



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104080772 B

(45)授权公告日 2016.10.05

(21)申请号 201280060950.2

(22)申请日 2012.11.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104080772 A

(43)申请公布日 2014.10.01

(30)优先权数据

61/564,559 2011.11.29 US

61/614,292 2012.03.22 US

61/641,698 2012.05.02 US

61/666,291 2012.06.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.06.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/066938 2012.11.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/082210 EN 2013.06.06

(73)专利权人 佩罗斯菲尔股份有限公司

地址 美国康涅狄格

(72)发明人 S·S·斯泰纳尔 B·E·劳利希特

S·H·贝克鲁 E·马希奥维茨

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 焦丽雅

(51)Int.Cl.

C07D 241/04(2006.01)

C07D 295/13(2006.01)

A61K 31/495(2006.01)

A61P 7/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1198748 A,1998.11.11,

权利要求书3页 说明书28页 附图11页

(54)发明名称

抗凝血逆转剂

(57)摘要

本发明公开了新型抗凝血逆转化合物,以及

CN 1314895 A,2001.09.26,

CN 1905883 A,2007.01.31,

WO 9610022 A1,1996.04.04,

US 20020022614 A1,2002.02.21,

US 6403583 B1,2002.06.11,

WO 9712904 A1,1997.04.10,

Shuji Kitamura,等.Potent Dibasic

GPIIb/IIIa Antagonists with Reduced

Prolongation of Bleeding Time: Synthesis

and Pharmacological Evaluation of 2-

Oxopiperazine Derivatives.《Journal of

Medicinal Chemistry》.2001,第44卷(第15期),

第2443页表3.

Fritz Bischoff.Preparation of some

substituted guanidines.《The Journal of

Biological Chemistry》.1928,第80卷第347页.

Ahmed Sabet Hammam.Heterocyclic

Quinones VIII. Synthesis and spectra of

new carbazoloquinone derivatives of

naturally occurring amino acids.《Journal

of Applied Chemistry and Biotechnology》

.1976,第26卷(第1期),第670页. (续)

审查员 辜艳

[接上页]

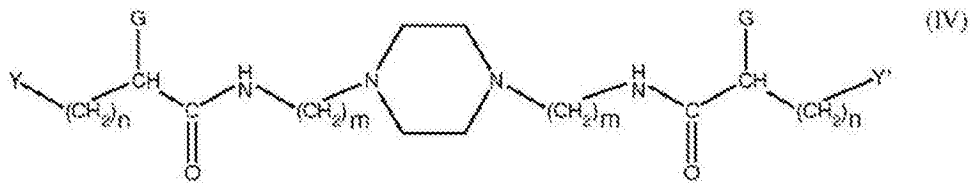
(56)对比文件

Mark A. Crowther,等.Bleeding risk and the management of bleeding complications in patients undergoing anticoagulant therapy: focus on new anticoagulant agents.《BLOOD》.2008,第111卷(第10期),第

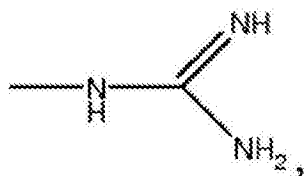
4874页表2.

Robert P. Mull,等.Guanidines with Antihypertensive Activity.II.《Journal of medicinal and pharmaceutical chemistry》.1962,第5卷第948页表III.

1. 由式IV表示的化合物：



或是其药学上可接受的盐，
其中Y和Y'各自是

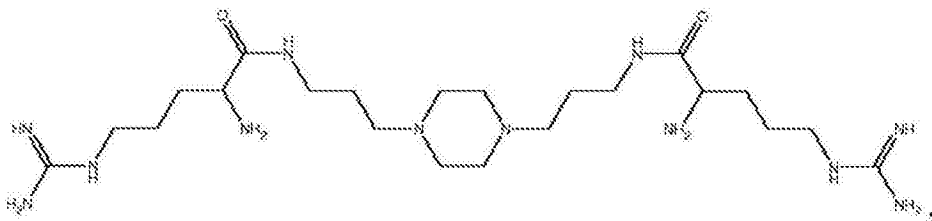


n是3至5, m是3至6并且G选自-NH₂和OH。

2. 权利要求1所述的化合物，其中G是氨基。

3. 权利要求1的化合物，其中所述化合物由式V代表

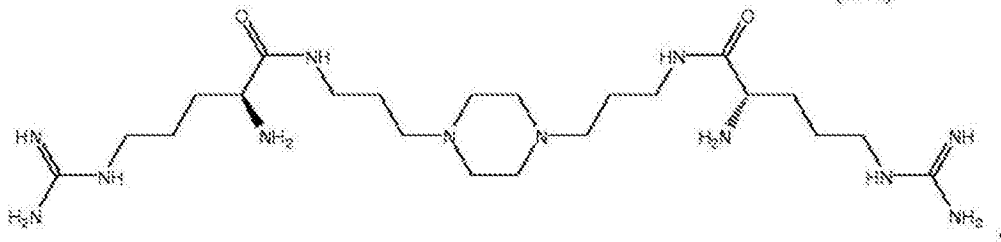
(V)



或其药学上可接受的盐。

4. 权利要求1的化合物，其中所述化合物由式VII代表

(VII)

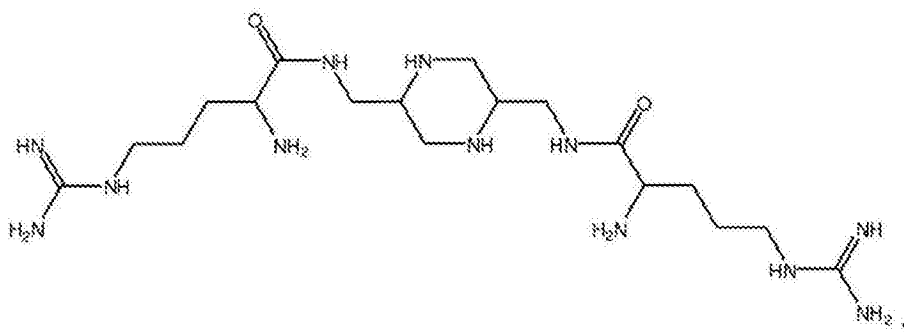


或其药学上

可接受的盐。

5. 由式VI代表的化合物

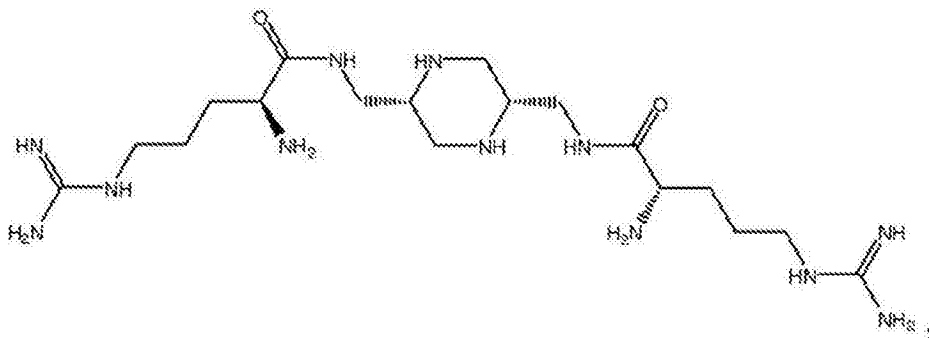
(VI)



或其药学上可接受的盐。

6. 由式VIII代表的化合物

(VIII)



或其药学上可接

受的盐。

7. 一种药物组合物,其包含权利要求1至6中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

8. 权利要求7所述的药物组合物,其中所述组合物适于肠内施用。

9. 权利要求8所述的药物组合物,其中所述组合物适于口服施用。

10. 权利要求7所述的药物组合物,其中所述组合物适于肠胃外施用。

11. 权利要求10所述的药物组合物,其中所述组合物适于静脉内或皮下施用。

12. 权利要求1至6中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备完全或部分地逆转有需要的受试者中凝血抑制剂的抗凝血效应的药物中的用途。

13. 权利要求12所述的用途,其中所述凝血抑制剂选自由以下组成的组:未分级肝素、低分子量肝素LMWH、因子IIa抑制剂和因子Xa抑制剂。

14. 权利要求13所述的用途,其中所述凝血抑制剂是因子Xa抑制剂。

15. 权利要求14所述的用途,其中所述因子Xa抑制剂选自由以下组成的组:利伐沙班、阿哌沙班、依杜沙班和磺达肝癸。

16. 权利要求12所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

17. 权利要求16所述的用途,其中所述受试者是人。

18. 权利要求12所述的用途,其中凝血抑制剂的抗凝血效应的所述完全或部分逆转通过抗-因子Xa活性测定来测量。

19. 权利要求12所述的用途,其中所述有需要的受试者是指示抗凝血的急性或规划逆转的受试者。

20. 权利要求19所述的用途,其中指示抗凝血的急性或规划逆转的所述受试者是遭受抗凝血剂过量用药的受试者、遭受出血的受试者、需要规划外科手术的受试者、经历需要活检的侵入或非侵入程序的受试者、经历其中如果所述受试者保持抗凝血,那么程序误差可能导致出血的程序的受试者,或需要脊柱或硬膜外麻醉的受试者。

21. 权利要求19所述的用途,其中所述有需要的受试者是接受抗凝血以用于中风预防、心脏手术和诊断程序、心律失常、深静脉血栓形成DVT预防、肺栓塞或一般用于预防病理性血液凝块的受试者。

22. 权利要求13所述的用途,其中所述凝血抑制剂是LMWH,并且其中所述LMWH选自由以下组成的组:贝米肝素、舍托肝素、达肝素、依诺肝素、那屈肝素、帕肝素、瑞肝素和亭扎肝素。

23. 权利要求12所述的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以所述化合物或其药学上可接受的盐与抗凝血剂的0.01:1至1000:1之间的剂量质量比来施用。

24. 权利要求23所述的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐以所述化合物或其药学上可接受的盐与抗凝血剂的10:1的剂量质量比来施用。

25. 权利要求12所述的用途,其中所述药物联合至少一种额外治疗剂给药。

26. 权利要求25所述的用途,其中所述至少一种额外治疗剂是维生素K。

27. 一种诊断试剂盒,其包括权利要求1至6中任一项所述的化合物。

28. 权利要求27所述的试剂盒,其中所述试剂盒用于确定血液中的抗凝血剂浓度。

抗凝血逆转剂

[0001] 本申请要求2011年11月29日提交的美国临时专利申请号61/564,559,2012年3月22日提交的美国临时专利申请号61/614,292,2012年5月2日提交的美国临时专利申请号61/641,698和2012年6月29日提交的美国临时专利申请号61/666,291的优先权益,所述美国临时专利申请的内容整体并入本文。

发明领域

[0002] 本发明公开了完全或部分地逆转凝血抑制剂的抗凝血效应的化合物,这些凝血抑制剂如未分级肝素(“UFH”)、低分子量肝素(“LMWH”)、磺达肝癸和其它抗凝血酶结合抗凝血剂,以及直接Xa和IIa抑制剂。

[0003] 发明背景

[0004] 凝血级联是旨在防止血管损伤之后大量失血或出血的正常生理过程。但有时,血凝块(血栓)将在不需要的时候形成。例如,一些高风险状况如急性内科疾病、长时间不活动、外科手术或癌症可增加形成血凝块的风险,从而可潜在地导致显著后果如动脉粥样硬化性心血管疾病和/或异常心脏节律。

[0005] 凝血级联由一系列步骤组成,其中蛋白酶裂解并且随后活化此序列中的下一种蛋白酶。每种蛋白酶可活化此系列中的下一种蛋白酶的多个分子,从而扩大此生物级联。这些反应的最终结果是将纤维蛋白原(一种可溶性蛋白质)转化成不溶性纤维蛋白丝。与血小板一起,纤维蛋白丝形成稳定血凝块。

[0006] 抗凝血酶(AT),一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,是凝血蛋白酶的主要血浆抑制剂。AT通过例如抑制凝血酶(因子IIa)和活化因子X(因子Xa)来阻断凝血级联。肝素(未分级肝素)和低分子量肝素(LMWH;分级肝素)通过经由五糖序列来结合至AT而抑制凝血过程。此结合导致AT的构象变化,从而加速其对因子IIa、Xa和参与血液凝结的其它蛋白酶的抑制。一旦解离,肝素和LMWH自由结合至另一个抗凝血酶分子并且随后抑制更多的凝血酶和因子Xa。

[0007] 未分级肝素是葡胺聚糖(GAG)的混合物,1916年由McLean和Howell在约翰霍普金斯大学(Johns Hopkins University)发现它在犬的肝脏中具有抗凝血性质。除了抗凝血以外,发现未分级肝素具有其它性质,包括抗炎和血管生成。LMWH是由一般具有小于8000Da的分子量的短链多糖组成的肝素。LMWH和肝素均用于防止血液在体内凝结,但是在临床上用于不同情况。

[0008] 肝素可以肠胃外施用的液体溶液形式来获得。LMWH,如依诺肝素,是肝素的低分子量部分。它也可以液体可注射溶液形式来获得。美国FDA批准的LMWH的当前可获得品牌是**LOVENOX®**(通用名称,依诺肝素)和**FRAGMIN®**(通用名称,达肝素钠)。

[0009] 与未分级肝素相比,低分子量或分级肝素针对血液因子Xa和因子IIa活性具有更大特异性。另外,LMWH对活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)的具有更大可重现性的效应,所述部分促凝血酶原激酶时间是凝血时间的度量。LMWH具有肝素诱发血小板减少症(HIT)的较低发病率。因为LMWH具有更可预测的功效和不利效应如HIT的较低发生率,所以患者可自己在家注射LMWH,但是它也经常在医院中使用。出于这些原因,LMWH已经成为市场领先的

抗凝血剂。

[0010] 鱼精蛋白,一种带正电荷分子,可用于逆转由于施用高度带负电荷未分级肝素或低分子量肝素(LMWH)所导致的抗凝血。鱼精蛋白是天然产物,它已经被供应问题所困扰,从而突出对于额外的、理想地合成的逆转剂选项的需求。LMWH的抗凝血活性可部分地,但是不完全地,通过静脉内施用鱼精蛋白来逆转。在LMWH的情况下,鱼精蛋白的抗凝血逆转活性减小的原因被认为是与未分级肝素相比,对于血液中的LMWH部分的结合亲和力较小。由于降压作用和关于过敏反应的问题,鱼精蛋白必须缓慢施用。

[0011] 最近,额外抗凝血剂开始获得监管部门的批准。这类抗凝血剂的实例包括达比加群(dabigatran)或**PRADAXA®**、阿加曲班(argatroban)或**ARGATROBAN®**、利伐沙班(rivaroxaban)或**XARELTO®**、阿哌沙班(apixaban)或**ELIQUIS®**、依杜沙班(edoxaban)或**LIXIANA®**,和磺达肝癸(fondaparinux)或**ARIXTRA®**。这些抗凝血剂抑制因子IIa或因子Xa传播凝血。

[0012] 抗凝血剂如达比加群、磺达肝癸、利伐沙班和阿哌沙班没有经过批准的逆转剂。达比加群或**PRADAXA®**逆转的当前技术现状是使用活性炭来试图从血液中移除达比加群和使用输血。Eerenberg等Circulation.2011年10月4日;124(14):1573-9.Epub2011年9月6日报道在一项小规模临床试验中,凝血酶原复合物浓缩物能够逆转达比加群,但是不能够逆转利伐沙班,除此之外没有用于逆转任何这些凝血因子IIa或Xa抑制剂的数据或临床可获得解毒剂。因此,在患者使用这些药剂来抗凝血时,与施用未分级肝素相关联的副作用相比,与过量用药相关的有害作用,尤其是显著或致命出血危险得多。因此,逆转剂的缺乏限制这些药物的使用。

[0013] 出于这些原因,存在对于新的抗凝血逆转剂的长期、强烈、未满足的临床需求。

[0014] 发明概述

[0015] 已开发肝素、肝素片段、磺达肝癸和其它因子Xa或因子IIa抑制剂的抑制剂。所感兴趣的抗凝血逆转剂的一般结构是:R-Z-R',其中R和R'是在生理pH下带正电荷的试剂并且可为相同或不同分子,并且Z是疏水性环状或稠环化合物。更具体地说,抑制剂由式I的化合物或其药学上可接受的盐所表示:

[0016] $Y-M-X-L-A-L'-X'-M'-Y'$ (I)

[0017] 其中:

[0018] A是取代的或未取代的芳族或非芳族、碳环或杂环或直链部分;

[0019] L和L'相同或不同并且是接头;

[0020] X和X'相同或不同,并且不存在或是分别将接头L连接至M并且将接头L'连接至M'的官能团;

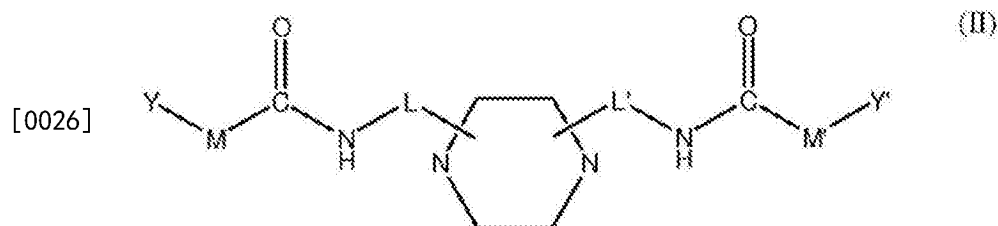
[0021] M和M'相同或不同,并且不存在或是分别将X连接至Y并且将X'连接至Y'的接头;并且

[0022] Y和Y'相同或不同,并且是含有一个或多个阳离子原子或基团或一个或多个在生理条件下成为阳离子的基团的部分。

[0023] 化合物可为对称或不对称的;也就是说,L、L'、X、X'、M、M'、Y或Y'中的一个或多个可为相同或不同的。化合物可为手性的(即,含有一个或多个手性中心)或非手性的。

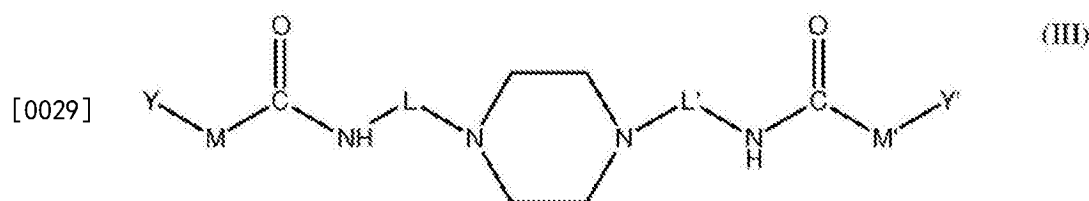
[0024] 在一些实施方案中,A是杂环部分。在其它实施方案中,A是杂环部分并且L和L'是取代的或未取代的亚烷基链。在其它实施方案中,A是杂环部分,L和L'是取代的或未取代的亚烷基链,并且X和X'是-NH-C(=O)-。在其它实施方案中,A是杂环部分,L和L'是取代的或未取代的亚烷基链,X和X'是-NH-C(=O)-,并且M和M'是取代的亚烷基链。在其它实施方案中,A是杂环部分,L和L'是取代的或未取代的亚烷基链,X是-NH-C(=O)-,M和M'是取代的亚烷基链,并且Y和Y'是胍部分。在具体实施方案中,A是1,4或2,5二取代哌嗪环。

[0025] 在本发明的另一实施方案中,抑制剂是由式II表示的化合物或其药学上可接受的盐:



