

LES NOUVEAUX ANTICOAGULANTS : LE POINT DE VUE DU BIOLOGISTE.

Dr P. Guéret

CHU Rennes - Unité d'Hémostase – 2 Rue Henri Le Guilloux – 35033 RENNES Cedex 9 - pierre.gueret@chu-rennes.fr

I. RESUME :

Les anticoagulants directs oraux sont de petites molécules qui inhibent spécifiquement et sélectivement le facteur Xa (amplification de la coagulation) ou la thrombine (enzyme effectrice). En comparaison aux AVK, le Dabigatran Etxilate (Pradaxa®), le Rivaroxaban (Xarelto®) et l'Apixaban (Eliquis®) ont des fenêtres thérapeutiques larges du fait de leurs profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques relativement prédictibles : ils sont prescrits à doses fixes et ne nécessitent pas de monitoring. Cependant, il existe des circonstances cliniques où le dosage de ces molécules et/ou la détermination de leurs demi-vies apparentes s'avèrent utiles. La surveillance biologique de ces nouveaux anticoagulants doit également inclure l'indice de Cockcroft, qui au-delà de la filtration glomérulaire, doit être perçu comme un indicateur de risque hémorragique. Les anticoagulants directs oraux agissent sur la plupart des tests de coagulation, leurs effets dépendent de la concentration de ces molécules et de la sensibilité des réactifs employés. La détermination de l'INR au cours de ces traitements n'a pas de valeur et doit être abandonnée du fait de l'inadaptation des réactifs actuels. La détermination des concentrations de ces nouveaux anticoagulants nécessite des tests spécifiques et non des tests chronométriques classiques qui sont sensibles à d'autres anomalies possibles de la coagulation. Les biologistes doivent être vigilants vis-à-vis de la sensibilité des réactifs employés et doivent accompagner les cliniciens dans l'interprétation de ceux-ci.

II. INTRODUCTION :

Les anticoagulants directs oraux (ADO) ont fait la preuve de leur efficacité dans la prophylaxie thromboembolique de la fibrillation auriculaire non valvulaire, dans la prévention des événements thromboemboliques veineux en chirurgie orthopédique pour les prothèses de hanches, de genoux et dans le traitement de la maladie thromboembolique veineuse. Ce sont des inhibiteurs directs (non dépendants de l'antithrombine) et réversibles du facteur Xa libre ou présent dans le complexe pro-thrombinase pour le Rivaroxaban et l'Apixaban ou des inhibiteurs directs et réversibles de la thrombine libre ou liée à la fibrine pour le Dabigatran (Figure 1).

Ces molécules sont prescrites à doses fixes sans nécessité de monitoring ou d'ajustement de dose. L'alimentation n'a pas que peu d'effet sur le métabolisme de ces drogues et les interactions médicamenteuses doivent être prises en compte, même si elles sont plus limitées qu'avec les anti-vitamines K (AVK) (Table I). Leurs rapidités d'action et leurs demi-vies courtes en font des médicaments beaucoup plus souples à utiliser que les AVK. Cette facilité d'utilisation ne doit pas faire oublier pour autant que ce sont des anticoagulants avec un risque hémorragique proportionnel à l'intensité de l'hypocoagulabilité. Les principales caractéristiques pharmacologiques de ces molécules sont résumées en Table II.

III. QUAND DEVONS-NOUS DETERMINER LA CONCENTRATION DES ANTICOAGULANTS DIRECTS ORAUX ?

Comme tous les anticoagulants, la concentration de ces molécules reflète le degré d'hypo coagulabilité induit par ces traitements. Au-delà d'un simple dosage ponctuel, il est parfois utile de répéter ces mesures à intervalles réguliers afin de déterminer la demi-vie apparente de ces molécules lors de situations d'accumulation rénale (pour tous les ADO) ou d'insuffisance hépatique (pour les anti-Xa directs oraux) (1).

