

(11) Número de Publicação: **PT 2785700 E**

(51) Classificação Internacional:
C07D 241/04 (2016.01) **C07D 295/13** (2016.01)
A61K 31/495 (2016.01) **A61P 7/00** (2016.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2012.11.29	(73) Titular(es): PEROSPHERE, INC. 20 KENOSIA AVENUE DANBURY, CT 06810 US
(30) Prioridade(s): 2011.11.29 US 201161564559 P 2012.03.22 US 201261614292 P 2012.05.02 US 201261641698 P 2012.06.29 US 201261666291 P	(72) Inventor(es): SOLOMON S. STEINER US BRYAN E. LAULICHT US SASHA H. BAKHRU US EDITH MATHIOWITZ US
(43) Data de publicação do pedido: 2014.10.08	(74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2016.03.09 107/2016	

(54) Epígrafe: **AGENTES DE REVERSÃO DE ANTICOAGULANTES**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADOS NOVOS COMPOSTOS DE REVERSÃO DE ANTICOAGULANTES, BEM COMO MÉTODOS PARA FAZER OS COMPOSTOS, COMPOSIÇÕES FARMACOLÓGICAS CONTENDO OS COMPOSTOS, MÉTODOS PARA UTILIZAR OS COMPOSTOS PARA REVERTER OS EFEITOS ANTICOAGULANTES DE INIBIDORES DA COAGULAÇÃO, E ENSAIOS DE DIAGNÓSTICO QUE UTILIZAM OS COMPOSTOS.

RESUMO**"AGENTES DE REVERSÃO DE ANTICOAGULANTES"**

São divulgados novos compostos de reversão de anticoagulantes, bem como métodos para fazer os compostos, composições farmacológicas contendo os compostos, métodos para utilizar os compostos para reverter os efeitos anticoagulantes de inibidores da coagulação, e ensaios de diagnóstico que utilizam os compostos.

DESCRIÇÃO

"AGENTES DE REVERSÃO DE ANTICOAGULANTES"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção divulga compostos que revertem total ou parcialmente os efeitos anticoagulantes de inibidores da coagulação, tais como heparina não-fracionada ("UFH"), heparina de baixo peso molecular ("LMWH"), fondaparinux, e outros anticoagulantes que se ligam à anti-trombina, bem como inibidores diretos de Xa e IIa.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A cascata de coagulação é um processo fisiológico normal que se destina a impedir perdas de sangue significativas ou hemorragias na sequência de danos vasculares. Por vezes, contudo, um coágulo sanguíneo (trombo) pode formar-se quando não é necessário. Por exemplo, situações de alto risco, como doença aguda, imobilização prolongada, cirurgia, ou cancro, podem aumentar o risco de formação dum coágulo sanguíneo, que pode ter consequências importantes, tais como doença cardiovascular aterosclerótica e/ou anomalias nos ritmos cardíacos.

A cascata de coagulação consiste numa série de etapas em que uma protease cliva e posteriormente ativa a protease seguinte na sequência. Cada protease pode ativar várias moléculas da protease seguinte da série, amplificando esta cascata biológica. O resultado final destas reações é a conversão de fibrinogénio, uma proteína solúvel, em filamentos insolúveis de fibrina. Em conjunto com as

plaquetas, os filamentos de fibrina formam um coágulo sanguíneo estável.

A anti-trombina (AT), um inibidor de proteases de serina, é o principal inibidor plasmático de proteases de coagulação. A AT bloqueia a cascata de coagulação através de, por exemplo, a inibição da trombina (fator IIa) e do fator X ativado (fator Xa). A heparina (heparina não-fracionada) e heparinas de baixo peso molecular (LMWHs; heparina fracionada) inibem o processo de coagulação ligando-se à AT através de uma sequência de penta-sacarídeos. Esta ligação conduz a uma alteração conformacional da AT, que acelera a sua inibição dos fatores IIa, Xa, e outras proteases envolvidas na coagulação sanguínea. Uma vez dissociadas, a heparina e a LMWH ficam livres para se ligar a outra molécula de antitrombina e posteriormente inibir mais trombina e fator Xa.

A heparina não-fracionada é uma mistura de glicosaminoglicanos (GAGs) que, em 1916, McLean and Howell, na Universidade de Johns Hopkins, descobriram terem propriedades anticoagulantes em fígados de cães. Para além da sua capacidade anticoagulante, a heparina não-fracionada mostrou ter outras propriedades, incluindo anti-inflamatórias e angiogénicas. As LMWHs são heparinas que consistem de cadeias curtas de polissacáridos, geralmente com pesos moleculares inferiores a 8000 Da. A LMWH e a heparina são ambas usadas para impedir a coagulação sanguínea dentro do corpo, mas são usadas em situações clínicas distintas.

A heparina está disponível como solução líquida administrada de forma parenteral. A LMWH, como a enoxaparina, é uma fração de heparina de baixo peso molecular. Também está disponível como solução líquida

injetável. As marcas presentemente disponíveis de LMWH aprovadas pela FDA nos Estados Unidos são LOVENOX® (nome genérico, enoxaparina) e FRAGMIN® (nome genérico, dalteparina).

A heparina de baixo peso molecular ou fracionada tem maior especificidade para o fator Xa sanguíneo e atividade para fator IIa do que a heparina não-fracionada. Além disso, a LMWH tem um efeito mais reprodutível sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), uma medida do tempo de coagulação. A LMWH tem uma menor incidência de Trombocitopenia Induzida pela Heparina (HIT). Dado que a LMWH tem uma eficácia mais previsível e uma menor incidência de efeitos adversos, tais como a HIT, os pacientes podem eles próprios injetar LMWH em casa, embora seja também frequentemente usada no hospital. Por estas razões, as LMWHs tornaram-se o anticoagulante líder de mercado.

A protamina, uma molécula carregada positivamente, pode ser usada para reverter o efeito anticoagulante resultante da administração de heparina não-fracionada ou heparina de baixo peso molecular (LMWH), carregadas muito negativamente. A protamina é um produto natural que foi associado a problemas de abastecimento, o que realça a necessidade de se encontrarem outras opções de agentes de reversão, idealmente sintéticos. A atividade anticoagulante da LMWH pode ser parcial, mas não totalmente, revertida pela administração intravenosa de protamina. Pensa-se que a razão para a reduzida atividade de reversão da protamina no caso das LMWH é uma menor afinidade de ligação à fração de LMWH do que à heparina não-fracionada no sangue. A protamina tem de ser administrada lentamente, devido aos seus efeitos hipotensores e a questões relacionadas com a anafilaxia.

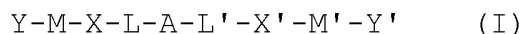
Recentemente, outros agentes anticoagulantes começaram a obter aprovação regulatória. Exemplos de tais anticoagulantes incluem dabigatran ou PRADAXA®, argatroban ou ARGATROBAN®, rivaroxaban ou XARELTO®, apixaban ou ELIQUIS®, edoxaban ou LIXIANA®, e fondaparinux ou ARIXTRA®. Estes anticoagulantes inibem quer o fator IIa, quer o fator Xa, de propagarem a coagulação.

Não existem agentes de reversão aprovados para anticoagulantes como o dabigatran, fondaparinux, rivaroxaban e apixaban. Atualmente, o estado da técnica para a reversão de dabigatran ou PRADAXA® é a utilização de carvão ativado para tentar remover o dabigatran do sangue, e recorrer a transfusões de sangue. Para além de Eerenberg et al. *Circulation*. 2011 Oct 4;124(14):1573-9. Epub 2011 Sep 6., que descrevem que num pequeno ensaio clínico um complexo de protrombina concentrado foi capaz de reverter o dabigatran, mas não o rivaroxaban, não existem dados ou antídotos clinicamente disponíveis para reverter quaisquer destes inibidores da coagulação de Fator IIa ou Xa. Desta forma, quando estes agentes são usados como anticoagulantes em pacientes, efeitos adversos associados à sobredosagem, ferimentos particularmente significativos ou fatais, são muito mais sérios do que os efeitos secundários associados à administração de heparina não-fracionada. Assim, a ausência de agentes de reversão limita o uso destes fármacos.

Por estas razões, existe uma grande e prolongada necessidade clínica não atendida de novos agentes de reversão de anticoagulantes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Foram desenvolvidos inibidores de heparina, fragmentos de heparina, fondaparinux e outros inibidores de fator Xa ou fator IIa. A estrutura geral dos agentes de reversão de anticoagulantes de interesse é: **R-Z-R'**, em que R e R' são agentes carregados positivamente a pH fisiológico e podem ser a mesma molécula ou moléculas diferentes e Z é um composto cíclico hidrofóbico ou anel fundido. Mais especificamente, o inibidor é representado por um composto com a fórmula I ou um seu sal farmacologicamente aceitável:



em que:

A é um anel substituído ou não-substituído, aromático ou não-aromático, carbocíclico ou heterocíclico, ou uma fração linear;

L e L' são iguais ou diferentes e são ligantes;

X e X' são iguais ou diferentes e estão ausentes ou são um grupo funcional que liga o ligante L a M e o ligante L' a M', respetivamente;

M e M' são iguais ou diferentes e estão ausentes ou é um ligante que liga X a Y e X' a Y', respetivamente; e

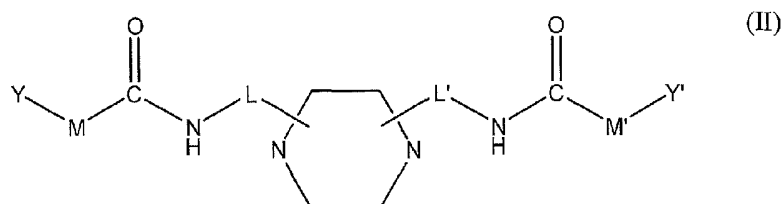
Y e Y' são iguais ou diferentes e são uma fração contendo um ou mais átomos ou grupos catiónicos ou um ou mais grupos que se tornam catiónicos em condições fisiológicas, tal como definido de forma mais restrita nas reivindicações.

Os compostos podem ser simétricos ou assimétricos; isto é, um ou mais de entre L, L', X, X', M, M', Y ou Y' podem ser iguais ou diferentes. Os compostos podem ser quirais (i.e., conter um ou mais centros quirais) ou aquirais.

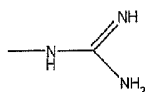
Em algumas formas de realização, definidas de forma mais restrita nas reivindicações, A é uma fração heterocíclica.

Em outras formas de realização, A é uma fração heterocíclica e L e L' são uma cadeia de alquilenos substituídos ou não-substituídos. Ainda em outras formas de realização, A é uma fração heterocíclica, L e L' são uma cadeia de alquilenos substituídos ou não-substituídos, X e X' são NH-C(=O)-, e M e M' são uma cadeia de alquilenos substituídos. Ainda em outras formas de realização, A é uma fração heterocíclica, L e L' são uma cadeia de alquilenos substituídos ou não-substituídos, X e X' são NH-C(=O)-, M e M' são uma cadeia de alquilenos substituídos, e Y e Y' são uma fração de guanidina. Em formas de realização específicas, A é um anel de piperazina 1,4 ou 2,5 dissustituído.

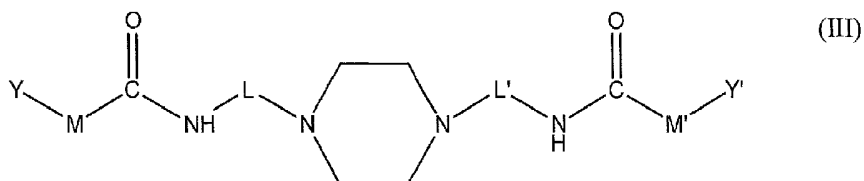
Em uma forma de realização da invenção, o inibidor é um composto representado pela fórmula II ou um seu sal farmacologicamente aceitável:



em que L e L' são ambos uma cadeia de alquilenos C₁ a C₁₀ substituídos ou não-substituídos, em que M e M' são ambos uma cadeia de alquilenos C₁ a C₁₀, e em que Y e Y' são ambos

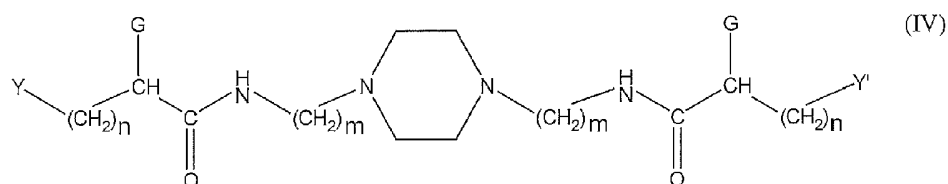


Em uma forma de realização da invenção, o inibidor é um composto representado pela fórmula III ou um seu sal farmacologicamente aceitável:



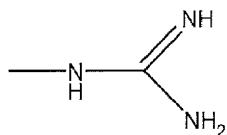
em que L, L', M, M', Y e Y' são tal como aqui descritos.

Em ainda outra forma de realização da invenção, o inibidor é um composto representado pela fórmula (IV) ou um seu sal farmacologicamente aceitável:

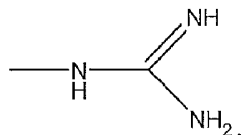


em que Y e Y' são tal como aqui descritos e n é 3 a 5, m é 3 a 6 e G é escolhido de entre -NH₂ e OH. De preferência, G é amino.

Em ainda outra forma de realização da invenção, o inibidor é um composto representado por qualquer das fórmulas II, III ou IV, e Y e Y' são escolhidos independentemente de entre o grupo que consiste em

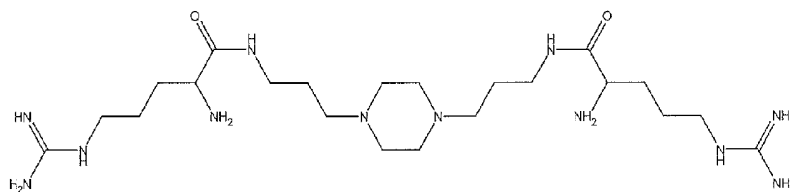


De preferência G é -NH₂ e Y e Y' são



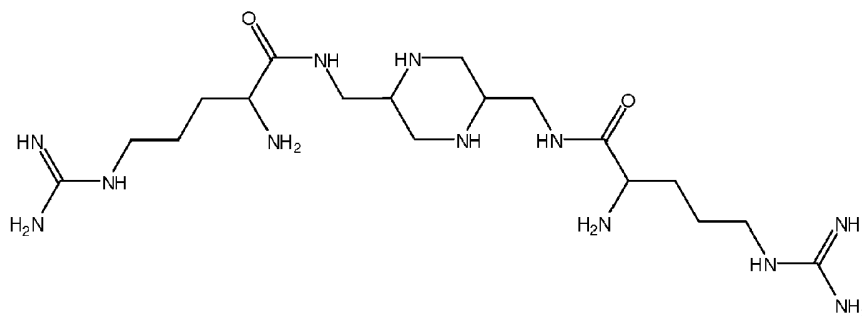
Na forma de realização preferida, o composto é piperazina di-arginina (DAP), representado pela fórmula V, ou um composto relacionado, representado pela fórmula VI, ou sais farmacologicamente aceitáveis de qualquer dos compostos:

(V)



Ácido 2-Amino-5-guanidino-pentanóico (3-{4-[3-(2-amino-5-guanidino-pentanoilamino)-propilo]-piperazina-1-il}-propilo]-amida; ou

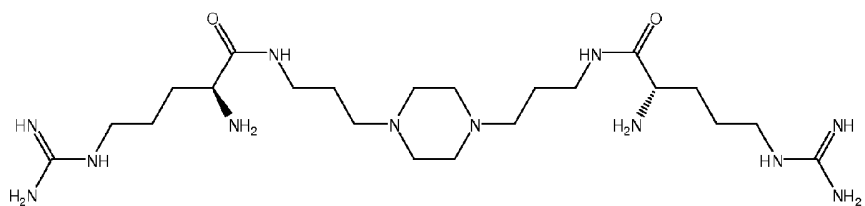
(VI)



Ácido 2-Amino-5-guanidino-pentanóico {5-[(2-amino-5-guanidino-pentanoilamino)-metil]-piperazina-2ilmetil-amida.

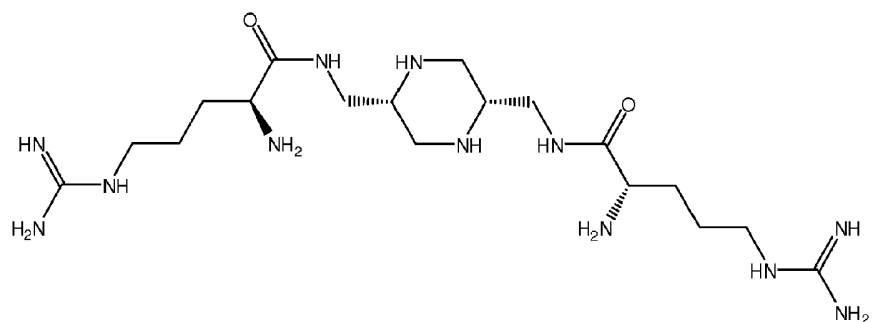
Em uma forma de realização específica, o composto da fórmula V é um estereoisômero tal como representado pela fórmula VII:

(VII)



Em outra forma de realização específica, o composto da fórmula VI é um estereoisômero tal como representado pela fórmula VIII:

(VIII)



Os compostos da invenção podem ser administrados numa composição farmacológica como solução aquosa em bolus e/ou infusão intravenosa, injeção subcutânea, ou oralmente. Na forma de realização preferida, os compostos são administrados por injeção (intravenosa, intramuscular ou subcutânea) num veículo como água destilada, soro fisiológico, soro fisiológico tamponado, ou outro excipiente farmacologicamente aceitável para injeção. Em algumas formas de realização, o inibidor pode ser administrado oralmente, numa superfície mucosa (nasal, pulmonar, vaginal, retal ou bucal), ou por deposição.

Os compostos da invenção podem ser administrados em composição farmacológica a pacientes com necessidade de reversão de heparina, LMWH ou outra anticoagulação mediada por inibidores de trombina, em quantidades capazes de restaurar uma coagulação normal e hemostasia. As composições farmacológicas contendo o composto das invenções são adequadas para uso hospitalar ou em reversão não-urgente em casa. É administrado a pacientes com necessidade de reversão de heparina, LMWH ou outra anticoagulação mediada por inibidores de trombina em quantidades capazes de restaurar a coagulação. Os compostos e composições farmacológicas aqui descritos podem também ser utilizados para reduzir a atividade de fatores de crescimento que se ligam à heparina e/ou para reverter

completa ou parcialmente uma combinação de um ou mais agentes anticoagulantes de Fator IIa e/ou Fator Xa.

Assim, os compostos da invenção podem ser usados na reversão completa ou parcial de um efeito anticoagulante de um inibidor da coagulação. Os compostos da invenção podem também ser usados como parte dum kit de diagnóstico para determinar a concentração sanguínea de um anticoagulante.

