre, y se cuantifica la actividad residual del factor de coagulación (por ejemplo, del Factor Xa) para determinar la concentración del anticoagulante en la muestra. En otra forma de realización, el ensayo diagnóstico puede comprender el compuesto de la invención (por ejemplo, la DAP) conjugado con micropartículas magnéticas, en el que el compuesto de la invención puede unirse a un anticoagulante en una muestra de sangre con objeto de eliminar el anticoagulante de la muestra o de concentrarlo.

El ensayo cromogénico basado en la DAP o centro de atención de la invención puede ayudar en la determinación de los niveles de un anticoagulante en los sujetos, que actualmente es una necesidad clínica significativa no satisfecha, dado que los actuales diagnósticos no pueden determinar las concentraciones sanguíneas de los inhibidores directos con una precisión elevada.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un ensayo, por ejemplo, un ensayo cromogénico, para la determinación de la concentración del compuesto de la invención, por ejemplo, la DAP, requerida para la reversión del anticoagulante presente en la sangre. En una forma de realización, el ensayo usa la DAP como agente de unión directa para varios anticoagulantes.

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

La presente invención también proporciona un kit diagnóstico que incorpora un ensayo diagnóstico descrito anteriormente en el presente documento. Por lo tanto, en una forma de realización, el kit se usa para la determinación de la concentración del anticoagulante en la sangre. El kit puede contener otros componentes, envase, instrucciones, reactivos y/u otro material para ayudar en la determinación del anticoagulante (por ejemplo, de un inhibidor del Factor Xa) o de la concentración de la DAP y para ayudar en el uso del kit. Adicionalmente, el kit puede usarse para determinar si existe una combinación de warfarina y otro anticoagulante, ya que la warfarina no se verá afectada por el compuesto de la invención, mientras que otros anticoagulantes serán revertidos.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, un compuesto de la invención (por ejemplo, la DAP) es capaz de unirse a la heparina, inactivándola *in vivo.* Por lo tanto, además de sus efectos sobre la coagulación, un compuesto de la invención también puede usarse para privar a los tejidos de las actividades bioquímicas de la heparina. Por ejemplo, otras moléculas de unión a la heparina han mostrado la capacidad de reducir el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y otros factores de crecimiento de unión a la heparina. Se ha demostrado que la privación de VEGF y de FGF es útil en las terapias oncológicas, haciendo que los compuestos de la invención sean posibles candidatos para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento, la prevención o la mejora de un cáncer en un sujeto, que comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como se muestra en los ejemplos, un compuesto de la invención, la DAP, se une a XARELTO®, a ELIQUIS®, a ARIXTRA® y a la HBPM *in vitro* medido mediante una dispersión dinámica de la luz (DLS). La DAP revertió *in vivo* ARIXTRA® y la HBPM administrados por vía subcutánea*.* La DAP revertió *in vivo* XARELTO®, ELIQUIS®, PRADAXA®, LIXIANA®, la heparina no fraccionada y la bemiparina*.* La DAP, administrada por vía intravenosa a unas dosis de 100 mg/kg, de 250 mg/kg y de 400 mg/kg en ratas, no mostró ningún efecto adverso. La DAP era biodisponible por vía oral en ratas. La DAP no mostró ninguna unión al ERG humano, no inhibía ni servía como sustrato de las enzimas del CYP, y no se unió apreciablemente a ninguna proteína plasmática (datos no mostrados). Además, parece que la DAP tiene una semivida de eliminación corta, debido a que la anticoagulación inducida por PRADAXA® se recuperó en 20-30 minutos después de una dosis en bolo intravenosa de DAP en ratas. Además, la DAP era estable frente a la esterilización (sobrevivió a un calentamiento hasta 200 ºC) y al almacenamiento en forma de un polvo liofilizado a 4 ºC durante más de un año. En la Tabla 2 se presenta un sumario de la reversión anticoagulante por parte de la DAP.

Tabla 2: reversión anticoagulante

Nombre comercial	Nombre genérico	Compañía	Factor sanguíneo inhibido	Vía de administración	Se une a la DAP	Agentes de reversión
Lovenox® Hibor®	Enoxaparina Bemiparina	Sanofi, Sandoz/ Momenta, Rovi	~ 80-90 % del Xa, ~ 10-20 % del IIa	Inyección s.c.	X	Protamina * & DAP
Arixtra®	Fondaparinux	GSK	Xa	Inyección s.c.	X	DAP
Eliquis®	Apixabán	Pfizer, BMS	Xa	Oral	X	DAP
Xarelto®	Rivaroxabán	Bayer, Janssen, J&J	Xa	Oral	X	DAP
Argatroban®	Argatrobán	GSK	IIa	Inyección s.c.	--	Ninguno
Pradaxa®	Etexilato de dabigatrán	Boehringer Ingelheim	IIa	Oral	X	DAP
* La protamina revierte parcialmente las heparinas de bajo peso molecular.						

Tabla 3: correlación *in vitro-in vivo*

Nombre genérico del fármaco	Proporción molar de unión mediante DLS [DAP/fármaco]	Proporción molar de reversión [DAP/fármaco]	Medición *in vivo*	Factor(es) sanguíneo(s) inhibido(s)	Vía de administración
Rivaroxabán	9	3*	Ensayo de hemorragia	Xa	Oral
Apixabán	10	8*	Ensayo de hemorragia	Xa	Oral
Fondaparinux	3	130	kit de Xa	Xa	Inyección s.c.
Bemiparina	7	140	aPTT	~ 80-90 % de Xa, ~ 10-20 % de IIa	Inyección s.c.
Argatrobán	N/A	N/A	aPTT	IIa	Inyección s.c.
Asume unas biodisponibilidades orales del 60 % para el rivaroxabán, del 50 % para el apixabán y del 5 % para el dabigatrán; asume una biodisponibilidad del 100 % para los anticoagulantes inyectables.					

En la Tabla 3 se presenta un sumario de la correlación *in vitro-in vivo* del tratamiento con DAP. La proporción molar de unión mediante DLS se calcula dividiendo la menor proporción en masa entre la DAP y el anticoagulante que muestra una unión significativa, definida como una asociación en suero salino tamponado por encima de 50 nm de diámetro aparente, mediante la proporción entre los pesos moleculares de la DAP y el anticoagulante. Los pesos moleculares usado en los cálculos fueron de 512 Da (DAP), de 436 Da (rivaroxabán), de 460 Da (apixabán), de 1,7 kDa (fondaparinux), de 3,6 kDa (bemiparina), de 628 Da (dabigatrán) y de 509 Da (ARGATROBÁN®). La proporción molar de la reversión se calculó de forma similar mediante el uso de la dosis de reversión mínima *in vivo* de la DAP necesaria para conseguir una reversión medida mediante el ensayo de hemorragia por transección de la cola de rata, un kit cromogénico anti-Xa, o mediante el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT). Para el ensayo de hemorragia, se consideró que el anticoagulante revertía si la pérdida de sangre durante un periodo de 30 minutos después de la transección de la cola, con la cola transectada sumergida en suero salino a la temperatura ambiente, estaba en un 25 % del control (sin haber administrado anticoagulante). Medida mediante el kit de Xa, se conseguía una reversión cuando la concentración eficaz del anticoagulante se llevaba por debajo de la concentración eficaz mínima (CEM) para la anticoagulación. Medida mediante el aPTT, la reversión se consideró conseguida cuando un aPTT de rata anticoagulada volvía al 10 % del basal. En el caso del fondaparinux, aunque 200 mg/kg de DAP era la dosis más baja administrada *in vivo,* los datos *in vitro* indican que son posibles unas dosis de reversión significativamente inferiores.

Ejemplos

La invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes Ejemplos no limitantes. Estos Ejemplos se establecen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no pretenden y no deberían ser interpretados como, limitantes de su ámbito en modo alguno. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de los métodos convencionales que son bien conocidos por los expertos habituales en la materia.

Ejemplo 1: ensayo de estabilidad *in vitro* de la diarginina piperazina ("DAP")

Materiales y métodos

Se preparó una sal de acetato de la DAP según se describe en el presente documento. Según se describe en estos ejemplos, la DAP sólida o en polvo se refiere a la sal de acetato, mientras que la DAP en solución se refiere a la base libre cuando la sal se ioniza en una solución acuosa. Según se describe en estos ejemplos, el compuesto de DAP usado era el compuesto de Fórmula VII.