Les circonstances cliniques où la détermination de la concentration et/ou la demi-vie apparente peuvent être utiles sont les suivantes :

- avant une chirurgie ou un acte invasif,
- en situation hémorragique,

- en situation de surdosage,
- ou lors d'une dégradation de la fonction rénale (mesurée par l'indice de Cockcroft),
- et peut-être lors de co-médications

IV. QUELLES TECHNIQUES DEVONS-NOUS METTRE EN ŒUVRE ?

Les dosages spécifiques du Rivaroxaban et de l'Apixaban sont basés sur des tests anti-Xa chromogéniques. Les tests anti-Xa classiques pour l'héparine sont trop sensibles pour le Rivaroxaban et l'Apixaban mais sont utilisables lorsque nous diluons davantage les plasmas à tester. Ces méthodes restent malgré tout sensibles à la présence d'héparine (HNF ou HBPM), ce qui peut constituer une limite importante lors de relais ADO-Héparine. Pour pallier à ce problème des tests anti-Xa chromogéniques spécifiques, des anti-Xa oraux directs ont été développés, ils ne sont pas sensibles aux HNF, HBPM, Orgaran et Fondaparinux. Pour le Dabigatran, l'activité anti-IIa peut être déterminée par un temps d'Ecarine chromogénique ou par un test en dilution dérivé du temps de thrombine (temps de thrombine dilué), cette dilution du plasma permet d'effacer un trouble potentiel de la coagulation du plasma analysé.

Il sera important de choisir un test ayant une linéarité corrélée avec la méthode de référence LC-MS/MS (2), (3) et avec une limite de quantification inférieure vérifiée permettant de mesurer des concentrations faibles autorisant une intervention chirurgicale majeure (inférieure à 30 ng/mL, pour le Dabigatran et le Rivaroxaban) (4). Ces tests doivent également présenter une variabilité inter-laboratoire acceptable, certaines adaptations de tests anti-Xa développées pour les héparines ne sont pas applicables pour cette raison (5). Dans tous les cas, ces dosages requièrent l'utilisation de plasmas de calibration et de contrôles de qualité spécifiques, préparés avec les médicaments à doser. Les plasmas spécifiques de l'Apixaban seront disponibles prochainement et permettront son dosage.

L'interprétation des résultats dépendra du type d'anticoagulant. Le clinicien devra impérativement préciser de quel anticoagulant il s'agit du fait de la spécificité des calibrations mises en œuvre (rappelons qu'il en va de même des différentes héparines et dérivés...). La posologie et l'horaire de la dernière prise devront être également connus. Les notions d'insuffisance rénale ou d'insuffisance hépatique sont également importantes compte tenu des modifications possibles de la demi-vie attendue, il en va de même des co-médications ayant un impact sur le métabolisme de ces médicaments.

V. DES TESTS SPECIFIQUES : OUI, MAIS POUR QUELLES ZONES DE CONCENTRATIONS ?

Ces zones de concentrations sont connues et publiées pour le Rivaroxaban et Dabigatran (6), (7). Pour l'Apixaban, au-delà des résultats de phase I publiés (8), seules les concentrations résiduelles (C_{\min}) observées dans les études de phases II ont été publiées (9). Cependant, le différentiel $C_{\max} - C_{\min}$ de l'Apixaban reste modéré du fait d'un régime en deux prises quotidiennes. Les valeurs de C_{\max} et de C_{\min} des tables III, IV et V sont les valeurs rapportées dans les études de Phase II.

Contrairement aux AVK, les profils pharmacologiques des ADO sont relativement prédictifs. Malgré tout, il existe une variabilité de concentration non négligeable avec toutes les classes d'ADO (6), (9), (10). Cette variabilité explique pourquoi une concentration donnée d'ADO ne peut être corrélée à un taux d'événements thrombotiques ou hémorragiques et démontre, de fait, l'absence d'intérêt des dosages des ADO pour monitorer ces traitements. Des adaptations de doses en dehors de celles validées par les études et reprises dans les autorisations de mise sur le marché semblent difficiles compte-tenu de cette variabilité des concentrations observées (patients de poids extrêmes...).