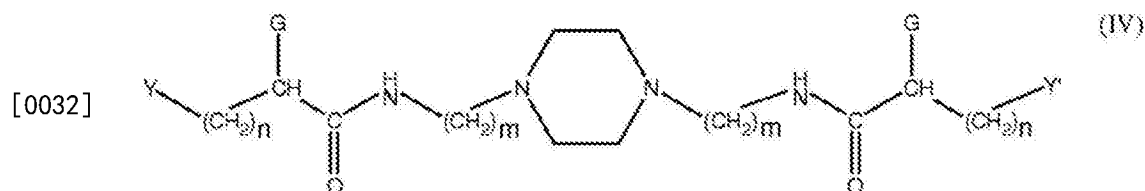
[0027] 其中L、L'、M、M'、Y和Y'各自如本文描述。

[0028] 在本发明的另一实施方案中,抑制剂是由式III表示的化合物或其药学上可接受的盐:



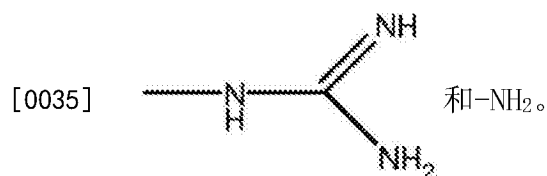
[0030] 其中L、L'、M、M'、Y和Y'如本文描述。

[0031] 在本发明的另一实施方案中,抑制剂是由式(IV)表示的化合物或其药学上可接受的盐:

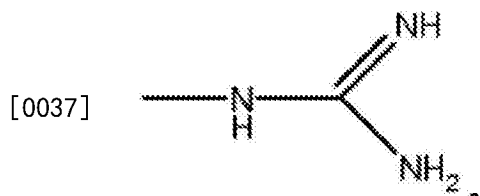


[0033] 其中Y和Y'如本文描述并且n是3至5,m是3至6并且G选自-NH₂和OH。最优选地,G是氨基。

[0034] 在本发明的另一个实施方案中,抑制剂是由任何式II、III或IV表示的化合物,并且Y和Y'独立地选自由以下组成的组

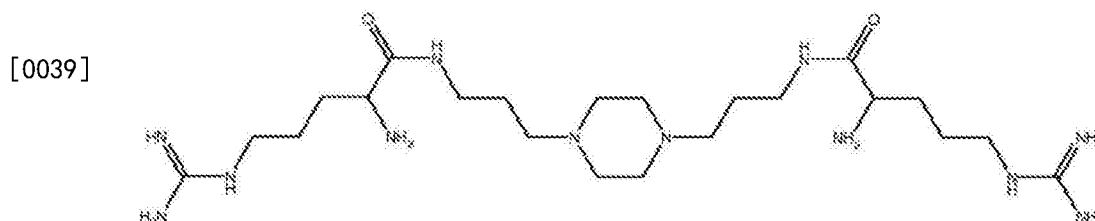


[0036] 最优选地G是-NH₂并且Y和Y'是



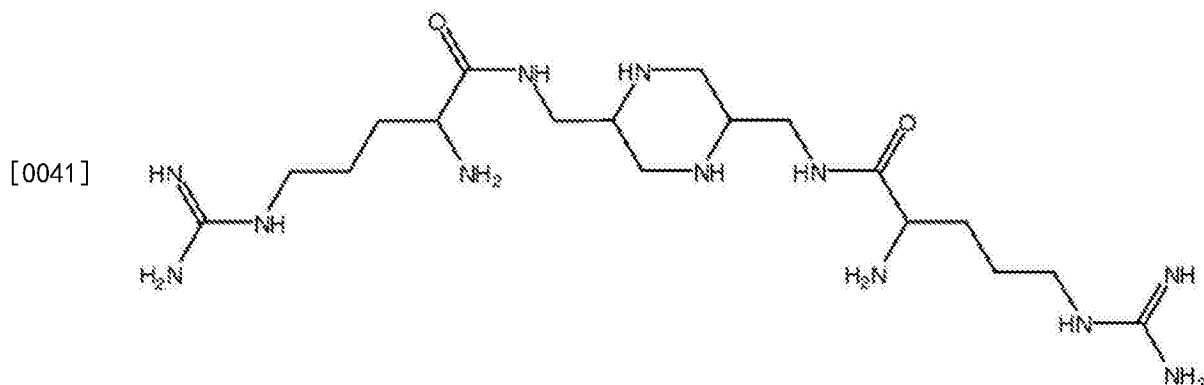
[0038] 在优选实施方案中,化合物是式V描绘的二精氨酸哌嗪(DAP),或式VI描绘的相关化合物,或任一化合物的药学上可接受的盐:

(V)



[0040] 2-氨基-5-胍基-戊酸(3-{4-[3-(2-氨基-5-胍基-戊酰基氨基)-丙基]-哌嗪-1-基}-丙基)-酰胺;或

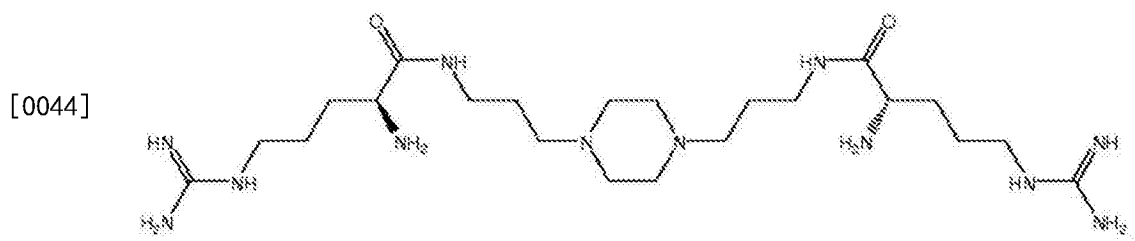
(VI)



[0042] 2-氨基-5-胍基-戊酸{5-[(2-氨基-5-胍基-戊酰基氨基)-甲基]-哌嗪-2-基甲基}-酰胺。

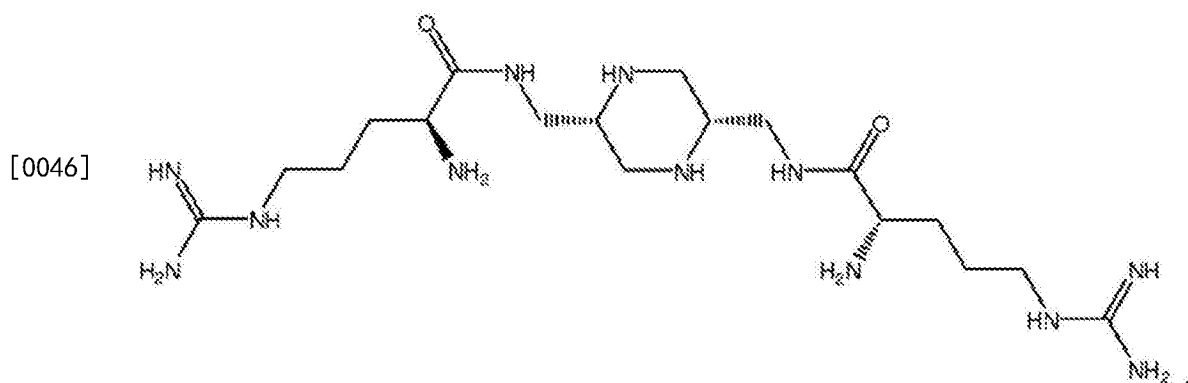
[0043] 在具体实施方案中,式V的化合物是如式VII描绘的立体异构体:

(VII)



[0045] 在另一个具体实施方案中,式VI的化合物是如式VIII描绘的立体异构体:

(VIII)



[0047] 本发明的化合物可在药物组合物中以水溶液形式以推注和/或静脉内输注形式、皮下注射或口服来施用。在优选实施方案中,化合物通过注射(静脉内、肌肉内或皮下)在载体如蒸馏无菌水、盐水、缓冲盐水或用于注射的另一种药学上可接受的赋形剂中来施用。在一些实施方案中,抑制剂可口服施用至粘膜表面(鼻腔、肺部、阴道、直肠或颊腔)或通过积存物来施用。

[0048] 本发明的化合物可在药物组合物中以恢复正常凝血和止血的有效量施用至需要逆转肝素、LMWH或其它凝血酶抑制剂介导的抗凝血的患者。包含本发明化合物的药物组合物适合于医院使用或非紧急家庭逆转。它以恢复凝血的有效量施用至需要逆转肝素、LMWH或其它凝血酶抑制剂介导的抗凝血的患者。本文描述的化合物和药物组合物也可用于减少肝素结合生长因子的活性且/或完全或部分地逆转一种或多种因子IIa和/或因子Xa抗凝血剂的组合。

[0049] 因此,本发明的化合物可用于完全或部分地逆转凝血抑制剂的抗凝血效应的方法中。本发明的化合物也可用作诊断试剂盒,例如,用于确定血液中的抗凝血剂浓度的诊断试剂盒的一部分。

[0050] 实例证明DAP直接结合利伐沙班、阿哌沙班、未分级肝素、磺达肝癸和LMWH,从而逆转抗凝血活性。DAP在大鼠中在体内逆转口服利伐沙班和皮下LMWH抗凝血,如通过aPTT来测量,并且逆转皮下磺达肝癸,如通过Xa活性来测量。通过大鼠尾横断测定中的失血的统计上显著减少来证实,DAP逆转对于阿哌沙班、达比加群、依杜沙班和利伐沙班得到证明。DAP在人血液中离体以约10:1DAP:抗凝血剂的剂量质量比完全逆转阿哌沙班和利伐沙班,如使用抗-Xa试剂盒来测量。DAP在人血液中离体展示剂量依赖性逆转阿哌沙班和利伐沙班。新鲜抽取的人全血中的利伐沙班逆转通过离体aPTT测量证实。DAP在体外不结合高达1:1000浓度的阿加曲班。DAP在大鼠中在体内逆转口服达比加群,如通过aPTT来测量。在200x静脉内(IV)剂量的DAP之后,给予阿加曲班的大鼠保持抗凝血,显示DAP是安全的并且逆转相互作用对于肝素和新的口服抗凝血剂具有特异性。总之,实例证明DAP络合至肝素和LMWH,并且DAP充当肝素、肝素样化合物和其它凝血酶抑制剂的极好逆转剂,这些凝血酶抑制剂包括达比加群、批准的低分子量肝素以及利伐沙班(**XARELTO®**)、磺达肝癸(**ARIXTRA®**)、依杜沙班(**LIXIANA®**)和阿哌沙班(**ELIQUIS®**),如在使用人血液的体外测定、抗-Xa和aPTT试验中所测试和/或在大鼠尾横断测定中在体内所测试。

[0051] 附图简述

[0052] 图1是如通过差示扫描量热法(DSC)来测量的热流相比于温度的图,其中将DAP从-20℃加热至200℃(“1”或“第一加热”),冷却至-20℃,并且加热回到200℃(“2”或“第二加热”)。

[0053] 图2是单独DAP、单独UFH和DAP-UFH组合的图,其随着体积百分比相比于尺寸(直径nm)而变化,如通过动态光散射(DLS)来测量。

[0054] 图3是单独DAP、单独利伐沙班和1:1和10:1DAP:利伐沙班比率的DAP-利伐沙班的图,其随着体积(百分比)相比于尺寸(直径nm)而变化,如通过DLS来测量。

[0055] 图4是单独DAP、单独阿哌沙班和以1:1、10:1和100:1比率结合的DAP-阿哌沙班的图,其随着体积(百分比)相比于尺寸(直径nm)而变化,如通过DLS来测量。

[0056] 图5是单独DAP、单独磺达肝癸和以1:1、10:1和100:1比率结合的DAP-磺达肝癸的图,其随着体积(百分比)相比于尺寸(直径nm)而变化,如通过DLS来测量。

[0057] 图6是单独DAP、单独LMWH和以1:1、1:10和100:1比率结合的DAP-LMWH的图,其随着体积(百分比)相比于尺寸(直径nm)而变化,如通过DLS来测量。

[0058] 图7是单独DAP、单独阿加曲班和以1:1、10:1、100:1和1000:1比率结合的DAP-阿加曲班的图,其随着体积(百分比)相比于尺寸(直径nm)而变化,如通过DLS来测量。

[0059] 图8是向大鼠皮下施用10mg贝米肝素(bemiparin)(LMWH)之后五小时期间随着时间的推移(小时)测量的活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT,秒)的图。治疗四小时后,大鼠接受静脉内给药200mg/kg(100mg)DAP。

[0060] 图9是向大鼠口服施用**PRADAXA®**(达比加群),随后静脉内施用200和100mg/kg(100mg和50mg)DAP之后随着时间的推移(小时)测量的活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT,秒)的图。

[0061] 图10是向大鼠皮下施用未分级肝素(UFH),随后静脉内施用200mg/kg(100mg)和400mg/kg(200mg)DAP之后随着时间的推移(小时)测量的活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)的图。

[0062] 图11是向大鼠口服施用5mg/kg利伐沙班,随后静脉内施用5mg/kg(2mg)DAP之后随着时间的推移(小时)测量的aPTT(秒)的图。

[0063] 图12是向大鼠皮下施用5mg/kg磺达肝癸,随后静脉内施用200mg/kg DAP(即,“逆转”)之后随着时间的推移(逆转之后分钟数)测量的活性磺达肝癸浓度($\mu\text{g/mL}$)的图。

[0064] 图13是向大鼠口服施用15.5mg/kg**PRADAXA®**(达比加群),随后静脉内施用100mg/kg DAP(即,“逆转”)之后随着时间的推移(逆转之后分钟数)测量的aPTT(秒)的图。

[0065] 图14是0、2、10、25、50和100mg静脉内施用DAP的aPTT时间(秒)的图。

[0066] 图15是接受2mg利伐沙班和0mg DAP、2mg利伐沙班和2.5mgDAP、2mg利伐沙班和12.5mg DAP,或假逆转和抗凝血剂量(“假”)的大鼠的大鼠尾横断出血测定中在30分钟内收集的血液(即,累计失血)的图。对于三个年龄匹配大鼠的组,12.5mg DAP减少失血至假剂量水平,产生与只接受利伐沙班的大鼠的统计上的显著差异(* $p < 0.05$)。

[0067] 图16是接受1.25mg阿哌沙班和0mg DAP、1.25mg阿哌沙班和5mg DAP、1.25mg阿哌沙班和12.5mg DAP,或假逆转和抗凝血剂量(“假”)的大鼠的大鼠尾横断出血测定中在30分钟内收集的血液(即,累计失血)的图。对于三个年龄匹配大鼠的组,5mg和12.5mg的DAP减少

失血至假剂量水平,产生与只接受阿哌沙班的大鼠的统计上的显著差异(** $p < 0.01$)。

[0068] 图17是接受1.25mg依杜沙班和0mg DAP、1.25mg依杜沙班和12.5mg DAP或假逆转和抗凝血剂量(“假”)的大鼠的大鼠尾横断出血测定中在30分钟内收集的血液(即,累计失血)的图。对于三个年龄匹配大鼠的组,12.5mg DAP减少失血至假剂量水平,产生与只接受依杜沙班的大鼠的统计上的显著差异(* $p < 0.05$)。

[0069] 图18是接受15mg达比加群酯和0mg DAP、15mg达比加群酯和5mg DAP、15mg达比加群酯和12.5mg DAP,或假逆转和抗凝血剂量(“假”)的大鼠的大鼠尾横断出血测定中在30分钟内收集的血液(即,累计失血)的图。对于三个年龄匹配大鼠的组,12.5mg DAP减少失血至假剂量水平,产生与只接受达比加群酯的大鼠的统计上的显著差异(** $p < 0.01$)。

[0070] 图19是用50微克/毫升DAP、0.25微克/毫升利伐沙班、50微克/毫升DAP和0.25微克/毫升利伐沙班或盐水离体处理的新鲜抽取人血液中测量的aPTT(秒)的图。

[0071] 图20是显示在离体用单独或与1,250mg/L DAP组合的218 μ g/L利伐沙班,和单独或与6,250 μ g/L DAP组合的459 μ g/L利伐沙班处理的人血浆中通过抗-因子Xa活性测定测量的有效抗凝血剂浓度的图。

[0072] 图21是显示在离体用单独或与1,156 μ g/L DAP组合的156 μ g/L阿哌沙班,和单独或与3,125 μ g/L DAP组合的313 μ g/L阿哌沙班处理的人血浆中通过抗-因子Xa活性测定测量的有效抗凝血剂浓度的图。

[0073] 图22是显示在离体用单独或与递增量(1.25、12.5、125和1,250 μ g/L)DAP组合的218 μ g/L利伐沙班处理的人血浆中通过抗-因子Xa活性测定测量的有效抗凝血剂浓度的图。

[0074] 发明详述

[0075] I. 抗凝血逆转剂

[0076] 公开了新型抗凝血逆转剂。本发明的化合物包括本文描述的化合物,以及其药学上可接受的盐。

[0077] 已开发肝素、肝素片段、磺达肝癸和因子Xa或因子IIa抑制剂(例如,口服因子Xa或因子IIa抑制剂)的抑制剂。所感兴趣的抗凝血逆转剂的一般结构是:R-Z-R',其中R和R'是在生理pH下带正电荷的试剂并且可为相同或不同分子,并且Z是疏水性环状或稠环化合物。

[0078] 更具体地说,抑制剂是式(I)的化合物或其药学上可接受的盐:

[0079] Y—M—X—L—A—L'—X'—M'—Y' (I)

[0080] 其中:

[0081] A是取代的或未取代的芳族或非芳族、碳环或杂环或直链部分;

[0082] L和L'相同或不同并且是接头;

[0083] X和X'相同或不同,并且不存在或是分别将接头L连接至M并且将接头L'连接至M'的官能团;

[0084] M和M'相同或不同,并且不存在或是分别将X连接至Y并且将X'连接至Y'的接头;并且

[0085] Y和Y'相同或不同,并且是含有一个或多个阳离子原子或基团或一个或多个在生理条件下成为阳离子的基团的部分。

[0086] 化合物可为对称或不对称的;也就是说,L、L'、X、X'、M、M'、Y或Y'中的一个或多个可为相同或不同的。化合物可为手性的(即,含有一个或多个手性中心)或非手性的。

[0087] 在一些实施方案中,A是杂环部分。在其它实施方案中,A是杂环部分并且L和L'是取代的或未取代的亚烷基链。在其它实施方案中,A是杂环部分,L和L'是取代的或未取代的亚烷基链,并且X和X'是-NH-C(=O)-。在其它实施方案中,A是杂环部分,L和L'是取代的或未取代的亚烷基链,X和X'是-NH-C(=O)-,并且M和M'是取代亚烷基链。如本文使用,亚烷基链是C₁至C₁₀,优选地C₃至C₆长度的二价烯部分,并且可被取代或未被取代。示例性取代基包括烷基、羟基、羟基烷基、氨基、氨基烷基、烷氧基、烷基烷氧基。如本文使用,术语烷基是C₁至C₁₀,优选地C₁-C₆直链或支链烃。在其它实施方案中,A是杂环部分,L和L'是取代的或未取代的亚烷基链,X是-NH-C(=O)-,M和M'是取代的亚烷基链,并且Y和Y'是胍部分。

[0088] 在一些实施方案中,A是非芳族、杂环如哌嗪或二酮哌嗪。在其它实施方案中,A是直链部分,如直链二胺或含有反应性官能团的其它直链部分,这些官能团可与存在的X和X',或Y和Y'形成键。在一些实施方案中,接头L和L'连接至环A中的杂原子,如哌嗪中的两个氮原子。在其它实施方案中,接头L和L'连接至环中的除了杂原子以外的原子,如碳。在具体实施方案中,A是1,4或2,5二取代哌嗪环。在一些实施方案中,L和L'和/或M和M'是取代的或未取代的亚烷基链,如-(CH₂)_n,其中n是1-10,优选地1-6,例如,1-3的整数。在具体实施方案中,n是3。在一些实施方案中,L和/或M不存在。