Exemplos mostram que a DAP se ligou diretamente a rivaroxaban, apoxaban, heparina não-fracionada, fondaparinux, e LMWH, revertendo a atividade anticoagulante. A DAP reverteu a anticoagulação por rivaroxaban oral e LMWH subcutânea *in vivo*, tal como medida por aPTT, e por fondaparinux subcutâneo, tal como medido pela atividade Xa, em ratos. A reversão pela DAP, confirmada por um decréscimo estatisticamente significativo da hemorragia num ensaio de seccionamento de cauda de rato, foi demonstrada para apixaban, dabigatran, edoxaban, e rivaroxaban. A DAP reverteu por completo apixaban e rivaroxaban numa razão dose massa de cerca de 10:1 de DAP:anticoagulante em sangue humano *ex vivo*, medida com recurso a um kit anti-Xa. A DAP mostrou um efeito de reversão de apixaban e rivaroxaban dependente da dose em sangue humano *ex vivo*. A reversão recém-colhido foi confirmada por medições de aPTT *ex vivo*. A DAP não se ligou a argatroban *in vitro*, em concentrações até 1:1000. A DAP reverteu dabigatran oral *in vivo* em ratos, tal como medido por aPTT. Ratos aos quais foi administrado argatroban permaneceram anticoagulados após uma dose 200x IV de DAP, mostrando que a DAP é segura e que a interação de reversão é específica para as heparinas e novos anticoagulantes orais. Em resumo, os exemplos mostram a complexação da DAP com heparina e LMWH, e que a DAP constitui um excelente agente de reversão para heparina, compostos semelhantes à

heparina, e outros inibidores da trombina, incluindo dabigatran, heparinas de baixo peso molecular aprovadas, bem como rivaroxaban (XARELTO®), fondaparinux (ARIXTRA®), edoxaban (LIXIANA®), e apixaban (ELIQUIS®), tal como avaliado em ensaios *in vitro* com sangue humano, ensaios anti-Xa e aPTT e/ou num ensaio de seccionamento de cauda de rato.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **Figura 1** é um gráfico de fluxo de calor versus temperatura, medida por calorimetria diferencial de varrimento (DCS), em que a DAP é aquecida de -20 °C até 200 °C ("1" ou "primeiro aquecimento"), arrefecida a -20 °C, e reaquecida a 200 °C ("2" ou "segundo aquecimento").

A **Figura 2** é um gráfico de DAP isolada, UFH isolado, e uma combinação DAP-UFH, em função da percentagem de volume comparada com o tamanho (d.nm), medida por Dispersão de Luz Dinâmica (DLS).

A **Figura 3** é um gráfico de DAP isolada, rivaroxaban isolado, e DAP-rivaroxaban em razões 1:1 e 10:1, DAP:rivaroxaban, em função do volume (percentagem) comparado com o tamanho (d.nm), medido por DLS.

A **Figura 4** é um gráfico de DAP isolada, apixaban isolado, e ligação DAP-apixaban em razões 1:1, 10:1 e 100:1, em função do volume (percentagem) comparado com o tamanho (d.nm), medido por DLS.

A **Figura 5** é um gráfico de DAP isolada, fondaparinux isolado, e ligação DAP-fondaparinux em razões 1:1, 10:1 e 100:1, em função do volume (percentagem) comparado com o tamanho (d.nm), medido por DLS.

A **Figura 6** é um gráfico de DAP isolada, LMWH isolado, e ligação DAP-LMWH em razões 1:1, 10:1 e 100:1, em função do volume (percentagem) comparado com o tamanho (d.nm), medido por DLS.

A **Figura 7** é um gráfico de DAP isolada, argatroban isolado, e ligação DAP-argatroban em razões 1:1, 10:1, 100:1 e 1000:1, em função do volume (percentagem), comparado com o tamanho (d.nm), medido por DLS.

A **Figura 8** é um gráfico de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT, segundos) medido ao longo do tempo (horas) durante cinco horas após administração subcutânea de 10 mg de bemiparin (LMWH) a um rato. Ao fim de quatro horas de tratamento, o rato recebeu uma dose intravenosa de 200 mg/kg (100 mg) de DAP.

A **Figura 9** é um gráfico de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT, segundos) medido ao longo do tempo (horas) após administração oral de PRADAXA® (dabigatran) a um rato, seguida de administração intravenosa de 200 e 100 mg/kg (100mg e 50 mg) de DAP.

A **Figura 10** é um gráfico de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT, segundos) medido ao longo do tempo (horas) após administração subcutânea de heparina não-fracionada (UFH) a um rato, seguida de administração intravenosa de 200 mg/kg (100mg) e 400 mg/kg (200 mg) de DAP.

A **Figura 11** é um gráfico de aPTT (segundos) medido ao longo do tempo (horas) após administração oral de 5mg/kg de rivaroxaban a um rato, seguida de administração intravenosa de 5 mg/kg (2 mg) de DAP.

A **Figura 12** é um gráfico da concentração de fondaparinux ativo ($\mu\text{g/mL}$) medida ao longo do tempo (minutos após a reversão) após uma administração subcutânea de 5 mg/kg de fondaparinux a um rato, seguida de administração intravenosa de 200 mg/kg de DAP (isto é, "reversão").

A **Figura 13** é um gráfico de aPTT (segundos) medido ao longo do tempo (minutos após a reversão) após administração oral de 15,5 mg/kg de PRADAXA® (dabigatran) a um rato, seguida de administração intravenosa de 100 mg/kg de DAP (isto é, "reversão").

A **Figura 14** é um gráfico do tempo de aPTT (segundos) para 0, 2, 10, 25, 50 e 100 mg de DAP administrados por via intravenosa.

A **Figura 15** é um gráfico do sangue colhido (i.e., perda de sangue cumulativa) ao longo de 30 minutos num ensaio de seccionamento e sangramento de cauda de rato, em ratos aos quais foi administrado 2 mg de rivaroxaban e 0 mg de DAP, 2 mg de rivaroxaban e 2.5 mg de DAP, 2 mg de rivaroxaban e 12.5 mg de DAP, ou doses simuladas de agente de reversão e anticoagulante ("sham"). Com grupos de três ratos da mesma idade, 12,5 mg de DAP reduziram a perda de sangue para os níveis das doses simuladas, resultando numa diferença estatisticamente significativa ($*p < 0,05$) relativamente a ratos aos quais foi apenas administrado rivaroxaban.

A **Figura 16** é um gráfico do sangue colhido (i.e., perda de sangue cumulativa) ao longo de 30 minutos num ensaio de hemorragia após seccionamento de cauda de rato, em ratos aos quais foi administrado 1.25 mg de apixaban e 0

mg de DAP, 1.25 mg de apixaban e 5 mg de DAP, 1.25 mg de apixaban e 12.5 mg de DAP, ou doses simuladas de agente de reversão e anticoagulante ("sham"). Com grupos de três ratos da mesma idade, 12,5 mg de DAP reduziram a perda de sangue ao nível das doses simuladas, resultando numa diferença estatisticamente significativa ($***p<0,01$) relativamente a ratos aos quais foi apenas administrado apixaban.

A **Figura 17** é um gráfico do sangue colhido (isto é, perda de sangue cumulativa) ao longo de 30 minutos num ensaio de hemorragia após seccionamento de cauda de rato, em ratos aos quais foi administrado 1.25 mg de edoxaban e 0 mg de DAP, 1.25 mg de edoxaban e 12.5 mg de DAP, ou doses simuladas de agente de reversão e anticoagulante ("sham"). Com grupos de três ratos da mesma idade, 12,5 mg de DAP reduziram a perda de sangue ao nível das doses simuladas, resultando numa diferença estatisticamente significativa ($***p<0,05$) relativamente a ratos aos quais foi apenas administrado edoxaban.

A **Figura 18** é um gráfico do sangue colhido (isto é, perda de sangue cumulativa) ao longo de 30 minutos num ensaio de hemorragia após seccionamento de cauda de rato, em ratos aos quais foi administrado 15 mg de etexilato de dabigatran e 0 mg de DAP, 15 mg de etexilato de dabigatran e 5 mg de DAP, 15 mg de etexilato de dabigatran e 12.5 mg DAP, ou doses simuladas de agente de reversão e anticoagulante ("sham"). Com grupos de três ratos da mesma idade, 12,5 mg de DAP reduziram a perda de sangue ao nível das doses simuladas, resultando numa diferença estatisticamente significativa ($***p<0,01$) relativamente a ratos aos quais foi apenas administrado etexilato de dabigatran.

A **Figura 19** é um gráfico de aPTT (segundos) medido em sangue acabado de colher, tratado *ex vivo* com 50 microgramas/mL de DAP, 0,25 microgramas/mL de rivaroxaban, 50 microgramas/mL de DAP e 0,25 microgramas/mL de rivaroxaban, ou soro fisiológico.

A **Figura 20** é um gráfico que mostra a concentração efetiva de anticoagulante medida por um ensaio de atividade de anti-fator Xa em plasma humano tratado *ex vivo* com 218 µg/L de rivaroxaban isolado ou em combinação com 1250 mg/L de DAP, e 459 µg/L de rivaroxaban isolado ou em combinação com 6250 µg/L de DAP.

A **Figura 21** é um gráfico que mostra a concentração efetiva de anticoagulante medida por um ensaio de atividade de anti-fator Xa em plasma humano tratado *ex vivo* com 156 µg/L de apixaban, isoladamente ou em combinação com 1156 µg/L de DAP, e 313 µg/L de apixaban, isoladamente ou em combinação com 3125 µg/L de DAP.

A **Figura 22** é um gráfico que mostra a concentração efetiva de anticoagulante medida por um ensaio de atividade de anti-fator Xa em plasma humano tratado *ex vivo* com 218 µg/L de rivaroxaban, isolado ou em combinação com quantidades crescentes (1,25, 12,5, 125, 1250 µg/L) de DAP.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Agentes de Reversão de Anticoagulantes

São divulgados novos agentes de reversão de anticoagulantes. Os compostos da invenção incluem compostos aqui descritos, bem como os seus sais farmacologicamente aceitáveis.

Foram desenvolvidos inibidores de heparina, fragmentos de heparina, fondaparinux e inibidores de fator Xa ou fator IIa (por exemplo, inibidores de fator Xa oral ou fator IIa). A estrutura geral dos agentes de reversão de anticoagulantes de interesse é: **R-Z-R'**, em que R e R' são agentes carregados positivamente a pH fisiológico e podem ser moléculas iguais ou diferentes, e Z é um composto cíclico hidrofóbico ou anel fundido.

Tal como usado aqui, uma cadeia alquilenos é uma fração alquilenos divalente cujo comprimento é C₁ a C₁₀, de preferência C₃ a C₆. Exemplos de substituintes incluem alquilo, hidroxilo, hidroxilo alquilo, amino, amino alquilo, alcóxido, alquilo alcóxido. Tal como usado aqui, o termo alquilo é uma cadeia de hidrocarbonetos linear ou ramificada C₁ a C₁₀, de preferência C₁-C₆. Em outras formas de realização, A é uma fração heterocíclica, L e L' são uma cadeia alquilenos substituída ou não-substituída, X é NH-C(=O)-, M e M' são uma cadeia alquilenos substituída, e Y e Y' são uma fração de guanidina.

Em algumas formas de realização, os ligantes L e L' estão ligados aos heteroátomos no anel A, tais como os dois átomos de azoto na piperazina. Em outras formas de realização, os ligantes L e L' estão ligados a átomos que não os heteroátomos no anel, tais como átomos de carbono. Em formas de realização específicas, A é um anel de piperazina 1,4 ou 2,5 dissustituído. Em algumas formas de realização, L e L' e/ou M e M' são cadeias alquilenos substituídas ou não-substituídas, tais como -(CH₂)_n-, em que n é um número inteiro entre 1 e 10, de preferência entre 1 e 6, por exemplo, 1-3. Em formas de realização específicas, n é 3. Em algumas formas de realização, L e/ou M estão ausentes.

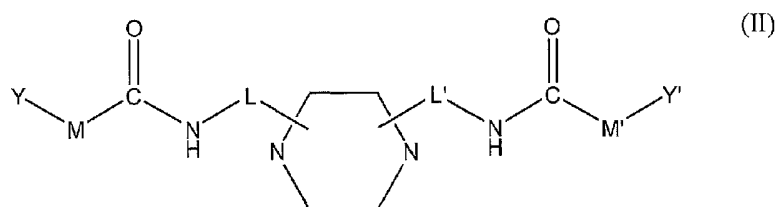
Y e Y' são uma fração que contem um ou mais átomos ou grupos que são catiónicos ou se tornam catiónicos em condições fisiológicas. Exemplos identificados de forma mais restrita nas reivindicações incluem frações amina e guanidina, bem como frações contendo fósforo, tais como frações alquiltrifenilfosfónio, tetrafenilfosfónio, tetrafenilarsónio, tribenzil de amónio, e fosfónio. Outras frações catiónicas incluem oligómeros catiónicos e polímeros, tais como oligo- ou poli-lisina, oligo- ou poli-arginina, polietileno imina N-alquilada, e outros semelhantes. Outras frações catiónicas incluem catiões lipofílicos deslocalizados contendo um a três unidades carbimino, sulfimino ou fosfinimino, como descrito em Kolomeitsev et al., Tet. Let., Vol. 44, No. 33, 5795-5798 (2003).

Em algumas formas de realização, o composto é um derivado de piperazina, em que as cadeias laterais de aminoácidos contêm um ou mais átomos carregados positivamente ou átomos que estarão carregados positivamente em condições fisiológicas. Exemplos incluem piperazina di-arginina. A arginina pode ser substituída por outros aminoácidos carregados positivamente ou que estarão carregados positivamente em condições fisiológicas.

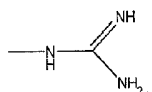
"Heterociclo" ou "heterocíclico", tal como usados aqui, referem-se a um radical cíclico ligado através dum carbono ou azoto do anel de um anel monocíclico ou bicíclico contendo 3-10 átomos no anel, e de preferência de 5-6 átomos no anel, consistindo em carbono e um a quatro heteroátomos, cada um dos quais selecionado de entre o grupo formado por oxigénio não-peróxido, enxofre, e N®, em que R está ausente ou é H, O, (C₁₋₄)alquilo, fenilo ou benzilo, e contendo opcionalmente 1-3 ligações duplas e opcionalmente substituído com um ou mais substituintes.

Exemplos de anéis heterocíclicos incluem, mas não se limitam a, benzimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiophenilo, benzoxazolilo, benzoxazolinilo, benzthiazolilo, benztriazolilo, benztetrazolilo, benzisoxazolilo, benzisotiazolilo, benzimidazolinilo, carbazolilo, 4aH-carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-b]tetrahydrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizínilo, indolilo, 3H-indolilo, isatinoilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, metiloenedioxifenilo, 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, piridooxazole, piridoimidazole, piridotiazole, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizínilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydroisoquinolinilo, tetrahydroquinolinilo, 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 and xantenilo.

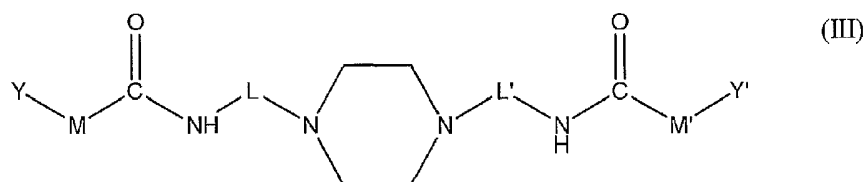
Numa forma de realização da invenção, o inibidor é um composto representado pela fórmula II ou um seu sal farmacologicamente aceitável:



em que L e L' são ambos uma cadeia alquilenos C₁ a C₁₀ substituída ou não-substituída, em que M e M' são ambos uma cadeia alquilenos C₁ a C₁₀ e em que Y e Y' são ambos

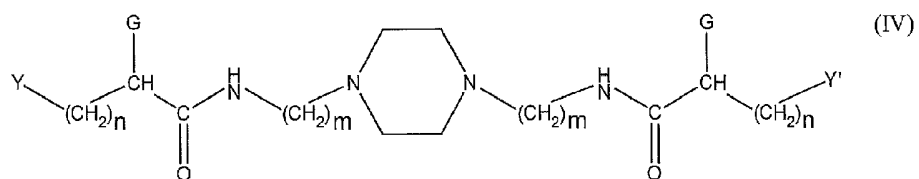


Em outra forma de realização da invenção, o inibidor é um composto representado pela fórmula III ou um seu sal farmacologicamente aceitável:



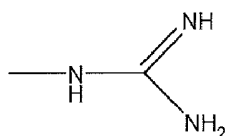
em que L, L', M, M', Y e Y' são como anteriormente descritos.

Em ainda outra realização da invenção, o inibidor é um composto representado pela fórmula (IV) ou um seu sal farmacologicamente aceitável:

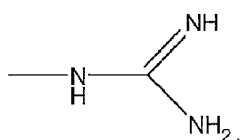


em que Y e Y' são tal como aqui descritos e n é 3 a 5, m é 3 a 6 e G é escolhido de entre -NH₂ e OH. De preferência, G é amino.

Em ainda outra forma de realização da invenção, o inibidor é um composto representado por qualquer das fórmulas II, III ou IV e Y e Y' são escolhidos independentemente de entre o grupo que consiste em

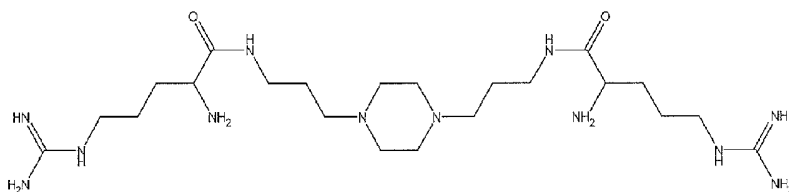


De preferência G é -NH₂ e Y e Y' são



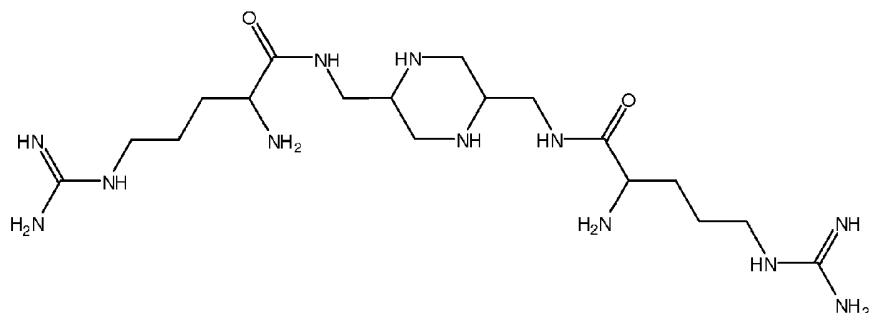
Assim, em uma forma de realização, o composto da invenção é piperazina di-ariginina (DAP), representado pela fórmula V, ou um composto relacionado, representado pela fórmula VI, ou sais farmacologicamente aceitáveis de qualquer dos compostos:

(V)



Ácido 2-Amino-5-guanidino-pentanóico (3-{4-[3-(2-amino-5-guanidino-pentanoilamino)-propilo]-piperazina-1-il}-propilo)-amida; ou

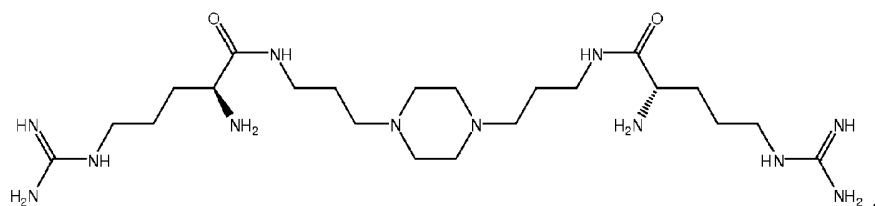
(VI)



Ácido 2-Amino-5-guanidino-pentanóico {5-[(2-amino-5-guanidino-pentanoilamino)-metilo]-piperazina-2ilmetilo-amida.