El polvo de DAP se ensayó para comprobar su estabilidad térmica de dos formas. La DAP se almacenó a 4 ºC durante 7 meses antes de su uso. Adicionalmente, se ensayó la DAP sólida mediante una calorimetría diferencial de barrido (DSC) calentando desde -20 ºC hasta 200 ºC, de nuevo hasta -20 ºC y de nuevo hasta 200 ºC.

Resultados

El polvo de DAP era estable a 4 ºC durante más de 12 meses. Los resultados de la DSC se muestran en la **Figura 1**. El segundo calentamiento ("2") mostró un comportamiento térmico similar al del primer calentamiento ("1"), lo que indica que la DAP sobrevivió a un calentamiento repetido hasta 200 ºC. Este hallazgo indica que la DAP es capaz de sobrevivir a un calentamiento a unas temperaturas por encima de las necesarias para su esterilización.

Ejemplo 2: unión de la DAP a la heparina y a la HBPM

Materiales y métodos

Se usó una dispersión dinámica de la luz (DLS) para evaluar la asociación de 1 mg/ml de heparina no fraccionada y 1 mg/ml de bemiparina (HBPM; HIBOR®), sola o junto con 100 mg/ml de DAP en agua (proporciones en masa de 100:1 entre la DAP y la heparina o la HBPM).

Resultados

La DAP se asocia físicamente en agua tanto con la heparina no fraccionada (**Figura 2**) como con la HBPM (no mostrado) para formar asociaciones físicas que aumentan el diámetro aparente. Cuando se mezclaron soluciones de DAP con soluciones de HBPM o de heparina no fraccionada, se formaron partículas debido a sus interacciones físicas, lo que apoya la teoría de que la DAP podría revertir la anticoagulación de la heparina y de la HBPM mediante una asociación física con estas moléculas.

Ejemplo 3: unión de la DAP a los anticoagulantes medida mediante DLS

Materiales y métodos

Se añadieron rivaroxabán (XARELTO®) solo, DAP sola y combinaciones de DAP:rivaroxabán en unas proporciones en masa de 1:1 y de 10:1 a una solución acuosa, y se analizaron mediante una dispersión dinámica de la luz (DLS) para evaluar la asociación entre la DAP y el rivaroxabán. Se llevó a cabo un experimento similar con apixabán (ELIQUIS®) solo, DAP sola y combinaciones de DAP:apixaban en unas proporciones en masa de 1:1, de 10:1 y de 100:1. De forma similar se ensayaron el fondaparinux (ARIXTRA®) solo, la DAP sola y combinaciones de fondaparinux:DAP en unas proporciones en masa de 1:1, de 10:1 y de 100:1. También se ensayaron la HBPM (bemiparina; HIBOR®), sola, la DAP sola, y combinaciones de HBPM:DAP en unas proporciones en masa de 1:1, de 10:1 y de 100:1. La concentración de HBPM ensayada era de 0,1 mg/ml. Por lo tanto, a 1:1, se ensayaron 0,1 mg/ml de DAP, a 10:1, se ensayó 1 mg/ml y a 100:1, se ensayaron 10 mg/ml de DAP.

Adicionalmente, se ensayaron el dabigatrán solo, la DAP sola y combinaciones de dabigatrán:DAP en unas proporciones en masa de 1:1, de 10:1, de 100:1, de 1.000:1 y de 10.000:1 de DAP. Finalmente, se ensayaron el ARGATROBÁN® solo, la DAP sola, o combinaciones de argatrobán:DAP en unas proporciones en masa de 1:1, de 10:1, de 100:1 y de 1.000:1.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 3 para el rivaroxabán; en la Figura 4 para el apixabán; en la Figura 5 para el fondaparinux (ARIXTRA®), en la Figura 6 para la HBPM; y en la Figura 7 para el argatrobán. Cada figura muestra los picos individuales que representan la DAP y el anticoagulante solo en solución acuosa. Cuando se mezcló el anticoagulante con la DAP a unas proporciones en masa lo suficientemente altas, se observó un cambio en el tamaño. En este ensayo, incluso un ligero aumento en el tamaño indica una interacción física entre los dos; sin embargo, únicamente se usan los cambios significativos en el diámetro aparente para la evaluación de la correlación *in vitro-in vivo*. El diámetro aparente es una medida del grado de interacción.

Ejemplo 4: reversión por parte de la DAP de la anticoagulación de la HBPM *in vivo*

Materiales y métodos

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

Resultados

Tras la administración de la HBPM, el aPTT aumentó desde 53 hasta 246 segundos en el transcurso de cuatro horas. La administración intravenosa de 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP) llevó el tiempo de aPTT por debajo del basal en 60 minutos (Figura 8).

Ejemplo 5: reversión por parte de la DAP de la anticoagulación del dabigatrán (PRADAXA®) *in vivo;* un estudio de sobredosis

Materiales y métodos

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

Aproximadamente a las 2 horas del tratamiento con PRADAXA®, se le administraron 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP) en forma de una inyección intravenosa en bolo. Aproximadamente 2 horas después, a la rata se le administró

una dosis de 100 mg/kg de DAP (50 mg de DAP). En otra hora, a la rata se le administró otra dosis de 100 mg/kg de DAP (50 mg de DAP). Se midió el aPTT durante el transcurso de la totalidad del tratamiento.

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 9 y 13. Dos horas después de la administración de PRADAXA®, el aPTT aumentó desde 43 hasta 81 segundos, demostrando una anticoagulación significativa. Se administraron 100 mg de DAP en forma de una inyección intravenosa en bolo, que redujeron el aPTT por debajo del basal en 25 minutos. Dos horas después, el aPTT había aumentado de nuevo hasta 79 segundos y a la rata se le administró una dosis de 50 mg de DAP. En 30 minutos, el aPTT se redujo por debajo del basal. Ambos tiempos, en los 60 minutos posteriores a la administración de la DAP, los niveles del aPTT habían vuelto por encima del basal. Después de la segunda dosis de DAP, el aPTT aumentó hasta 53 segundos. Se administró por vía intravenosa una tercera dosis de DAP, 100 mg/kg de DAP (50 mg de DAP), y el aPTT cayó hasta el basal en 20 minutos. La Figura 13 muestra un experimento similar en el que, después de una administración de 15,5 mg/kg de PRADAXA®, el aPTT volvió a la normalidad en aproximadamente 30 minutos después del inicio del tratamiento con 100 mg/kg de DAP.

Ejemplo 6: reversión por parte de la DAP de la anticoagulación de la heparina no fraccionada ("HNF") *in vivo*

Materiales y métodos

A una rata macho albina, con un peso de 515 g, se le administraron 10 mg/kg de heparina no fraccionada (5 mg de HNF) mediante una inyección subcutánea.

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

Resultados

Según se muestra en la Figura 10, el tiempo de aPTT aumentó significativamente desde 28 hasta 102 segundos en el transcurso de la hora posterior a la administración de la heparina. Se administraron por vía intravenosa 100 mg de DAP y llevó el tiempo de aPTT hasta 48 segundos en 20 minutos. En 1 hora, el aPTT aumentó hasta 120 segundos, después se administraron por vía intravenosa otros 100 mg de DAP. En 15 minutos, el aPTT se redujo hasta 47 segundos. En 1 hora, el aPTT aumentó hasta 96 segundos, después se administró por vía intravenosa una dosis de 200 mg de DAP. 10 minutos después, el aPTT cayó hasta 33 segundos.

Ejemplo 7: reversión por parte de la DAP de la anticoagulación del rivaroxabán (XARELTO®) *in vivo*

Materiales y métodos

Se administraron por vía oral a ratas 5 mg/kg de rivaroxabán (XARELTO®). Después de cuatro horas, se administraron por vía intravenosa 5 mg/kg de DAP (2 mg de DAP). Los aPTT se midieron en los minutos cero, 15, 30, 45, 60 y 240 antes de la administración de la DAP. Se midió de nuevo el aPTT aproximadamente a los 5, 10, 25, 35, 45, 60, 120 y 240 minutos después de la administración de la DAP.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 11. La DAP revertió de forma eficaz la anticoagulación del rivaroxabán (XARELTO®) *in vivo* en ratas.

Ejemplo 8: reversión por parte de la DAP de la anticoagulación del fondaparinux (ARIXTRA®) *in vivo*

Materiales y métodos

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

Resultados

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

Ejemplo 9: la DAP intravenosa no afecta al aPTT

Materiales y métodos

Se administraron por vía intravenosa 0, 2, 10, 25, 50 o 100 mg de DAP a ratas CD macho emparejadas por pesos y se midió el aPTT.