[0089] X和X'是将接头L和L'连接至Y和Y'的官能团。示例性官能团包括但不限于酯、酰胺、碳酸盐和酮。在具体实施方案中,X和X'是抵抗简单水解的官能团,如酰胺基。

[0090] Y和Y'是含有一个或多个原子或作为阳离子或在生理条件下为阳离子的基团的部分。实例包括胺和胍部分以及含磷部分,如烷基三苯基磷鎓、四苯基磷鎓、四苯基砷鎓、三苄基铵和磷鎓部分。额外的阳离子部分包括阳离子低聚物和聚合物,如寡或聚赖氨酸、寡或聚精氨酸、N-烷基化聚乙烯亚胺等。其它阳离子部分包括含有一个至三个氮甲酰基(carbimino)、烃基硫亚胺(sulfimino)或磷亚胺(phosphinimino)单元的离域亲脂性阳离子,如Kolomeitsev等Tet.Let.,第44卷,第33期,5795-5798(2003)描述。

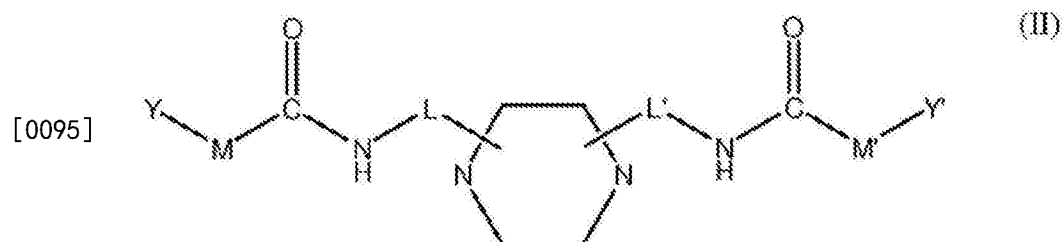
[0091] 在一些实施方案中,化合物是哌嗪衍生物,其中氨基酸侧链含有一个或多个带正电荷原子或在生理条件下带正电荷的原子。实例包括二精氨酸哌嗪。带正电荷或在生理条件下带正电荷的其它氨基酸可取代精氨酸。

[0092] 如本文使用,“芳族”是指5至12员,优选地5、6和7员芳族、杂环、稠合芳族、稠合杂环、双芳族或双杂环环系统,任选地经过取代。广泛地定义,如本文使用的“Ar”包括可包含零至四个杂原子的5、6和7员单环芳族基团,例如苯、吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。在环状结构中具有杂原子的那些芳基基团还可被称为“芳基杂环”或“杂芳族化合物”。芳族环可在一个或多个环位置用如上所述的这类取代基取代,例如卤素、叠氮化物、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰胺基、膦酸盐、亚膦酸盐、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、硫烷基、磺酰基、磺酰氨基、酮、醛、酯、杂环基、芳族或杂芳族部分、-CF₃、-CN等。术语“Ar”也包括具有两个或更多个环的多环系统,其中两个或更多个碳为两个相邻环(即,“稠合环”)共用,其中至少一个环是芳族的,例如,一个或多个其它环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基和/或杂环。杂环的实例包括但不限于苯并咪唑基、苯并呋喃基、硫茚基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并噁唑啉基、苯并噻唑基、苯并三唑基、苯并四唑基、苯并异噁唑基、苯并异噻唑基、苯并咪唑啉基、咪唑基、4aH卟啉基、卟啉基、色满基、苯并吡喃基、噌啉基、十氢喹啉基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、

二氢呋喃[2,3-b]四氢呋喃、呋喃基、呋咕基、咪唑烷基、咪唑啉基、咪唑基、1H-吡唑基、吡唑烯基(indolenyl)、二氢吡唑基、吡嗪基、吡唑基、3H-吡唑基、靛红酰基、异苯并呋喃基、异色满基、异吡唑基、异吡唑啉基、异吡唑基、异噻啉基、异噻唑基、异噻唑基、亚甲基二氧苯基、吗啉基、萘啉基、八氢异噻啉基、噁二唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、噁唑烷基、噁唑基、羟吡唑基、嘧啶基、菲啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噻噁基、吩噻嗪基、酞嗪基、哌嗪基、哌啶基、哌啶酮基、4-哌啶酮基、胡椒基、蝶啶基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并噁唑、吡啶并咪唑、吡啶并噻唑、吡啶基、吡啶基、嘧啶基、吡咯烷基、吡咯啉基、2H-吡咯基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、4H-喹啉基、喹啉基、奎宁环基、四氢呋喃基、四氢异噻啉基、四氢噻啉基、四唑基、6H-1,2,5-噻二唑基、1,2,3-噻二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,2,5-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、噻蒎基、噻唑基、噻吩基、噻吩并噻唑基、噻吩并噁唑基、噻吩并咪唑基、噻吩基和咕吨基。

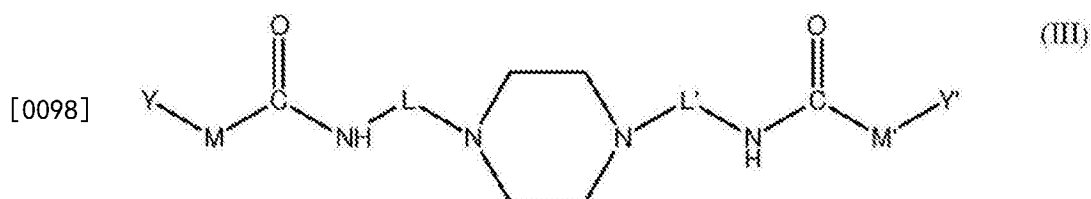
[0093] 如本文使用,“杂环”或“杂环的”是指经由含有3至10个环原子,并且优选地5至6个环原子的单环或双环的环碳或氮连接的环状基团,这些环原子由碳和各自选自以下组成的组的一个至四个杂原子组成:非过氧化物氧、硫和N(R),其中R不存在或为H、O、(C₁₋₄)烷基、苯基或苄基,并且任选地含有1至3个双键并且任选地被一个或多个取代基取代。杂环的实例包括但不限于苯并咪唑基、苯并呋喃基、硫茛基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并噁唑啉基、苯并噻唑基、苯并三唑基、苯并四唑基、苯并异噁唑基、苯并异噻唑基、苯并咪唑啉基、吡唑基、4aH吡唑基、吡啉基、色满基、苯并吡喃基、噌啉基、十氢噻啉基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、二氢呋喃[2,3-b]四氢呋喃、呋喃基、呋咕基、咪唑烷基、咪唑啉基、咪唑基、1H-吡唑基、吡唑烯基、二氢吡唑基、吡嗪基、吡唑基、3H-吡唑基、靛红酰基、异苯并呋喃基、异色满基、异吡唑基、异吡唑啉基、异吡唑基、异噻啉基、异噻唑基、异噻唑基、亚甲基二氧苯基、吗啉基、萘啉基、八氢异噻啉基、噁二唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,2,5-噁二唑基、1,3,4-噁二唑基、噁唑烷基、噁唑基、羟吡唑基、嘧啶基、菲啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噻噁基、吩噻嗪基、酞嗪基、哌嗪基、哌啶基、哌啶酮基、4-哌啶酮基、胡椒基、蝶啶基、嘌呤基、吡喃基、吡嗪基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡唑基、哒嗪基、吡啶并噁唑、吡啶并咪唑、吡啶并噻唑、吡啶基、吡啶基、嘧啶基、吡咯烷基、吡咯啉基、2H-吡咯基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、4H-喹啉基、喹啉基、奎宁环基、四氢呋喃基、四氢异噻啉基、四氢噻啉基、四唑基、6H-1,2,5-噻二唑基、1,2,3-噻二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,2,5-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、噻蒎基、噻唑基、噻吩基、噻吩并噻唑基、噻吩并噁唑基、噻吩并咪唑基、噻吩基和咕吨基。

[0094] 在本发明的另一实施方案中,抑制剂是由式II表示的化合物或其药学上可接受的盐:



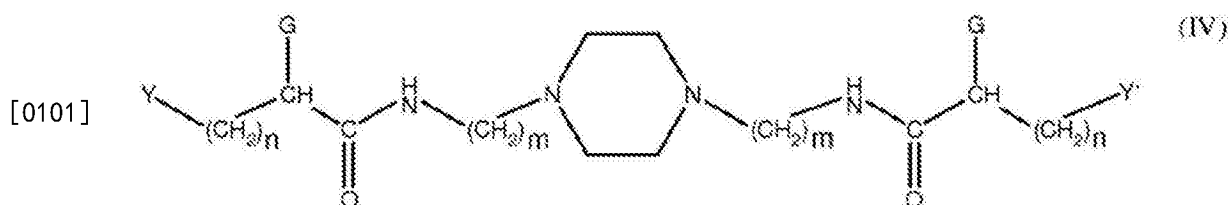
[0096] 其中L、L'、M、M'、Y和Y'各自如以前描述。

[0097] 在本发明的另一实施方案中,抑制剂是由式III表示的化合物或其药学上可接受的盐:



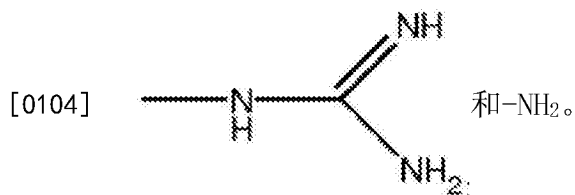
[0099] 其中L、L'、M、M'、Y和Y' 如以前描述。

[0100] 在本发明的另一实施方案中,抑制剂是由式(IV)的化合物或其药学上可接受的盐:

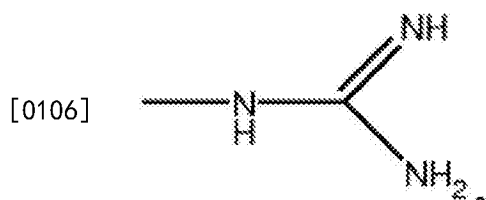


[0102] 其中Y和Y' 如以前描述并且n是3至5,m是3至6并且G选自-NH₂和OH。最优选地,G是氨基。

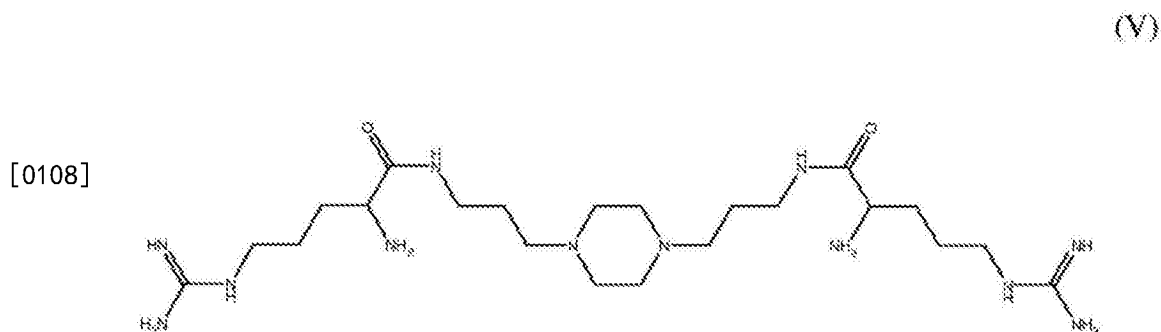
[0103] 在本发明的另一个实施方案中,抑制剂是由式II、III或IV中的任一者表示的化合物,并且Y和Y' 独立地选自自由以下组成的组



[0105] 最优选地G是-NH₂并且Y和Y' 是



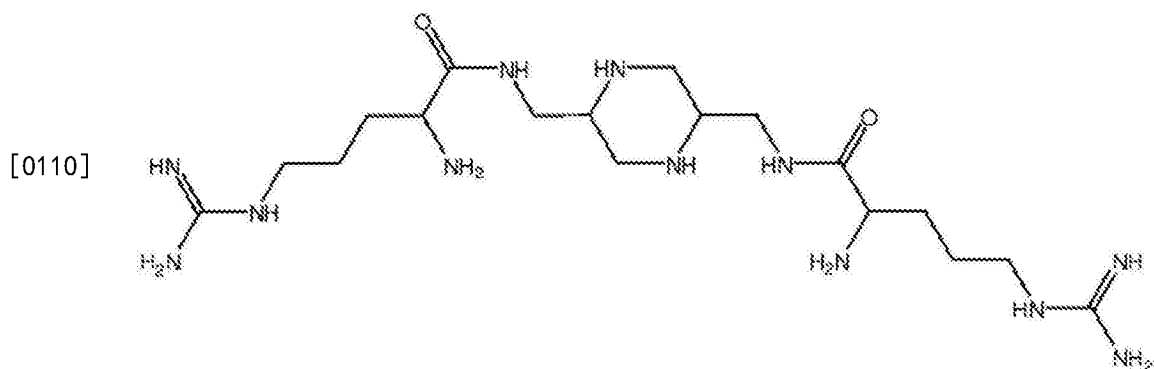
[0107] 因此,在一个实施方案中,本发明的化合物是二精氨酸哌嗪(“DAP”),如式V的化合物,或式VI的相关化合物,或任一化合物的药学上可接受的盐:



[0109] 2-氨基-5-胍基-戊酸(3-{4-[3-(2-氨基-5-胍基-戊酰基氨基)-丙基]-哌嗪-1-基}-丙基)-哌嗪-1-基

基)-丙基)-酰胺;或

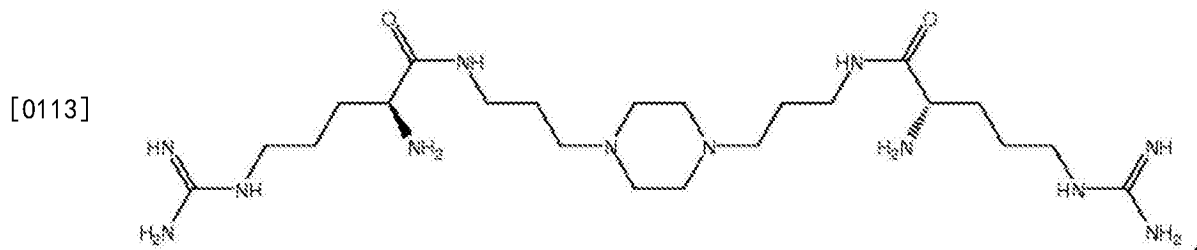
(VI)



[0111] 2-氨基-5-胍基-戊酸{5-[(2-氨基-5-胍基-戊酰基氨基)-甲基]-哌嗪-2-基甲基}-酰胺。

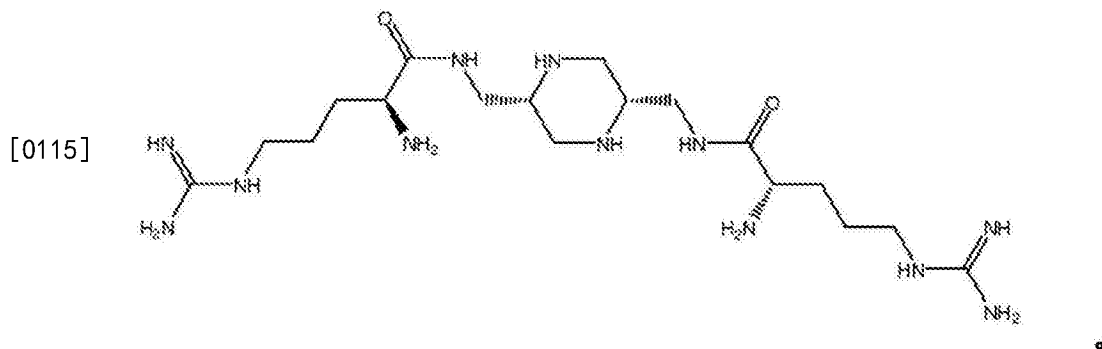
[0112] 在具体实施方案中,式V的化合物是如式VII描绘的立体异构体:

(VII)



[0114] 在另一个具体实施方案中,式VI的化合物是如式VIII描绘的立体异构体:

(VIII)



[0116] 如本文使用的化合物的短语“药学上可接受的盐”是指药学上可接受并且具有母体化合物的所需药理学活性的盐。药学上可接受的盐包括存在于本发明的化合物中的酸性或碱性基团的盐。药学上可接受的酸加成盐包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、醋酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、延胡索酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐(glucaronate)、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。合适碱盐包括但不限于铝、钙、锂、镁、钾、钠、锌和二乙醇胺盐。

[0117] 本发明的化合物抑制凝血抑制剂的活性。本发明的化合物的一种建议作用机制是

经由结合带负电荷分子(例如,本文描述的磺达肝癸、未分级肝素、LMWH)。其它凝血抑制剂(例如,本文描述的因子IIa和因子Xa抑制剂如达比加群、阿哌沙班、依杜沙班和利伐沙班)也具有负电荷;因而,本发明的化合物可经由中和其带负电荷部分来抑制这些凝血抑制剂。

[0118] 本发明的化合物的另一种建议作用机制是经由与凝血抑制剂的微弱物理相互作用如氢键合和疏水性相互作用。口服因子IIa和Xa抑制剂具有疏水性部分,其可导致与本发明的化合物,例如,DAP的疏水性缔合。

[0119] 因此,在一些实施方案中,本发明的化合物含有至少一个环状疏水性部分,例如,包括稠合环的脂族或芳族环之一或组合。在其它实施方案中,本发明的化合物含有至少一个环状疏水性部分和至少两个在生理pH下带正电荷或部分地带电的部分。

[0120] 在本发明的一些实施方案中,式V和VI的化合物(或式VII和VIII的化合物)的一个或两个精氨酸由一个或多个带正电荷氨基酸、其衍生物或类似带电化合物,例如,赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸来取代。式V和VI的化合物中的精氨酸或取代这类精氨酸的带正电荷氨基酸可为天然存在的氨基酸(即,L-氨基酸)、其对映异构体(即,D-氨基酸)或其外消旋或其它混合物。“对映异构体”是指彼此为非重叠镜像的化合物的两个立体异构体。

[0121] 本文使用的立体化学定义和规范总体上遵循S.P.Parker编著,McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,纽约;和ElieI,E.与Wilens,S.,Stereochemistry of Organic Compounds(1994)John Wiley&Sons,Inc.,纽约。许多有机化合物以旋光形式存在,即,其具有旋转平面偏振光的平面的能力。在描述具旋光性化合物时,前缀D和L或R和S用于指示分子围绕其手性中心的绝对构型。前缀D和L或(+)和(-)用于指示平面偏振光通过化合物来旋转的标志,其中(-)或L意指化合物是左旋的。以(+)或D前缀的化合物是右旋的。对于给定化学结构,这些立体异构体是相同的,除了其为彼此镜像以外。具体立体异构体还可被称为对映异构体,并且这类异构体的混合物经常称为对映异构体混合物。对映异构体的50:50混合物被称为外消旋混合物或外消旋物,其可在化学反应或过程中没有立体选择性或立体定向性时产生。术语“外消旋混合物”和“外消旋物”是指没有旋光性的两个对映异构体物质的等摩尔混合物。

[0122] 在本发明的其它实施方案中,本发明的化合物含有至少一个环状疏水性部分,例如,包括稠合环的脂族和芳族环之一或组合。所感兴趣的化合物含有至少一个环状疏水性部分和至少两个在生理pH下带正电荷或部分地带电的部分。

[0123] 应特别考虑设计基于肽的治疗剂,因为一旦施用至受试者,这类药剂可导致不需要的并且经常严重的免疫反应。本发明的化合物被设计成具有足够低分子量以将免疫原性问题减少到最低限度。在一个实施方案中,为了避免激活免疫响应,化合物被设计成使得其分子量小于约5000道尔顿,如小于或约1000道尔顿,例如,约500道尔顿。在一个实施方案中,化合物的分子量是约512道尔顿。