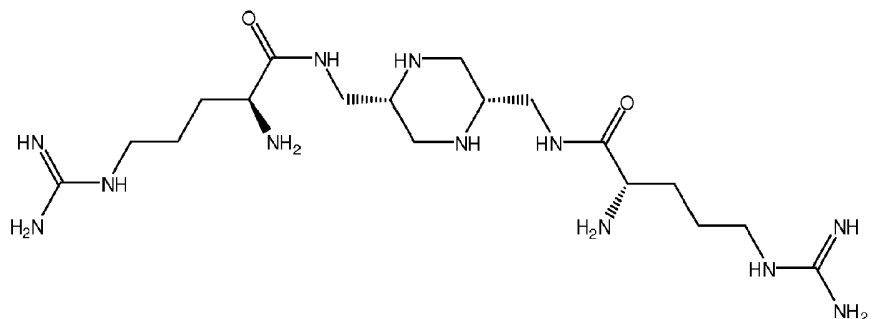
Em uma forma de realização específica, o composto da fórmula V é um estereoisômero tal como representado pela fórmula VII:

(VII)



Em outra forma de realização específica, o composto da fórmula VI é um estereoisômero tal como representado pela fórmula VIII:

(VIII)



A expressão "sal farmacologicamente aceitável" de um composto, tal como usada aqui, significa um sal que é

farmacologicamente aceitável e possui a atividade farmacológica desejada do composto de origem. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem sais de grupos acídicos ou básicos presentes em compostos da invenção. Sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não se limitam a, sais de hidrocloreto, hidrobrometo, hidroiodeto, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanesulfonato, etanesulfonato, benzensulfonato, p-toluenesulfonato e pamoato (i.e., 1,1'-metilene-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Sais de bases adequados incluem, mas não se limitam a, sais de alumínio, cálcio, lítio, magnésio, potássio, sódio, zinco, e dietanolamina.

O composto da invenção inibe a atividade de inibidores da coagulação. Um mecanismo de ação proposto para o composto da invenção é através da ligação a moléculas carregadas negativamente (por exemplo, fondaparinux, heparina não-fracionada, LMWH, aqui descritos). Outros inibidores de coagulação (por exemplo, inibidores de fator IIa e fator Xa tais como dabigatran, apixaban, edoxaban, e rivaroxaban, aqui descritos) também possuem cargas negativas; assim, o composto da invenção pode inibir estes inibidores da coagulação através da neutralização das suas frações carregadas negativamente.

Outro mecanismo de ação proposto para o composto da invenção é através de interações físicas fracas, tais como ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas, com os inibidores da coagulação. Os inibidores de Fator IIa e Xa orais possuem regiões hidrofóbicas, que podem levar à

associação hidrofóbica com o composto da invenção, por exemplo, DAP.

Assim, em algumas formas de realização, os compostos da invenção contêm pelo menos uma fração cíclica hidrofóbica, por exemplo, um ou uma combinação de anéis alifáticos ou aromáticos, incluindo anéis fundidos. Em outras formas de realização, os compostos da invenção contêm pelo menos uma fração cíclica hidrofóbica e pelo menos duas frações carregadas positivamente ou parcialmente carregadas a pH fisiológico.

Em algumas formas de realização da invenção, uma ou ambas as argininas dos compostos das Fórmulas V e VI (ou os compostos das fórmulas VII e VIII) são substituídos por um ou mais aminoácidos carregados positivamente, seus derivados, ou compostos com carga semelhante, por exemplo, lisina, histidina, ornitina. As argininas nos compostos das Fórmulas V e VI ou os aminoácidos carregados positivamente substituídos por estas argininas podem ser aminoácidos que ocorrem naturalmente (i.e., L-aminoácidos), seus enantiômeros (i.e., D-aminoácidos), ou misturas, racêmicas ou não, destes. "Enantiômeros" refere-se a dois estereoisômeros dum composto que não são imagens num espelho sobreponíveis uma na outra.

As definições estereoquímicas e convenções aqui usadas seguem geralmente S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; and Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muitos compostos orgânicos ocorrem em formas opticamente ativas, isto é, têm a capacidade de rodar o plano da luz polarizada num plano. Os prefixos D e L ou R são usados na descrição dum composto opticamente ativo para indicar a

configuração absoluta da molécula em torno do(s) seu(s) centro(s) quiral(is). Os prefixos D e L ou (+) e (-) são utilizados para designar o sinal da rotação da luz polarizada num plano pelo composto, significando (-) or L que o composto gira para a esquerda. Um composto com o prefixo (+) ou D gira para a direita. Para uma dada estrutura química, estes esteroisómeros são idênticos exceto pelo facto de serem a imagem no espelho um do outro. Um esteroisómero específico também pode ser designado por enantiómero, e uma mistura de tais isómeros é designada mistura racémica ou racemato, e pode ocorrer quando não houve estereoseleção ou esteroespecificidade numa reação ou processo químico. Os termos "mistura racémica" e "racemato" referem-se a uma mistura equimolar de duas espécies enantioméricas, destituída de atividade ótica.

Em outras formas de realização da invenção, o composto da invenção contem pelo menos uma fração cíclica hidrofóbica, por exemplo, um ou uma combinação de anéis alifáticos e aromáticos, incluindo anéis fundidos. Os compostos de interesse contêm pelo menos uma fração cíclica hidrofóbica e pelo menos duas frações carregadas positivamente ou parcialmente carregadas a pH fisiológico.

Deverá ser dada particular atenção ao desenho de agentes terapêuticos baseados em péptidos, uma vez que estes agentes podem provocar reações imunológicas indesejadas e frequentemente severas quando administrados a um paciente. O composto da invenção foi desenhado para ter um peso molecular suficientemente baixo para minimizar problemas de imunogenicidade. Numa forma de realização, de forma a evitar a ativação da resposta imunitária, o composto é desenhado de tal forma que o seu peso molecular é inferior a cerca de 5000 daltons, tal como menos de ou cerca de 1000 daltons, por exemplo, cerca de 500 daltons. Numa forma de

realização, o peso molecular do composto é cerca de 512 daltons.

É preferível que os compostos da invenção não se liguem, ou interfiram, com a função do ERG, um canal iônico de potássio que contribui para a condutividade elétrica do coração. A inibição deste canal de potássio pode conduzir a síndrome de QT longo, potencialmente fatal, e outros candidatos a fármacos que no restante tiveram sucesso apresentaram ligação a ERG humano.

Para além disso, é preferível que o composto da invenção não iniba ou sirva de substrato para enzimas citocromo P450 (CYP) de membrana. As CYPs são enzimas importantes envolvidas no metabolismo de fármacos, e a modulação da sua atividade pode interferir com a remoção e metabolismo de outros fármacos administrados a um paciente, conduzindo a interações entre fármacos indesejadas.

Também de preferência, os compostos da invenção não exibem ligação significativa a proteínas do plasma *in vitro* (por exemplo, ligação à albumina). Dado que no geral os compostos da invenção não se ligam a proteínas do plasma, exibem tempos de meia-vida de atividade curtos, minimizando o risco de sobredosagem devida à sua acumulação.

II. Síntese de Agentes de Reversão de Anticoagulantes

Os compostos e os seus sais farmacologicamente aceitáveis aqui descritos são preparados recorrendo a diversos métodos, a partir de compostos disponíveis comercialmente, compostos conhecidos, ou compostos preparados por métodos conhecidos. Os esquemas abaixo incluem exemplos de vias sintéticas para um dos compostos aqui descritos (Composto da Fórmula V, piperazina di-arginina, "DAP"). Os esquemas

abaixo também são aplicáveis ao composto estereoisómero de DAP da Fórmula VII através da seleção adequada dos compostos estereoisoméricos de partida. Outros compostos da invenção podem ser sintetizados seguindo um esquema de síntese semelhante. Quem é versado na matéria compreende que a ordem dos passos aqui apresentada pode ser alterada de modo a acomodar funcionalidade na molécula-alvo. Quem é versado na matéria também compreende que a síntese pode requerer vários passos de proteção e desproteção. A necessidade de proteção e desproteção, e a seleção de grupos protetores adequados, encontram-se, por exemplo, em Greene and Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, John Wiley & Sons (1991), que aqui se incorpora pela sua referência na totalidade.

Em algumas formas de realização da presente invenção, o grupo protetor é um grupo butiloxicarbonil (Boc) terciário. Em outras formas de realização da presente invenção, o grupo protetor é um grupo 2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf). Em outra forma de realização, o grupo protetor aminoácido pode ser, mas não se limita a, 2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulfonilo (PMC).

Os grupos protetores podem ser removidos por várias vias. A remoção de grupos protetores inclui, por exemplo, o tratamento do composto protegido com ácido trifluoroacético (TCA), HCl aquoso, ou aquecimento em ácido acético. Dado que a remoção de grupos protetores, por exemplo, a remoção de grupos protetores em condições acídicas, pode resultar na produção de espécies catiónicas que podem alquilar os grupos funcionais na cadeia peptídica, podem ser adicionados sequestradores durante o passo de desproteção para reagir com qualquer das espécies livres reativas. Exemplos de sequestradores incluem, mas não se limitam a,

água, derivados de anisol e derivados de tiol. Assim, em uma forma de realização, a remoção dos grupos protetores inclui o tratamento dos compostos protegidos com TFA e um sequestrador (por exemplo, TFA e água).

Diversos solventes, por exemplo, solventes orgânicos, podem ser usados nos passos da síntese. Entre os solventes adequados incluem-se, mas não se limitam a, sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano, metanol, etanol, cloreto de metileno, tolueno, e acetona. Em algumas formas de realização, o solvente é DMF.

Podem ser utilizados agentes de ligação ácidos adequados nos passos da síntese. Estes incluem, mas não se limitam a, bases orgânicas, tais como, por exemplo, piridina, trietilamina, trietanolamina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), e diisopropiletilamine (DIEA); e bases inorgânicas, tais como, por exemplo, hidreto de sódio, carbonato de potássio, e carbonatos de sódio. Em algumas formas de realização, o agente de ligação ácido é DIEA.

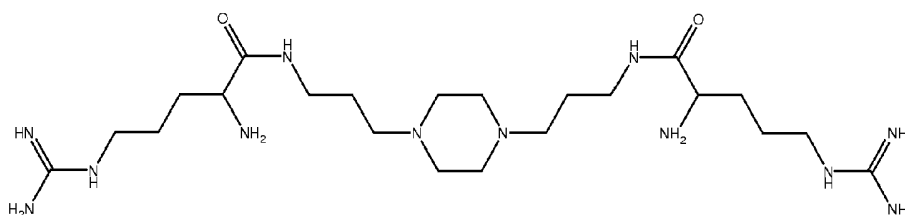
A síntese pode incluir reagentes de ligação peptídica. Os reagentes de ligação peptídica podem incluir, mas não se limitam a, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimide (EDC), N-Hidroxibenzotriazolo (HOBt), carbonildiimidazolo (CDI), diciclohexilcarbodiimide (DCC), éster N-hydroxysuccinamide (OSu) ativo, O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetrametil-uronium-hexafluoro-fosfato (HBTU), e combinações destes. Em outra forma de realização, o reagente de ligação peptídica é EDC/HOBt. Em ainda outra forma de realização, o reagente de ligação peptídica é um éster OSu ativo.

Ademais, a síntese pode incluir um passo em que um produto bruto é purificado, por exemplo, por cromatografia em coluna. Os produtos desejados de cada passo ou série de

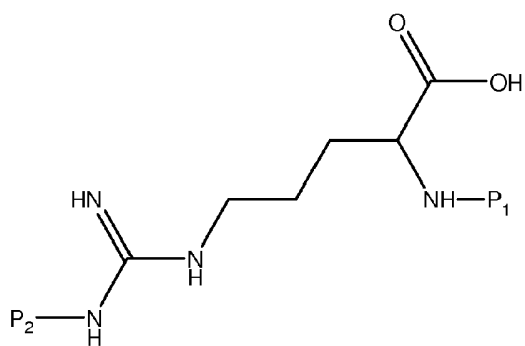
passos podem ser separados e/ou purificados até ao grau de homogeneidade desejado pelos métodos comumente usadas na técnica. Tipicamente, tais separações envolvem extração multifásica, cristalização a partir dum solvente ou mistura de solventes, destilação, sublimação, ou cromatografia. A cromatografia pode envolver vários métodos, incluindo, por exemplo: fase reversa e fase normal; exclusão molecular; troca iónica; métodos e aparelhos de cromatografia líquida de alta, média e baixa pressão; analítica em pequena escala; fase estacionária móvel simulada (SMB) e cromatografia preparativa em camada fina ou camada grossa, bem como técnicas de camada fina em pequena escala e cromatografia flash.

Em um esquema, o composto da Fórmula V (DAP)

(V)

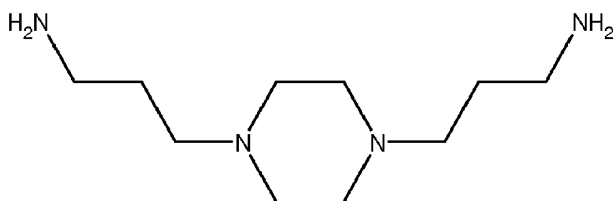


é sintetizado fazendo reagir um excesso de equivalentes (por exemplo, pelo menos dois equivalentes) de composto **1**



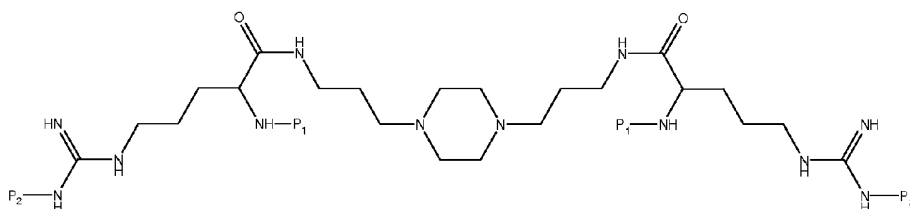
(1)

com um equivalente de composto **2**



(2),

na presença dum reagente de ligação peptídica, para se obter um composto **3**



(**3**),

em que P₁ é um grupo protetor e P₂ é um grupo protetor ou é um hidrogénio.

Em uma forma de realização, o reagente de ligação peptídica é HBTU, EDC/HOBt, ou um éster OSu ativo. Em uma forma de realização, o grupo protetor P₁ é Boc. Em outra forma de realização, o grupo protetor P₂ é Pbf. Em uma forma de realização diferente, o grupo protetor P₁ é Boc e P₂ é um hidrogénio.

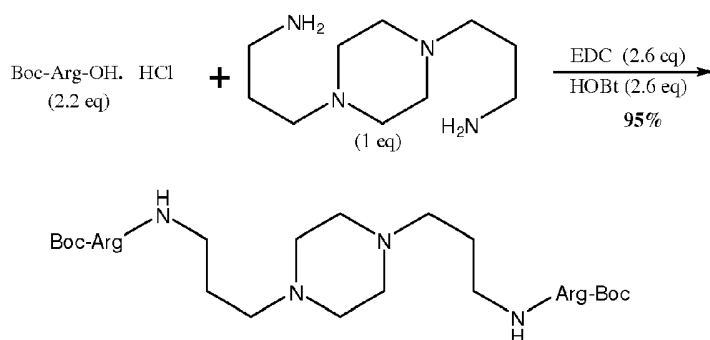
Seguidamente, **3** pode ser purificado. Esta purificação pode envolver vários métodos de cromatografia em coluna conhecidos na técnica.

Os grupos protetores de **3** podem ser removidos por vários métodos conhecidos na técnica, de modo a obter-se o composto da Fórmula V. A desproteção pode ser conseguida através de, por exemplo, remoção de grupos protetores com ácido trifluoroacético (TFA) e água, TFA e água ou outro sequestrador, incluindo, mas não limitado a, HCl aquoso ou aquecimento em ácido acético.

O composto pode ser adicionalmente purificado usando um método de cromatografia em coluna, tal como cromatografia

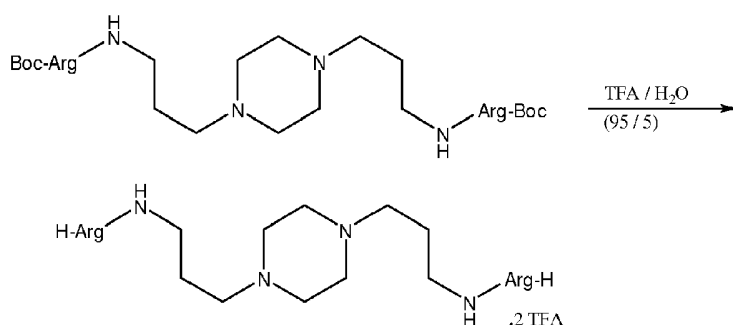
de troca iónica com tampões salinos ou HPLC preparativo usando ácido trifluoroacético ou ácido acético como tampão.

Num esquema mais específico, a ligação envolveu a reação do composto **1**, em que P1 era Boc e P2 era um hidrogénio (representado abaixo por Boc-Arg-OH- HCl) com composto **2**, como representado abaixo:



O produto bruto resultante tinha pureza superior a 95% por cromatografia em camada fina (TLC).

De seguida, o passo de desproteção foi levado a cabo como representado abaixo:



O produto desprotegido foi purificado por HPLC preparativo usando tampão de 1% de ácido acético. Foi observada uma pureza do produto $\geq 98\%$. O TFA residual foi removido por uma pequena quantidade de resina DOWEX. O peso molecular de DAP (o composto da Fórmula V) é 512,4, e o composto sintetizado

de acordo com o esquema acima mostrou o pico primário seguinte por espectroscopia de massa:

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

III. Composições Farmacológicas

São divulgadas composições farmacológicas contendo os compostos aqui descritos. Tal composição pode conter, para além do composto da invenção, um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável. O termo "farmacologicamente aceitável" significa um material não-toxico compatível com as características físicas e químicas do ingrediente ativo e que não interfere com a eficácia da atividade biológica do ativo. As composições podem conter vários agentes de diluição ou enchimento, sais, tampões, estabilizadores, e outros materiais bem conhecidos na técnica. As características do veículo dependerão da via de administração, e são geralmente bem conhecidas na técnica.