Resultados

Los resultados mostrados en la Figura 16 demuestran que la DAP administrada por vía intravenosa no afectó al aPTT de una forma dependiente de la dosis en ausencia de anticoagulantes. Las barras de error representan el error estándar de siete mediciones del aPTT promediadas a lo largo de 90 minutos.

Ejemplo 10: reversión por parte de la DAP de la anticoagulación en un modelo de transección de cola de rata

Materiales y métodos

Se administraron a tres ratas 2 mg de rivaroxabán. Una rata recibió una reversión ficticia que no contiene DAP, la segunda recibió 2,5 mg de DAP y la tercera recibió 12,5 mg de DAP. Una cuarta rata recibió unas dosis ficticias de anticoagulante y de reversión ("ficticia"). 20 minutos después de la dosis de reversión, se transectaron las colas a 1 mm de la punta, se colocaron en suero salino a la temperatura ambiente y se recogió la pérdida de sangre durante 30 minutos y después se pesó.

Se usaron los mismos procedimientos con 1,25 mg de apixabán (ELIQUIS®) solo o junto con 5 o 12,5 mg de DAP; con 15,5 mg de etexilato de dabigatrán (PRADAXA®) solo o junto con 5 o 12,5 mg de DAP; y con 5 mg de edoxabán (LIXIANA®) solo o junto con 12,5 mg de DAP.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 15 para el rivaroxabán, en la Figura 16 para el apixabán, en la Figura 17 para el edoxabán y en la Figura 18 para el etexilato de dabigatrán. El ensayo de hemorragia de la transección de la cola de rata es análogo a la situación clínica en la que se necesita una reversión anticoagulante aguda. Los resultados demuestran que la DAP y revirtió eficazmente la actividad anticoagulante, dando lugar a una reducción estadísticamente significativa en la pérdida de sangre en comparación con las ratas que únicamente reciben anticoagulante.

Ejemplo 11: reversión por parte de la DAP de la anticoagulación del rivaroxabán (XARELTO®) en sangre humana recién extraída *ex vivo.*

Materiales y métodos

Se extrajo sangre humana de un voluntario. Se añadió rivaroxabán a 0,25 µg/ml solo o junto con 50 µg/ml de DAP. Los controles contenían 50 µg/ml de DAP o solución salina. El aPTT se midió a los 2 minutos de recoger la sangre.

Resultados

La Figura 19 muestra que la administración de la DAP dio lugar a una reversión de la anticoagulación inducida por el rivaroxabán en sangre humana recién extraída, medida mediante el aPTT. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos independientes.

Ejemplo 12: reversión por parte de la DAP de la anticoagulación del rivaroxabán y del apixabán en plasma humano *ex vivo*

Materiales y métodos

Se añadieron 218 µg/l o 459 µg/l de rivaroxabán a plasma humano, con o sin 1.250 µg/l o 6.250 µg/l de DAP, respectivamente. De forma análoga, se añadieron 156 µg/l o 313 µg/l de apixabán a plasma humano, con o sin 1.156 µg/l o 3.125 µg/l de DAP, respectivamente. El efecto de la DAP sobre la anticoagulación se midió mediante el ensayo cromogénico de 510k anti-Factor Xa aclarado de Biophen. Las concentraciones de rivaroxabán se determinaron mediante una comparación con patrones de calibración de plasma, mientras que las concentraciones de apixabán se infirieron a partir de diluciones de la solución madre, ya que todavía no hay disponibles patrones de calibración.

Resultados

Para ambas concentraciones de rivaroxabán y de apixabán, la DAP devolvió la concentración anticoagulante eficaz hasta por debajo de la concentración eficaz mínima. La Figura 20 muestra los resultados para el rivaroxabán, y la Figura 21 muestra los resultados para el apixabán.

Ejemplo 13: reversión dependiente de la dosis por parte de la DAP de la anticoagulación del rivaroxabán en plasma humano *ex vivo*

Materiales y métodos

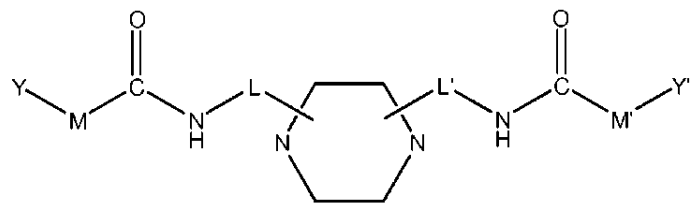
Se añadieron 218 µg/l de rivaroxabán a plasma humano solo o junto con 1,25, 12,5, 125 o 1.250 µg/l de DAP. La actividad del Factor Xa se midió mediante el kit de ensayo cromogénico de 510k anti-Factor Xa aclarado de Biophen. Las concentraciones de rivaroxabán se determinaron mediante una comparación con patrones de calibración de plasma.

Resultados

La Figura 22 muestra que la DAP era eficaz en la reversión dependiente de la dosis de la anticoagulación del rivaroxabán en plasma humano, según se demuestra por su efecto sobre la concentración del rivaroxabán (medido mediante el ensayo de actividad del Factor Xa).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula II:

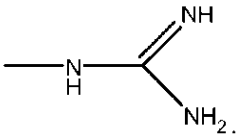


(II)

,

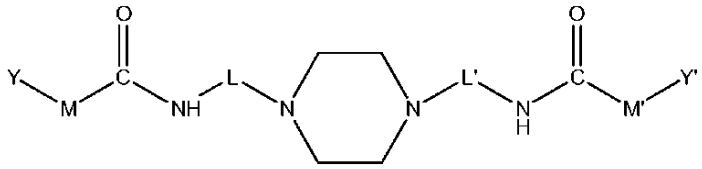
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

en el que L y L' son cada uno una cadena de alquileno de C_1 a C_{10} sustituida o no sustituida,
en el que M y M' son cada uno una cadena de alquileno de C_1 a C_{10} sustituida y en el que Y e Y' son cada uno



.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está representado por la fórmula III:

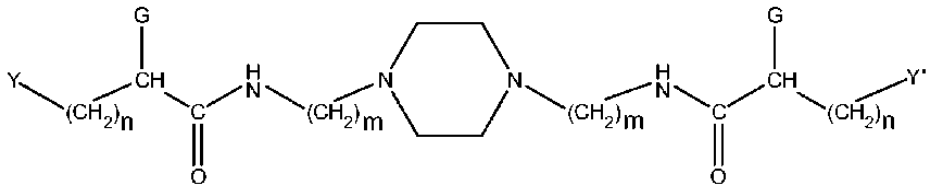


(III)

.

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que el compuesto está representado por la fórmula IV:



(IV)

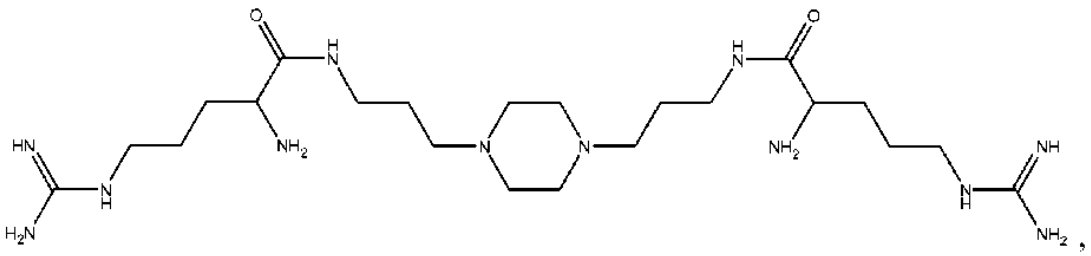
,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en el que n es de 3 a 5, m es de 3 a 6 y G se elige de entre $-NH_2$ y OH.

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que G es amino.

5. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está representado por la fórmula V

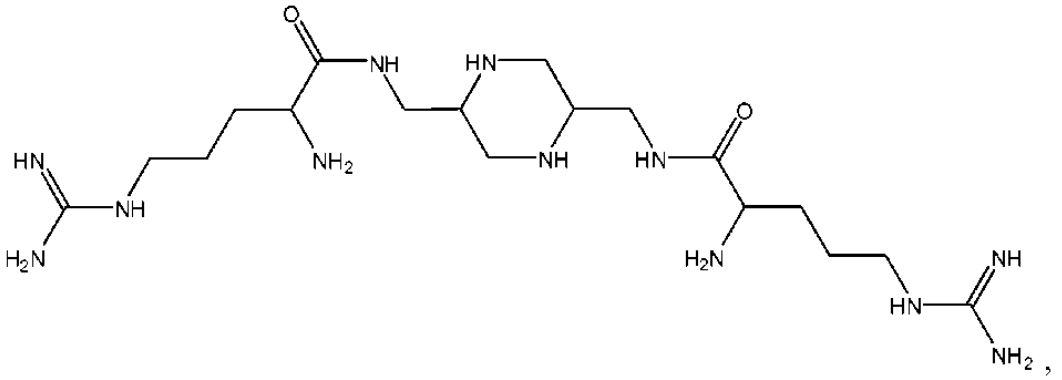
(V)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está representado por la fórmula VI

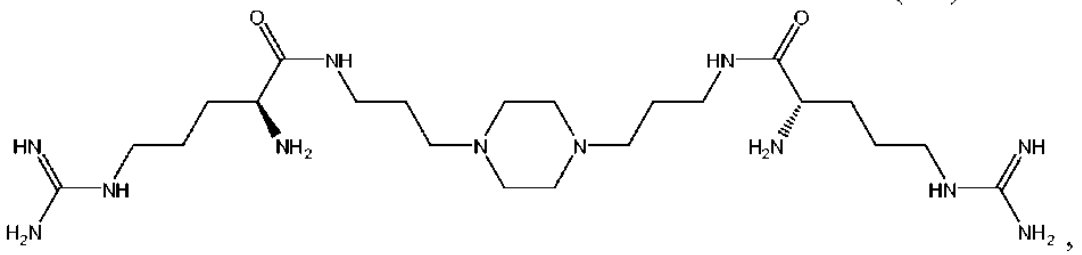
(VI)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está representado por la fórmula VII

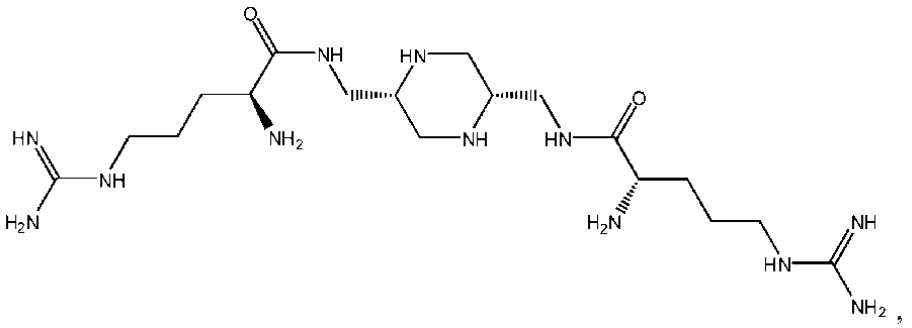
(VII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto está representado por la fórmula VIII

(VIII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

9. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un portador farmacéuticamente aceptable.

10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la composición está adaptada

(a) para una administración enteral;
(b) para una administración oral;
(c) para una administración parenteral; o
(d) para una administración intravenosa o subcutánea.

11. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para revertir completa o parcialmente el efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación en un sujeto en necesidad del mismo.

12. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el inhibidor de la coagulación se elige de entre el grupo que consiste en una heparina no fraccionada, una heparina de bajo peso molecular (HBPM), un inhibidor del Factor IIa y un inhibidor del Factor Xa.

13. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en el que el inhibidor de la coagulación es un inhibidor del factor Xa.

14. El compuesto para el uso de la reivindicación 13, en el que el inhibidor del factor Xa se elige de entre el grupo que consiste en rivaroxabán, apixabán, edoxabán y fondaparinux.

15. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el sujeto es un

(a) mamífero; o
(b) es un ser humano.

16. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que la reversión completa o parcial del efecto anticoagulante de un inhibidor de la coagulación se mide mediante el ensayo de actividad anti-factor Xa.

17. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el sujeto en necesidad del mismo es un sujeto en el que está indicada una reversión de la anticoagulación aguda o planificada.

18. El compuesto para el uso de la reivindicación 17, en el que

(a) el sujeto en el que está indicada una reversión de la anticoagulación aguda planificada es un sujeto que padece una sobredosis de un anticoagulante, un sujeto que padece una hemorragia, un sujeto que requiere una intervención quirúrgica planificada, un sujeto que está experimentando un procedimiento invasivo o no invasivo que requiere una biopsia, un sujeto que está experimentando un procedimiento en el que un error en el proceso puede dar como resultado una hemorragia si el sujeto permanece anticoagulado, o un sujeto que requiere anestesia espinal o epidural; o
(b) el sujeto en necesidad del mismo es un sujeto que está recibiendo anticoagulación para la prevención de una apoplejía, procedimientos cardiacos quirúrgicos y diagnósticos, arritmias cardíacas, prevención de la trombosis venosa profunda (TVP), embolia pulmonar, o de forma general para la prevención de coágulos sanguíneos patológicos.

19. El compuesto para el uso de la reivindicación 12, en el que el inhibidor de la coagulación es una HBPM y en el que la HBPM se elige de entre el grupo que consiste en bemiparina, certoparina, dalteparina, enoxaparina, nadroparina, parnaparina, reviparina y tinzaparina.

20. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una proporción entre dosis y masa de desde aproximadamente 0,01:1 hasta aproximadamente 1.000:1 entre el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el anticoagulante, preferiblemente en el que el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una proporción entre dosis y masa de aproximadamente 10:1 entre el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el anticoagulante.

21. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el método comprende la administración de al menos un agente terapéutico adicional; opcionalmente en el que el al menos un agente terapéutico adicional es la vitamina K.

22. Un kit diagnóstico que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

23. El kit de la reivindicación 22, en el que el kit se usa para la determinación de la concentración de un anticoagulante en la sangre.