VI. LA PLUPART DES TESTS DE COAGULATIONS CLASSIQUES SONT PERTURBES PAR LES ANTICOAGULANTS DIRECTS ORAUX :

Les ADO induisent un allongement significatif des tests de coagulation de routine comme le temps de Quick (TQ) avec une diminution du taux de prothrombine (TP) avec le Rivaroxaban et l'Apixaban ou un allongement du temps de céphaline activée (TCA) et du temps de thrombine (TT) pour le Dabigatran. L'avantage de ces tests est qu'ils sont disponibles rapidement dans tous les laboratoires, leur inconvénient principal est d'être influencé par un trouble sous-jacent de la coagulation qui peut fausser l'appréciation du degré d'hypocoagulabilité induite par ces molécules.

La relation effet-concentration est très variable et est dépendante de la sensibilité des réactifs employés. Pour tous les ADO, l'INR n'a aucune valeur pour estimer le degré d'hypocoagulabilité induit par ces molécules, son utilisation doit être proscrite car l'Index de sensibilité international (ISI) du réactif est spécifique des AVK (11).

Un TP/TQ et un TCA normal permet d'exclure une concentration mesurable de Rivaroxaban (11), mais cette règle peut être mise en défaut avec l'Apixaban pour lequel certains réactifs sont très peu sensibles, comme l'Innovin (Siemens, Allemagne) pour le TQ/TP (12) ou l'Actin FS (Siemens, Allemagne) pour le TCA. Pour le Dabigatran, la relation effet-concentration n'est pas linéaire avec le TCA contrairement au TT (7) mais cette linéarité du TT est peu exploitable compte tenu de sensibilité importante des réactifs employés. Un TT normal permet d'exclure une concentration mesurable de Dabigatran. Ces tests sont utilisables pour un contrôle d'observance.

Le dosage du fibrinogène fonctionnel, déterminé par la technique Von Clauss, peut-être perturbé lors de traitement par Dabigatran avec certains réactifs comme HemosIL C (Instrumentation Laboratories, USA) et le Multifibren U (Siemens, Allemagne), les autres réactifs n'ont pas d'impact sur ce dosage. La détermination du taux de fibrinogène par technique antigénique n'est bien sûr pas affectée.

La détermination des facteurs II, V, VII, X se mesure en système de type TQ à l'aide d'un plasma déficient du facteur à mesurer et il est donc logique de voir ces dosages altérés par la présence d'ADO ; Il en va de même pour le dosage des facteurs VIII, IX, XI, XII mesurés en système TCA à l'aide d'un plasma déficient. L'impact des anticoagulants directs sur le dosage de ces facteurs dépend de la sensibilité des réactifs employés et de la concentration de l'anticoagulant. Cependant, la détermination du taux de ces facteurs peut être possible en diluant le plasma pour des concentrations situées en zones thérapeutiques.

Lorsqu'un patient est traité par ADO, le bilan de thrombophilie n'est pas interprétable et sera effectué de préférence, au décours de l'arrêt du traitement anticoagulant (3 à 5 jours après l'arrêt du traitement correspondant aux 5 demi-vies de la molécule).

Pour les tests fonctionnels de coagulation, seule la détermination du taux de protéine C (PC) par technique chromogène n'est pas perturbée par la présence d'ADO dans le système de mesure. Les mesures de Protéine C et S par techniques chromométriques sont affectées quel que soit le mécanisme d'action des ADO. La détermination du taux d'antithrombine (AT) peut être perturbée en fonction du type d'ADO présent dans le plasma, sa mesure est possible lorsque la mesure de l'AT se fait par une technique anti-Xa lors d'un traitement par Dabigatran et par technique anti-IIa lors d'un traitement par anti-Xa direct, mais le laboratoire ne possède généralement qu'un type de réactif.

Enfin, la recherche d'un anticoagulant circulant de type lupique est perturbée aussi bien lors d'épreuves de mélange avec un plasma témoin ou avec un test de venin de vipère Russel dilué (dRVVT) ; il en va de même lors de la détermination d'un état de résistance à la protéine C activée (APCr). Ces différents temps de coagulation sont allongés par la présence d'ADO quel que soit son mécanisme d'action. Seuls les tests de biologie moléculaire et les tests immunologiques des anti-phospholipides (anticorps anti- β_2 GPI et anti-cardiolipine) sont déterminables. Les effets des ADO sur les tests de coagulation sont résumés Table VI.