[0124] 较好的是本发明的化合物不结合,或以其它方式干扰ERG的功能,所述ERG为有助于心脏电导性的钾离子通道。抑制此钾通道可导致潜在致命的长QT综合征,并且一些在其它方面成功的药物候选物已经展示人ERG结合。

[0125] 另外,较好的是本发明的化合物不抑制或充当膜结合细胞色素p450(CYP)酶的底物。CYP是参与药物代谢的主要酶,并且CYP活性的调节可干扰施用至受试者的其它药物的清除和代谢,从而导致不需要的药物相互作用。

[0126] 另外优选地,本发明的化合物在体外不展现显著血浆蛋白质结合(例如,白蛋白结合)。因为本发明的化合物很大程度上不结合至血浆蛋白质,所以其展现较短活性半衰期,从而将基于积聚的过量用药的风险减少到最低限度。

[0127] II. 抗凝血逆转剂的合成

[0128] 本文描述的化合物和其药学上可接受的盐使用多种方法从可购得化合物、已知化合物或通过已知方法制备的化合物开始来制备。本文描述的化合物中的一种(式V的化合物,二精氨酸哌嗪,“DAP”)的示例性合成途径包括于以下方案中。以下方案也可通过选择适当的立体异构性起始化合物来适用于式VII的DAP立体异构体化合物。本发明的其它化合物可遵循类似合成方案来合成。本领域技术人员应了解在本文中展示的步骤顺序可改变以适应靶分子中的功能性。本领域技术人员还应了解各种保护和脱保护步骤可为合成所需要。保护和脱保护的步骤,和适当保护基团的选择发现于例如Greene和Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 第二版, John Wiley & Sons(1991), 所述文献全部以引用方式并入本文。

[0129] 在本发明的一些实施方案中,保护基是叔丁氧羰基(Boc)。在本发明的其它实施方案中,保护基是2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf)。在另一个实施方案中,氨基酸保护基可为但是不限于2,2,5,7,8-五甲基-色满-6-磺酰基(PMC)。

[0130] 保护基团可通过多种途径来移除。移除保护基团包括,例如,用三氟醋酸(TFA)、HCl水溶液来处理受保护的化合物或在醋酸中加热。因为保护基团的移除,例如,在酸性条件下保护基团的移除可导致产生可使肽链上的官能团烷基化的阳离子物质,所以可在脱保护步骤期间添加清除剂以与任何自由反应性物质反应。清除剂的实例包括但不限于水、苯甲醚衍生物和硫醇衍生物。因此,在一个实施方案中,移除保护基团包括用TFA和清除剂(例如,TFA和水)处理受保护的化合物。

[0131] 各种溶剂,例如,有机溶剂,可用于合成步骤。适当的溶剂包括但不限于二甲亚砜、二甲基甲酰胺(DMF)、四氢呋喃、甲醇、乙醇、二氯甲烷、甲苯和丙酮。在一些实施方案中,溶剂是DMF。

[0132] 合适的酸结合剂可用于合成步骤。这些试剂包括但不限于有机碱,例如像吡啶、三乙基胺、三乙醇胺、1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯(DBU)和二异丙基乙胺(DIEA);和无机碱,例如像氢氧化钠、碳酸钾和碳酸钠。在一些实施方案中,酸结合剂是DIEA。

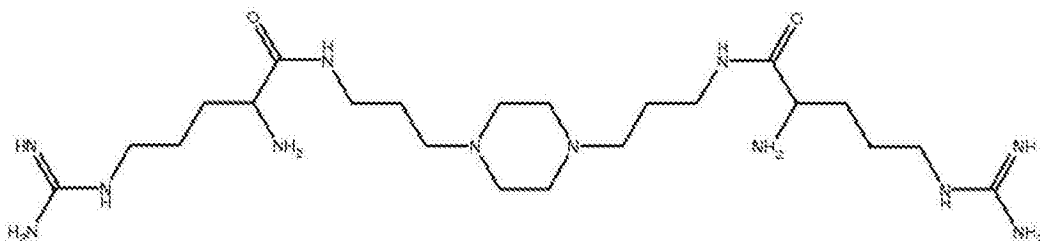
[0133] 合成可包括肽偶联试剂。肽偶联试剂可包括但不限于1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、N-羟基苯并三唑(HOBt)、羰基二咪唑(CDI)、二环己基碳二亚胺(DCC)、活性N-羟基琥珀酰胺(OSu)酯、O-苯并三唑-N,N,N',N'-四甲基-脒-六氟-磷酸酯(HBTU)和其组合。在一个实施方案中,肽偶联试剂是HBTU。在另一个实施方案中,肽偶联试剂是EDC/HOBt。在另一个实施方案中,肽偶联试剂是活性OSu酯。

[0134] 另外,合成可包括其中粗产物例如通过柱色谱来纯化的步骤。每个步骤或一系列步骤的所需产物可通过本领域中常见的技术分离且/或纯化至所需均性程度。通常,这类分离涉及多相提取、从溶剂或溶剂混合物来结晶、蒸馏、升华或色谱。色谱法可涉及许多方法包括例如:反相和正常相;体积排除;离子交换;高、中和低压液相色谱方法和设备;小规模分析;模拟移动床(SMB)和制备薄或厚层色谱,以及小规模薄层和快速色谱。

[0135] 在一个方案中,式V的化合物(DAP)

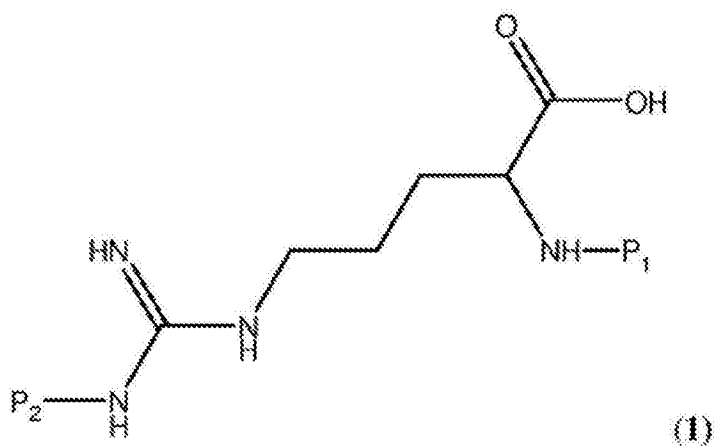
(V)

[0136]



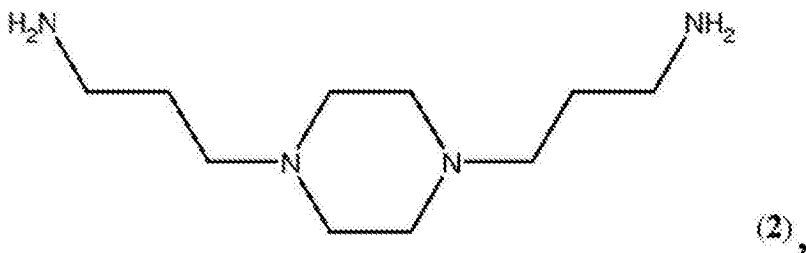
[0137] 通过使过量当量(例如,至少约两个当量)的化合物1

[0138]



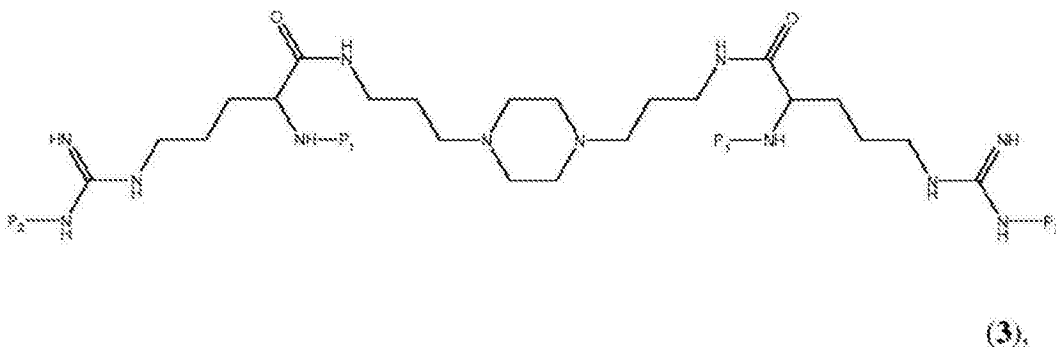
[0139] 与一个当量的化合物2

[0140]



[0141] 在肽偶联试剂存在下反应来合成,以获得化合物3

[0142]



(3),

[0143] 其中P1是保护基并且P2是保护基或氢。

[0144] 在一个实施方案中,肽偶联试剂是HBTU、EDC/HOBt或活性OSu酯。在一个实施方案中,保护基P1是Boc。在另一个实施方案中,保护基P2是Pbf。在不同实施方案中,保护基P1是Boc并且P2是氢。

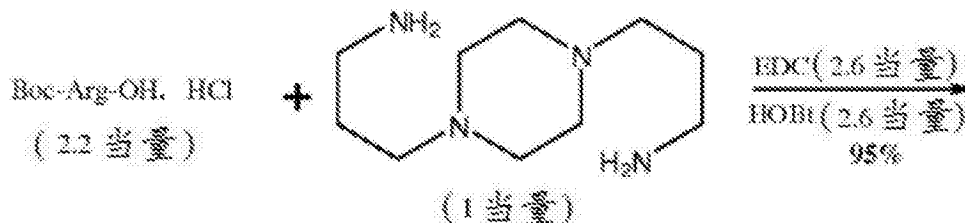
[0145] 随后,3可纯化。此纯化可涉及在本领域中已知的各种柱色谱方法。

[0146] 3的保护基团可通过本领域中已知的多种方法来移除以便获得式V的化合物。脱保

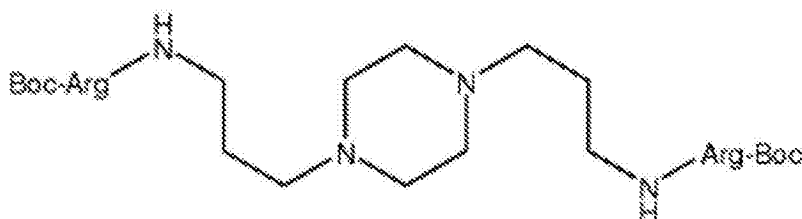
护可通过例如,使用三氟醋酸(TFA)和水、TFA和水或另一种清除剂(包括但不限于HCl水溶液)移除保护基团,或在醋酸中加热来实现。

[0147] 化合物可使用柱色谱方法来进行进一步纯化,如使用盐缓冲剂的离子交换色谱或使用三氟醋酸或醋酸作为缓冲剂的制备型HPLC。

[0148] 在更具体方案中,偶联涉及使化合物1反应,其中P1是Boc并且P2是氢(以下描述为Boc-Arg-OH·HCl),并且化合物2描述如下:

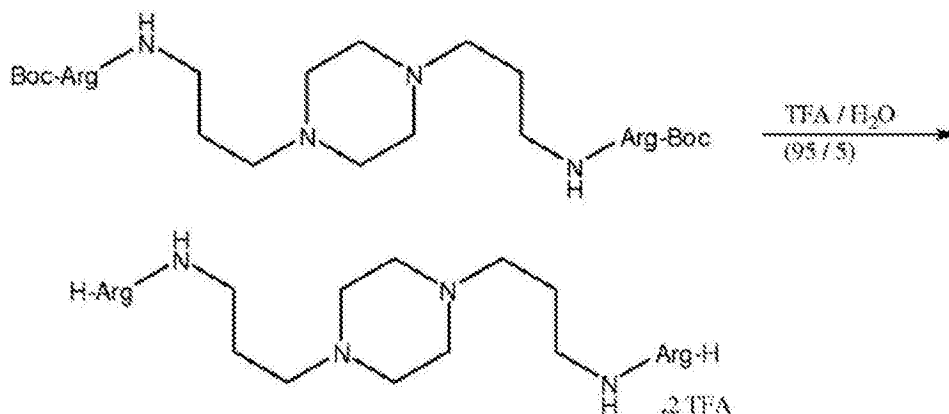


[0149]



[0150] 通过薄层色谱(TLC),所得粗产物纯度超过95%。

[0151] 随后,脱保护步骤如下描述来执行:



[0152]

[0153] 脱保护产物通过制备型HPLC使用1%醋酸缓冲液来纯化。观察到产物纯度 $\geq 98\%$ 。残余TFA通过低数量DOWEX树脂来移除。DAP(式V的化合物)的分子量是512.4,并且根据上述方案合成的化合物通过质谱分析展示以下第一峰: $[\text{M}+\text{H}]^+=513.4$ 。

[0154] III. 药物组合物

[0155] 提供包含本文描述的化合物的药物组合物。除了本发明的化合物以外,这类组合物可含有药学上可接受的载体或赋形剂。术语“药学上可接受的”是指与活性成分的物理和化学特性相容并且不干扰活性物质的生物活性的有效性的无毒材料。组合物可含有各种稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂和本领域中熟知的其它材料。载体的特性将取决于施用途径,并且一般在本领域中是熟知的。

[0156] 本发明的药物组合物可适于肠内施用-施用组合物,其中组合物经由消化道来吸收,例如,口服给药、直肠施用。在其它实施方案中,本发明的药物组合物可适于肠胃外施用-施用组合物,其中组合物经由除了消化道以外的途径来引入,例如,静脉内、皮下、皮肤、

鼻腔、肺、阴道、口腔途径。

[0157] 合适的药物组合物,例如,用于口服施用的组合物,可如参考文献中描述来制备,所述参考文献如以引用方式并入本文的“Pharmaceutical dosage form tablets”, Liberman等编(New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), “Remington—The science and practice of pharmacy”, 第20版, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, and “Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems”, 第6版, Ansel等 (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995), 所述参考文献提供关于用于制备片剂和胶囊以及缓释剂型的片剂、胶囊和颗粒的载体、材料(例如,包衣剂)、设备和过程的信息。

[0158] 合适包衣剂的实例包括但不限于纤维素聚合物如邻苯二甲酸酯醋酸纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸酯羟丙基甲基纤维素和琥珀酸酯醋酸羟丙基甲基纤维素;聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯、丙烯酸聚合物和共聚物,和可以商品名称 **Eudragit**[®] (Roth Pharma, Westerstadt, 德国)购得的甲基丙烯酸树脂、玉米蛋白、虫胶和多糖。另外,包衣剂可含有常规载体如增塑剂、颜料、着色剂、助流剂、稳定剂、成孔剂和表面活性剂。

[0159] 存在于含有药物的片剂、珠粒、微粒或颗粒中的任选药学上可接受的赋形剂包括但不限于稀释剂、结合剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、稳定剂和表面活性剂。

[0160] 通常需要稀释剂,也被称为“填充剂”,以增加固体剂型的体积以使得提供用于压缩片剂或形成珠粒和微粒的实际尺寸。合适的稀释剂包括但不限于磷酸氢钙二水合物、硫酸钙、乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、纤维素、微晶纤维素、高岭土、氯化钠、干淀粉、水解淀粉、预胶凝淀粉、二氧化硅、氧化钛、硅酸镁铝和粉末糖。

[0161] 结合剂用于将粘着性质赋予固体剂型,并且由此确保在形成剂型之后,片剂或珠粒或颗粒保持完整。合适的结合剂材料包括但不限于淀粉、预胶凝淀粉、明胶、糖(包括蔗糖、葡萄糖、右旋糖、乳糖和山梨糖醇)、聚乙二醇、蜡、天然和合成胶如阿拉伯树胶、黄蓍胶、褐藻酸钠、纤维素(包括羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素、乙基纤维素)和硅酸镁铝,以及合成聚合物如丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、氨基烷基甲基丙烯酸酯共聚物,聚丙烯酸/聚甲基丙烯酸和聚乙烯吡咯烷酮。

[0162] 润滑剂用于促进片剂制造。合适的润滑剂的实例包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、山嵛酸甘油酯、聚乙二醇、滑石和矿物油。

[0163] 崩解剂用于在施用之后促进剂型崩解或“分裂”,并且一般包括但不限于淀粉、羟甲基淀粉钠、羧甲基淀粉钠、羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素、预胶凝淀粉、粘土、纤维素、精氨酸、树胶或交联聚合物,如交联PVP(来自GAF Chemical Corp的Polyplasdone XL)。

[0164] 稳定剂用于抑制或阻止药物分解反应,药物分解反应包括,举例来说,氧化反应。

[0165] 表面活性剂可为阴离子、阳离子、两性或非离子表面活性剂。合适的阴离子表面活性剂包括但不限于含有羧酸根、磺酸根和硫酸根离子的那些表面活性剂。阴离子表面活性剂的实例包括长链烷基磺酸钠、长链烷基磺酸钾、长链烷基磺酸铵和烷基芳基磺酸盐如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,如十二烷基苯磺酸钠;二烷基磺基琥珀酸钠,如双-(2-乙基硫氧基)-磺基琥珀酸钠;和烷基硫酸盐如月桂基硫酸钠。阳离子表面活性剂包括但不限于季铵化合物如苯扎氯铵、苄索氯铵、西曲溴铵、硬脂基二甲基苄基氯化铵、聚氧乙烯和

椰子胺。非离子表面活性剂的实例包括乙二醇单硬脂酸酯、丙二醇肉豆蔻酸酯、甘油基单硬脂酸酯、甘油基硬脂酸酯、聚甘油-4-油酸酯、山梨醇酐酯化物、蔗糖酯化物、PEG-150月桂酸酯、PEG-400单月桂酸酯、聚氧乙烯单月桂酸酯、聚山梨醇酯、聚氧乙烯辛基苯基醚、PEG-1000鲸蜡基醚、聚氧乙烯十三烷基醚、聚丙二醇丁基醚、**Poloxamer**[®]401、硬脂酰基单异丙醇酰胺和聚氧乙烯氢化油脂胺。两性表面活性剂的实例包括N-十二烷基-β-丙氨酸钠、N-月桂基-β-亚氨基二丙酸钠、肉豆蔻两性基醋酸酯、月桂基甜菜碱和月桂基磺基甜菜碱。

[0166] 本发明的药物组合物可被设计成提供延迟、持续、脉动或其它改进释放。

[0167] 如果需要，片剂、珠粒颗粒或微粒还可含有少量无毒辅助物质如润湿或乳化剂、染料、pH缓冲剂和防腐剂。

[0168] 生物粘附制剂也可用于增强吸收或改进释放。这类制剂在本领域中为已知的。参见例如，Jacob的美国专利申请号20060045865，其以引用方式并入本文。

[0169] 适于经由鼻腔或肺部施用来输送的药物组合物也可有有用的。用于将治疗剂递送至呼吸道的气溶胶描述于例如Adjei, A. 和Garren, J. Pharm. Res., 7:565-569(1990);以及Zanen, P. 和Lamm, J.-W. J. Int. J. Pharm., 114:111-115(1995)。呼吸道包括上气道，包括口咽和喉部，随后下气道，包括气管，其随后分叉为支气管和细支气管。上气道和下气道称为传导气道。终末细支气管然后分成呼吸细支气管，其然后进入最终呼吸区域、肺泡或深肺。Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6: 273-313(1990)。深肺或肺泡是用于全身药物递送的吸入治疗性气溶胶的主要靶标。

[0170] 通过吸入施用的药物可以液体气溶胶制剂形式呈现。

[0171] 对于可注射组合物(例如，静脉内组合物)，载体是蒸馏无菌水、盐水、缓冲盐水或用于注射的另一种药学上可接受的赋形剂。添加剂可包括防腐剂和酸或碱以调整pH、改变溶解性或吸收。