A composição farmacológica da invenção pode ser adaptada para administração entérica - administração da composição, em que a composição é introduzida por uma via que não o trato digestivo, por exemplo, por via intravenosa, subcutânea, cutânea, nasal, pulmonar, vaginal, bucal.

Composições farmacologicamente aceitáveis, por exemplo, composições para administração oral, podem ser preparadas como descrito em referências como "Pharmaceutical dosage form tablets", eds. Liberman et. al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, e "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6th Edition, Ansel et.al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995), aqui incorporadas por referência, que fornecem informações acerca de veículos,

materiais (por exemplo, materiais de revestimento), equipamento e processo de preparação de comprimidos e cápsulas, e formas de dosagem de libertação retardada de comprimidos, cápsulas e grânulos.

Exemplos de materiais de revestimento adequados incluem, mas não se limitam a, polímeros de celulose tais como acetato ftalato de celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropil metilcelulose, ftalato de hidroxipropil metilcelulose e acetato succinato de hidroxipropil metilcelulose; acetato ftalato de polivinilo, polímeros e co-polímeros de ácido acrílico, e resinas metacrílicas disponíveis comercialmente sob a designação comercial Eudragit® (Roth Pharma, Westerstadt, Alemanha), Zein, goma-laca, e polissacáridos. Além disso, o material de revestimento pode conter veículos convencionais tais como plastificantes, pigmentos, corantes, agentes de deslizamento, agentes estabilizadores, formadores de poros e surfactantes.

Excipientes farmacologicamente aceitáveis opcionalmente presentes nos comprimidos, esferas, grânulos, ou partículas contendo o fármaco incluem, mas não se limitam a, agentes de diluição, ligação, lubrificação e desintegração, corantes, estabilizadores, e surfactantes.

Tipicamente, os agentes de diluição, também designados de "agentes de enchimento", são necessários para aumentar o volume de uma dose sólida, de forma a obter-se um tamanho adequado para a compressão de comprimidos ou para a formação de esferas e grânulos. Agentes de diluição adequados incluem, mas não se limitam a, fosfato de cálcio di-hidratado, sulfato de cálcio, lactose, sacarose, manitol, sorbitol, celulose, celulose microcristalina, caulino, cloreto de sódio, amido seco, amidos hidrolisados,

amido pré-gelatinizado, dióxido de silicone, óxido de titânio, silicato de magnésio e alumínio, e açúcar em pó.

Os agentes de ligação são utilizados para atribuir qualidades coesivas a uma dose sólida, assegurando deste modo que um comprimido ou esfera ou grânulo permanece intacto após a formação da forma de dosagem. Materiais de ligação adequados incluem, mas não se limitam a, amido, amido pré-gelatinizado, gelatina, açúcares (incluindo sacarose, glucose, dextrose, lactose e sorbitol), polietileno glicol, ceras, borrachas naturais e sintéticas tais como goma arábica, goma adragante, alginato de sódio, celulose, incluindo hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose, etilcelulose, e polímeros sintéticos tais como co-polímeros de ácido acrílico e ácido metacrílico, co-polímeros de ácido metacrílico, co-polímeros de metil metacrilato, co-polímeros de aminoalquil metacrilato, ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico e polivinilpirrolidona.

Os lubrificantes são utilizados para facilitar o fabrico de comprimidos. Exemplos de lubrificantes adequados incluem, mas não se limitam a, estearato de magnésio, estearato de sódio, estearato de cálcio, ácido esteárico, beeswax de glicerol, polietileno glicol, talco, e óleo mineral.

Os agentes de desintegração são utilizados para facilitar a desintegração ou "quebra" da forma de dosagem após a administração, e geralmente incluem, mas não se limitam a, amido, glicolato de amido sódico, amido de carboximetil de sódio, carboximetilcelulose de sódio, hidroxipropil celulose amido pré-gelatinizado, argilas, celulose, alginina, borrachas ou polímeros reticulados, tais como PVP (Polyplasdone XL da GAF Chemical Corp.) reticulado.

Os estabilizadores são usados para inibir ou retardar reações de decomposição do fármaco que incluem, por exemplo, reações oxidativas.

Os surfactantes podem ser agentes ativos aniônicos, catiónicos, anfotéricos ou de superfície não-iônica. Surfactantes aniônicos adequados incluem, mas não se limitam a, surfactantes contendo carboxilato, sulfonato e iões sulfato. Exemplos de surfactantes aniônicos incluem sódio, potássio, amônio de sulfonatos alquilo de cadeia longa e sulfonatos alquilo arilo tais como dodecilbenzeno sulfonato de sódio; sulfosuccinatos de sódio dialquilo, tais como dodecilbenzeno sulfonato de sódio, sulfosuccinatos de sódio dialquilo, tais como bis-(2-etiltioxil)-sulfosuccinate de sódio; e sulfatos de alquilo, tais como sulfato de laurilo e sódio. Surfactantes catiónicos incluem, mas não se limitam a, compostos amônio quaternários tais como cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio, brometo de centrimônio, cloreto de estearil dimetilbenzil amônio, polioxoetileno e amina de côco. Exemplos de surfactantes não-iônicos incluem monoestearato de etileno glicol, miristato de propileno glicol, monoestearato de glicerilo, estearato de glicerilo, poligliceril-4-oleate, acilato de sorbitan, acilato de sacarose, laurato de PEG-150, monolaurato de PEG-400, monolaurato de polioxietileno, polisorbatos, octilfeniléter de polioxietileno, éter cetilo de PEG-1000, éter tridecilo de polioxietileno, éter butil de polipropileno glicol, Poloxamer[®] 401, monoisopropanolamida de estearoilo, e amida de sebo polioxietileno hidrogenada. Exemplos de surfactantes anfotéricos incluem N-dodecil-.beta.-alanina de sódio, N-lauril-.beta.-iminodipropionato de sódio, miristoamfoacetato, betaína lauril e sulfobetaína lauril.

Composições farmacológicas da invenção podem ser desenhadas de forma a permitir libertação retardada, continua, pulsátil, ou com outro tipo de modificação.

Se desejado, os comprimidos, esferas, grânulos ou partículas também podem conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares não-tóxicas, tais como agentes humidificadores ou emulsionantes, corantes, tampões de pH, e conservantes.

Também podem ser usadas formulações bioadesivas para aumentar a aquisição ou alterar a libertação. Tais formulações são conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Pedido de Patente EUA No. 20060045865 por Jacob, aqui incorporada por referência.

Também poderão ser úteis composições farmacológicas adaptadas a libertação através de administração por via nasal ou pulmonar. Foram descritos aerossóis para a libertação de agentes terapêuticos no trato respiratório, por exemplo, Adjei, A. and Garren, J. *Pharm. Res.*, 7: 565-569 (1990); and Zanen, P. e Lamm, J.-W.J. *Int. J. Pharm.*, 114: 111-115 (1995). O trato respiratório compreende as vias respiratórias superiores, incluindo a orofaringe e a laringe, seguidas das vias respiratórias inferiores, que incluem a traqueia, seguida de bifurcações para o interior dos brônquios e bronquíolos. As vias respiratórias superiores e inferiores são designadas vias condutoras. Os bronquíolos terminais dividem-se então em bronquíolos respiratórios, que por sua vez conduzem à zona respiratória final, os alvéolos ou pulmão profundo. 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). O pulmão profundo, ou

alvéolos, é o alvo primário de aerossóis terapêuticos inalados para libertação sistêmica de fármacos.

Fármacos administrados por inalação podem vir em formulações de aerossóis líquidos.

Para composições injetáveis (por exemplo, composições intravenosas), o veículo é água estéril destilada, soro fisiológico, soro fisiológico tamponado, ou outro excipiente farmacologicamente aceitável para injeção. Os aditivos podem incluir conservantes e ácidos ou bases para ajustar o pH, para alterar a solubilidade ou a aquisição.

Em uma forma de realização, em que a composição farmacológica inclui o composto DAP da fórmula V (ou o seu estereoisómero da fórmula VII) e a composição está adaptada a administração parentérica numa injeção, o composto é dissolvido em água com modificadores de tonicidade e molalidade adequados (tais como tampão fosfato). DAP é solúvel em água a mais de 100 mg/ml. Em uma forma de realização, DAP está adaptado a uma solução estéril para injeção intravenosa. Em uma aspeto, a molalidade da composição farmacológica em que DAP está adaptado a administração intravenosa é ajustada a 290 mOsm/L com cloreto de sódio e o pH é ajustado a 7,4 com hidróxido de sódio. De preferência a composição farmacológica é administrada lentamente na forma de um bolus intravenoso.

IV. Métodos de Utilização

A presente invenção fornece um composto da invenção para ser utilizado na reversão completa ou parcial do efeito anticoagulante de um inibidor da coagulação num paciente (por exemplo, um composto da fórmula II, III, IV, V, VI, VII ou VIII) ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

Na presente invenção, um inibidor da coagulação (também aqui designado por anticoagulante) é uma molécula que inibe o processo de coagulação. Exemplos de inibidores da coagulação incluem, mas não se limitam a, ativadores da antitrombina (por exemplo, heparina não fracionada e LMWH), inibidores de fator IIa, e inibidores de fator Xa.

Heparina: A heparina é um mucopolissacárido que ocorre naturalmente e que atua no organismo como um cofator da antitrombina para impedir a coagulação intravascular. Esta substância é produzida por basófilos e mastócitos, que se encontram em grande número no tecido conetivo que rodeia os capilares, sobretudo nos pulmões e no fígado. Na forma de sal de sódio, a heparina é usada terapeuticamente como anticoagulante.

Heparina de Baixo Peso Molecular: A Heparina de Baixo Peso Molecular (LMWH) é formada a partir da heparina através de diversos métodos de despolimerização, incluindo a despolimerização oxidativa com peróxido de hidrogénio, usada no fabrico de ardeparin (NORMIFLO®); clivagem desaminativa com nitrito de isoamil, usada no fabrico de certoparin (SANDOPARIN®); clivagem alcalina beta-eliminativa do éster benzílico da heparina, usada no fabrico de enoxaparin (LOVENOX® e CLEXANE®); despolimerização oxidativa com Cu^{2+} e peróxido de hidrogénio, usada no fabrico de parnaparin (FLUXUM®); clivagem beta-eliminativa pela enzima heparinase, usada no fabrico de tinzaparin (INNOHEP® e LOGIPARIN®); clivagem desaminativa com ácido nitroso, usada na manufatura de dalteparin (FRAGMIN®), reviparin (CLIVARIN®) e nadroparin (FRAXIPARIN®), que resulta na formação dum resíduo de anidromanose não-natural na extremidade redutora dos oligossacáridos produzidos. Este pode posteriormente ser

convertido em anidromanitol utilizando um agente redutor adequado. Quer a beta-eliminação química quer a enzimática resultam na formação dum resíduo uronato (UA) insaturado não-natural na extremidade não-redutora.

A Tabela 1 apresenta um resumo das atividades anticoagulantes de diversas LMWHs.

Tabela 1: Pesos moleculares (MW) e atividades anticoagulantes de produtos LMWH presentemente disponíveis.

LMWH	Peso molecular médio	Razão de atividades anti-Xa/anti-IIa
BEMIPARIN	3600	9.7
CERTOPARIN	5400	2.4
DALTEPARIN	6000	2.5
ENOXAPARIN	4500	3.9
NADROPARIN	4300	3.3
PARNAPARIN	5000	2.3
REVIPARIN	4400	4.2
TINZAPARIN	6500	1.6
<i>Adaptado de Gray E. et al., Thromb Haemost, 99: 807-818 (2008).</i>		

Clinicamente, a LMWH (peso molecular médio de cerca de 4,5 kDa) difere da heparina (isto é, "heparina não-fracionada"; peso molecular médio de cerca de 15 kDa) de diversos modos: (a) a LMWH necessita de doses subcutâneas menos frequentes para profilaxia pós-operatória de tromboembolismo venoso; (2) a LMWH requer uma ou duas injeções subcutâneas diárias em pacientes tratados para tromboembolismo venoso e angina instável em vez da infusão intravenosa necessária com heparina; (3) a LMWH não requer a monitorização do parâmetro de coagulação aPTT; (4) a LMWH oferece menos riscos de hemorragias; (5) o uso prolongado de LMWH oferece menores riscos de osteoporose; e (6) a LMWH oferece riscos menores de trombocitopenia induzida pela heparina (um

efeito secundário potencial da administração de heparina). Contudo, os efeitos anticoagulantes da heparina são geralmente reversíveis com sulfato de protamina, enquanto a protamina tem um efeito limitado na LMWH. Além disso, a LMWH tem um efeito menor na atividade da trombina (Fator IIa) do que a heparina, enquanto a LMWH e a heparina têm efeitos semelhantes na atividade do Fator Xa.

Trombina e Outros Inibidores de Fator IIa ou Xa: Exemplos de inibidores da trombina (Fator IIa) e fator Xa incluem anticoagulantes como dabigatran (PRADAXA®), rivaroxaban (XARELTO®), apixaban (ELIQUIS®), edoxaban (LIXIANA®), fondaparinux (ARIXTRA®), e argatroban (ARGATROBAN®).

O nome químico para o anticoagulante oral PRADAXA®, dabigatran etexilato mesylato, um inibidor direto da trombina, é β -Alanina, N-[[[2-[[[4-[[[(hexiloxi)carbonil]amino]iminometil]fenil]amino]metil]-1-metil-1H-benzimidazol-5-yl]carbonil]-N-2-piridinil-,etil éster, methanesulfonato. O dabigatran e os seus glucoronidos acilo são inibidores diretos e competitivos da trombina. Dado que a trombina (Fator IIa, protease de serina) permite a conversão de fibrinogénio em fibrina durante a cascata de coagulação, a sua inibição impede o desenvolvimento de um trombo.

O Rivaroxaban, um inibidor do fator Xa, é o ingrediente ativo em XARELTO®, e o seu nome químico é 5-Cloro-N-({(5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxo-4-morfolinil)fenol]-1,3-oxazolidin-5-il}metol)-2-tiophenecarboxamida. O rivaroxaban é um (S)-enantiómero puro. O XARELTO® é um inibidor de fator Xa biodisponível oralmente que bloqueia seletivamente o centro ativo do fator Xa e não necessita de um cofator (tal como Anti-trombina III) para a sua atividade.

O apixaban ou ELIQUIS® é 1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-4,5-dihidropirazolo[5,4-c]piridina-3-carboxamida. É um inibidor direto do fator Xa administrado oralmente, aprovado na Europa, e presentemente a ser testado em ensaios de fase III nos E.U.A. para a prevenção de tromboembolismo venoso.

O edoxaban or LIXIANA® é N'-(5-cloropiridin-2-il)-N-[(1S,2R,4S)-4-(dimetilcarbamoil)-2-[(5-metil-6,7-dihidro-4H-[1,3]tiazolo[5,4-c]piridina-2-carbonil)amino]ciclohexil]oxamida. O edoxaban é um inibidor direto do fator Xa, e o seu uso foi aprovado no Japão para a prevenção de tromboembolismo venoso.

ARIXTRA® é fondaparinux sódio. É um inibidor sintético e específico de Fator X ativado (Xa). Fondaparinux sódio é metil 0-2-deoxi-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-2-deoxi-3,6-di-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-2-O-sulfo- α -L-idopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2-deoxi-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranoside, sal decasódico. A fórmula molecular do fondaparinux sódio é $C_{31}H_{43}N_3Na_{10}O_{49}S_8$ e o seu peso molecular é 1728. A fórmula estrutural é apresentada de seguida:



A atividade antitrombótica do fondaparinux sódio resulta da inibição seletiva do Fator Xa, mediada pela anti-trombina III (ATIII). Ao ligar-se seletivamente à ATIII, o fondaparinux sódio potencia (cerca de 300 vezes) a neutralização inata do Fator Xa pela ATIII. A neutralização do Fator Xa interrompe a cascata de coagulação sanguínea, inibindo dessa forma a formação de trombina e o

desenvolvimento de trombos. O fondaparinux sódio não inativa a trombina (Fator IIa ativado) e não tem efeitos conhecidos na função das plaquetas. Na dose recomendada, o fondaparinux sódio não afeta a atividade fibrinolítica ou o tempo de hemorragia. A farmacodinâmica/farmacocinética do fondaparinux sódio derivam das concentrações plasmáticas de fondaparinux quantificadas através da atividade anti-fator Xa. Apenas o fondaparinux pode ser utilizado para calibrar o ensaio anti-Xa. (Os padrões internacionais de heparina ou LMWH não são adequados para este fim.) Desta forma, a atividade do fondaparinux sódio é expressa como miligramas (mg) do calibrador fondaparinux. A atividade anti-Xa do fármaco aumenta com um aumento da concentração de fármaco, atingindo valores máximos em cerca de três horas. O fondaparinux sódio administrado por injeção subcutânea é absorvido rápida e completamente (a biodisponibilidade absoluta é 100%). Em pacientes tratados com uma injeção diária de 2,5 mg de fondaparinux sódio, o pico da concentração plasmática no estado estacionário é, em média, 0,39 a 0,50 mg/L e é atingido cerca de 3 horas após a administração. Nestes pacientes, a concentração plasmática mínima no estado estacionário é 0,14 a 0,19 mg/L. Em pacientes com trombose venosa profunda sintomática e embolia pulmonar tratado com uma injeção diária de 5 mg (peso corporal <50 kg), 7,5 mg (peso corporal 50 to 100 kg), e 10 mg (peso corporal >100 kg) de fondaparinux sódio, as doses ajustadas ao peso corporal resultam em picos médios de fase estacionária e concentrações plasmáticas mínimas semelhantes para todas as categorias de peso corporal. Em média, a concentração plasmática de pico em fase estacionária varia entre 1,20 e 1,26 mg/L. Nestes pacientes, em média, a concentração plasmática mínima em fase estacionária varia entre 0,46 e 0,62 mg/L.

ARGATROBAN® é um inibidor direto da trombina (Fator IIa) sintético, derivado da L-arginina. O nome químico do ARGATROBAN® é ácido 1-[5-[(aminoiminometil) amino]-1-oxo-2-[[(1,2,3,4-tetrahidro-3-metil-8-quinolinil)sulfonil]amino]pentil]-4-metil-2-piperidinecarboxílico, monohidratado. A fórmula molecular do ARGATROBAN® é $C_{23}H_{36}N_6O_5S \cdot H_2O$. O seu peso molecular é 526,66. O ARGATROBAN® é um inibidor direto da trombina que se liga reversivelmente ao centro ativo da trombina. O ARGATROBAN® não necessita do cofator anti-trombina III para a sua atividade antitrombótica. O ARGATROBAN® é administrado por injeção e exerce os seus efeitos anticoagulantes através da inibição de reações catalisadas ou induzida pela trombina, incluindo a formação de fibrina; ativação dos fatores de coagulação V, VIII e XIII; ativação da proteína C; e agregação de plaquetas.