VII. L'INDICE DE COCKCROFT DOIT FAIRE PARTIE DU SUIVI BIOLOGIQUE DES ADO

Comme pour tout anticoagulant, l'évaluation de la fonction rénale par la formule de Cockcroft et Gault doit être réalisée avant toutes prescriptions. Même si d'autres formules telles que le MDRD ou le CKD-EPI sont mieux adaptées pour évaluer la filtration glomérulaire et sont a priori considérées comme de meilleurs estimateurs de la fonction rénale, seule la formule de Cockcroft et Gault doit être utilisée pour évaluer l'impact de la fonction rénale sur le risque hémorragique. Le sexe, l'âge, le poids et la fonction rénale (créatinémie) qui le composent sont des paramètres sensibles du risque hémorragique et thromboembolique.

Dans la mesure où cette fonction rénale peut varier au cours du temps chez un même malade, il est recommandé de surveiller régulièrement l'indice de Cockcroft, que ces molécules aient ou non un métabolisme rénal prépondérant. Ceci est particulièrement important chez le sujet âgé où les valeurs de clairance de la créatinine, au-delà de 75 ans, sont systématiquement plus basses que les valeurs obtenues avec la formule de MDRD. Les ajustements de posologies seront plus fréquents avec la formule de Cockcroft, renforçant ainsi la sécurité d'utilisation des ADO.

VIII. EXISTE-T-IL UN MARQUEUR BIOLOGIQUE DE SURVEILLANCE LORS DE LA REVERSION DE CES ANTICOAGULANTS ?

Le TQ/TP paraît être un bon marqueur de réversion par les concentrés de complexes prothrombiniques (CCP) (13) lors de surdosages par le Rivaroxaban, mais là aussi, la sensibilité du réactif employé doit être optimale en termes d'effet-concentration. Le choix du réactif est encore plus critique dans le cadre des reversions en cas de surdosage avec l'Apixaban compte-tenu de la moindre sensibilité du TQ/TP. Pour le Dabigatran, le TCA et le TT ne semblent pas être de bons marqueurs lors des reversions avec les CCP, expliquant en partie « l'échec apparent » des CCP dans la réversion du Dabigatran chez le témoin sain lorsque celle-ci est jugée sur des paramètres standards de coagulation (13), ces marqueurs seront peut-être plus sensibles lors de réversion par le CCP activé (Feiba®). Pour tous les ADO, le test de génération de thrombine semble mieux adapté (14), même si celui-ci est faussé lors de l'analyse de concentrations intermédiaires d'anti-thrombine directe (15), mais ce test n'est pas utilisable en situation d'urgence. Les dosages spécifiques des ADO peuvent être utilisés, mais aucun résultat n'a été publié à ce jour. En cas de réversion, il sera important d'effectuer un bilan biologique avant et après réversion. Il convient de répéter celui-ci quelques heures après l'injection de l'agent réversant, afin de s'assurer de l'absence de rebond de l'anticoagulation. Le volume de distribution des ADO est particulièrement important et pourrait théoriquement induire un rebond d'anticoagulation (table I).

IX. CONCLUSIONS :

Compte-tenu de la variabilité des concentrations circulantes de ces molécules, un monitoring de ces traitements par un dosage biologique n'est pas possible : il n'existe pas de corrélation entre une concentration circulante et un risque hémorragique ou thrombotique. Ces dosages sont malgré tout utiles avant une intervention chirurgicale ou un geste invasif, en situation hémorragique, en cas d'accumulation par insuffisance rénale voire hépatique et peut-être en cas de co-médications.

L'impact des ADO sur les tests de coagulation est important et rend difficile l'interprétation d'un trouble de la coagulation sous-jacent, notamment en situation hémorragique grave, où l'hémorragie elle-même participe à ces troubles. Les effets des ADO sur les tests de coagulation dépendent du mécanisme d'action de la molécule considérée (anti-Xa ou anti-IIa) et oblige le clinicien à une nouvelle gymnastique d'interprétation. Ces effets sont également liés à la concentration circulante d'anticoagulant et sont aussi très dépendants de la sensibilité des réactifs employés. Le rôle du biologiste dans les choix des réactifs est donc important et le dialogue clinicien biologiste est primordial.