[0172] 在一个实施方案中，其中药物组合物包括式V的DAP化合物(或式VII的其立体异构体)并且组合物适于在注射剂中肠胃外施用，化合物与适当张力和摩尔浓度调节剂(如磷酸缓冲盐水)一起溶解于水中。DAP具有大于100mg/ml的水溶性。在一个实施方案中，DAP适合作为无菌溶液来静脉内施用。在一方面，其中DAP适于静脉内施用的药物组合物的摩尔浓度使用氯化钠来调整至290mOsm/L，并且pH用氢氧化钠来调整至7.4。优选地药物组合物以静脉内推注形式通过缓慢推进来施用。

[0173] IV. 使用方法

[0174] 本发明提供完全或部分地逆转凝血抑制剂的抗凝血效应的方法，包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的化合物(例如，式I、II、III、IV、V、VI、VII或VIII的化合物)或其药学上可接受的盐。本发明还提供促进有需要的受试者的凝血的方法，其中受试者正接受凝血抑制剂，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。另外，本发明提供中和或抑制凝血抑制剂的方法，包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。

[0175] 在本发明中，凝血抑制剂(在本文中也称为抗凝血剂)是抑制凝血过程的分子。示例性的凝血抑制剂包括但不限于抗凝血酶活化剂(例如，未分级肝素和LMWH)、因子IIa抑制

剂和因子Xa抑制剂。

[0176] 肝素:肝素是天然存在的粘多糖,其在体内充当抗凝血酶辅助因子以预防血管内凝固。此物质由嗜碱性粒细胞和肥大细胞产生,这些细胞以较大数量存在于毛细血管周围的结缔组织中,尤其在肺和肝脏中。以钠盐形式,肝素在治疗上用作抗凝血剂。

[0177] 低分子量肝素:低分子量肝素(LMWH)使用各种解聚方法由肝素制得,包括以过氧化氢来氧化解聚,用于制造阿地肝素(ardeparin) (**NORMIFLO®**);以亚硝酸异戊酯来脱氨裂解,用于制造舍托肝素(certoparin) (**SANDOPARIN®**);肝素的苯甲基酯的碱性 β -消除性裂解,用于制造依诺肝素(enoxaparin) (**LOVENOX®**和**CLEXANE®**);以 Cu^{2+} 和过氧化氢的氧化解聚,用于制造帕肝素(panaparin) (**FLUXUM®**);以肝素酶来 β -消除性裂解,用于制造亭扎肝素(tinzaparin) (**INNOHEP®**和**LOGIPARIN®**);以亚硝酸来脱氨裂解,用于制造达肝素钠(dalteparin) (**FRAGMIN®**)、瑞维肝素(reviparin) (**CLIVARIN®**)和那屈肝素(nadroparin) (**FRAXIPARIN®**),导致在所产生的寡糖的还原末端形成非天然脱水甘露糖残基。随后可使用合适的还原剂将此残基转化成脱水甘露醇。化学和酶法 β -消除导致在非还原末端处形成非天然不饱和和糖醛酸残基(UA)。

[0178] 多种LMWH的抗凝血活性的概述呈现于表1。

[0179] 表1:当前可获得LMWH产物的分子量(MW)数据和抗凝血活性。

[0180]

LMWH	平均分子量	抗-Xa/抗-IIa活性比率
贝米肝素	3600	9.7
舍托肝素	5400	2.4
达肝素钠	6000	2.5
依诺肝素	4500	3.9
那屈肝素	4300	3.3
帕肝素	5000	2.3
瑞维肝素	4400	4.2
亭扎肝素	6500	1.6

[0181] 根据Gray E.等,Thromb Haemost,99:807-818(2008)来改编。

[0182] 在临床上,LMWH(约4.5kDa的平均分子量)在多个方面不同于肝素(即,“未分级肝素”;约15kDa的平均分子量):(a)LMWH需要频率较小的皮下给药以便手术后预防静脉血栓栓塞;(2)在治疗静脉血栓栓塞和不稳定心绞痛的患者中,LMWH需要每日一次或两次皮下注射而非肝素所需要的静脉内输注;(3)LMWH不需要监测aPTT凝血参数;(4)LMWH构成较低出血风险;(5)长期使用LMWH构成较低骨质疏松症风险;和(6)LMWH构成较低肝素诱发血小板减少症风险(肝素施用的潜在副作用)。然而,肝素的抗凝血作用通常可用鱼精蛋白硫酸盐来逆转,同时鱼精蛋白对于LMWH的效果是有限的。另外,与肝素相比,LMWH对于凝血酶(因子IIa)活性具有较小效应,同时LMWH和肝素对于因子Xa活性具有类似效应。

[0183] 凝血酶和其它因子IIa或Xa抑制剂:凝血酶(因子IIa)和因子Xa抑制剂的实例包括抗凝血剂

如达比加群(**PRADAXA®**)、利伐沙班(**XARELTO®**)、阿哌沙班(**ELIQUIS®**)、依杜沙班(**LIXIANA®**)、磺达肝癸(**ARIXTRA®**)和阿加曲班(**ARGATROBAN®**)

[0184] 口服抗凝血剂 **PRADAXA®**, 达比加群酯甲磺酸盐, 一种直接凝血酶抑制剂, 的化学名称是β-丙氨酸, N-[[2-[[[4-[[[(己氧基)羰基]氨基]亚氨基甲基]苯基]氨基]甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-基]羰基]-N-2-吡啶基-乙酯, 甲磺酸盐。达比加群和其酰基葡萄糖醛酸苷是竞争性、直接凝血酶抑制剂。因为凝血酶(因子IIa, 丝氨酸蛋白酶)使得在凝血级联期间纤维蛋白原能够转化成纤维蛋白, 所以其抑制可阻止血栓的发展。

[0185] 利伐沙班, 一种因子Xa抑制剂, 是 **XARELTO®** 中的活性成分, 并且具有化学名称 5-氯-N-((5S)-2-氧代-3-[4-(3-氧代-4-吗啉基)苯基]-1,3-噁唑烷-5-基)甲基)-2-噻吩甲酰胺。利伐沙班是纯的(S)-对映异构体。**XARELTO®** 是口服生物利用因子Xa抑制剂, 其选择性阻断因子Xa的活性位点并且不需要辅因子(如抗-凝血酶III)以获得活性。

[0186] 阿哌沙班或 **ELIQUIS®** 是 1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代哌啶-1-基)苯基]-4,5-二氢吡唑并[5,4-c]吡啶-3-羧酰胺。它是口服施用的直接因子Xa抑制剂, 在欧洲被批准并且目前在美国经历III期试验以用于预防静脉血栓栓塞。

[0187] 依杜沙班或 **LIXIANA®** 是 N'-(5-氯吡啶-2-基)-N-[(1S,2R,4S)-4-(二甲基氨基甲酰)-2-[(5-甲基-6,7-二氢-4H-[1,3]噻唑并[5,4-c]吡啶-2-羰基)氨基]环己基]草酰胺。依杜沙班是直接因子Xa抑制剂, 并且它已经在日本批准用于预防静脉血栓栓塞。

[0188] **ARIXTRA®** 是磺达肝癸钠。它是活化因子X(Xa)的合成和特异性抑制剂。磺达肝癸钠是甲基0-2-脱氧-6-0-磺基-2-(磺氨基)-α-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-O-β-D-吡喃葡萄糖醛酸基-(1→4)-O-2-脱氧-3,6-二-O-磺基-2-(磺氨基)-α-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-O-2-0-磺基-α-L-吡喃伊多糖醛酸基-(1→4)-2-脱氧-6-0-磺基-2-(磺氨基)-α-D-吡喃葡萄糖苷, 十钠盐。磺达肝癸钠的分子式是C₃₁H₄₃N₃Na₁₀O₄₉S₈并且其分子量是1728。结构式提供如下:



[0190] 磺达肝癸钠的抗血栓形成活性是因子Xa的抗凝血酶III(ATIII)介导的选择性抑制的结果。通过选择性结合至ATIII, 磺达肝癸钠加强(约300倍)由ATIII对因子Xa的先天中和。因子Xa的中和中断凝血级联并且由此抑制凝血酶形成和血栓发展。磺达肝癸钠不使凝血酶(活化因子II)失活并且已知对于血小板功能没有作用。在建议剂量下, 磺达肝癸钠不影响纤维蛋白溶解活性或出血时间。磺达肝癸钠的药效学/药代动力学经由抗-因子Xa活性来量化的磺达肝癸血浆浓度来获得。仅磺达肝癸可用于校准抗-Xa测定。(肝素或LMWH的国际标准不适合于此用途。)因此, 磺达肝癸钠的活性以磺达肝癸校准物的毫克数(mg)来表示。药物的抗-Xa活性随着药物浓度递增而增加, 在近似三个小时内达到最大值。通过皮下注射来施用的磺达肝癸钠快速并且完全地吸收(绝对生物利用率是100%)。在经历每日一

次用2.5mg磺达肝癸钠注射剂治疗的患者中,峰稳态血浆浓度平均为0.39至0.50mg/L并且在给药后约3小时达到。在这些患者中,最小稳态血浆浓度是0.14至0.19mg/L。在经历每日一次用5mg(体重<50kg)、7.5mg(体重50至100kg)和10mg(体重>100kg)磺达肝癸钠注射剂治疗的患有症状性深静脉血栓形成和肺栓塞的患者中,体重调整的剂量在所有体重类别中提供类似平均稳态峰和最小血浆浓度。平均峰稳态血浆浓度在1.20至1.26mg/L范围内。在这些患者中,平均最小稳态血浆浓度在0.46至0.62mg/L范围内。

[0191] **ARGATROBAN®**是从L-精氨酸衍生的合成的直接凝血酶(因子IIa)抑制剂。

ARGATROBAN®的化学名称是1-[5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-1-氧代-2-[(1,2,3,4-四氢-3-甲基-8-喹啉基)磺酰基]氨基]戊基]-4-甲基-2-哌啶甲酸,一水合物。

ARGATROBAN®的分子式是 $C_{23}H_{36}N_6O_5S \cdot H_2O$ 。它的分子量是526.66。**ARGATROBAN®**是可逆地结合至凝血酶活性位点的直接凝血酶抑制剂。**ARGATROBAN®**不需要辅因子抗凝血酶III来获得抗血栓形成活性。**ARGATROBAN®**通过注射来施用,并且它通过抑制凝血酶催化或凝血酶诱导的反应来发挥其抗凝血效应,这些反应包括纤维蛋白形成;凝血因子V、VIII和XIII的活化;蛋白质C的活化;和血小板聚集。

[0192] 抗凝血效应是由于凝血抑制剂(例如,肝素、LMWH、因子Xa抑制剂、因子IIa抑制剂)阻断凝血级联的传播而导致的任何效应。抗凝血效应的非限定性实例包括上调抗凝血酶活性、降低因子Xa活性、降低因子IIa活性、增加失血和其中凝血因子的活性或浓度以抑制血栓块形成的方式加以改变的任何其它状况。

[0193] 凝血抑制剂的活性(即,其抗凝血效应)可通过多种方法来测量,包括但不限于发色抗-因子Xa活性测定、活化部分促凝血酶原激酶时间测定、凝血酶原时间、出血测定(例如,大鼠尾出血测定)、血栓弹性描记法、凝血酶产生测定、稀释Russel蝮蛇蛇毒时间(dilute Russel's viper venom time)、蝰蛇毒凝固时间(ecarin clotting time)、高岭土凝固时间、国际标准化比率(INR)、纤维蛋白原测试(Clauss)、凝血酶时间(TCT)、拌和时间和优球蛋白溶解时间。这些方法帮助确定各种抗凝血参数,并且为本领域技术人员已知的。因此,在一些实施方案中,抗凝血可通过以上列出测定之一或组合来监测。

[0194] 抗-因子Xa测定直接测量抗-因子Xa活性。抗-因子Xa测定的方法是将患者血浆添加至已知量的过量因子Xa和过量抗凝血酶。如果因子Xa抑制剂存在于患者血浆中,它将减少因子Xa的酶活性。残余因子Xa的量与血浆中的抗-Xa试剂的量成反比。残余因子Xa的量通过添加发色底物来检测,所述底物模拟因子Xa的天然底物,使得残余因子Xa将它裂解,从而释放有色化合物,所述有色化合物可通过分光光度计来检测。患者中的抗凝血酶缺乏不影响测定,因为在反应中提供过量抗凝血酶。结果以单位/毫升表示的抗因子Xa的抗凝血浓度给出,以使得高值指示高水平抗凝血并且低值指示低水平抗凝血。

[0195] 活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)测定是测量血液凝结耗费的多长时间的测定。收集血液样品以直接测量或在具有草酸盐和柠檬酸盐的试管中以阻止由钙引起的凝聚直到测定可执行为止。在测定中,将磷脂、活化剂(二氧化硅、硅藻土、高岭土、鞣花酸等)和钙混合至血浆中以诱导凝血。测定测量了时间直到血栓(凝块)形成为止。

[0196] 大鼠尾出血测定或大鼠尾横断测定是测量失血,例如,药物施用之后失血的测定。

在一个实施方案中,其中测试本发明的化合物(例如,DAP)的效应,在抗凝血剂的T_{max},将DAP静脉内施用。20分钟之后,将大鼠尾在距尖端约1mm处横断,放置于室温盐水中,并且收集血液30分钟并且称重。

[0197] 用于测量凝血抑制剂活性的测定可在实验室或临床上用于测量凝血抑制剂的抗凝血效应的逆转,例如,由于施用包含本发明的化合物的药物组合物所导致的凝血抑制剂的抗凝血效应的逆转。因此,在一个实施方案中,测定用于测量凝血抑制剂(如肝素、LMWH、因子IIa抑制剂和因子Xa抑制剂)的抗凝血效应的完全或部分逆转。

[0198] 凝血抑制剂的抗凝血效应的完全逆转在中和抗凝血活性后发生。在一个实施方案中,如通过抗-Xa活性测定所测量的凝血抑制剂的抗凝血效应的完全逆转在使得抗凝血剂浓度低于抗凝血的最小有效浓度(MEC)时发生。如本文使用,MEC是治疗效果所需要的药物(例如,凝血抑制剂)的最低量。在另一个实施方案中,如aPTT测定所测量的凝血抑制剂的抗凝血效应的完全逆转在aPTT返回到基线的约10%内时发生。如本文使用,基线是指不存在凝血抑制剂的情况下的aPTT。

[0199] 在许多情况下,仍然需要抗凝血,但是程度较小。因此,将指示凝血抑制剂的抗凝血效应的部分逆转。如通过抗-Xa活性测定所测量的凝血抑制剂的抗凝血效应的部分逆转在使得抗凝血剂浓度低于不存在抗凝血逆转剂(例如,本发明的化合物)情况下的抗凝血剂浓度,但是仍然高于抗凝血所需的MEC时发生。因此,在一些实施方案中,凝血抑制剂的抗凝血效应的部分逆转在抗凝血剂浓度低于MEC约四倍,优选地MEC约两倍,更优选地小于MEC约两倍(例如,大约为MEC)时发生。如通过aPTT测定所测量的凝血抑制剂的抗凝血效应的部分逆转在aPPT减少至低于不存在抗凝血逆转剂(例如,本发明的化合物)情况下的测量值但是高于基线时发生。因此,在其它实施方案中,凝血抑制剂的抗凝血效应的部分逆转在aPTT测量值减少至低于基线约四倍、优选地基线约两倍、更优选地小于基线约两倍时发生。总体上,抗凝血逆转的程度和持续时间由医师或兽医来确定。

[0200] 如本文使用,“有需要的受试者”是其中指示急性或规划逆转抗凝血的受试者,例如,遭受抗凝血剂过量用药的受试者、遭受出血(例如,创伤诱导出血或GI道或别处的自发出血)的受试者、需要规划外科手术的受试者、经历需要活检的侵入或非侵入程序的受试者、经历其中如果受试者保持抗凝血,那么程序误差可能冒出血的风险的程序的受试者、需要脊柱或硬膜外麻醉的受试者。“有需要的受试者”可为其中直接因子抑制剂(因子Xa、因子IIa和/或抗凝血酶)的存在产生或可能产生出血效应的患者。因此,“有需要的受试者”可为接受抗凝血疗法的受试者(例如,接受肝素、LMWH、因子IIa抑制剂或因子Xa抑制剂的受试者),以用于例如中风预防、心脏手术和诊断程序、心律失常、深静脉血栓形成(DVT)预防、肺栓塞、形成病理血液凝块的一般预防。

[0201] 如本文使用,“有需要的受试者”是动物。“有需要的受试者”包括不限于人、小鼠、大鼠、豚鼠、犬、猫、马、牛、猪、猴、黑猩猩、狒狒或恒河猴。在一个实施方案中,“有需要的受试者”是哺乳动物。在另一个实施方案中,“有需要的受试者”是人。

[0202] 如本文使用,“治疗有效量”是指抗凝血逆转剂(例如,本文描述的本发明的化合物)的量,其在单一或多个剂量施用(例如,推注和/或维持剂量)至受试者后可有效地中和或抑制(完全或部分地逆转)凝血抑制剂的抗凝血效应或促进凝血。

[0203] 在一方面,治疗有效量是以重量计在抗凝血剂剂量0.01与10,000倍之间的抗凝血

逆转剂的剂量。在另一方面,抗凝血逆转剂以抗凝血逆转剂与抗凝血剂的约1:1与1000:1之间的剂量质量比来施用,例如,100:1的抗凝血逆转剂与抗凝血剂,如10:1的抗凝血逆转剂与抗凝血剂。在本发明方法的一个实施方案中,治疗有效量的抗凝血逆转剂可通过皮下、肌肉内或静脉内施用途径来施用。举例来说,它可静脉内以无菌溶液形式来施用。在另一个实施方案中,治疗有效量的抗凝血逆转剂通过口腔、鼻腔或肺部途径施用,或施用至粘膜区域(嘴、直肠或阴道)。

[0204] 抗凝血逆转剂(即,本发明的化合物)的治疗有效量通常在约0.001mg/kg至约1g/kg体重/天的范围内;在另一个实施方案中,在约0.01mg/kg至约600mg/kg体重/天的范围内;在另一个实施方案中,在约0.01mg/kg至约250mg/kg体重/天的范围内;在另一个实施方案中,在约0.01mg/kg至约400mg/kg体重/天的范围内;在另一个实施方案中,在约0.01mg/kg至约200mg/kg体重/天的范围内;在另一个实施方案中,在约0.01mg/kg至约100mg/kg体重/天的范围内;在一个实施方案中,在约0.01mg/kg至约25mg/kg体重/天的范围内;在另一个实施方案中,在约0.1mg/kg至约10mg/kg体重/天的范围内;在另一个实施方案中,在约0.001mg/kg至约100mg/kg体重/天的范围内;在另一个实施方案中,在约0.001mg/kg至约10mg/kg体重/天的范围内;和在另一个实施方案中,在约0.001mg/kg至约1mg/kg体重/天的范围内。标准凝血测定(如本文描述的那些)和其它体外测定可用于确定治疗有效量。

[0205] 在本发明的一些方面,本发明的化合物可与至少一种额外的治疗剂共同施用。在一个实施方案中,所述至少一种额外治疗剂可为维生素K,其通常用于校正由华法林化合物(warfarin compound)诱导的凝血缺陷。

[0206] 本发明还提供用于确定血液中的抗凝血剂浓度的诊断测定。如以下实施例13所示,使用510k-清除抗-因子Xa发色测定,DAP离体在人血浆中展示逆转利伐沙班的剂量响应趋势。因此,本发明的化合物,例如,DAP,可用于诊断测定中以确定血液中的抗凝血剂,例如,因子Xa抑制剂的浓度。在这类测定中,本发明的化合物,例如,DAP,可结合当前可获得试剂盒试剂使用或作为替换存在于当前可获得试剂盒中的合成因子的直接结合底物。在一个实施方案中,诊断测定可包括本发明的化合物(例如,DAP)作为结合底物,其中本发明的化合物结合血液样品中的抗凝血剂,并且将凝血因子(例如,因子Xa)的残余活性量化以确定样品中的抗凝血剂浓度。在另一个实施方案中,诊断测定可包括偶联至磁性微粒的本发明的化合物(例如,DAP),其中本发明的化合物可结合血液样品中的抗凝血剂以便从样品中移除抗凝血剂或将它浓缩。本发明的基于DAP的发色或医疗点测定可帮助确定受试者的抗凝血剂水平,这是当前重大的临床未满足的需求,因为当前诊断不能以高精度来确定直接抑制剂的血液浓度。