Um efeito anticoagulante é qualquer efeito dum inibidor da coagulação (por exemplo, heparina, LMWH, inibidor do Fator Xa, inibidor do Fator IIa) que resulta no bloqueio da propagação das cascatas de coagulação. Exemplos não-limitantes de efeitos anticoagulantes incluem o aumento da atividade antitrombina, diminuição da atividade de Fator Xa, diminuição da atividade de Fator IIa, aumento de perda de sangue, e quaisquer outras situações em que a atividade ou as concentrações de fatores de coagulação estão alteradas de modo a inibir a formação de coágulos sanguíneos.

A atividade dum inibidor da coagulação (isto é, os seus efeitos anticoagulantes) pode ser medida por diversos métodos, incluindo, mas não limitado a, ensaio cromogénico de atividade anti-fator Xa, ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada, tempo de protrombina, ensaio de hemorragia (por exemplo, ensaio de hemorragia

caudal em ratos), tromboelastografia, ensaio de geração de trombina, tempo de veneno de víbora Russel diluída, tempo de coagulação da ecarina, tempo de coagulação de caulino, Razão Internacional Normalizada (INR), teste de fibrinogénio (Clauss), tempo de trombina (TCT), tempo de mistura, e tempo de lise de euglobulina. Estes métodos ajudam a determinar vários parâmetros de anticoagulação, e são conhecidos por quem é especializado na técnica. Assim, em algumas formas de realização, a anticoagulação pode ser monitorizada por um, ou por uma combinação, dos ensaios acima enumerados.

O fator de atividade anti-fator Xa mede diretamente a atividade anti-fator Xa. A metodologia subjacente um ensaio anti-fator Xa consiste na adição de plasma do paciente a uma quantidade conhecida de fator Xa e antitrombina em excesso. Se um inibidor do fator Xa estiver presente no plasma do paciente, irá diminuir a atividade enzimática do fator Xa. A quantidade de fator Xa residual é inversamente proporcional à quantidade de agente anti-Xa no plasma. A quantidade de fator Xa residual é detetada através da adição dum substrato cromogénico que mimetiza o substrato natural do fator Xa, levando à sua clivagem pelo fator Xa e à libertação dum composto corado que pode ser detetado por um espectrofotómetro. O ensaio não é afetado por deficiências de antitrombina do paciente, porque é fornecido à reação um excesso de antitrombina. Os resultados são fornecidos em termos de concentração de anticoagulante, em unidades/mL de anti-fator Xa, de forma que valores elevados indicam níveis elevados de anticoagulação e valores baixos indicam níveis baixos de anticoagulação.

O ensaio de atividade de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) é um ensaio que mede o tempo de coagulação

sanguínea. São recolhidas amostras de sangue para medição direta ou em tubos com oxalato e citrato para impedir a coagulação pelo cálcio até que o ensaio possa ser realizado. Durante o ensaio, são adicionados ao plasma um fosfolípido, um ativador (por exemplo sílica, celite, caulino, ácido elágico, etc.), e cálcio, para induzir a coagulação. O ensaio mede o tempo de formação de um trombo (coágulo).

O ensaio de hemorragia caudal em ratos ou ensaio de seccionamento de cauda de rato é um ensaio que meda a perda de sangue, por exemplo, a perda de sangue após a administração de um fármaco. Em uma forma de realização, em que se testa o efeito do composto da invenção (por exemplo, DAP), DAP é administrado por via intravenosa na T_{max} do anticoagulante. Após 20 minutos, as caudas dos ratos são seccionadas a cerca de 1 mm da extremidade, colocadas em soro fisiológico à temperatura ambiente, e o sangue é recolhido durante 30 minutos e posteriormente pesado.

Os ensaios utilizados para medir a atividade de inibidores da coagulação podem ser usados no laboratório ou na clínica para medir a reversão do efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação, por exemplo, a reversão do efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação devida à administração duma composição farmacológica contendo um composto da invenção. Assim, em uma forma de realização, os ensaios são utilizados para medir a reversão completa ou parcial dum efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação (tal como heparina, LMWH, inibidor do Fator Xa, e inibidor do Fator IIa).

Ocorre uma reversão completa de um efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação aquando da neutralização da atividade anticoagulante. Em uma forma de realização,

ocorre uma reversão completa de um efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação, medida pelo ensaio de atividade anti-Xa, quando a concentração de anticoagulante é trazida abaixo da concentração mínima efetiva (MEC) para a anticoagulação. Tal como usada aqui, a MEC é a quantidade mais baixa de fármaco (por exemplo, inibidor da coagulação) necessária para um efeito terapêutico. Em outra forma de realização, ocorre uma reversão completa de um efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação, medida pelo ensaio aPTT, quando o aPTT regressa para cerca de 10% do patamar inicial. Tal como usado aqui, o patamar inicial refere-se a aPTT na ausência de inibidores da coagulação.

Em muitos casos, a anticoagulação ainda é desejável, embora em menor grau. Assim, será indicada uma reversão parcial de um efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação. Ocorre reversão parcial de um efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação, medida pelo ensaio de atividade anti-Xa, quando a concentração de anticoagulante é trazida abaixo da concentração de anticoagulante na ausência dum agente de reversão da anticoagulação (por exemplo, um composto da invenção), mas permanece acima da MEC para anticoagulação. Assim, em algumas formas de realização, ocorre reversão parcial de um efeito anticoagulante de um inibidor da coagulação quando a concentração de anticoagulante é cerca de quatro vezes inferior à MEC, de preferência cerca de o dobro da MEC, de maior preferência menor do que cerca do dobro da MEC (por exemplo, aproximadamente a MEC). A reversão parcial de um efeito anticoagulante de um inibidor da coagulação, tal como medida por um ensaio aPTT, ocorre quando aPTT é inferior à medida na ausência dum agente de reversão da anticoagulação (por exemplo, um composto da invenção) mas acima do patamar inicial. Assim, em outras formas de realização, ocorre a reversão parcial de um efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação quando a

medida de aPTT é menor do que cerca de quatro vezes o patamar inicial, de preferência cerca de o dobro da MEC, de maior preferência menor do que cerca de o dobro da MEC. Em geral, a extensão e duração da reversão da anticoagulação é determinada pelo médico ou veterinário.

Tal como utilizado aqui "sujeito com necessidade" é um sujeito com necessidade aguda ou planeada de reversão de anticoagulação, por exemplo, um sujeito com sobredosagem de anticoagulante, um sujeito com hemorragias (por exemplo, hemorragia induzida por trauma ou hemorragia espontânea do trato gastrointestinal ou noutro local), um sujeito com necessidade de intervenção cirúrgica planeada, um sujeito submetido a procedimentos invasivos ou não-invasivos com necessidade de biópsia, um sujeito submetido a um procedimento em que um erro processual possa conter um risco de hemorragia caso o sujeito permaneça anticoagulado, um sujeito com necessidade de anestesia espinal ou epidural. "Sujeito com necessidade" pode ser um paciente em quem a presença de um inibidor de fator direto (Fator Xa, Fator IIa e/ou antitrombina) produz ou é provável que produza efeitos hemorrágicos. Assim, "sujeito com necessidade" pode ser um sujeito sob terapia de anticoagulantes (por exemplo, sujeito a receber heparina, LMWH, inibidor de Fator IIa, ou inibidor de Fator Xa) para, por exemplo, prevenção de acidente vascular cerebral, procedimentos cardíacos cirúrgicos e de diagnóstico, arritmias cardíacas, prevenção de trombose venosa profunda (DVT), embolia pulmonar, prevenção da formação de coágulos sanguíneos patológicos em geral.

Tal como usado aqui, "sujeito com necessidade" é um animal. "Sujeito com necessidade" inclui, sem limitação, um ser humano, ratinho, rato, cobaia, cão, gato, cavalo, vaca, porco, macaco, chimpanzé, babuíno ou macaco rhesus. Em uma

forma de realização, "sujeito com necessidade" é um mamífero. Em outra forma de realização, "sujeito com necessidade" é um ser humano.

Tal como usado aqui, "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de agente de reversão da anticoagulação (por exemplo, um composto da invenção aqui descrita) que é eficaz, após administração de uma ou várias doses (por exemplo, bolus e/ou doses de manutenção) a um sujeito, na neutralização ou inibição (completa ou parcial) do efeito anticoagulante dum inibidor da coagulação ou na estimulação da coagulação.

Em um aspeto, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma dose dum agente de reversão da anticoagulação que tem entre 0,01 e 10.000 vezes o peso da dose de anticoagulante. Em outro aspeto, o agente de reversão da anticoagulação é administrado a uma razão dose massa entre cerca de 1:1 e 1:1000 de agente de reversão da anticoagulação para anticoagulante, por exemplo, 100:1 de agente de reversão da anticoagulação para anticoagulante, tal como 10:1 de agente de reversão da anticoagulação para anticoagulante. Em uma forma de realização do presente método, uma quantidade terapeuticamente eficaz de agente de reversão da anticoagulação pode ser administrada por uma via de administração subcutânea, intramuscular, ou intravenosa. Por exemplo, pode ser administrado por via intravenosa como solução estéril. Em outra forma de realização, uma quantidade terapeuticamente eficaz de agente de reversão da anticoagulação é administrada por via oral, nasal, ou pulmonar, ou numa região mucosa (boca, reto, ou vagina).

Geralmente, a quantidade terapeuticamente eficaz de agente de reversão da anticoagulação (isto é, o composto da invenção) varia entre cerca de 0,001 mg/kg e cerca de 1

g/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,01 mg/kg e cerca de 600 mg/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,01 mg/kg e cerca de 250 mg/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,01 mg/kg e cerca de 400 mg/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,01 mg/kg e cerca de 200 mg/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,01 mg/kg e cerca de 100 mg/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,01 mg/kg e cerca de 25 mg/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,001 mg/kg e cerca de 100 mg/kg do peso corporal por dia; em outra forma de realização, entre cerca de 0,001 mg/kg e cerca de 10 mg/kg do peso corporal por dia; e em outra forma de realização, entre cerca de 0,001 mg/kg e cerca de 1 mg/kg do peso corporal por dia. Podem ser usados ensaios de coagulação padrão (tais como os aqui descritos) e outros ensaios *in vitro* para determinar a quantidade terapeuticamente eficaz.

Em alguns aspetos da invenção, o composto da invenção pode ser co-administrado com pelo menos um agente terapêutico adicional. Em uma forma de realização, o pelo menos um agente terapêutico adicional pode ser vitamina K, que é geralmente utilizada para corrigir deficiências na coagulação induzidas por compostos varfarina.

A presente invenção também fornece um ensaio de diagnóstico para determinar a concentração de anticoagulante no sangue. Tal como mostrado no Exemplo 13 abaixo, DAP demonstra uma tendência de dose-resposta na reversão de rivaroxaban *ex vivo* em plasma humano usando um ensaio cromogénico anti-

fator Xa clarificado a 510k. Assim, o composto da invenção, por exemplo, DAP, pode ser usado num ensaio de diagnóstico para determinar a concentração sanguínea dum anticoagulante, por exemplo, um inibidor de Fator Xa. Num ensaio deste tipo, o composto da invenção, por exemplo, DAP, pode ser usado em conjunto com os reagentes do kit atualmente disponível ou enquanto substrato de ligação direta, substituindo fatores sintéticos presentes em kits atualmente disponíveis. Em uma forma de realização, o ensaio de diagnóstico pode incluir o composto da invenção (por exemplo, DAP) como substrato de ligação, em que o composto da invenção se liga a um anticoagulante numa amostra de sangue, e a atividade residual do fator de coagulação (por exemplo, Fator Xa) é quantificada de modo a determinar-se a concentração de anticoagulante na amostra. Em outra forma de realização, o ensaio de diagnóstico pode incluir o composto da invenção (por exemplo, DAP) conjugado com micropartículas magnéticas em que o composto da invenção pode ligar-se a um anticoagulante numa amostra de sangue de modo a remover o anticoagulante da amostra ou a concentrá-lo. O ensaio cromogénico baseado em DAP ou realizado no ponto de atendimento pode ajudar na determinação de níveis de anticoagulantes, o que constitui atualmente uma significativa necessidade clínica não atendida, uma vez que os meios de diagnóstico atualmente disponíveis não permitem determinar com elevada precisão as concentrações sanguíneas de inibidores diretos.

Além disso, a presente invenção fornece um ensaio, por exemplo, um ensaio cromogénico, para determinar a concentração de composto da invenção, por exemplo, DAP, necessária para reverter o anticoagulante presente no sangue. Em uma forma de realização, o ensaio utiliza DAP como agente de ligação direta para vários anticoagulantes.

A invenção também fornece um ensaio, por exemplo, um ensaio cromogénico, para determinar a concentração sanguínea do composto da invenção, por exemplo, DAP. Tal ensaio pode utilizar concentrações pré-determinadas dum anticoagulante.

A presente invenção também fornece um kit de diagnóstico que incorpora um ensaio de diagnóstico acima descrito. Assim, em uma forma de realização, o kit é utilizado para determinar a concentração de anticoagulante no sangue. O kit pode conter outros componentes, invólucros, instruções, reagentes, e/ou outros materiais para auxiliar na determinação de anticoagulante (por exemplo, inibidor de Fator Xa) ou concentração de DAP, e para facilitar a utilização do kit. Além disso, o kit pode ser utilizado para determinar se existe uma combinação de varfarina e outro anticoagulante, já que a varfarina não é afetada pelo composto da invenção, ao passo que outros anticoagulantes serão revertidos.

Tal como demonstrado nos exemplos seguintes, um composto da invenção (por exemplo, DAP) pode ligar-se à heparina, inativando-a *in vivo*. Assim, para além dos seus efeitos na coagulação, um composto da invenção pode também ser usado para destituir tecidos das atividades bioquímicas da heparina. Por exemplo, outras moléculas que se ligam à heparina demonstraram a capacidade de reduzir o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento da epiderme (EGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), e outros fatores de crescimento que se ligam à heparina. Foi demonstrado que a privação de VEGF e EGF é útil na terapia do cancro, tornando os compostos da invenção possíveis candidatos para o tratamento do cancro. Assim, em um aspeto, a presente invenção fornece um método para tratar, prevenir, ou melhorar o cancro, incluindo a administração duma quantidade terapeuticamente eficaz dum

composto da invenção ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

Tal como demonstrado nos exemplos, um composto da invenção, DAP, ligou-se a XARELTO®, ELIQUIS®, ARIXTRA® e LMWH *in vitro*, tal como medido por dispersão de luz dinâmica (DLS). DAP reverteu ARIXTRA® e LMWH administrados por via subcutânea *in vivo*. DAP reverteu XARELTO®, ELIQUIS®, PRADAXA®, LIXIANA®, heparina não-fracionada e bemiparin *in vivo*. DAP administrado por via intravenosa a ratos em doses de 100mg/kg, 250mg/kg e 400mg/kg não mostrou efeitos adversos. DAP mostrou biodisponibilidade oral em ratos. DAP não revelou ligação a ERG humano, não inibiu ou atuou como substrato de enzimas CYP, e não se ligou a quaisquer proteínas do plasma de forma apreciável (dados não mostrados). Além disso, DAP parece ter um tempo de meia-vida de eliminação curto, já que a anticoagulação induzida por PRADAXA® regressou ao fim de 20-30 minutos após uma dose intravenosa de DAP em ratos. Ademais, DAP foi estável à esterilização (sovbreviveu um aquecimento a 200 °C) e ao armazenamento sob a forma de pó liofilizado por mais de um ano. A tabela 2 mostra um resumo da reversão de anticoagulantes por DAP.

Tabela 2: Reversão de anticoagulantes

Nome Comercial	Nome Genérico	Empresa	Fator Sanguíneo Inibido	Via de Administração	Liga-se a DAP	Agentes de Reversão
Lovenox®	Enoxaparin	Sanofi, Sandoz/ Momenta,	~80-90% Xa,	Injeção s.c.	X	Protamina* & DAP
Hibor®	Bemiparin	Rovi	~10-20% IIa			
Arixtra®	Fondaparinu	GSK	Xa	Injeção s.c.	X	DAP

Nome Comercial	Nome Genérico	Empresa	Fator Sanguíneo Inibido	Via de Administração	Liga-se a DAP	Agentes de Reversão
	X					
Eliquis®	Apixaban	Pfizer, BMS	Xa	Oral	X	DAP
Xarelto®	Rivaroxaban	Bayer, Janssen, J&J	Xa	Oral	X	DAP
Argatroban®	Argatroban	GSK	IIa	Injeção s.c.	--	Nenhum
Pradaxa®	Dabigatran etexilate	Boehringer Ingelheim	IIa	Oral	X	DAP

* A protamina reverte parcialmente heparinas de baixo peso molecular.

Tabela 3: Correlação *in vitro in vivo*

Nome Genérico do Fármaco	Razão Molar de Ligação por DLS [DAP/fármaco]	Razão Molar de Reversão [DAP/fármaco]	Medição <i>in vivo</i>	Fator(es) Sanguíneo(s) Inibido(s)	Via de Administração
Rivaroxaban	9	3*	Ensaio de hemorragia	Xa	Oral
Apixaban	10	8*	Ensaio de hemorragia	Xa	Oral
Fondaparinux	3	130	Kit Xa	Xa	Injeção s.c.
Bemiparin	7	140	aPTT	~80-90% Xa, ~10-20% IIa	Injeção s.c.
Argatroban	N/A	N/A	aPTT	IIa	Injeção s.c.
Assume biodisponibilidades orais de 60% para rivaroxaban, 50% para apixaban, e 5% para dabigatran; Assume 100% de biodisponibilidade para anticoagulantes injetáveis.					

A Tabela 3 mostra um resumo da correlação *in vitro-in vivo* do tratamento com DAP. A razão molar de ligação medida por DLS é calculada dividindo a razão de massas entre DAP e anticoagulante mais baixa que mostra ligação significativa, definida como uma associação em tampão fosfato acima de 50 nm em diâmetro aparente, pela razão de pesos moleculares entre DAP e o anticoagulante. Os pesos moleculares usados nos cálculos foram 512 Da (DAP), 436 Da (rivaroxaban), 460 Da (apixaban), 1,7 kDa (fondaparinux), 3,6 kDa (bemiparin), 628 Da (dabigatran), e 509 Da (ARGATROBAN®). A razão molar de reversão foi calculada de modo idêntico usando a dose de reversão mínima de DAP necessária para atingir reversão, tal como medida pelo ensaio hemorrágico de seccionamento de cauda de ratos, kit cromogénico anti-Xa, ou por tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT). Para o ensaio hemorrágico, considerou-se que o anticoagulante foi revertido se a perda sangue ao longo de 30 minutos após o seccionamento da cauda, com a cauda cortada imersa em soro

fisiológico à temperatura ambiente, fosse até 25% da do controle (sem administração de anticoagulante). Tal como medida pelo kit Xa, a reversão foi atingida quando a concentração efetiva de anticoagulante desceu abaixo da concentração efetiva mínima (MEC) para anticoagulação. Tal como medida por aPTT, considerou-se que a reversão foi atingida quando uma aPTT de rato anticoagulada regressou a até 10% do patamar inicial. No caso de fondaparinux, embora a dose mais baixa de DAP administrado *in vivo* tenha sido 200mg/kg, os dados *in vitro* indicam que são possíveis doses de reversão significativamente mais baixas.