ANNEXES :

Figure I : modes d'actions des anticoagulants directs oraux et des anticoagulants parentéraux, hors AVK.

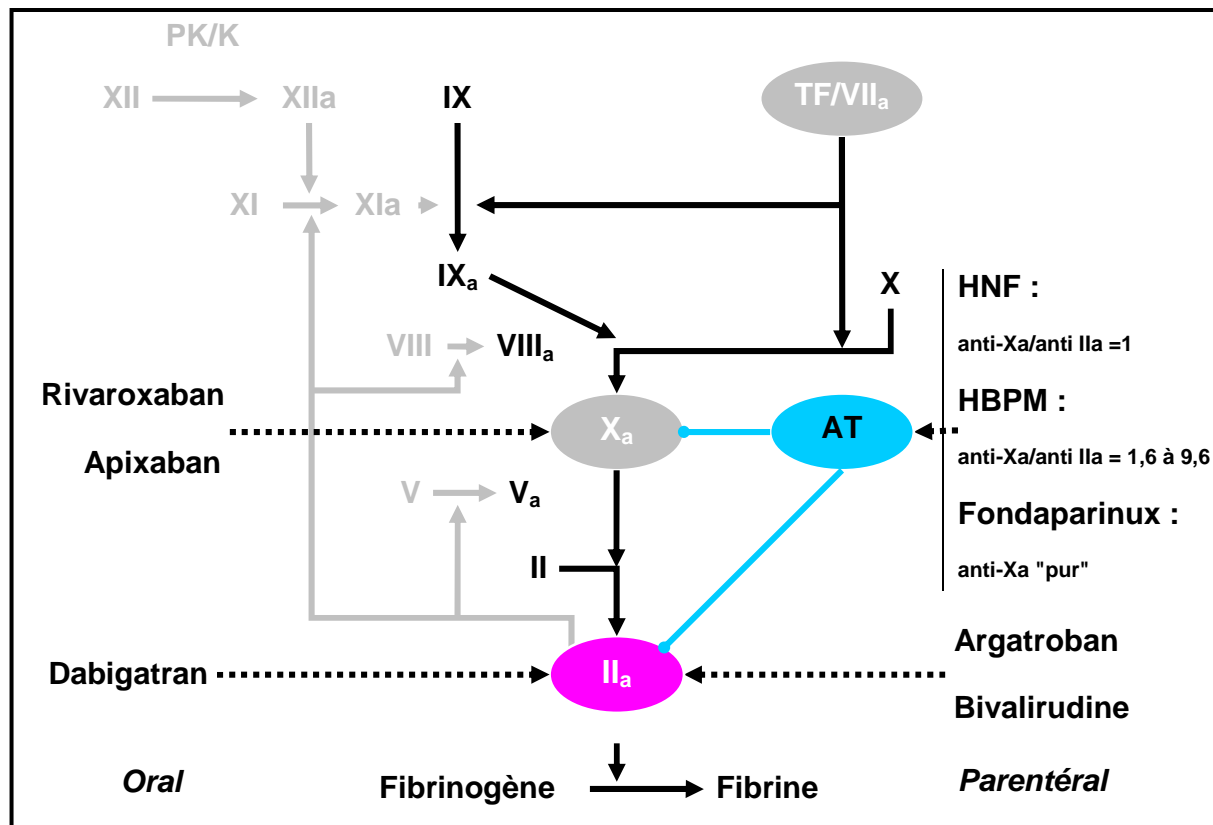


Table I : AOD et interactions médicamenteuses

AOD et interactions médicamenteuses		Variation d'exposition en %		
		Rivaroxaban	Apixaban	Dabigatran
P-gp Inhibition	Kétoconazole	160	100	150
	Quinidine			53
	Amiodarone			60
	Vérapamil			≈ 50 (50 à 150) †
	Dronédarone	à éviter	à éviter	136
	Tacrolimus	à éviter	à éviter	C. Indication
	Cyclosporine	à éviter	à éviter	C. Indication
P-gp Induction	Rifampicine	- 50	-54	- 67
	Millepertuis	à éviter	à éviter	à éviter
CYP3A4 inhibition	Kétoconazole	160	100	Autre mécanisme pour le Dabigatran Pantoprazole : -30
	Clarithromycine	50	40	
	Ritonavir	150		
CYP3A4	Rifampicine	- 50	- 54	