[0207] 另外,本发明提供测定,例如,发色测定,以确定逆转存在于血液中的抗凝血剂所需要的本发明的化合物,例如,DAP的浓度。在一个实施方案中,测定使用DAP作为各种抗凝血剂的直接结合剂。

[0208] 本发明还提供测定,例如,发色测定,以确定血液中的本发明的化合物,例如,DAP的量。这类测定可利用预定浓度的抗凝血剂。

[0209] 本发明还提供诊断试剂盒,其并入本文以上描述的诊断测定。因此,在一个实施方案中,试剂盒用于确定血液中的抗凝血剂浓度。试剂盒可含有其它组分、包装、指令、试剂和/或其它材料以帮助确定抗凝血剂(例如,因子Xa抑制剂)或DAP浓度并且帮助使用试剂

盒。另外,试剂盒可用于确定是否存在华法林与另一种抗凝血剂的组合,因为华法林不受本发明的化合物影响,而其它抗凝血剂将被逆转。

[0210] 如以下实施例展示,本发明的化合物(例如,DAP)能够结合肝素,使它在体内失活。因此,除了其对于凝血的效应以外,本发明的化合物还可用于使组织丧失肝素的生物化学活性。举例来说,其它肝素结合分子证明减少成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)、血管内皮生长因子(VEGF)和其它肝素结合生长因子的能力。VEGF和FGF丧失表明适用于抗癌疗法,使得本发明的化合物成为用于治疗癌症的可能候选物。因此,在一方面,本发明提供用于治疗、预防或改善受试者的癌症的方法,包括向受试者施用治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐。

[0211] 如实施例中展示,一种本发明化合物,DAP,在体外结合**XARELTO®**、**ELIQUIS®**、**ARIXTRA®**和LMWH,如通过动态光散射(DLS)来测量。DAP在体内逆转皮下施用的**ARIXTRA®**和LMWH。DAP在体内逆转**XARELTO®**、**ELIQUIS®**、**PRADAXA®**、**LIXIANA®**、未分级肝素和贝米肝素。以100mg/kg、250mg/kg和400mg/kg剂量在大鼠中静脉内施用的DAP不显示有害作用。DAP在大鼠中口服生物利用。DAP不展示人ERG结合,不抑制或充当CYP酶的底物,并且不明显结合任何血浆蛋白质(数据未显示)。另外,似乎DAP具有较短消除半衰期,因为在大鼠中静脉内施用单次剂量DAP之后,由**PRADAXA®**诱导的抗凝血在20-30分钟内恢复。此外,DAP对于灭菌稳定(经受得住加热至200℃)并且在4℃下以冻干粉末形式存储一年以上。DAP的抗凝血逆转的概述呈现于表2。

[0212] 表2:抗凝血逆转

[0213]

商品名称	通用名称	公司	所抑制的血液因子	施用途径	结 合 DAP	逆转剂
Lovenox® Hibor®	依诺肝素 贝米肝素	Sanofi, Sandoz/ Momenta, Rovi	约 80-90% Xa, 约 10-20% IIa	皮下注射	X	鱼精蛋白 * & DAP
Arixtra®	磺达肝癸	GSK	Xa	皮下注射	X	DAP
Eliquis®	阿哌沙班	Pfizer, BMS	Xa	口服	X	DAP
Xarelto®	利伐沙班	Bayer, Janssen, J&J	Xa	口服	X	DAP
Argatroban®	阿加曲班	GSK	IIa	皮下注射	--	无
Pradaxa®	达比加群酯	Boehringer Ingelheim	IIa	口服	X	DAP

[0214] *鱼精蛋白部分地逆转低分子量肝素。

[0215] 表3:体外体内关系

[0216]

药物通用名称	DLS 结合摩尔比 [DAP/药物]	逆转摩尔比 [DAP/药物]	体内测量	所抑制的血液因子	施用途径
利伐沙班	9	3*	出血测定	Xa	口服
阿哌沙班	10	8*	出血测定	Xa	口服
磺达肝癸	3	130	Xa 试剂盒	Xa	皮下注射
贝米肝素	7	140	aPTT	约 80-90% Xa, 约 10-20% I Ia	皮下注射
阿加曲班	N/A	N/A	aPTT	I Ia	皮下注射

[0217] 假定利伐沙班的口服生物利用率是60%，阿哌沙班是50%，并且达比加群是5%；假定可注射抗凝血剂的生物利用率是100%。

[0218] 用DAP治疗的体外-体内关系的概述呈现于表3。计算DLS结合摩尔比，方法是将显示显著结合的DAP与抗凝血剂的最低质量比除以DAP与抗凝血剂的分子量比率，所述结合定义为超过50nm视直径的在磷酸缓冲盐水中的缔合。用于计算的分子量是512Da(DAP)、436Da(利伐沙班)、460Da(阿哌沙班)、1.7kDa(磺达肝癸)、3.6kDa(贝米肝素)、628Da(达比加群)和509Da(**ARGATROBAN®**)。类似地使用实现如大鼠尾横断出血测定、发色抗-Xa试剂盒或活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)所测量的逆转所需要的DAP的最小体内逆转剂量来计算逆转摩尔比。对于出血测定，如果在尾横断之后，在切除尾浸没于室温盐水中的情况下，在30分钟时段内的失血在对照(不施用抗凝血剂)的25%内，那么认为抗凝血剂得到逆转。如通过Xa试剂盒所测量，在使得有效抗凝血剂浓度低于用于抗凝血的最小有效浓度(MEC)时，实现逆转。如通过aPTT所测量，当抗凝血大鼠aPTT返回至基线的10%内时，认为实现逆转。在磺达肝癸的情况下，虽然200mg/kg DAP是体内施用的最低剂量，但是体外数据指示显著较低逆转剂量是可能的。

[0219] 在本申请中通篇叙述的所有参考文献、专利申请和专利的全部内容通过引用并入本文。

实施例

[0220] 本发明进一步在以下非限制性实施例中说明。陈述这些实施例以帮助理解本发明但是不旨在并且不应理解为以任何方式限制其范围。实施例不包括本领域普通技术人员熟知的常规方法的详细说明。

[0221] 实施例1:二精氨酸哌嗪(“DAP”)的体外稳定性试验

[0222] 材料和方法

[0223] DAP的醋酸盐如本文描述来制备。如在这些实施例中描述，DAP固体或粉末是指醋酸盐，而溶液中的DAP是指当盐在水溶液中电离时的游离碱。如在这些实施例中描述，所使用的DAP化合物是式VII的化合物。

[0224] DAP粉末以两种方法来测试热稳定性。在使用之前,DAP在4℃下存储7月。另外,DAP固体通过差示扫描量热法(DSC)通过从-20℃加热至200℃,回到-20℃并且再次加热至200℃来测试。

[0225] 结果

[0226] DAP粉末在4℃下稳定超过12个月。DSC的结果显示于图1。第二加热(“2”)显示与第一加热(“1”)类似的热行为,指示DAP经受得住重复加热至200℃。此发现结果指示DAP能够经受得住加热至高于灭菌所需要的温度。

[0227] 实施例2:DAP结合至肝素和LMWH

[0228] 材料和方法

[0229] 动态光散射(DLS)用于评估在水中单独或与100mg/ml DAP组合的1mg/ml未分级肝素与1mg/ml贝米肝素(LMWH;**HIBOR®**)的缔合(DAP与肝素或LMWH的质量比率为100:1)。

[0230] 结果

[0231] DAP在水中与未分级肝素(图2)和LMWH(未显示)物理上缔合以形成增加视直径的物理缔合。当DAP溶液与LMWH或未分级肝素溶液混合时,由于其物理相互作用而使其形成微粒,支持DAP可通过与这些分子物理上缔合来逆转肝素和LMWH抗凝血的理论。

[0232] 实施例3:如通过DLS测量的DAP结合至抗凝血剂。

[0233] 材料和方法

[0234] 将单独利伐沙班(**XARELTO®**)、单独DAP和1:1和10:1质量比率的DAP:利伐沙班组合添加至水溶液并且通过动态光散射(DLS)分析以评估DAP与利伐沙班的缔合。对单独阿哌沙班(**ELIQUIS®**)、单独DAP和1:1、10:1和100:1质量比率的DAP:阿哌沙班组合进行类似的实验。类似地测试单独磺达肝癸(**ARIXTRA®**)、单独DAP和1:1、10:1和100:1质量比率的磺达肝癸:DAP组合。也测试单独LMWH(贝米肝素;**HIBOR®**)、单独DAP和1:1、10:1和100:1质量比率的LMWH:DAP组合。所测试的LMWH的浓度是0.1mg/ml。因此,在1:1下,测试0.1mg/ml DAP,在10:1下,测试1mg/ml,并且在100:1下,测试10mg/ml DAP。

[0235] 另外,测试单独达比加群、单独DAP和1:1、10:1、100:1、1,000:1和10,000:1DAP质量比率的达比加群:DAP组合。最后,测试单独**ARGATROBAN®**、单独DAP或1:1、10:1、100:1和1,000:1质量比率的阿加曲班:DAP组合。

[0236] 结果

[0237] 结果显示于图3涉及利伐沙班;图4涉及阿哌沙班;图5涉及磺达肝癸(**ARIXTRA®**),图6涉及LMWH;并且图7涉及阿加曲班。每个图显示代表水溶液中的单独DAP和抗凝血剂的个别峰。当抗凝血剂与DAP在足够高质量比率下混合时,观察到尺寸变化。在此测定中,尺寸的甚至轻微增加指示两者之间的物理相互作用;然而,只视直径的显著偏移用于评估体外体内关系。视直径是相互作用程度的度量。

[0238] 实施例4:DAP逆转体内LMWH抗凝血

[0239] 材料和方法

[0240] 通过皮下注射对称量470g的雄性白化鼠施用10mg贝米肝素(过量LMWH)。aPTT时间在五个小时过程中测量。LMWH施用之后四小时,大鼠接受200mg/kg DAP(100mg DAP)的静脉

内剂量。

[0241] 结果

[0242] 施用LMWH后,在四个小时过程内,aPTT从53秒上升至246秒。静脉内施用200mg/kg DAP(100mgDAP)使得在60分钟内,aPTT时间低于基线(图8)。

[0243] 实施例5:DAP逆转体内达比加群(**PRADAXA®**)抗凝血;过量用药研究

[0244] 材料和方法

[0245] 对称量430g的雄性白化鼠通过灌胃来施用40mg/kg **PRADAXA®** (20mg **PRADAXA®**;过量的**PRADAXA®**)。

[0246] **PRADAXA®**治疗大约2小时后,将200mg/kg DAP(100mg DAP)以静脉内推注来施用。大约2小时后,向大鼠施用100mg/kg DAP(50mgDAP)的剂量。再过一小时,向大鼠施用另一剂量的100mg/kg DAP(50mg DAP)。aPTT在整个治疗过程中测量。

[0247] 结果

[0248] 结果显示于图9和13。施用**PRADAXA®**之后2小时,aPTT从43秒上升至81秒,显示显著抗凝血。100mg DAP以静脉内推注形式来施用,使得在25分钟内,aPTT降至低于基线。2小时后,aPTT已上升回到79秒并且向大鼠施用50mg DAP剂量。在30分钟内,使aPTT降至低于基线。在这两次,在DAP施用之后60分钟内,aPTT水平返回至高于基线。在第二剂量DAP之后,aPTT上升至53秒。静脉内施用第三剂量的DAP,100mg/kg DAP(50mg DAP),并且aPTT在20分钟内降至基线。图13显示类似实验,其中在施用15.5mg/kg**PRADAXA®**之后,aPTT在开始100mg/kg DAP治疗约30分钟内返回正常。

[0249] 实施例6:DAP逆转体内未分级肝素(“UFH”)抗凝血。

[0250] 材料和方法

[0251] 通过皮下注射,对称量515g的雄性白化鼠施用10mg/kg的未分级肝素(5mg UFH)。

[0252] 在UFH施用之后,200mg/kg DAP(100mg DAP)以两次静脉内推注形式来施用。随后,向大鼠施用400mg/kg DAP(200mg DAP)剂量。aPTT在整个治疗过程测量。

[0253] 结果

[0254] 如图10所显示,在施用肝素之后一个小时过程中,aPTT时间从28秒显著上升至102秒。静脉内施用100mg DAP并且这使得aPTT时间在20分钟内达到48秒。在1小时内,aPTT上升至120秒,然后再静脉内施用100mg DAP。在15分钟后,aPTT降低至47秒。在1小时内,aPTT上升至96秒,然后静脉内施用200mg剂量的DAP。10分钟之后,aPTT降至33秒。

[0255] 实施例7:DAP逆转体内利伐沙班(**XARELTO®**)抗凝血

[0256] 材料和方法

[0257] 将5mg/kg的利伐沙班(**XARELTO®**)口服施用至大鼠。四个小时之后,静脉内施用5mg/kg DAP(2mg DAP)。在施用DAP之前零、15、30、45、60和240分钟,测量aPTT。在DAP施用之后约5、10、25、35、45、60、120和240分钟,再次测量aPTT。

[0258] 结果

[0259] 结果显示于图11。在大鼠体内,DAP有效地逆转利伐沙班(**XARELTO®**)抗凝血。

[0260] 实施例8: DAP逆转体内磺达肝癸(**ARIXTRA®**)抗凝血。

[0261] 材料和方法

[0262] 将5mg/kg磺达肝癸皮下施用至大鼠。2小时之后, 静脉内施用200mg/kg DAP。在DAP施用之后10、20、30和60分钟, 活性通过发色510k清除因子Xa测定(Biophen)来测量。

[0263] 结果

[0264] 图12显示在施用10分钟内, 磺达肝癸抗凝血的DAP介导的逆转。

[0265] 实施例9: 静脉内DAP不影响aPTT

[0266] 材料和方法

[0267] 将0、2、10、25、50或100mg DAP静脉内施用至雄性、重量匹配CD大鼠并且测量aPTT。

[0268] 结果

[0269] 图16显示的结果证明不存在抗凝血剂的情况下, 静脉内施用的DAP不以剂量依赖性方式来影响aPTT。误差线代表在90分钟内取平均值的来自七次aPTT测量的标准误差。

[0270] 实施例10: 在大鼠尾部横断模型中DAP逆转抗凝血。

[0271] 材料和方法

[0272] 三只大鼠分别施用2mg利伐沙班。一只大鼠接受不含有DAP的假逆转, 第二只接受2.5mg DAP, 并且第三只接受12.5mg DAP。第四只大鼠接受假抗凝血剂和逆转剂量(“假”)。逆转剂量之后20分钟, 将尾在距尖端1mm处横断, 安置于室温盐水中, 并且收集失血30分钟, 然后称重。

[0273] 相同程序用于单独或与5或12.5mg DAP组合的1.25mg阿哌沙班(**ELIQUIS®**); 用于单独或与5或12.5mg DAP组合的15.5mg达比加群酯(**PRADAXA®**); 并且用于单独或与12.5mg DAP组合的5mg依杜沙班(**LIXIANA®**)。

[0274] 结果

[0275] 结果显示于图15涉及利伐沙班, 图16涉及阿哌沙班, 图17涉及依杜沙班, 并且图18涉及达比加群酯。大鼠尾横断出血测定类似于其中需要急性抗凝血剂逆转的临床情况。结果表明DAP有效地逆转抗凝血活性, 导致与只接受抗凝血剂的大鼠相比, 失血统计上显著减少。

[0276] 实施例11: 在新鲜抽取人血液中, DAP逆转离体利伐沙班(**XARELTO®**)抗凝血。

[0277] 材料和方法

[0278] 人血液从志愿者抽取。单独或与50μg/ml DAP组合, 添加0.25μg/ml利伐沙班。对照包含50μg/ml DAP或盐水。aPTT在血液收集2分钟内测量。

[0279] 结果

[0280] 图19显示施用DAP导致逆转新鲜抽取人血液中的利伐沙班诱导的抗凝血, 如通过aPTT所测量。误差线代表来自三次独立实验的标准误差。

[0281] 实施例12: 在人血浆中DAP逆转离体利伐沙班和阿哌沙班抗凝血

[0282] 材料和方法

[0283] 分别在存在或不存在1,250μg/L或6,250μg/L DAP的情况下, 将218μg/L或459μg/L利伐沙班添加至人血浆。类似地, 分别在存在或不存在1,156μg/L或3,125μg/L DAP的情况下, 将156μg/L或313μg/L阿哌沙班添加至人血浆。对抗凝血的DAP效应通过510k清除

Biophen抗-因子Xa发色测定来测量。利伐沙班浓度通过与血浆校准标准比较来确定,而当校准标准仍不可获得时,阿哌沙班浓度从储备溶液稀释液来推断。

[0284] 结果

[0285] 对于两种浓度的利伐沙班和阿哌沙班,DAP使有效抗凝血剂浓度返回至低于最小有效浓度。图20显示利伐沙班的结果并且图21显示阿哌沙班的结果。

[0286] 实施例13:DAP剂量依赖性逆转离体人血浆中的利伐沙班抗凝血

[0287] 材料和方法

[0288] 将218 μ g/L利伐沙班单独或与1.25、12.5、125或1,250 μ g/L DAP组合来添加至人血浆。因子Xa活性通过510k清除Biophen抗-Xa发色测定试剂盒来测量。利伐沙班浓度通过与血浆校准标准比较来确定。