Figura 1

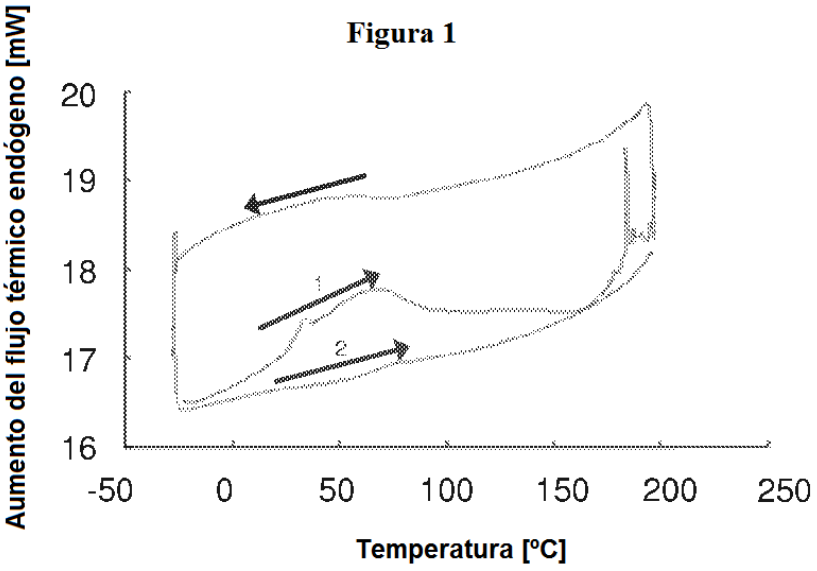


Figura 2

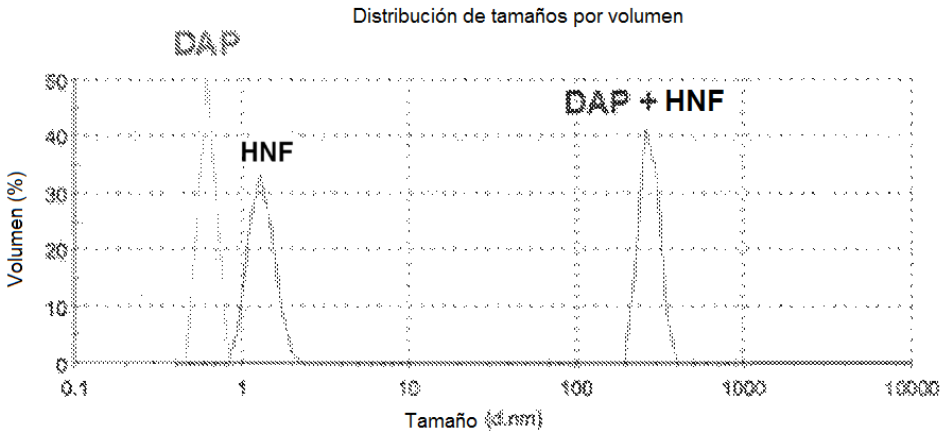


Figura 3

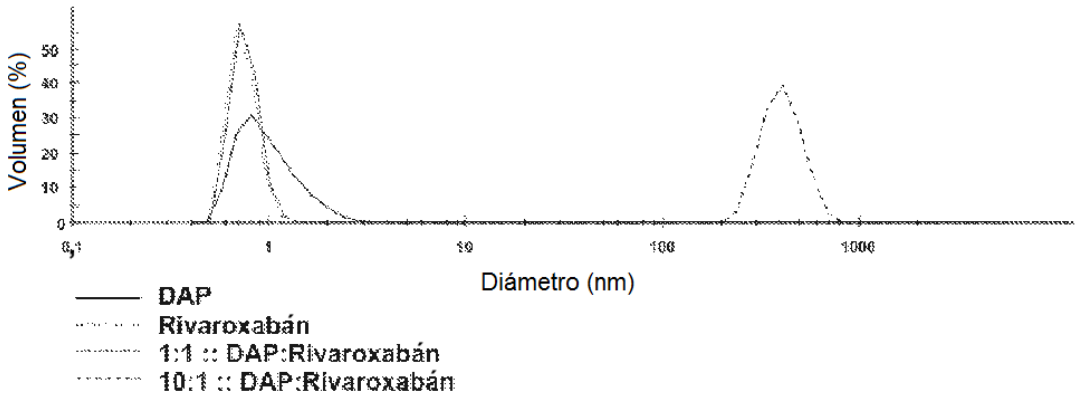


Figura 4

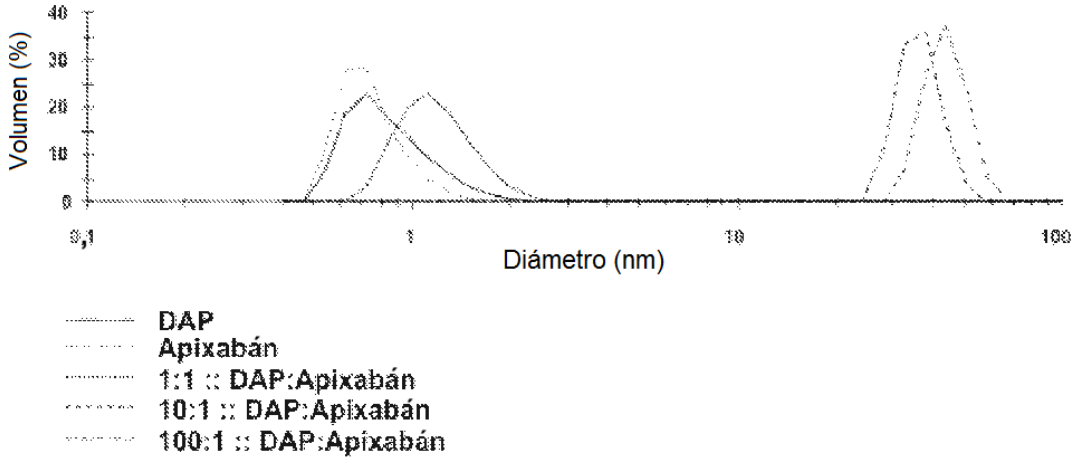


Figura 5

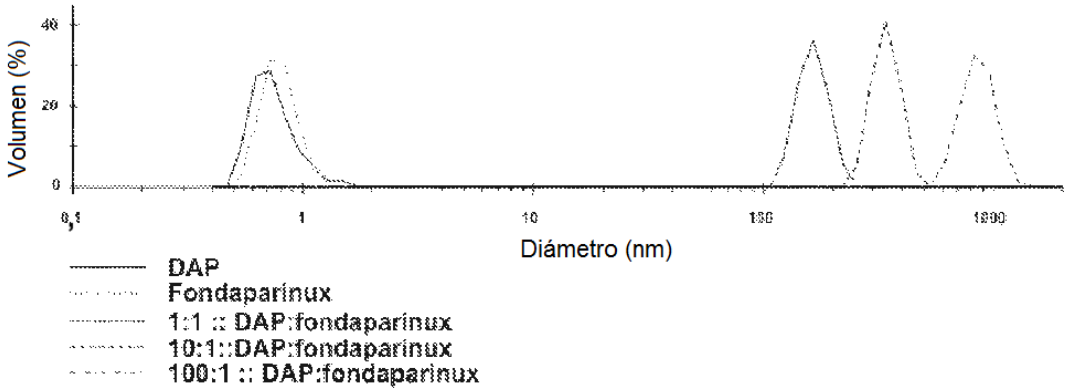


Figura 6

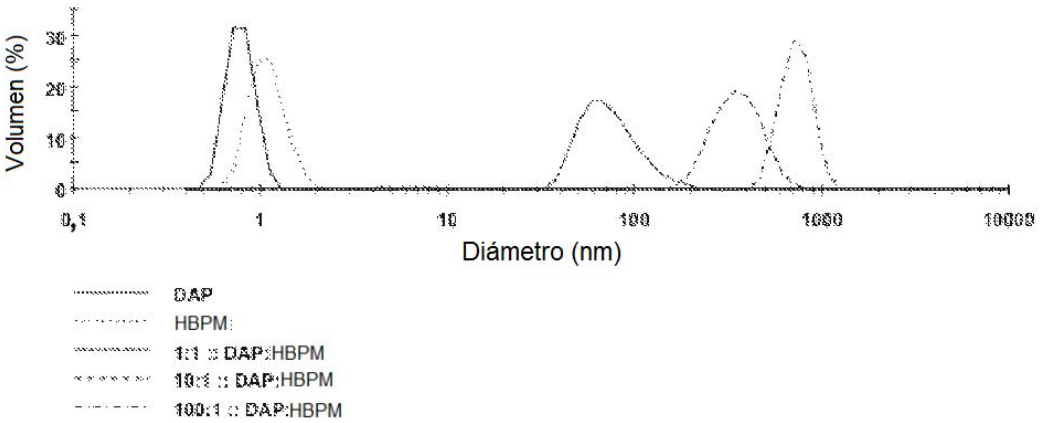


Figura 7

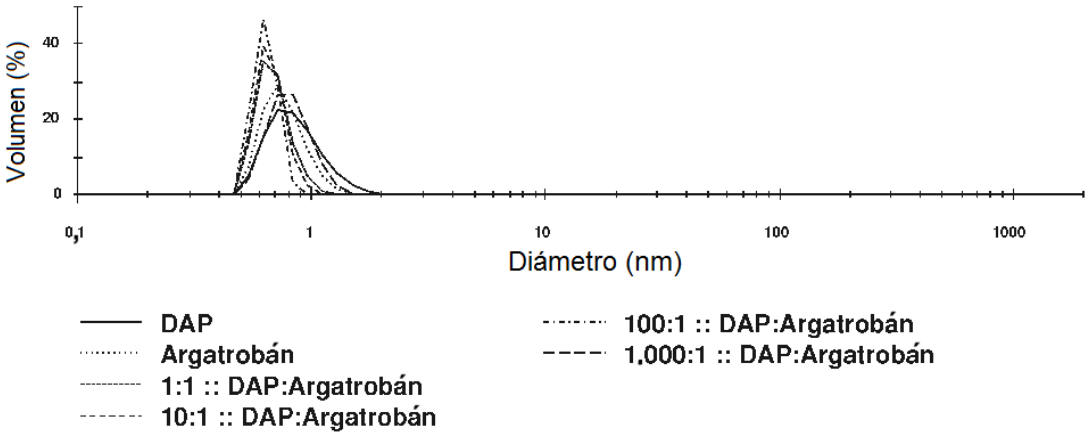

Volumen (%)
40
20
0
0,1
1
10
100
1000
Diámetro (nm)
DAP
Argatrobán
1:1 :: DAP:Argatrobán
10:1 :: DAP:Argatrobán
100:1 :: DAP:Argatrobán
1,000:1 :: DAP:Argatrobán