induction	Millepertuis	à éviter	à éviter	
C. Indications formelles		kétoconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole...		kétoconazole, itraconazole...
		inhibiteurs de la protéase du VIH		tacrolimus, ciclosporine
				dronédarone

T dépend de la formulation du Vérapamil (Modifié d'après Schulman, Blood 2012)

Table II : caractéristiques pharmacologiques générales des AOD :

	Dabigatran Etexilate	Rivaroxaban	Apixaban
Cible	Inhibiteur direct Thrombine	Inhibiteur direct FXa	Inhibiteur direct FXa
Prodrogue	Oui	Non	Non
Bio disponibilité	6,5%	~ 80%	50%
T_{max}	2 H	3 H	3 H
Demi-Vie	14 - 17 H	7 - 11 H	9 - 14 H
Volume de distribution	60 - 70 L	~ 50 L	~ 21 L
Interactions médicamenteuses	Inhibiteurs Pgp, Pantoprazol (PPI)	Inhibiteurs CYP3A4 et Pgp	Inhibiteurs CYP3A4 et Pgp
Excrétion	80% Rénale	33% Rénale (forme active), 66% Biliaire	25% Rénale, 75% Biliaire
Antidote spécifique	Non	Non	Non
Dialysable	Oui Liaison protéique : 35%	Non Liaison protéique : 92 - 95%	Non Liaison protéique : 87%

Absorption rapide : T_{max} < 3 H

Ce sont des molécules à demi-vie intermédiaires : disparition de la molécule en 5 demi-vies

Le mode d'excrétion rend compte de leur accumulation en cas d'insuffisance rénale ou hépatique

Pas d'antidote spécifique dans l'état actuel des choses, mais possibilité de neutralisation par les concentrés de complexe pro-thrombinique (CCP) ou par CCP activé (Feiba®).

Le volume de distribution important pourrait expliquer un rebond d'anticoagulation après réversion par CCP ou CCP activé ou durant une dialyse (Dabigatran).

Cmax et Cmin issus des études cliniques du Rivaroxaban :

Rivaroxaban	Cmax (ng/mL)	Cmin (ng/mL)
10 mg x 1/J	124,6 (91,4 - 195,5)	9,1 (1,3 - 37,6)
20 mg x 1/J	222,6 (159,6 - 359,8)	22,3 (4,3 - 95,7)

Médianes prédites des paramètres pharmacocinétiques du Rivaroxaban, essais de phase II, après 5 jours d'administration du Rivaroxaban, (5e et 95e percentiles) (6).

Cmax et Cmin issus des études cliniques du Dabigatran :

Dabigatran	Cmax (ng/mL)	Cmin (ng/mL)
220 mg x 1/J	183 (62 - 447)	37 (10 - 96)
150 mg x 2/J	184 (64 - 443)	90 (31 - 225)

Médianes (5e et 95e percentiles), calculées à l'état d'équilibre lors des essais de phase II avec une clairance de la créatinine médiane de 75 mL/min (7).

Cmax et Cmin issus des études cliniques de l'Apixaban :

Apixaban	Cmax (ng/mL)	Cmin (ng/mL)
2,5 mg x 2/J	NC	55,9 (23,6 - 103)
5 mg x 2/J	NC	107 (55,6 - 203)

Médianes (10e et 90e percentiles), observées à l'état d'équilibre d'après les essais de phase II (9); NC : non communiqué.

Les plasmas de calibration et de contrôle de qualités spécifique pour le dosage de l'Apixaban par activité anti-Xa seront disponibles pour 2014.

Tables III, IV, V : zones de concentrations des ADO lors des études de Phase II.