[0289] 结果

[0290] 图22显示DAP在剂量依赖性逆转人血浆中的利伐沙班抗凝血方面是有效的,如通过其对于利伐沙班浓度的效应所证明(通过因子Xa活性测定来测量)。

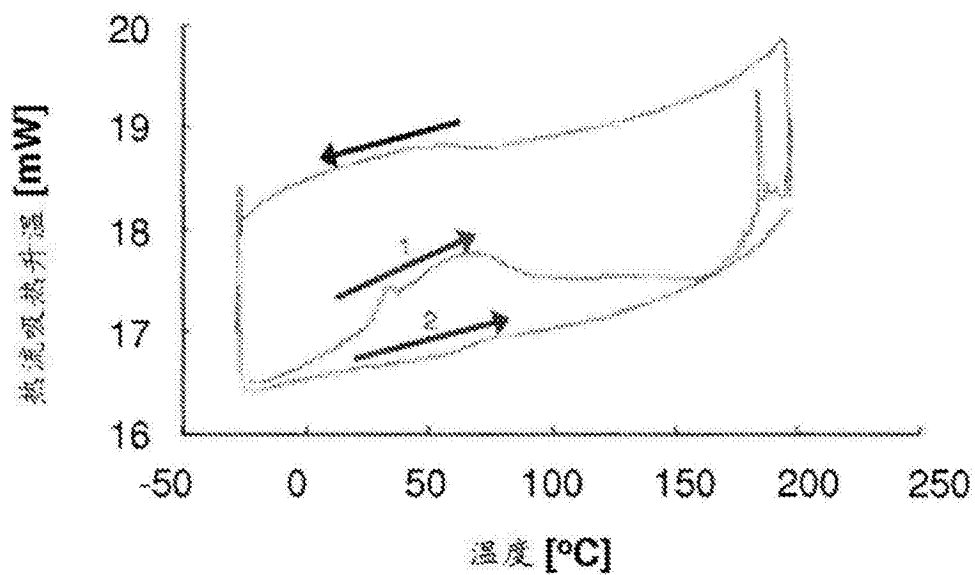


图1

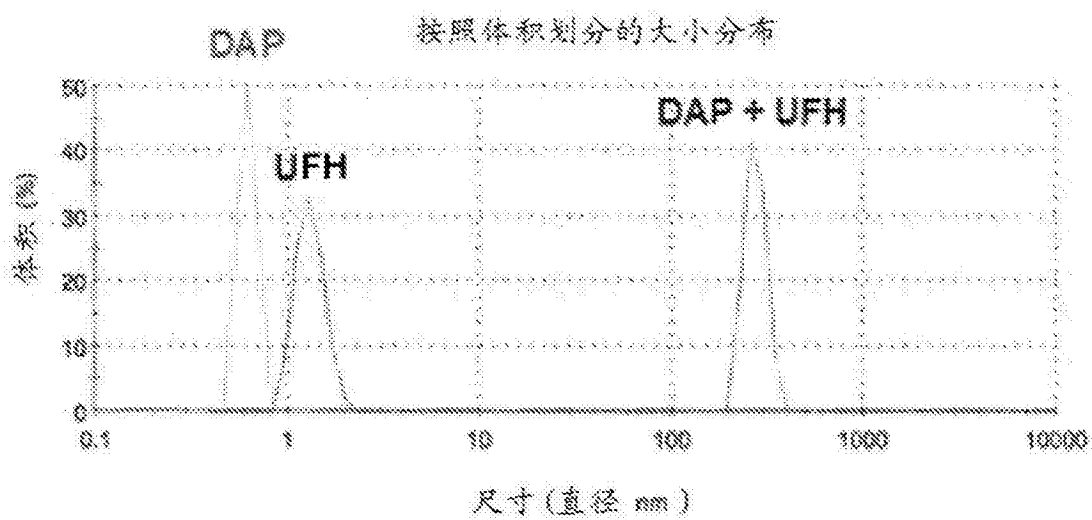


图2

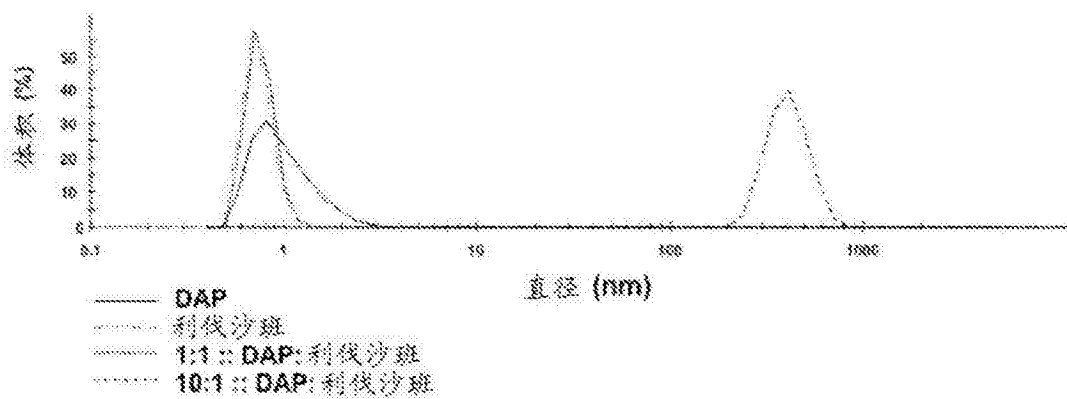


图3

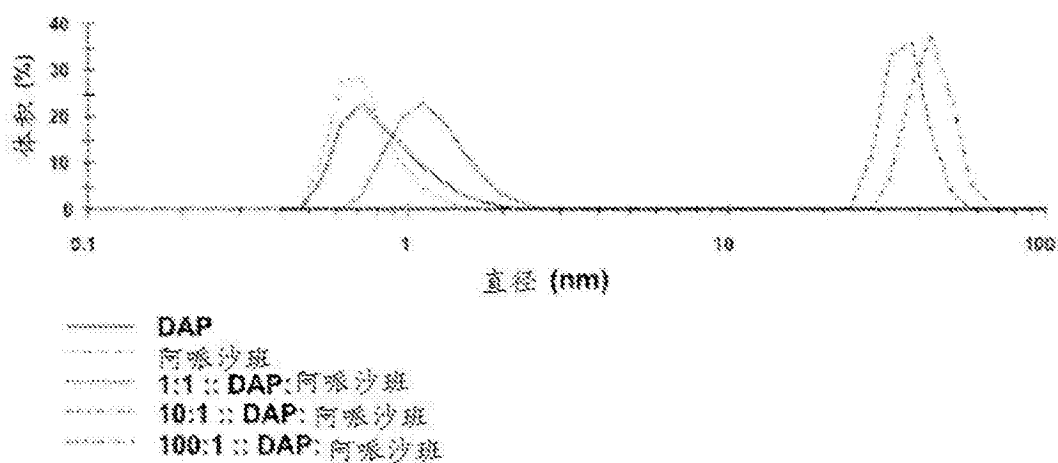


图4

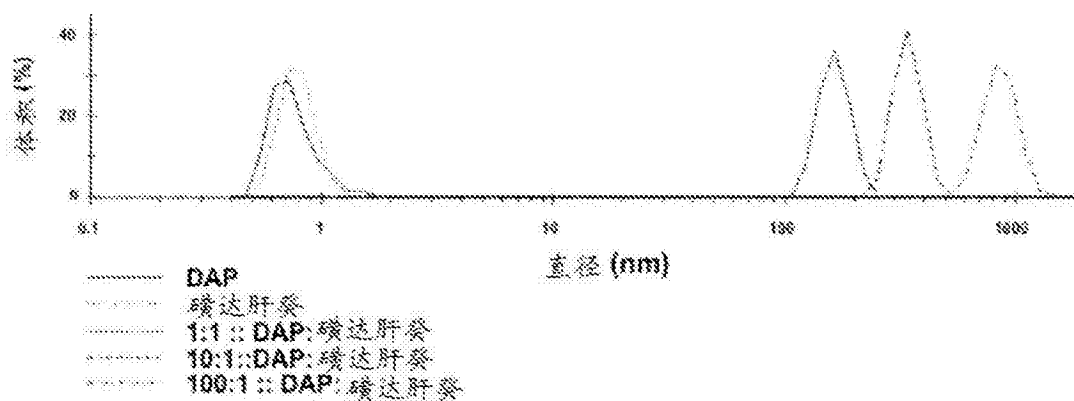


图5

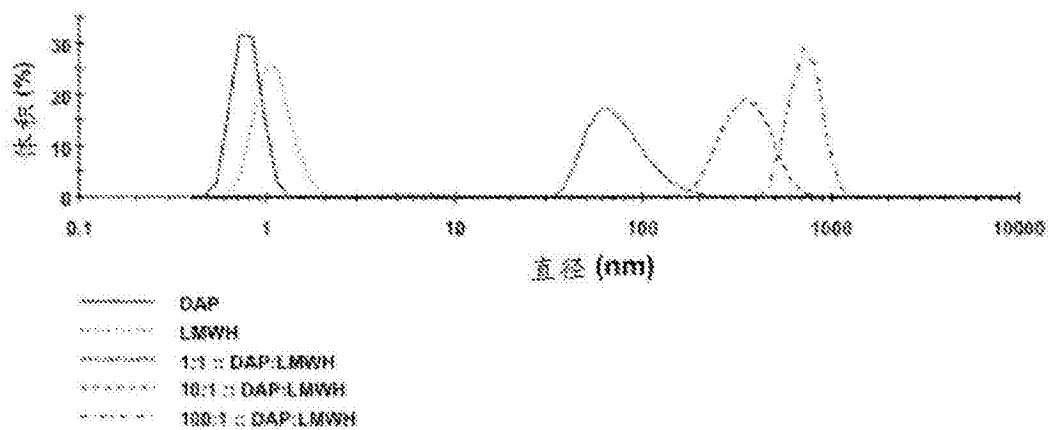


图6

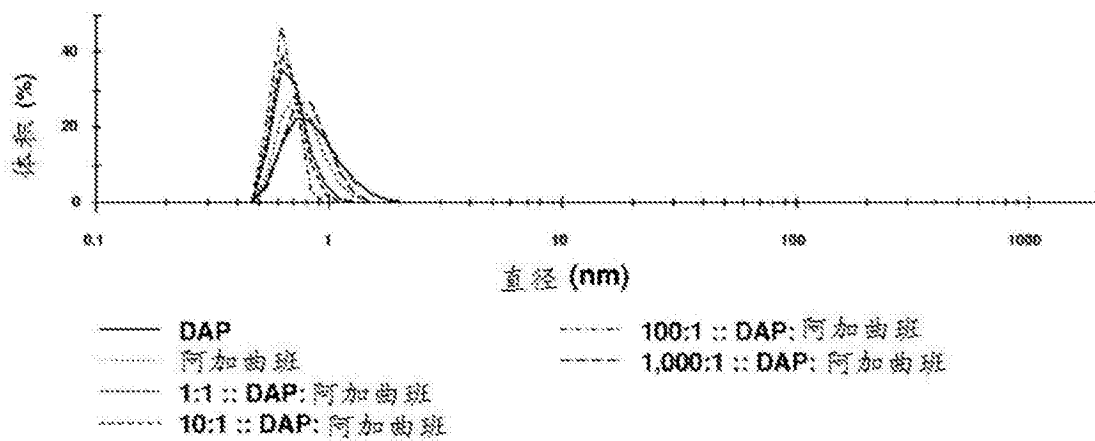


图7

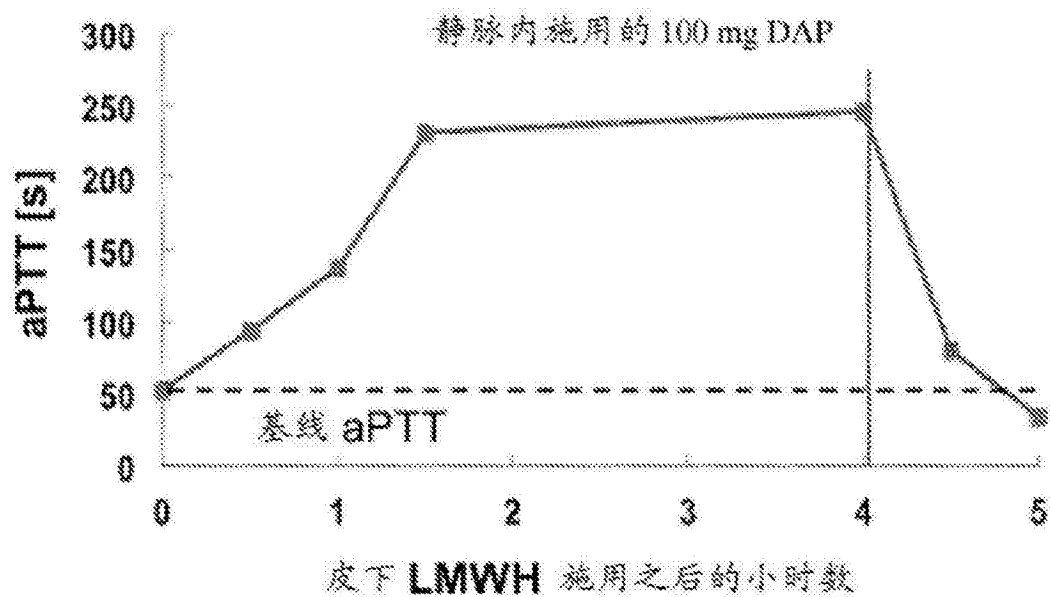


图8

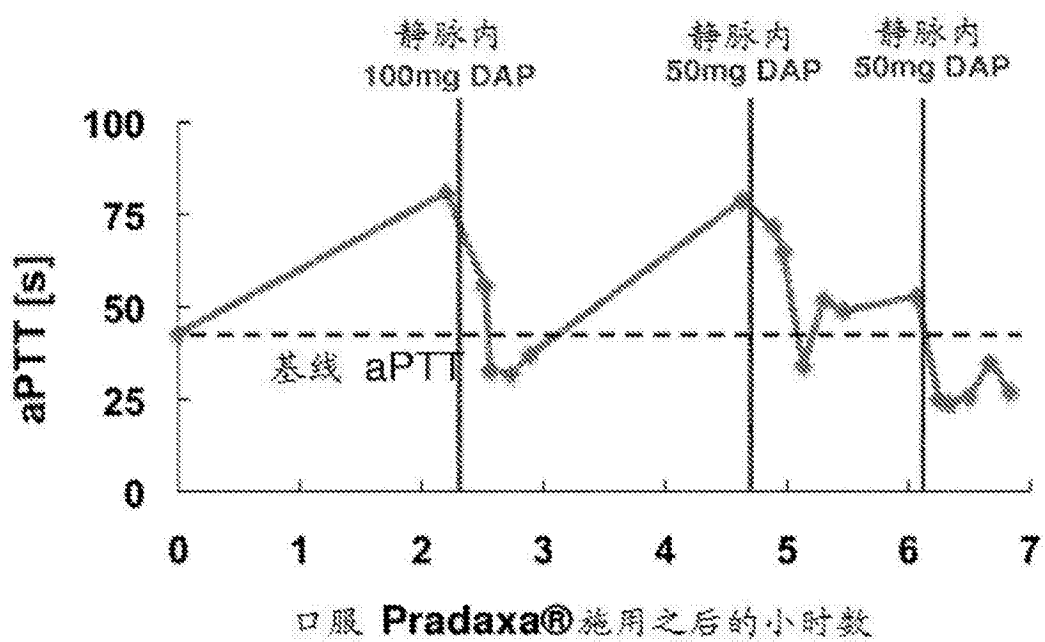


图9

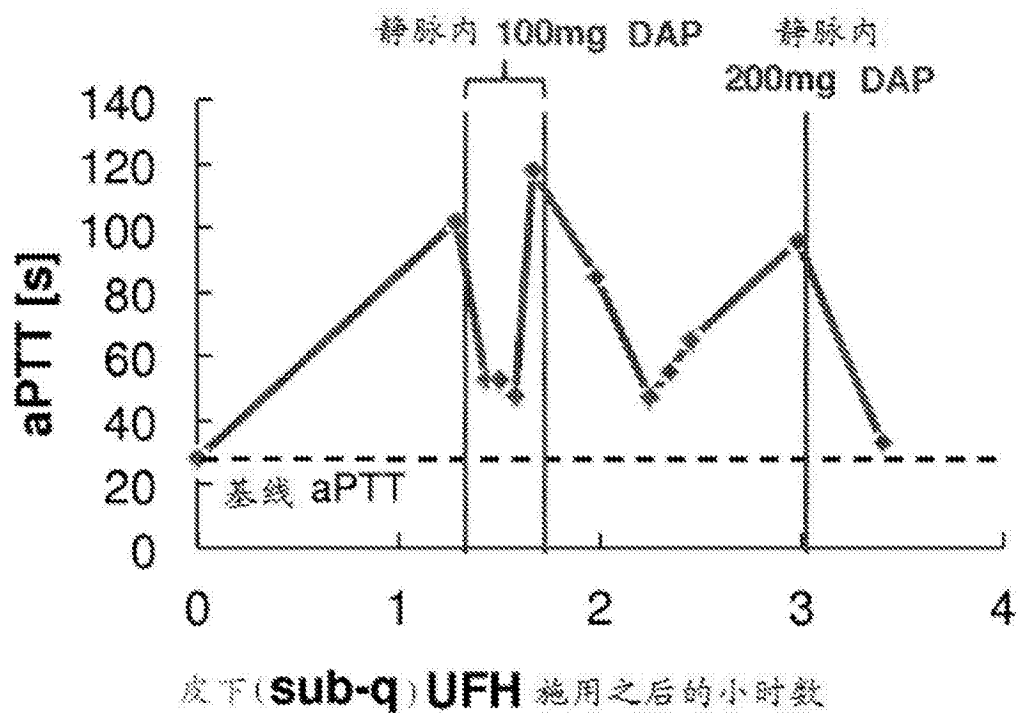


图10