Figura 8

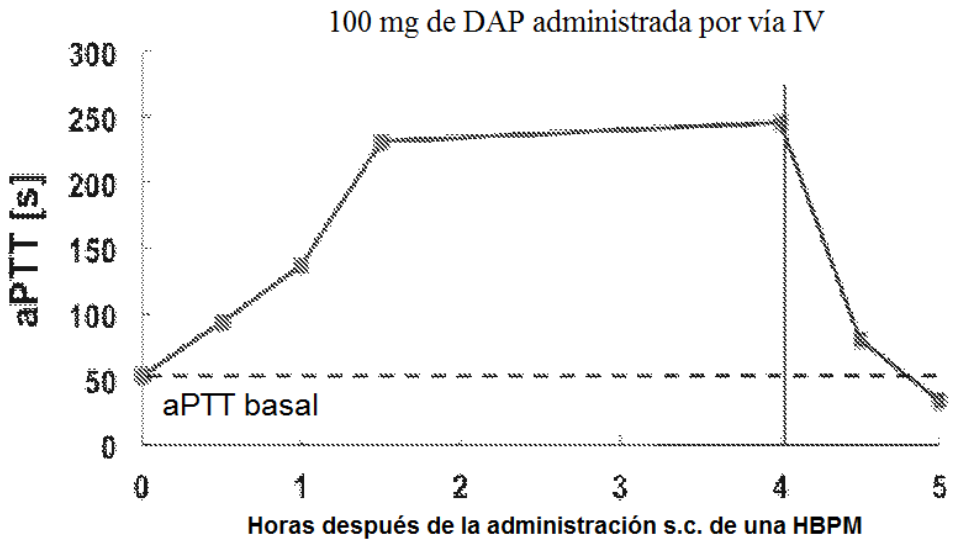


Figura 9

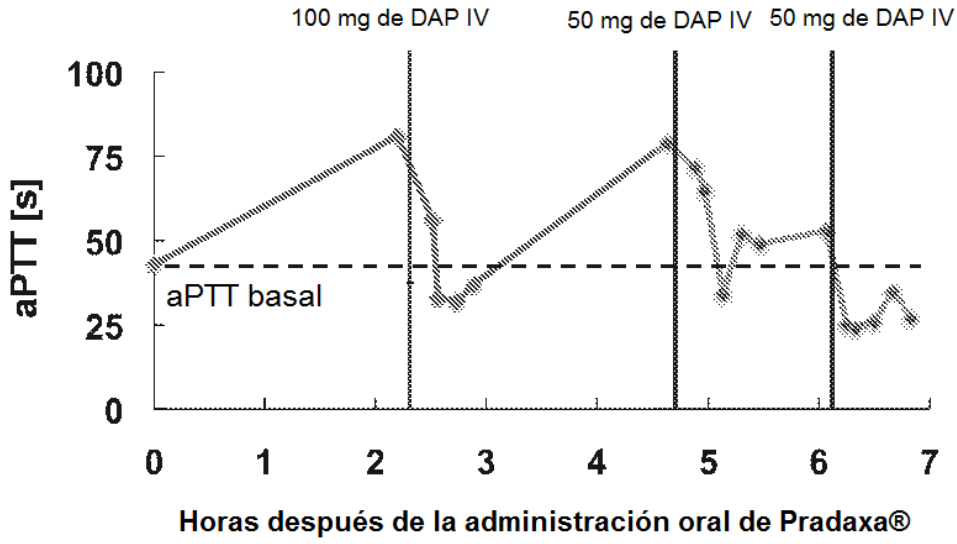


Figura 10

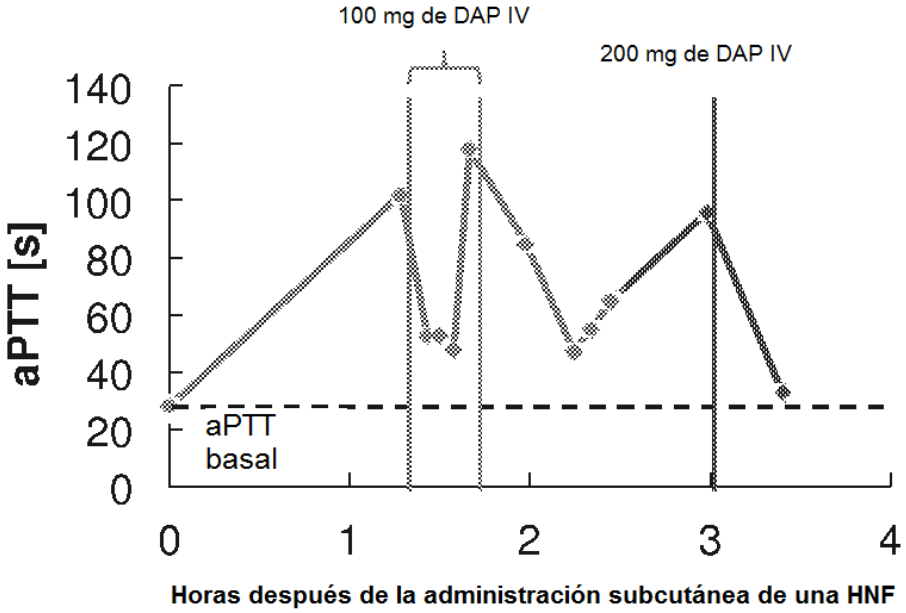


Figura 11

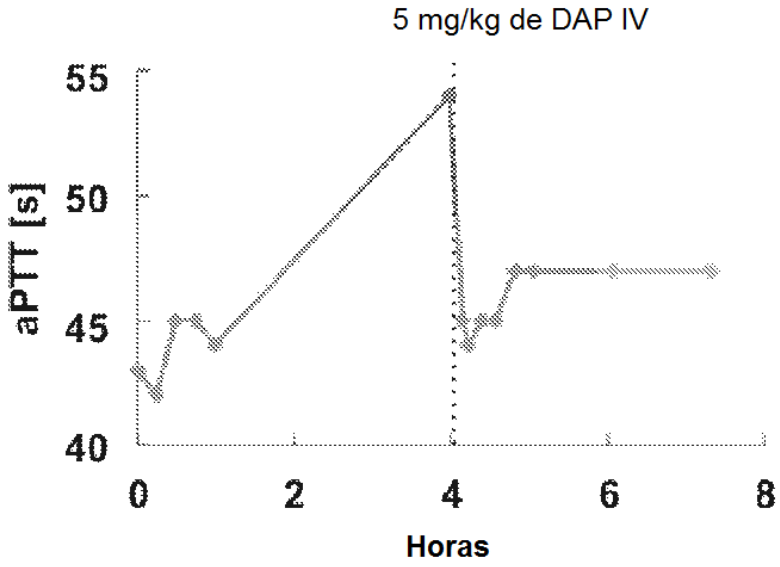
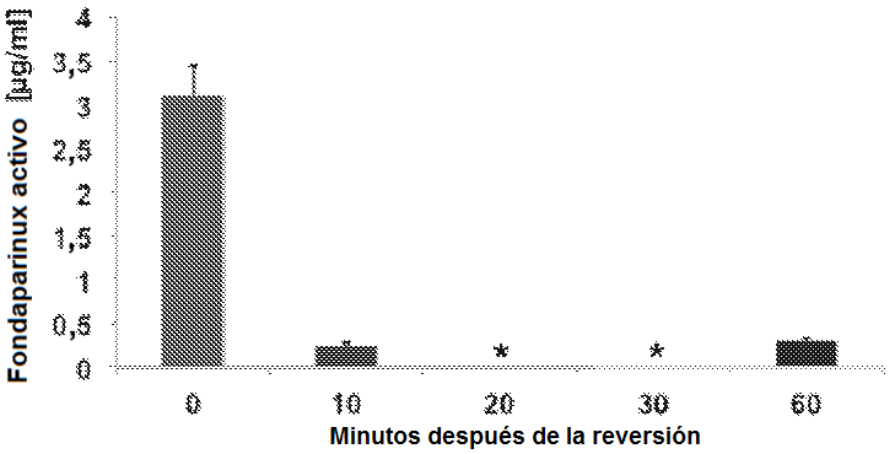