EXEMPLOS

A invenção será adicionalmente ilustrada nos Exemplos não-limitantes seguintes. Estes Exemplos são apresentados para facilitar a compreensão da invenção mas não pretendem limitar de alguma forma o seu âmbito, nem deverão ser interpretados como tal. Os Exemplos não incluem descrições detalhadas de métodos convencionais que são bem conhecidos por quem tenha um grau comum de especialização na técnica.

Exemplo 1: Avaliação da Estabilidade *in vitro* da Piperazina Di-Arginina ("DAP")

Materiais e Métodos

Foi preparado um sal acetato de DAP como aqui descrito. Tal como descrita nestes exemplos, DAP sólida ou em pó refere-se ao sal acetato, enquanto DAP em solução se refere à base livre que resulta da ionização do sal em solução aquosa. Como é descrito nestes exemplos, o composto DAP utilizado foi o composto da Fórmula VII.

A estabilidade térmica de DAP em pó foi testada de duas formas. DAP foi armazenada a 4 °C durante 7 meses antes da utilização. Além disso, DAP sólido foi inspecionado por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) através do seu aquecimento desde -20 °C até 200 °C, retorno a -20 °C e novo aumento até 200 °C.

Resultados

DAP em pó foi estável a 4 °C por mais de 12 meses. Os resultados de DSC são apresentados na **Figura 1**. O segundo aquecimento ("2") revelou um comportamento térmico semelhante ao primeiro aquecimento ("1"), indicando que DAP sobreviveu aquecimentos repetidos a 200 °C. Este resultado sugere que DAP tem a capacidade de sobreviver a temperaturas superiores às necessárias para esterilização.

Exemplo 2: Ligação de DAP a Heparina e LMWH

Materiais e Métodos

Foi utilizada dispersão de luz dinâmica (DLS) para avaliar a associação de 1 mg/mL de heparina não-fracionada e 1 mg/mL de bemiparina bemiparin (LMWH; HIBOR®), sozinhas ou em combinação, com 100 mg/mL de DAP em água (razões de massa de 100:1 de DAP para heparina ou LMWH).

Resultados

DAP associou-se fisicamente em água, quer com heparina não-fracionada (**Figura 2**), quer com LMWH (não mostrado), formando associações físicas que aumentam o diâmetro aparente. Quando foram misturadas soluções de DAP com soluções de LMWH ou heparina não-fracionada, formaram-se

partículas devido às interações físicas entre ambos, em concordância com a teoria que DAP tem a capacidade de reverter a anticoagulação por heparina e por LMWH através duma associação física com estas moléculas.

Exemplo 3: Ligação de DAP a Anticoagulantes Medida por DLS

Materiais e Métodos

Rivaroxaban (XARELTO®) isoladamente, DAP isoladamente, e combinações DAP:rivaroxaban em razões de massa de 1:1 e 10:1, foram adicionados a uma solução aquosa e analisados por dispersão dinâmica da luz (DLS) para avaliar a associação entre DAP e rivoraxaban. Realizou-se uma experiência semelhante com apixaban (ELIQUIS®) isoladamente, DAP isoladamente, e combinações DAP:apixaban em razões de massa de 1:1, 10:1 e 100:1. Foram testados de modo semelhante fondaparinux (ARIXTRA®) isoladamente, DAP isoladamente, e combinações fondaparinux:DAP em razões de massa de 1:1, 10:1 e 100:1. Foram também testados LMWH (bemiparin; HIBOR®), isoladamente, DAP isoladamente, e combinações LMWH:DAP em razões de massa de 1:1, 10:1 e 100:1. A concentração de LMWH testada foi 0,1 mg/mL. Assim, a 1:1 foram testados 0,1 mg/mL de DAP, a 10:1 foram testados 1 mg/mL de DAP, e a 100:1 foram testados 10 mg/mL de DAP.

Além disso, foram testados dabigatran isoladamente, DAP isoladamente, e combinações dabigatran:DAP em razões de massa de 1:1, 10:1, 100:1, 1000:1 e 10.000:1. Finalmente, foram testados ARGATROBAN® isoladamente, DAP alone, ou combinações de argatroban:DAP em razões de massa de 1:1, 10:1, 100:1 e 1000:1.

Resultados

A **Figura 3** mostra os resultados para rivaroxaban; a **Figura 4** para apixaban; a **Figura 5** para fondaparinux (ARIXTRA®); a **Figura 6** para LMWH; e a **Figura 7** para argatroban. Cada uma destas figuras mostra os picos individuais que representam DAP e o anticoagulante isoladamente em solução aquosa. Quando se misturou o anticoagulante com DAP em razões de massa suficientemente elevadas, observou-se uma alteração no tamanho. Neste ensaio, mesmo um pequeno aumento de tamanho indica uma interação física entre ambos; contudo, apenas se usaram alterações significativas no diâmetro aparente para avaliar a correlação *in vitro in vivo*. O diâmetro aparente é uma medida do grau de interação.

Exemplo 4: Reversão por DAP da Anticoagulação por LMWH In Vivo

Materiais e Métodos

Foram administrados por injeção subcutânea 10 mg de bemiparina (uma sobredosagem de LMWH) a um rato albino macho, com um peso de 470 g. O aPTT foi medido ao longo de cinco horas. Quatro horas após a administração de LMWH, o rato recebeu uma dose intravenosa de 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP).

Resultados

A administração de LMWH levou a um aumento de aPTT de 53 para 246 segundos ao longo de quatro horas. A administração intravenosa de 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP) trouxe o aPTT para níveis inferiores aos do patamar inicial em 60 minutos (**Figura 8**).

Exemplo 5: Reversão por DAP da Anticoagulação por Dabigatran (PRADAXA®) In Vivo; um Estudo de Sobredosagem

Materiais e Métodos

Foram administrados oralmente 40 mg/kg de PRADAXA® (20mg de PRADAXA®; sobredosagem de PRADAXA®) a um rato albino macho, com um peso de 430 g.

Após aproximadamente 2 horas de tratamento com PRADAXA®, foram administrados por via intravenosa 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP). Aproximadamente 2 horas mais tarde, foi administrada ao rato uma dose de 100 mg/kg de DAP (50 mg de DAP). Uma hora mais tarde, foi administrada ao rato outra dose de 100 mg/kg de DAP (50 mg de DAP). O aPTT foi medido ao longo de todo o tratamento.

Resultados

Os resultados são apresentados nas **Figuras 9 e 13**. Duas horas após a administração de PRADAXA®, aPTT subiu de 43 para 81 segundo, mostrando anticoagulação significativa. Foram administrados 100 mg de DAP por via intravenosa, o que reduziu aPTT a valores inferiores aos do patamar inicial em 25 minutos. Duas horas mais tarde, aPTT tinha voltado a subir para 79 segundos e foi administrada ao rato uma dose de 50 mg de DAP. Em 30 minutos, aPTT desceu abaixo do patamar inicial. Em ambas as vezes, os níveis de aPTT subiram acima dos do patamar inicial em 60 minutos após a administração de DAP. Após a segunda dose de DAP, aPTT subiu para 53 segundos. Foi administrada por via intravenosa uma terceira dose de 100 mg/kg de DAP (50 mg de DAP) e aPTT baixou para valores do patamar inicial em 20

minutos. A **Figura 13** mostra uma experiência semelhante em que, após a administração de 15,5 mg/kg de PRADAXA®, aPTT regressou ao normal dentro de cerca de 30 minutos após o início do tratamento com 100 mg/kg de DAP.

Exemplo 6: Reversão por DAP da Anticoagulação por Heparina Não-Fracionada ("UHF") In Vivo.

Materiais e Métodos

Foram administrados por injeção subcutânea 10 mg/kg de heparina não-fracionada (5 mg de UHF) a um rato albino macho, com um peso de 515 g.

Foram administrados 200 mg/kg de DAP (100 mg de DAP) em dois bolus intravenosos após a administração de UHF. De seguida, foi administrada ao rato uma dose de 400mg/kg de DAP (200mg de DAP). O aPTT foi medido ao longo de todo o tratamento.

Resultados

Tal como mostrado na **Figura 10**, o aPTT subiu significativamente de 28 para 102 segundos ao longo de uma hora após a administração de heparina. A administração por via intravenosa de 100 mg de DAP fez descer o aPTT para 48 segundos em 20 minutos. Em 1 hora, aPTT subiu para 120 segundos, e foram administrados por via intravenosa mais 100mg de DAP. Em 15 minutos aPTT desceu para 47 segundos. Em 1 hora, aPTT subiu para 96 segundos, e foi administrada por via intravenosa uma dose de 200mg de DAP. Dez minutos mais tarde aPTT desceu para 33 segundos.

Exemplo 7: Reversão por DAP da Anticoagulação por Rivaroxaban (XARELTO®) In Vivo.***Materiais e Métodos***

Foram administrados oralmente 5 mg/kg de rivaroxaban (XARELTO®) a ratos. Quatro horas mais tarde, foram administrados por via intravenosa 5 mg/kg de DAP (2 mg de DAP). O aPTT foi medido aos zero, 15, 30, 45, 60 e 240 minutos antes da administração de DAP. O aPTT foi de novo medido cerca de 5, 10, 25, 35, 45, 60, 120, e 240 minutos após a administração de DAP.

Resultados

Os resultados são apresentados na **Figura 11**. DAP reverteu eficazmente a anticoagulação por rivaroxaban (XARELTO®) *in vivo*, em ratos.

Exemplo 8: Reversão por DAP da Anticoagulação por Fondaparinux (ARIXTRA®) In Vivo.***Materiais e Métodos***

Foram administrados por via subcutânea 5 mg/kg de fondaparinux a ratos. Duas horas mais tarde, foram administrados por via intravenosa 200 mg/kg de DAP. A atividade foi medida pelo ensaio cromogénico anti-fator Xa clarificado a 510k (Biophen) 10, 20, 30 e 60 minutos após a administração de DAP.

Resultados

A **Figura 12** mostra a reversão por DAP da anticoagulação por fondaparinux em 10 minutos após a administração.

Exemplo 9: DAP intravenosa não influencia aPTT.

Materiais e Métodos

Foram administrados por via intravenosa 0, 2, 10, 25, 50 ou 100 mg de DAP a ratos CD machos com pesos semelhantes e foi medido o aPTT.

Resultados

Os resultados mostrados na Figura 16 mostram que DAP administrada por via intravenosa não influenciou o aPTT de forma dependente da dose na ausência de anticoagulantes. As barras de erro representam os desvios-padrão da média de sete medições de aPTT ao longo de 90 minutos.

Exemplo 10: Reversão por DAP da Anticoagulação num Modelo de Seccionamento de Cauda de Rato.

Materiais e Métodos

Foram administrados 2 mg de rivaroxaban a três ratos. Um rato recebeu uma simulação de um agente de reversão sem DAP, o segundo recebeu 2,5 mg de DAP, e o terceiro recebeu 12,5 mg de DAP. Um quarto rato recebeu doses simuladas de anticoagulante e de agente de reversão ("sham"). Vinte minutos após a dose de reversão, as caudas foram seccionadas a 1 mm da extremidade, colocadas em soro fisiológico à temperatura ambiente, e o sangue foi recolhido ao longo de 30 minutos e posteriormente pesado.

Foram realizados os mesmos procedimentos com 1.25 mg de apixaban (ELIQUIS®) isoladamente ou em combinação com 5 ou 12,5 mg de DAP; com 15,5 mg de etexilato de dabigatran (PRADAXA®) isoladamente ou em combinação com 5 ou 12,5 mg de DAP; e com 5 mg de edoxaban (LIXIANA®), isoladamente ou em combinação com 12,5 mg de DAP.

Resultados

A **Figura 15** mostra os resultados para rivaroxaban, a **Figura 16** para apixaban, a **Figura 17** para edoxaban, e a **Figura 18** para etexilato de dabigatran. O ensaio de seccionamento de causa de rato é análogo à situação clínica em que é necessária uma reversão aguda de anticoagulante. Os resultados mostram que DAP reverteu eficazmente a atividade anticoagulante, levando a uma redução estatisticamente significativa da hemorragia, comparada com a de ratos que apenas receberam anticoagulante.

Exemplo 11: Reversão por DAP da Anticoagulação por Rivaroxaban (XARELTO®) em Sangue Humano Recém-Colhido Ex Vivo.

Materiais e Métodos

Foi recolhido sangue humano de um voluntário. Foram adicionados 0,25 µg/mL de rivaroxaban, isoladamente ou em combinação com 50 µg/mL de DAP. Os controlos continham 50 µg/mL de DAP os soro fisiológico. O aPTT foi medido dentro de 2 minutos após a recolha do sangue.

Resultados

A **Figura 19** mostra que a administração de DAP levou a uma reversão da anticoagulação induzida por rivaroxaban em sangue humano recém-colhido, tal como medido por aPTT. As barras de erro representam os erros-padrão de três experiências independentes.

Exemplo 12: Reversão por DAP da Anticoagulação por Rivaroxaban e Apixaban em Plasma Humano *Ex Vivo*.

Materiais e Métodos

Foram adicionados 218 µg/L ou 459 µg/L de rivaroxaban a plasma humano, com ou sem 1250 µg/L ou 6250 µg/L de DAP, respetivamente. De forma semelhante, foram adicionados 156 µg/L ou 313 µg/L de apixaban a plasma humano, com ou sem 1156 µg/L ou 3125 µg/L de DAP, respetivamente. O efeito de DAP na anticoagulação foi medido pelo ensaio cromogénico anti-fator Xa clarificado a 510k Biophen. As concentrações de rivaroxaban foram determinadas por comparação com padrões de calibração plasmáticos, enquanto as concentrações de apixaban foram inferidas de diluições de uma solução-stock, uma vez que ainda não estão disponíveis padrões de calibração.

Resultados

Para ambas as concentrações de rivaroxaban e apixaban, DAP devolveu a concentração efetiva de anticoagulante a valores abaixo da concentração mínima efetiva. A **Figura 20** mostra os resultados para rivaroxaban e a **Figura 21** mostra os resultados para apixaban.

Exemplo 13: Reversão dependente da dose de DAP da Anticoagulação por Rivaroxaban em Plasma Humano *Ex Vivo*.

Materiais e Métodos

Foram adicionados 218 µg/L de rivaroxaban a plasma humano, isoladamente ou em combinação com 1,25, 12,5, 125, ou 1250 µg/L de DAP. A atividade de fator Xa foi medida por um kit de ensaio cromogénico anti-fator Xa clarificado a 510k Biophen. As concentrações de rivaroxaban foram determinadas por comparação com padrões de calibração plasmáticos.

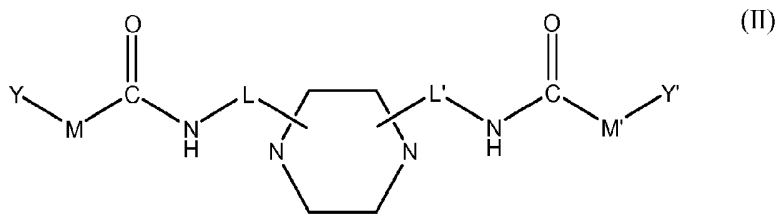
Resultados

A **Figura 22** mostra que DAP foi eficaz a reverter a anticoagulação de rivaroxaban em plasma humano de forma dependente da dose, tal como demonstrado pelo seu efeito na concentração de rivaroxaban (medida por um ensaio de atividade de Fator Xa).

REIVINDICAÇÕES

"AGENTES DE REVERSÃO DE ANTICOAGULANTES"

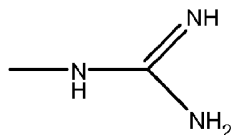
1. Um composto com a fórmula II:



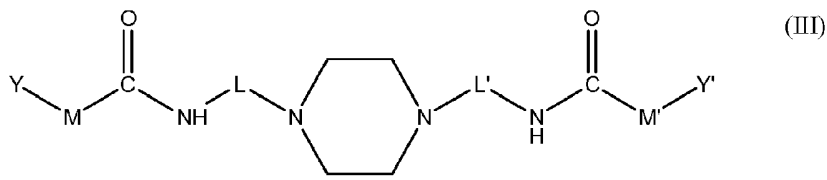
ou um seu sal farmacologicamente aceitável;

em que L e L' são ambas cadeias alquilenos C₁ a C₁₀ substituídas ou não-substituídas,

em que M e M' são ambas uma cadeia alquilenos C₁ a C₁₀ e em que Y e Y' são ambos

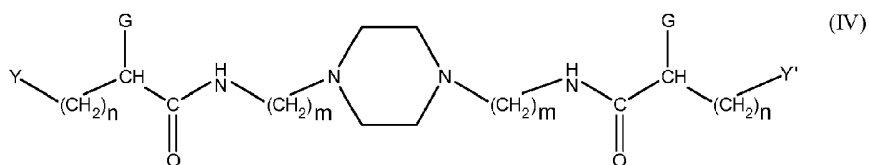


2. O composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto é representado pela fórmula III:



ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

3. O composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto é representado pela fórmula IV:

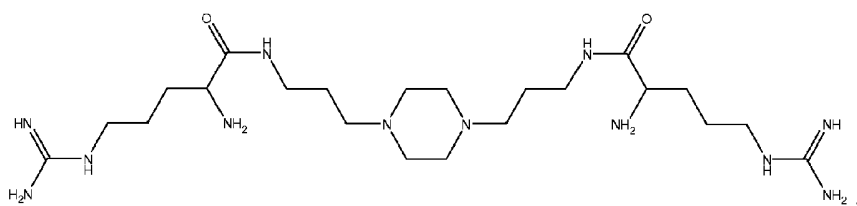


ou um seu sal farmacologicamente aceitável,
em que n é 3 a 5, m é 3 a 6 e G é escolhido de entre
 $-NH_2$ e OH .