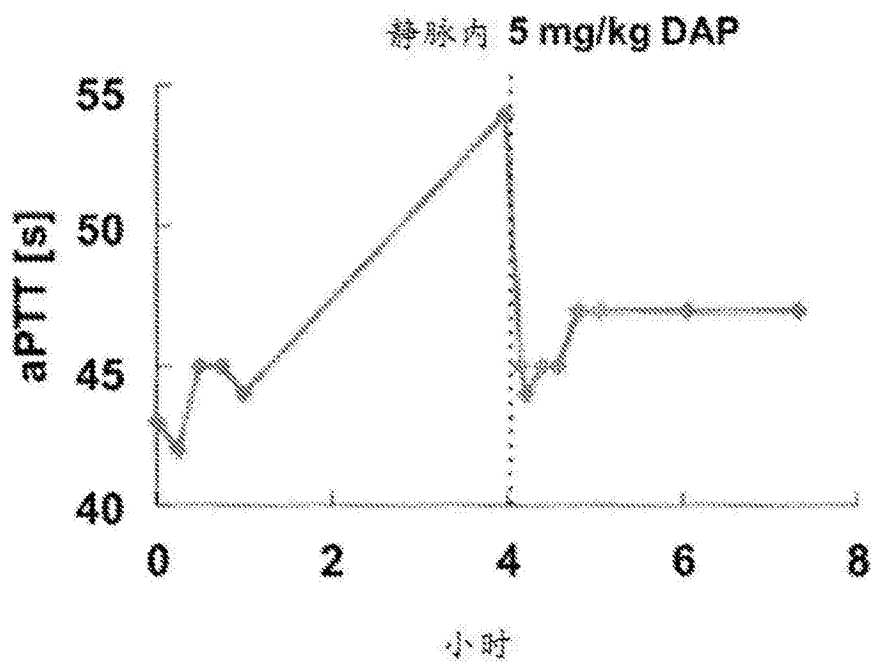


图11

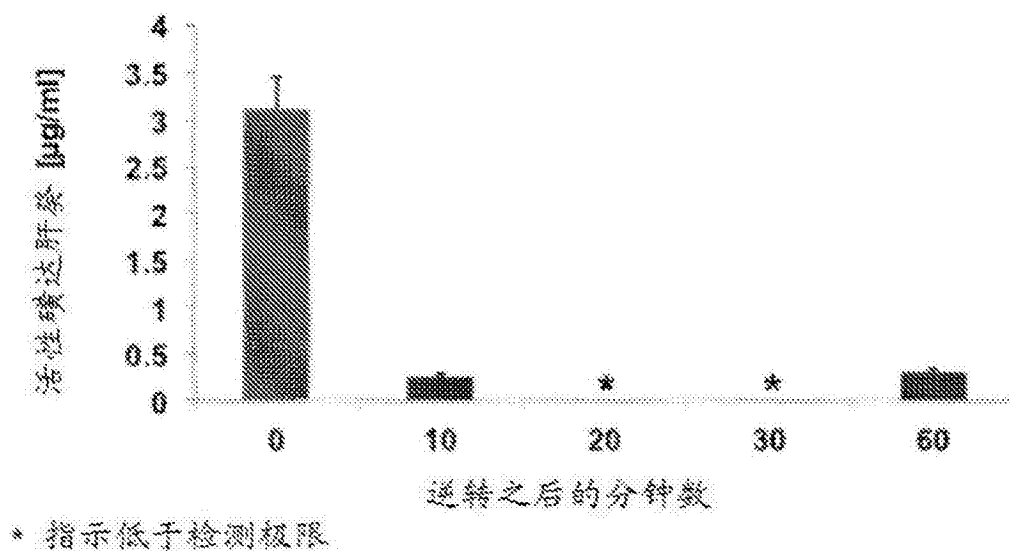


图12

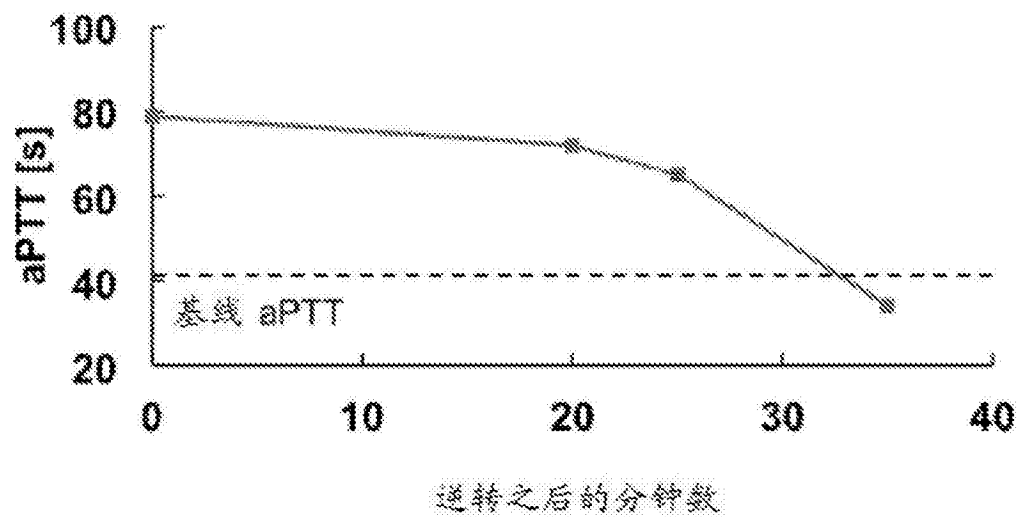


图13

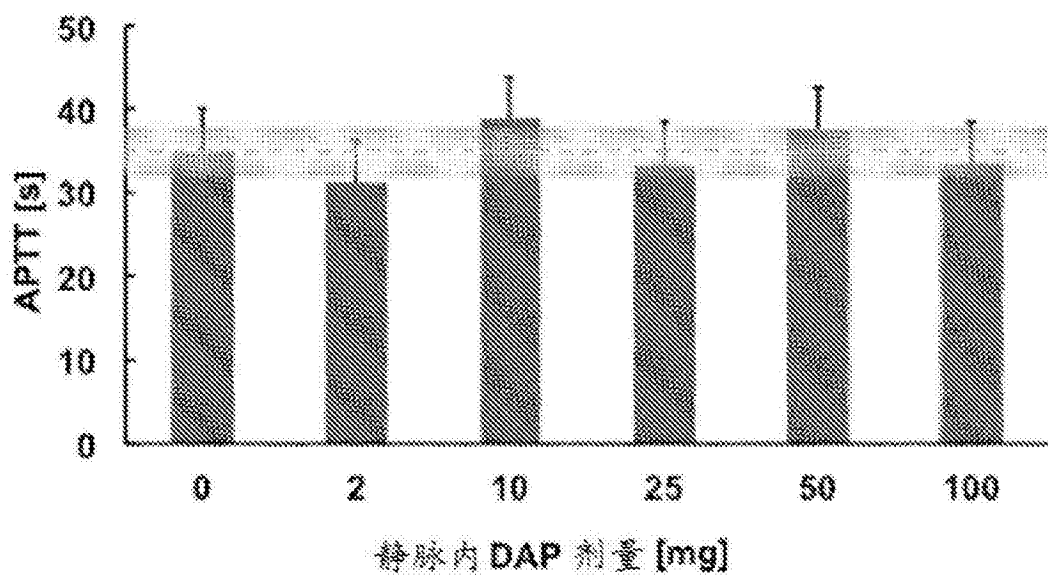


图14

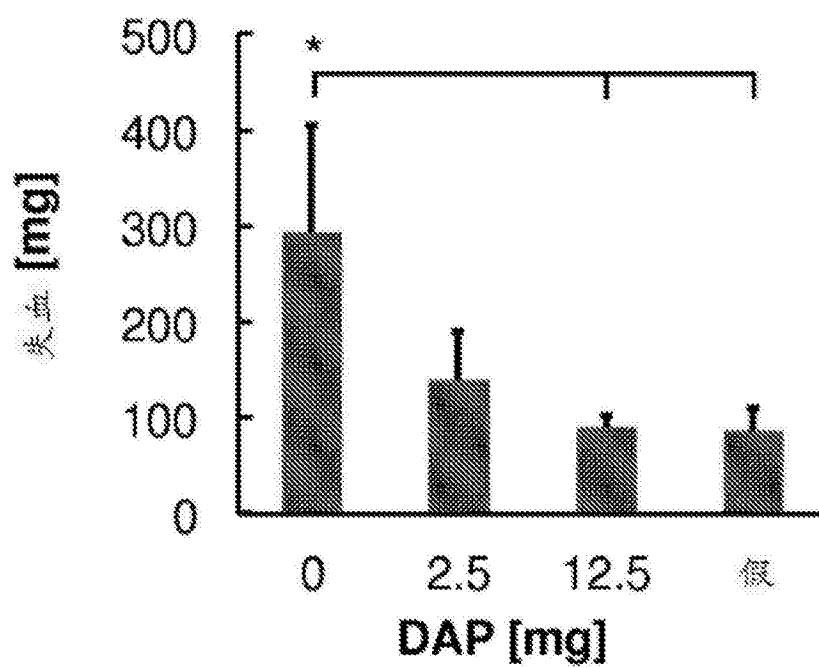


图15

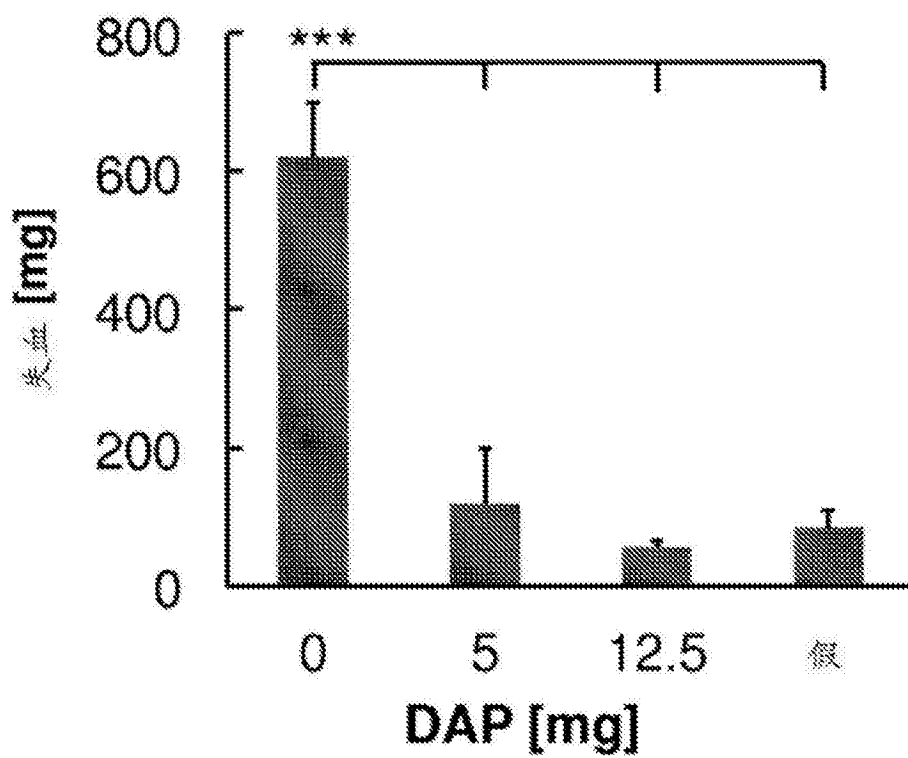


图16

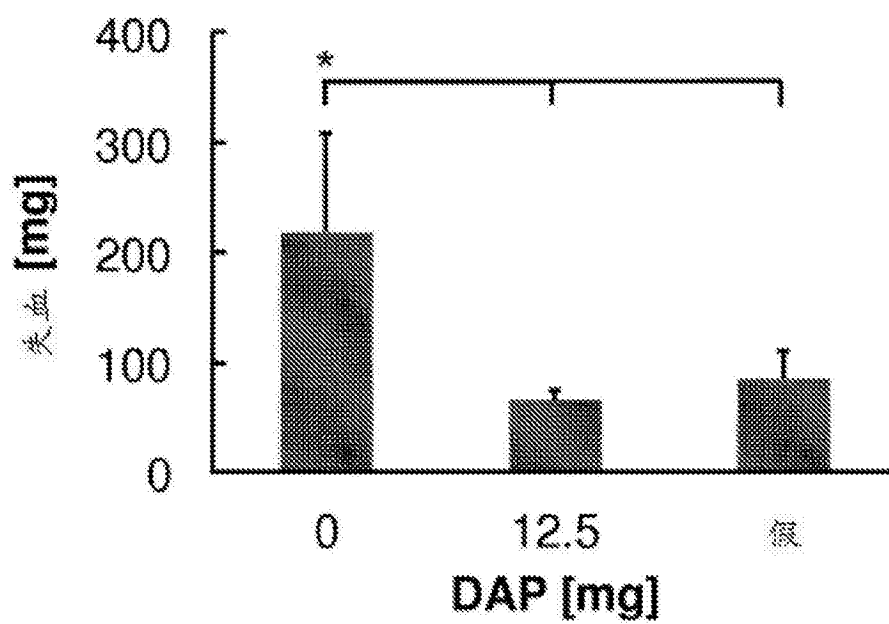


图17

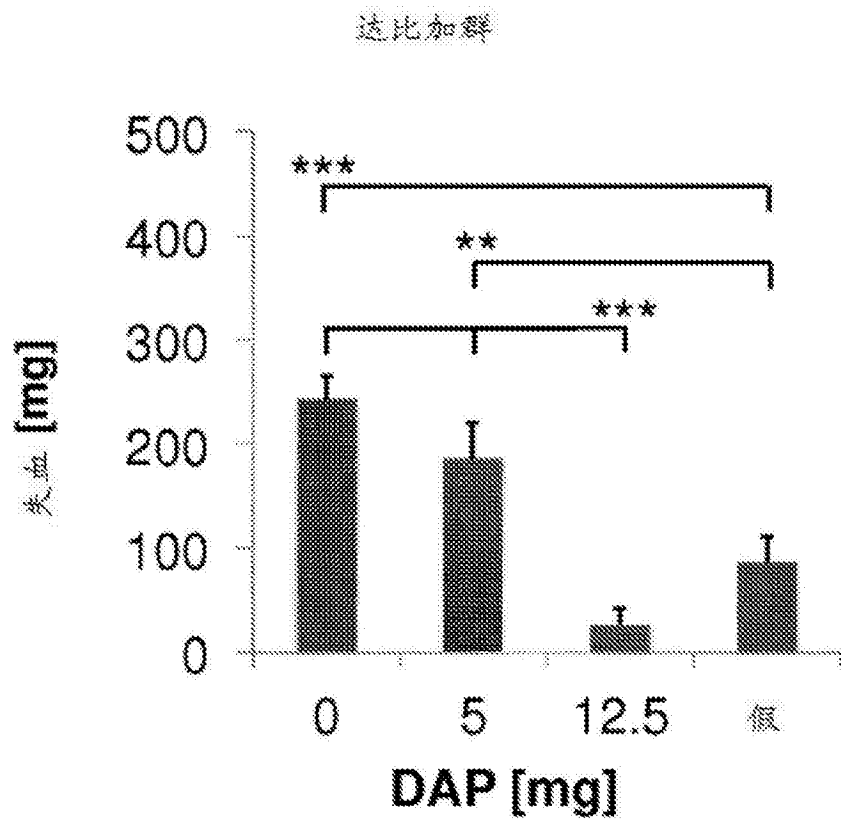


图18

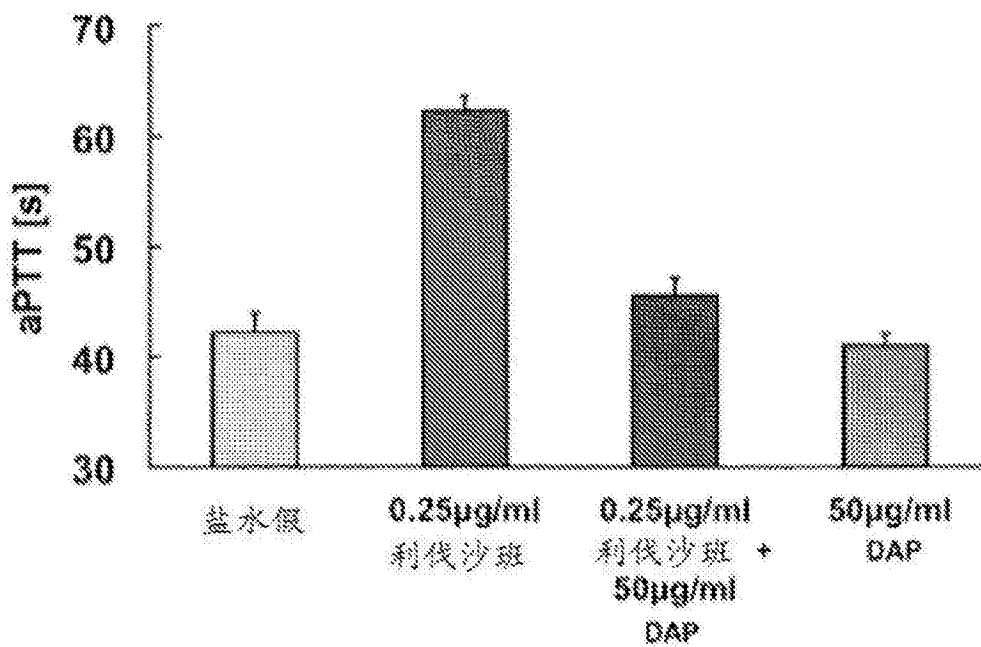


图19

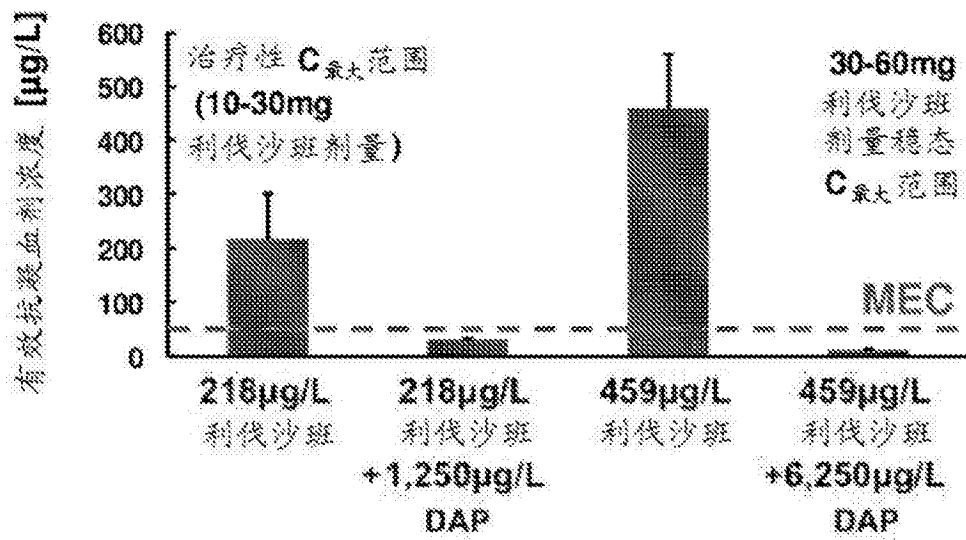


图20

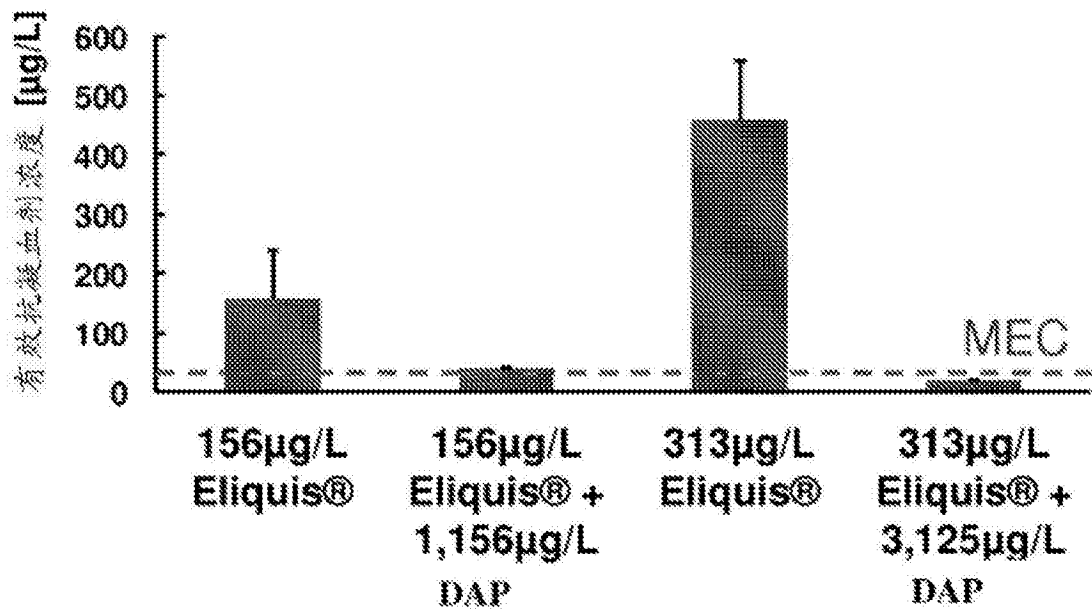


图21

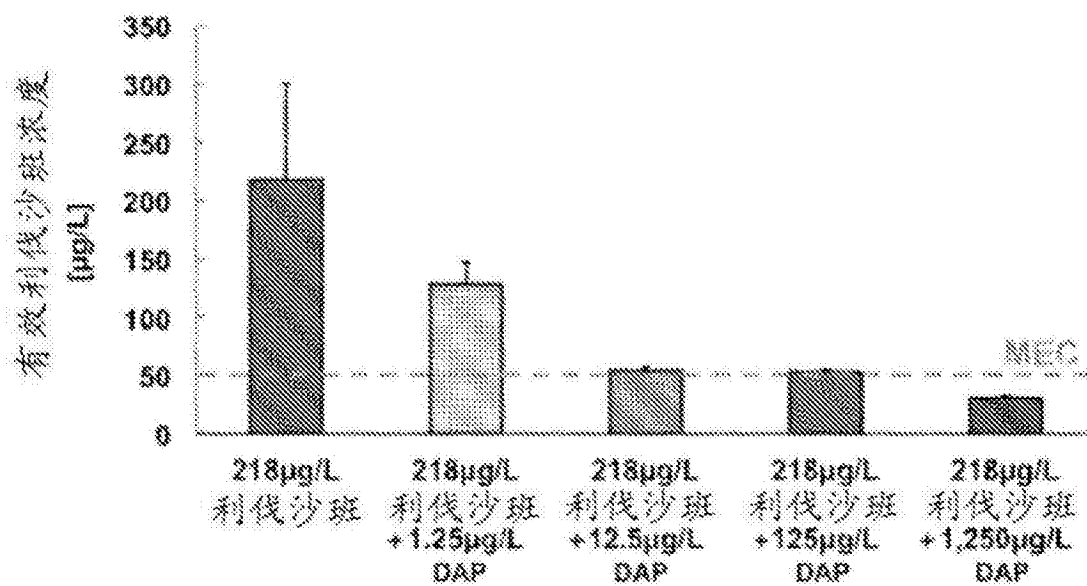


图22