Figura 12



*** indica por debajo del límite de detección**

Figura 13

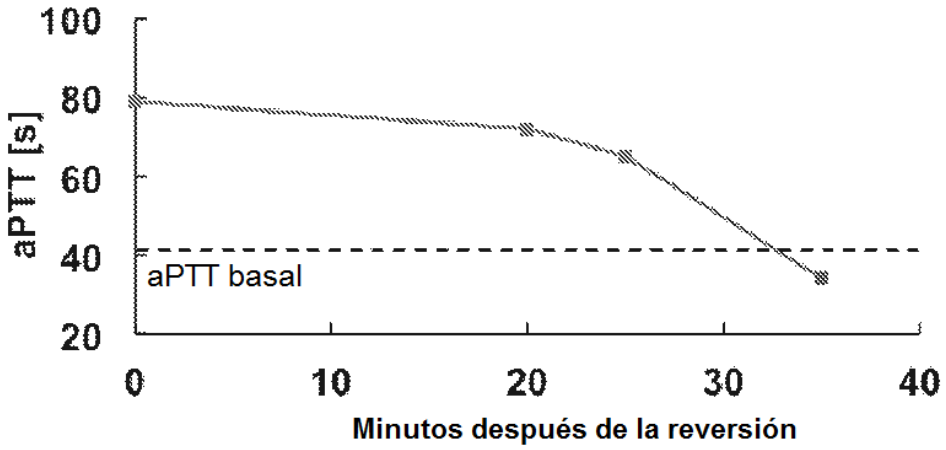


Figura 14

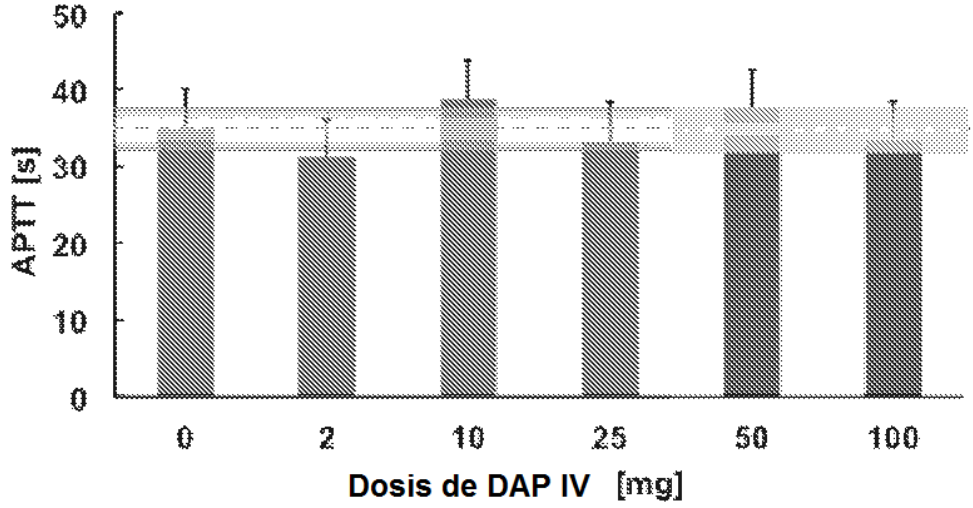


Figura 15

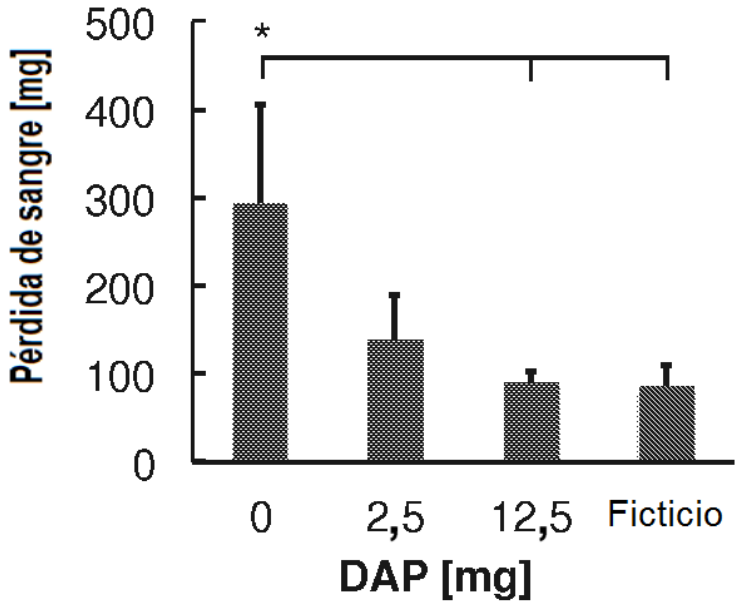


Figura 16

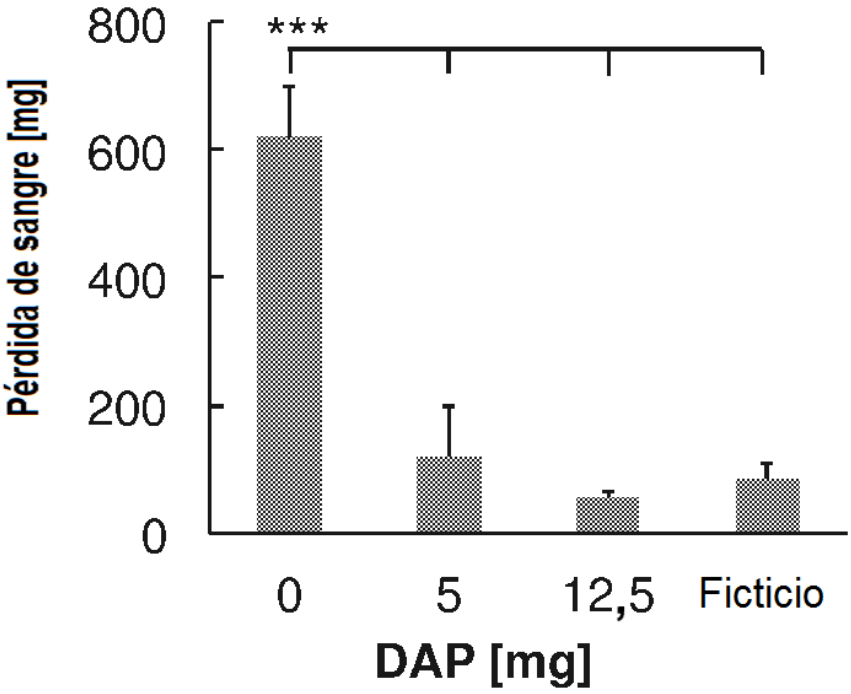


Figura 17

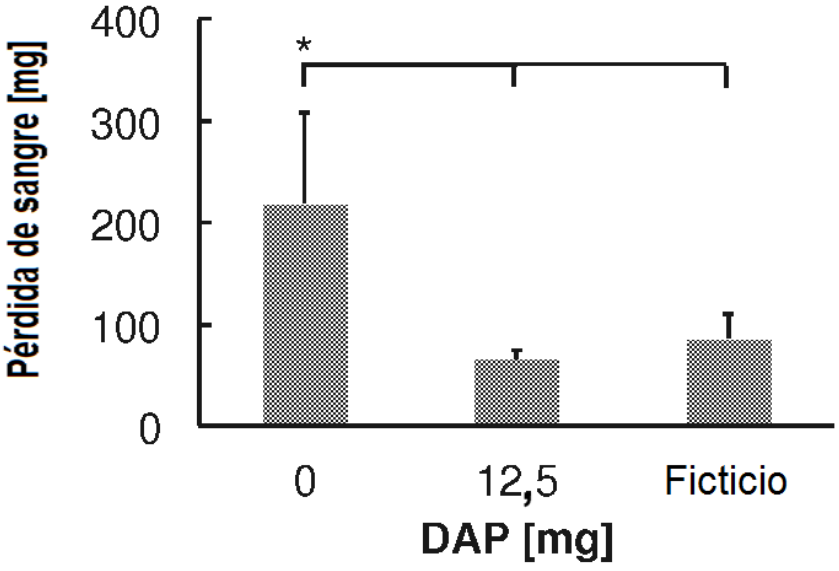


Figura 18

Dabigatrán

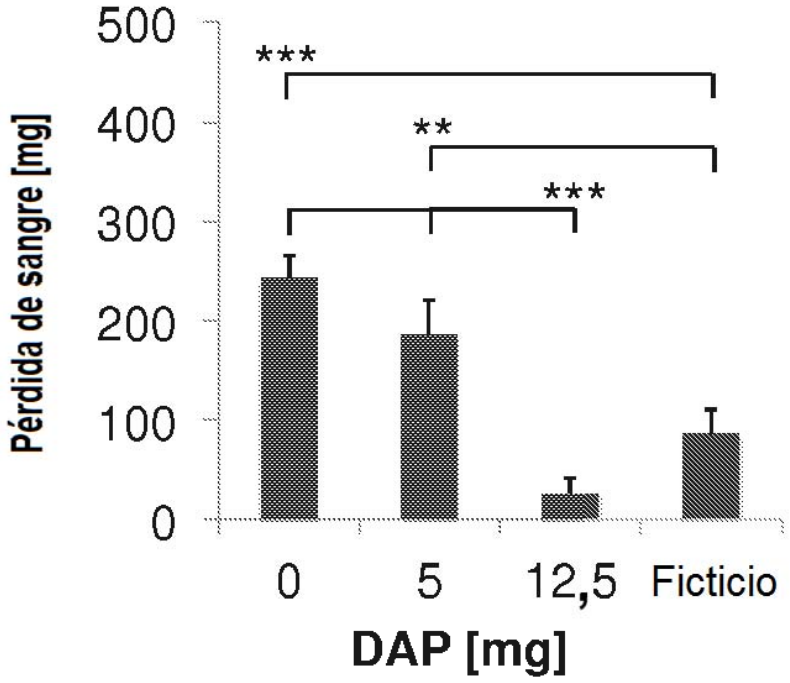


Figura 19

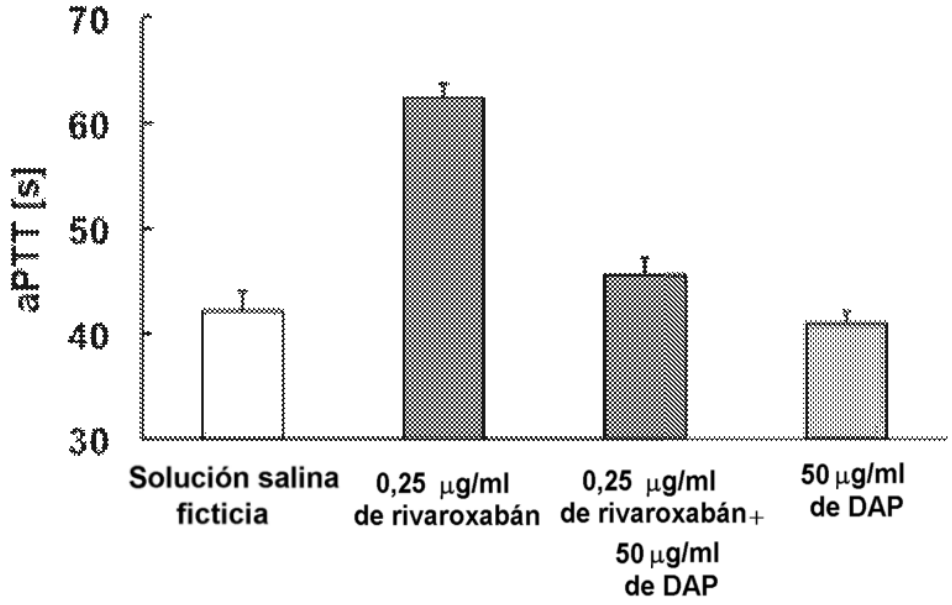