4. O composto de acordo com a reivindicação 3, em que G é amino.

5. Um composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto é representado pela fórmula V

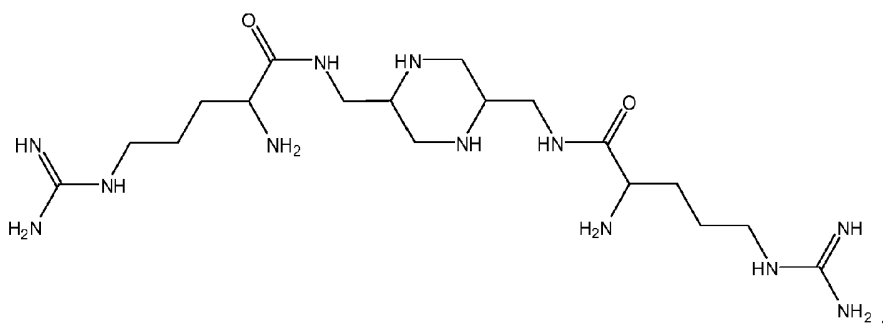
(V)



ou um seu sal farmacologicamente aceitável,

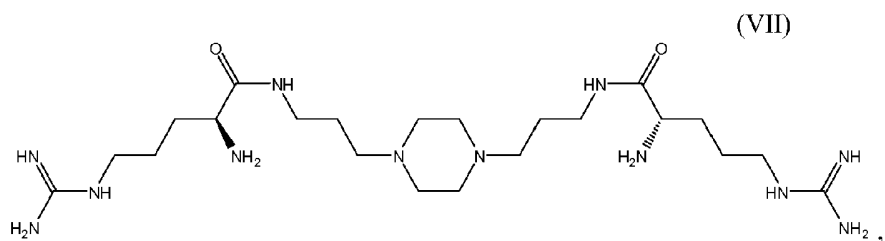
6. O composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto é representado pela fórmula VI

(VI)



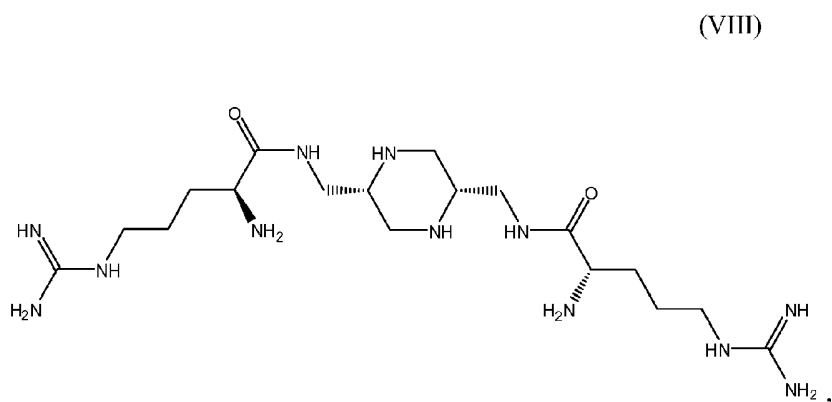
ou um seu sal farmacologicamente aceitável,

7. O composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto é representado pela fórmula VII



ou um seu sal farmacologicamente aceitável,

8. O composto de acordo com a reivindicação 1, em que o composto é representado pela fórmula VIII



ou um seu sal farmacologicamente aceitável,

9. Uma composição farmacológica contendo o composto de quaisquer de acordo com as reivindicações 1-8 e um veículo farmacologicamente aceitável.

10. A composição farmacológica da reivindicação 9, em que a composição está adaptada

- (a) a administração entérica;
- (b) a administração oral;
- (c) a administração parentérica; ou
- (d) a administração intravenosa ou subcutânea.

11. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8 ou seu sal farmacologicamente aceitável para utilização num método de reversão completa ou parcial

do efeito anticoagulante de um inibidor da coagulação num sujeito que dela necessite.

12. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o inibidor da coagulação é escolhido de entre o grupo formado por uma heparina não-fracionada, heparina de baixo peso molecular (LMWH), inibidor de Fator IIA, e inibidor de Fator Xa.

13. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o inibidor da coagulação é um inibidor do fator Xa.

14. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o inibidor da coagulação é escolhido de entre o grupo formado por rivaroxaban, apixaban, edoxaban, e fondaparinux.

15. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o sujeito é um

- (a) mamífero; ou
- (b) é um ser humano.

16. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que a reversão completa ou parcial de um efeito anticoagulante de um inibidor da coagulação é medida por um ensaio de atividade anti-fator Xa.

17. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o sujeito com necessidade é um sujeito a quem é indicada reversão de anticoagulação, aguda ou planeada.

18. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 17, em que

(a) o sujeito a quem é indicada reversão de anticoagulação, aguda ou planeada, é um sujeito com sobredosagem de anticoagulante, um sujeito com hemorragia, um sujeito a necessitar de intervenção cirúrgica planeada, um sujeito submetido a procedimentos invasivos ou não-invasivos com necessidade de biópsia, um sujeito submetido a um procedimento em que um erro processual possa conter um risco de hemorragia caso o sujeito permaneça anticoagulado, ou um sujeito com necessidade de anestesia espinal ou epidural; ou

(b) o sujeito com necessidade é um sujeito sob terapia de anticoagulantes para prevenção de acidente vascular cerebral, procedimentos cardíacos cirúrgicos e de diagnóstico, arritmias cardíacas, prevenção de trombose venosa profunda (DVT), embolia pulmonar, prevenção da formação de coágulos sanguíneos patológicos em geral.

19. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o inibidor da coagulação é uma LMWH, e em que a LMWH é escolhida de entre o grupo formado por bemiparina, certoparina, dalteparina, enoxaparina, nadroparina, parnaparina, reviparina, e tinzaparina.

20. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o composto ou o seu sal farmacologicamente aceitável é administrado numa razão dose massa de entre cerca de 0,01:1 até cerca de 1000:1 de composto ou do seu sal farmacologicamente aceitável para anticoagulante, de preferência em que o composto ou o seu sal farmacologicamente aceitável é administrado numa razão

dose massa de cerca de 10:1 de composto ou do seu sal farmacologicamente aceitável para anticoagulante.

21. O composto para utilização de acordo com a reivindicação 11, em que o método inclui a administração de pelo menos um agente terapêutico adicional; em opção, em que o pelo menos um agente terapêutico adicional é vitamina K.

22. Um kit de diagnóstico incluindo o composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8.

23. O kit de acordo com a reivindicação 22, em que o kit é utilizado para determinar uma concentração de anticoagulante no sangue.

Figura 1

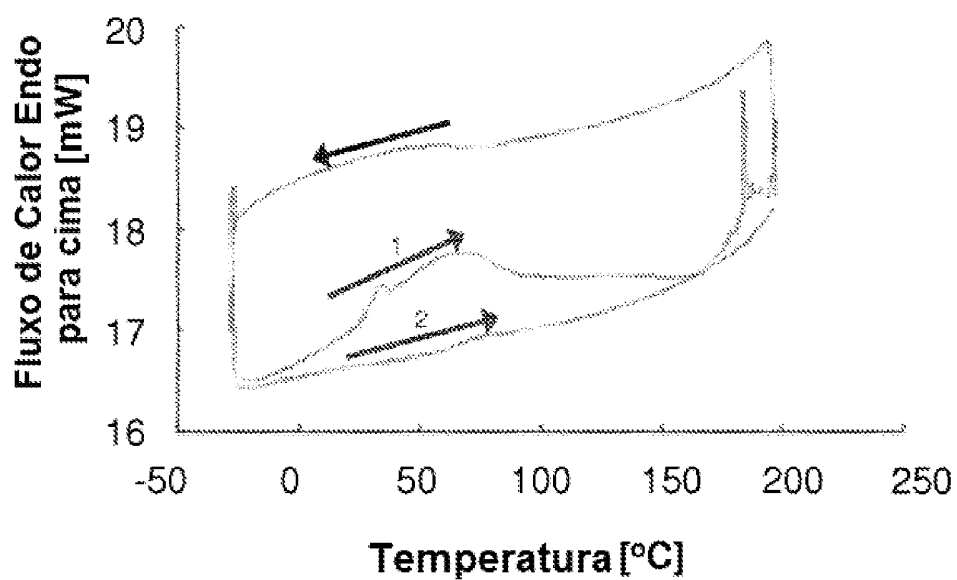


Figura 2

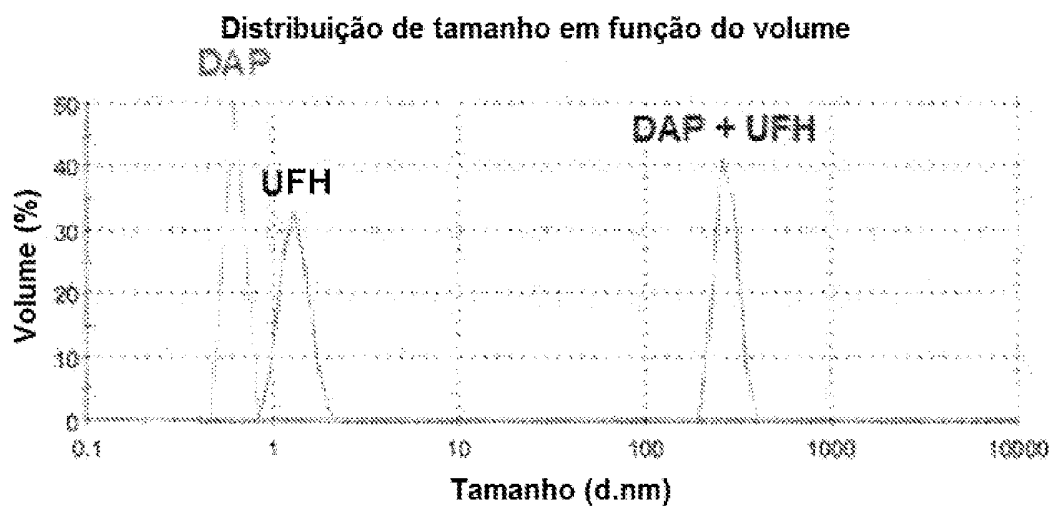


Figura 3

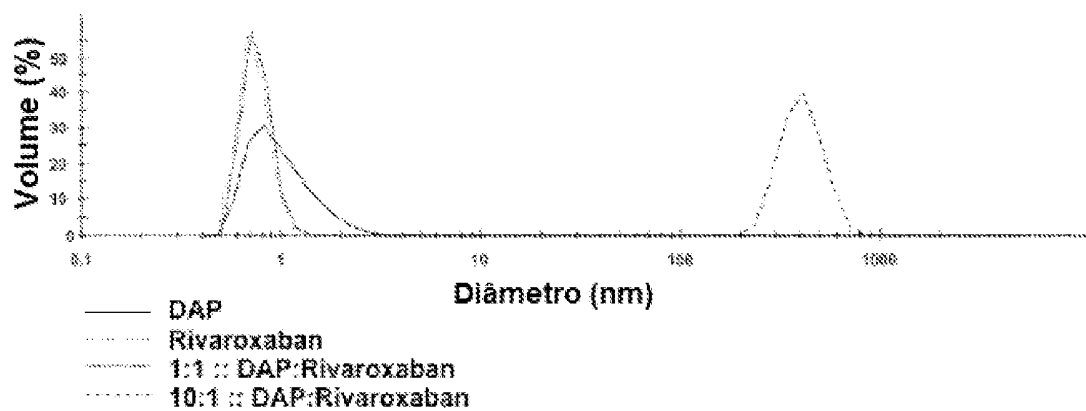


Figura 4

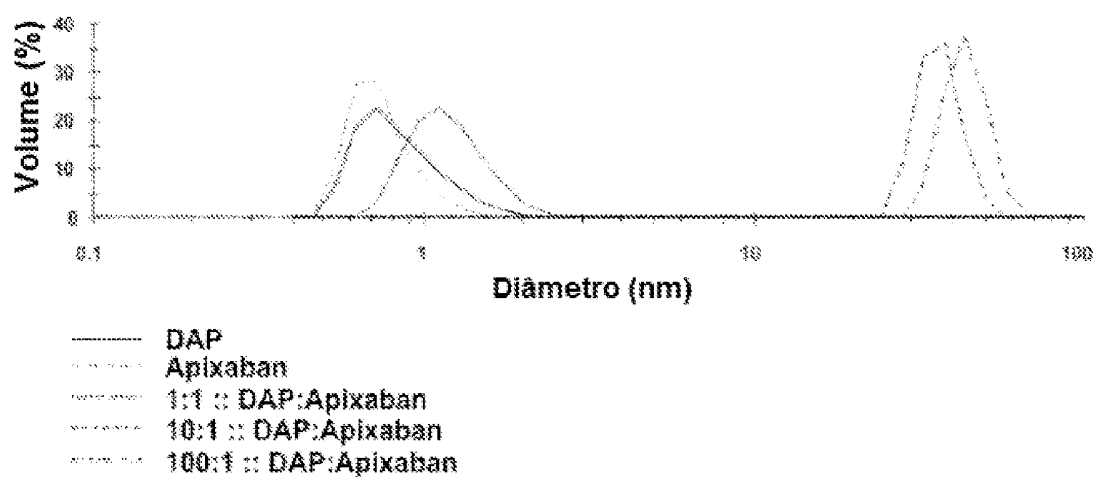


Figura 5

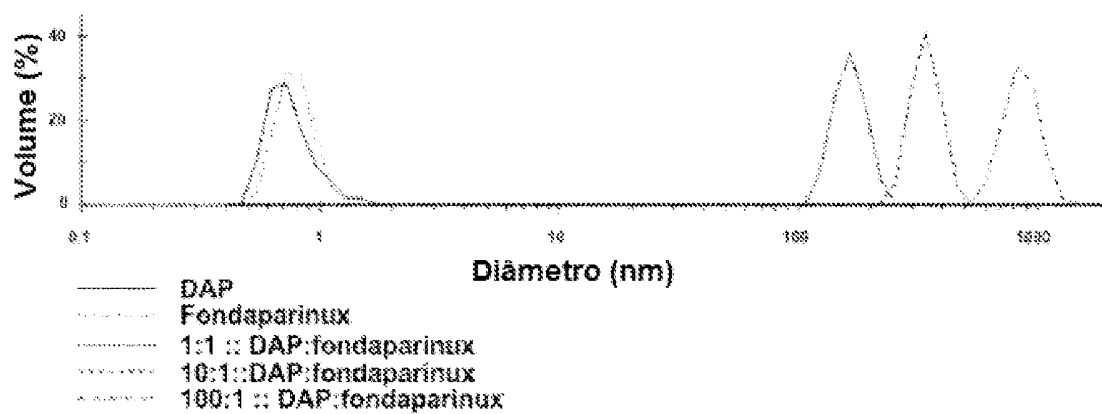


Figura 6

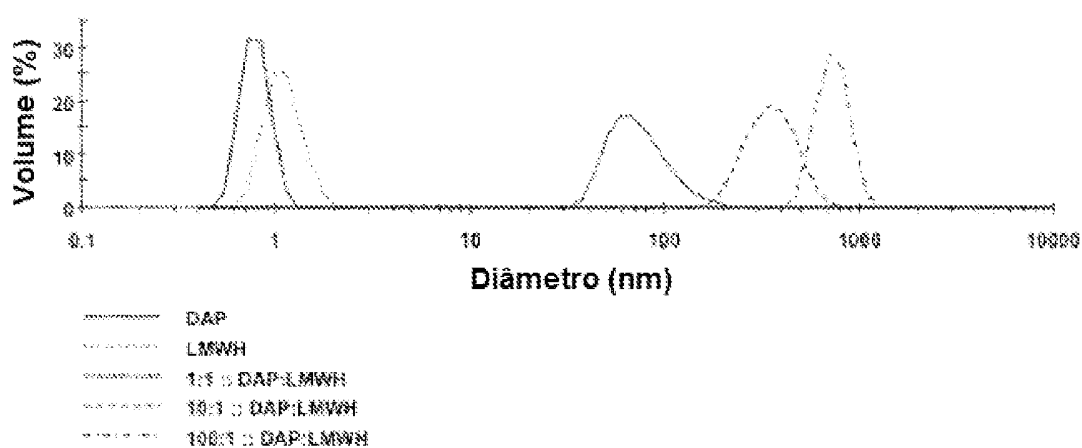


Figura 7

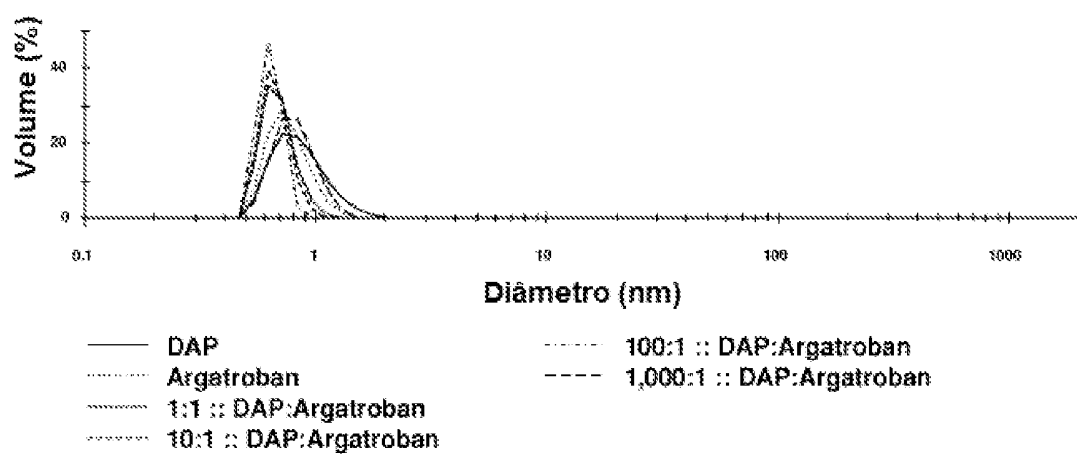


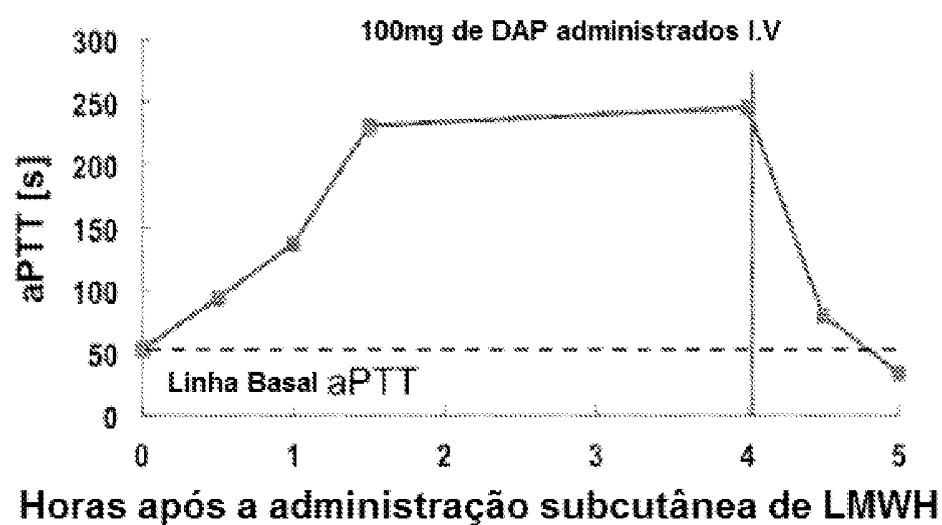
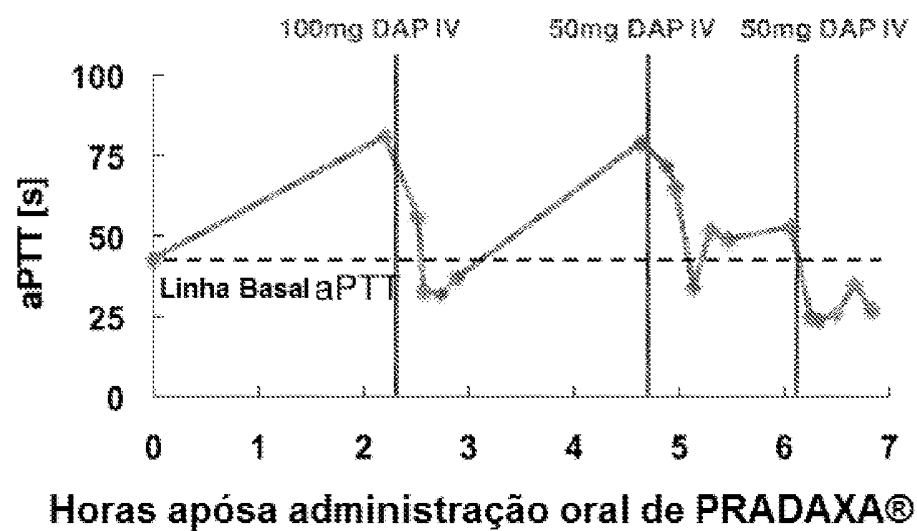
Figura 8**Figura 9**