Figura 20

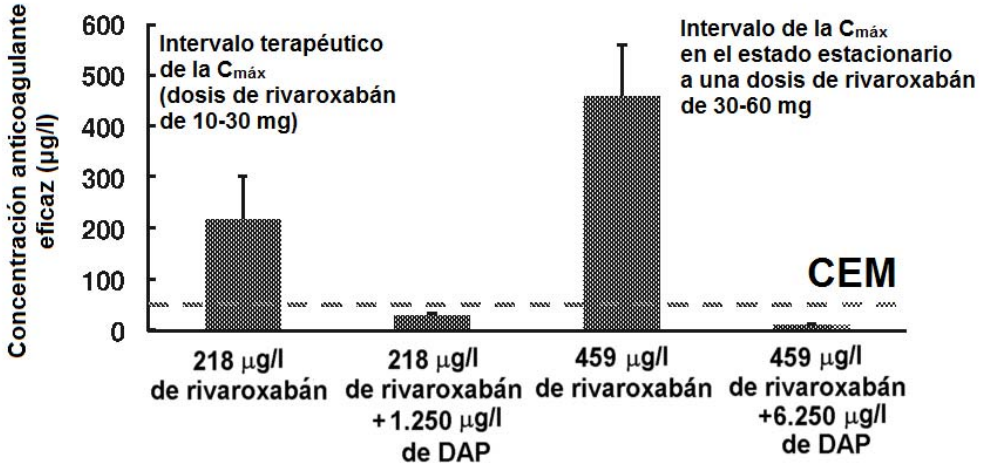


Figura 21

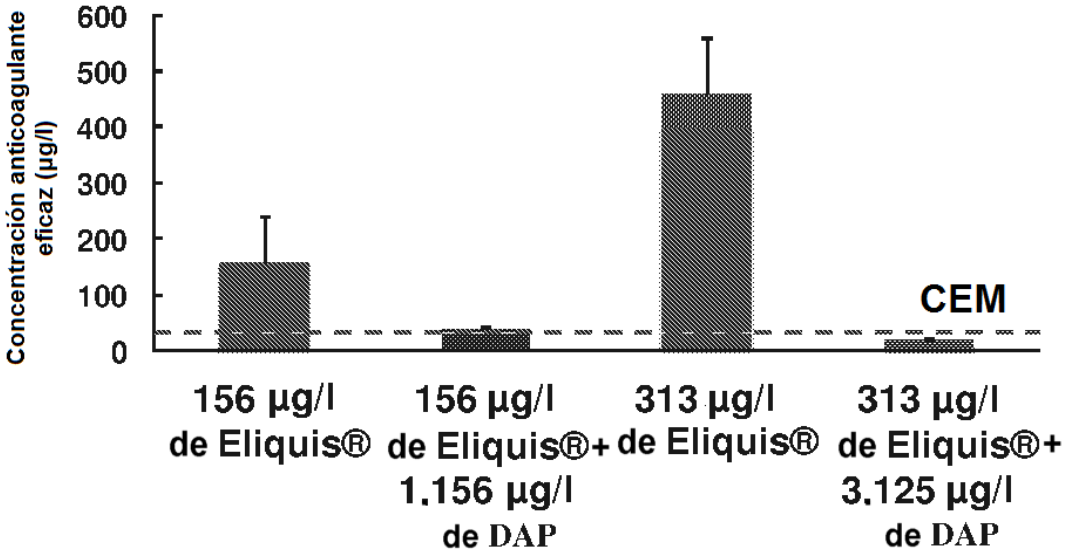
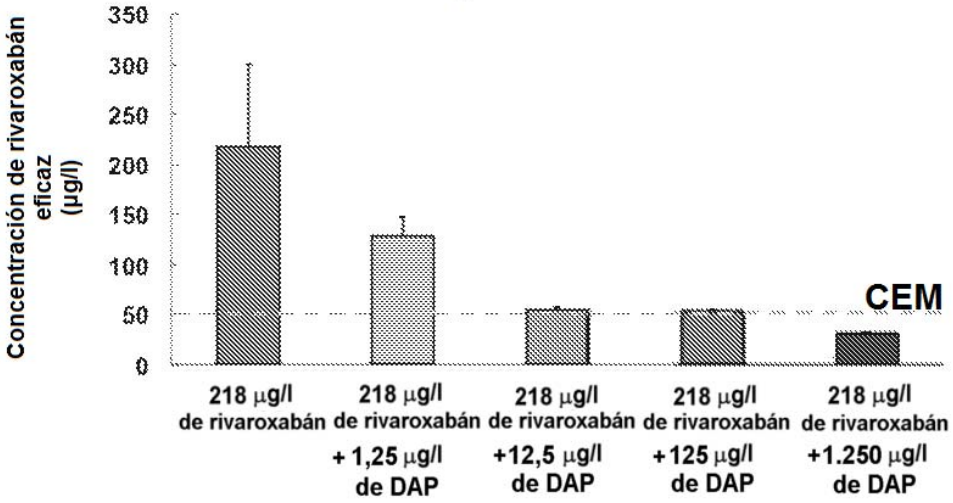


Figura 22


Concentración de rivaroxabán eficaz (µg/l)
350
300
250
200
150
100
50
0
CEM
218 µg/l de rivaroxabán
218 µg/l de rivaroxabán + 1,25 µg/l de DAP
218 µg/l de rivaroxabán +12,5 µg/l de DAP
218 µg/l de rivaroxabán +125 µg/l de DAP
218 µg/l de rivaroxabán +1.250 µg/l de DAP