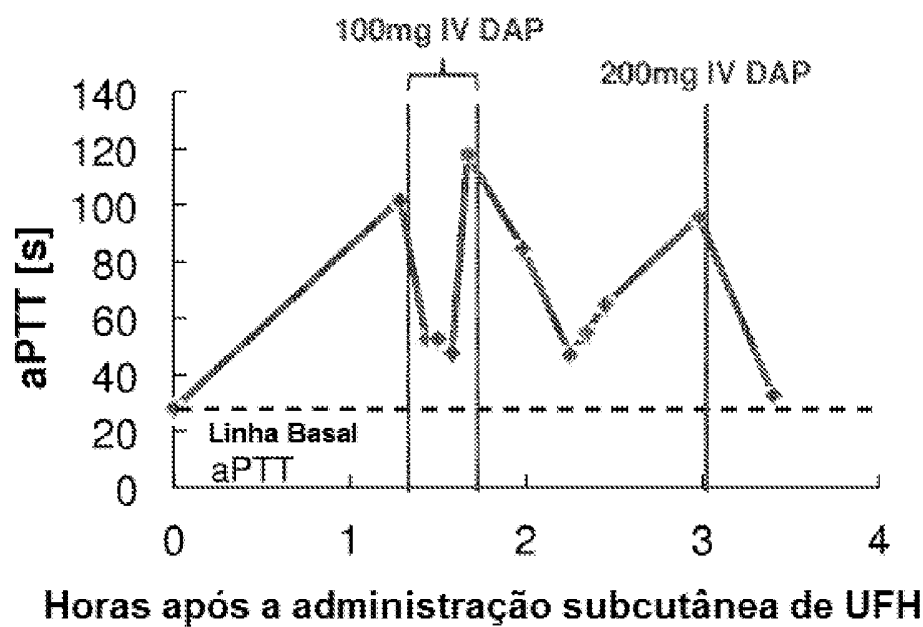
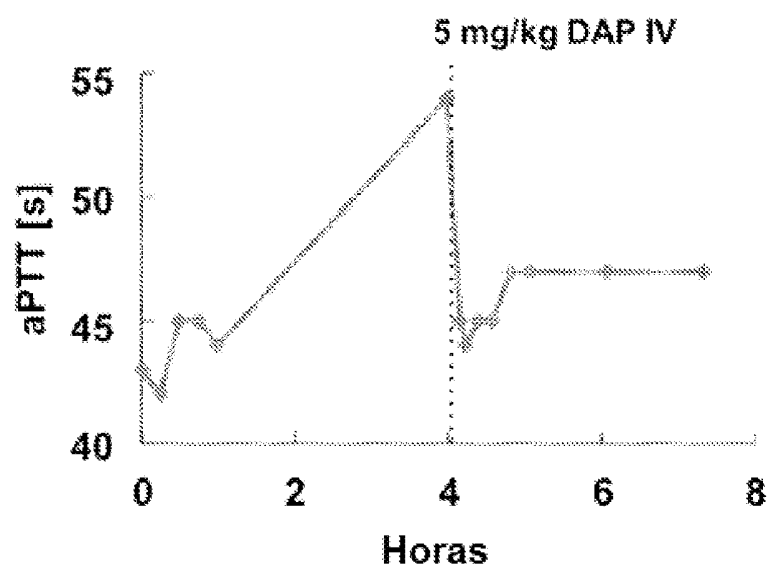
Figura 10**Figura 11**

Figura 12

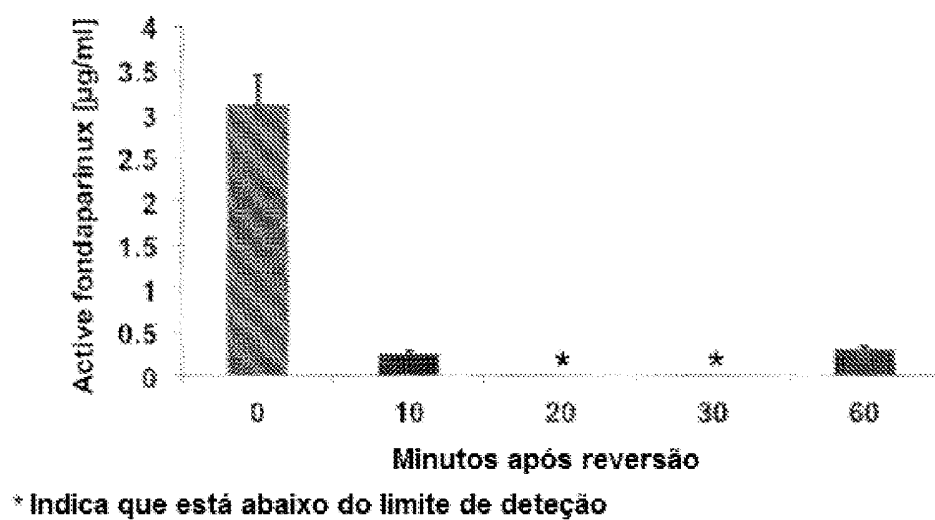


Figura 13

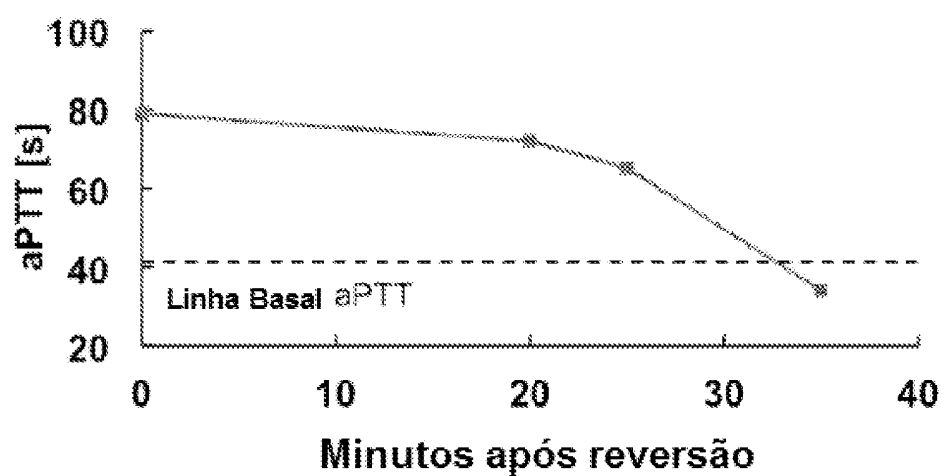


Figura 14

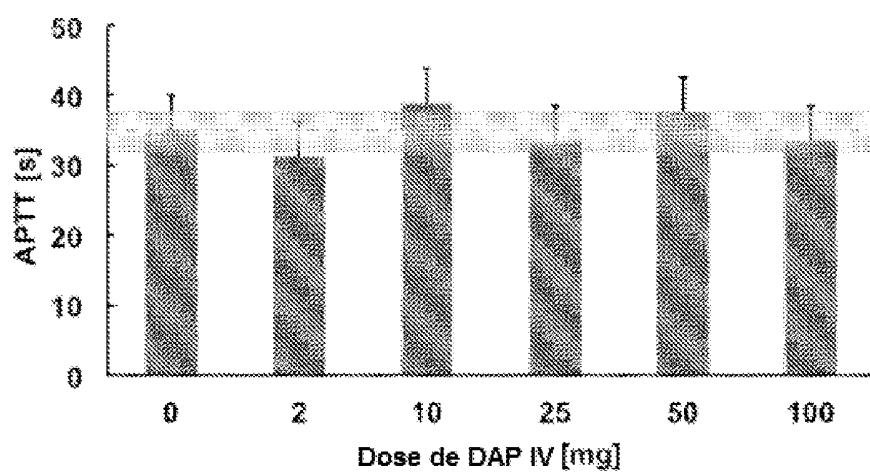


Figura 15

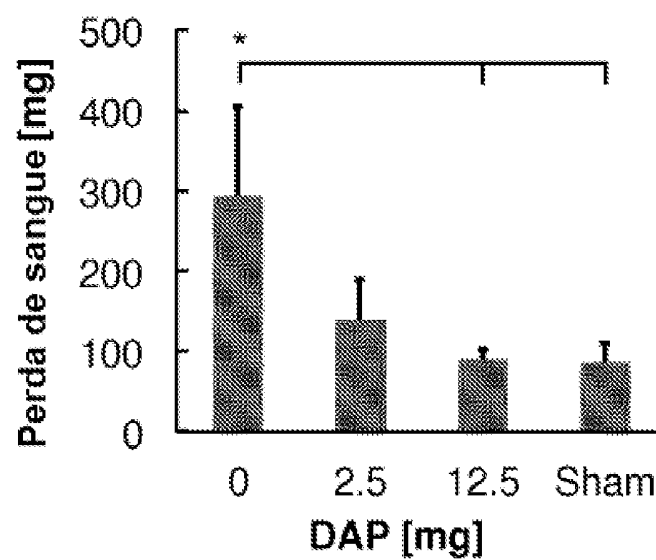


Figura 16

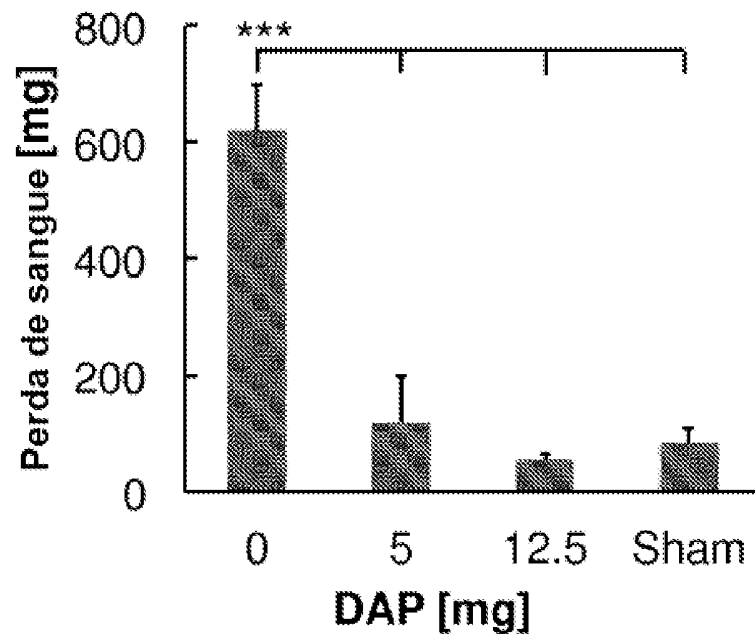


Figura 17

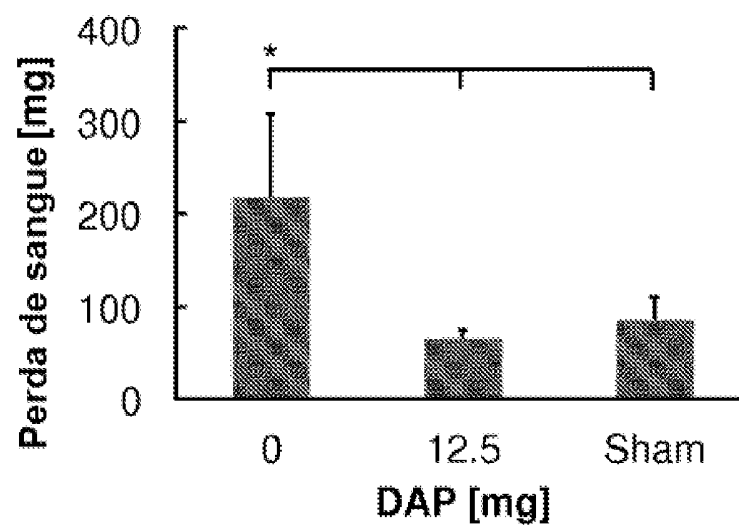


Figura 18

Dabigatran

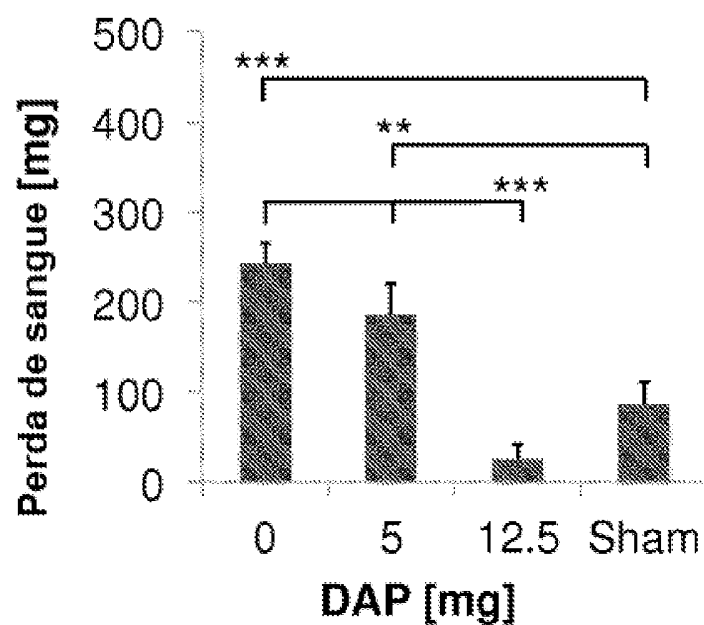
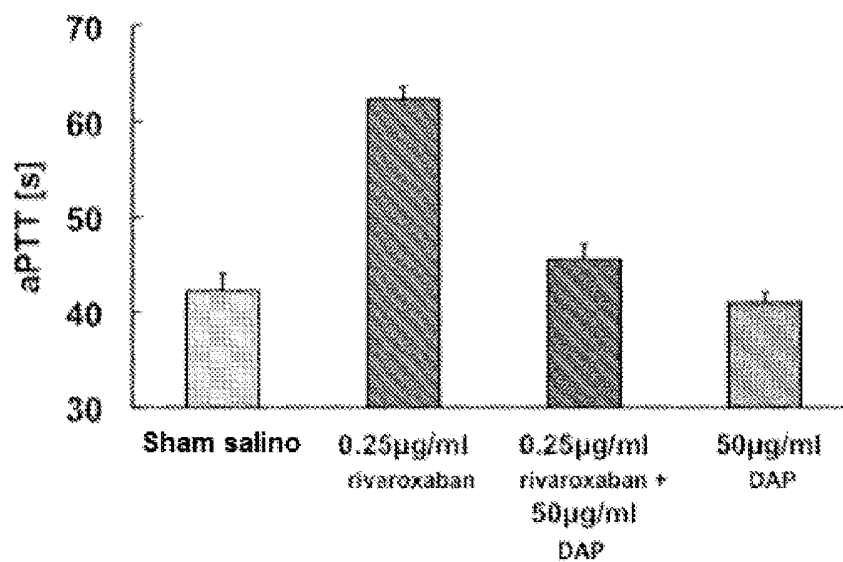
**Figura 19**

Figura 20

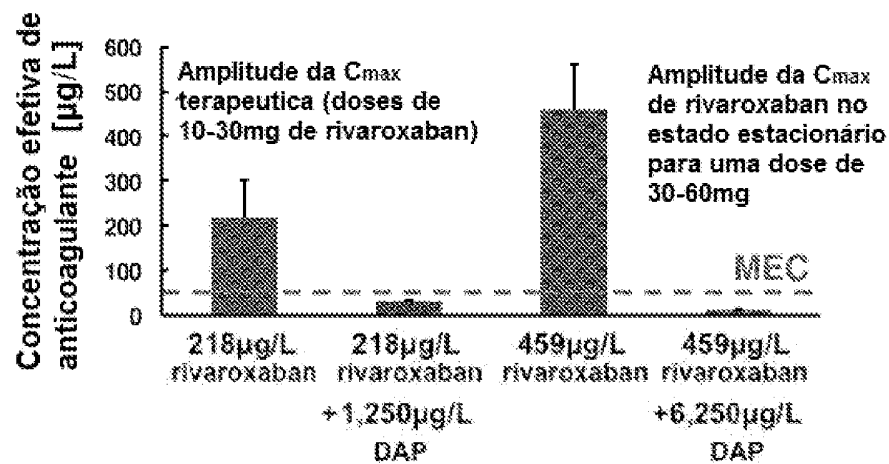


Figura 21

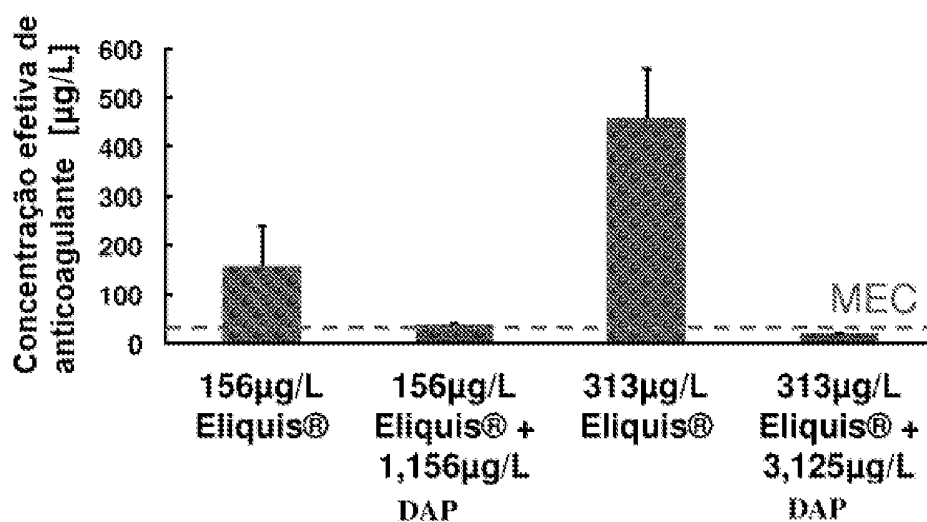


Figura 22