Test	Apixaban	Rivaroxaban	Dabigatran
TP%	Normal ou +/- ↘	↘	+/- ↘
TCA	Normal ou +/- ↗	↗	↗
TT	Normal		↗
Fg	Normal		Normal ou ↘
F II, V, VII, X	↘		↘

F VIII, IX, XI, XII	⬇	⬇
dRVVT	Faux positifs	Faux positifs
AT chromogène	Normal (Perturbé avec réactifs anti-Xa)	Normal (Perturbé avec réactifs anti IIa)
PC chromogène	Normal	Normal
PC chronométrique	↗	↗
PS chronométrique	↗	↗
APCr	Ratio APCr ↗	Ratio APCr ↗

Table VI : modifications des tests de coagulation lors d'un traitement par ADO :

Le bilan de coagulation est fortement perturbé chez les patients traités par les ADO et reste difficilement interprétable.

Ces perturbations des tests fonctionnels dépendent :

- du mode d'action de l'anticoagulant :
 - o Anti-Xa : TQ/TP/INR et TCA perturbé
 - o Anti IIa : TQ/TP/INR et TCA et TT et parfois Fg perturbé
- de la concentration de ces anticoagulants : relation effet- concentration
- de la sensibilité des réactifs employés

Un temps de Thrombine normal élimine un traitement par Dabigatran

Un TP et un TCA normal élimine un traitement par Rivaroxaban

Pour l'Apixaban, le bilan de coagulation (TP, TCA) peut être normal ou très peu perturbé malgré des concentrations thérapeutiques élevées.

Lors d'un traitement par ADO, le dosage des facteurs II, V, VII X et VIII, IX, XI, XII est possible en système de dilution, pour des concentrations thérapeutiques d'anticoagulants.

REFERENCES :

1. Baglin T, Hillarp A, Tripodi A, Elalamy I, Buller H, Ageno W. Measuring Oral Direct Inhibitors (ODIs) of thrombin and factor Xa: A recommendation from the Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2013; 11(4):756-760.
2. Douxfils J, Tamigniau A, Chatelain B, Chatelain C, Wallemacq P, Mullier F, et al. Comparison of calibrated chromogenic anti-Xa assay and PT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with rivaroxaban. *Thromb Haemost.* 2013;110(3): doi:10.1160/TH13-04-0274.
3. Douxfils J, Dogné J-M, Mullier F, Chatelain B, Rönquist-Nii Y, Malmström RE, et al. Comparison of calibrated dilute thrombin time and aPTT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with dabigatran etexilate. *Thromb Haemost.* 2013;110(3):543-549.
4. Pernod G, Albaladejo P, Godier A, Samama CM, Susen S, Gruel Y, et al. Management of major bleeding complications and emergency surgery in patients on long-term treatment with direct oral anticoagulants, thrombin or factor-Xa inhibitors. Proposals of the Working Group on Perioperative Haemostasis (GIHP) - March 2013. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2013; doi: 10.1016/j.annfar.2013.04.016
5. Harenberg J, Marx S, Weiss C, Krämer R, Samama M, Schulman S, et al. Report of the Subcommittee of Control of Anticoagulation on the determination of the anticoagulant effects of rivaroxaban. *J Thromb Haemost.* 2012;10(7):1433-1436.
6. Mueck W, Borris LC, Dahl OE, Haas S, Huisman MV, Kakkar AK, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of once- and twice-daily rivaroxaban for the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing total hip replacement. *Thromb Haemost.* 2008;100(3):453-461.
7. Van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld K-H, Wiene W, Feuring M, et al. Dabigatran etexilate--a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 2010;103(6):1116-1127.
8. Frost C, Wang J, Nepal S, Schuster A, Barrett YC, Mosqueda-Garcia R, et al. Apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor: single dose safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and food effect in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(2):476-487.
9. Leil TA, Feng Y, Zhang L, Paccaly A, Mohan P, Pfister M. Quantification of apixaban's therapeutic utility in prevention of venous thromboembolism: selection of phase III trial dose. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88(3):375-382.
10. Stangier J, Eriksson BI, Dahl OE, Ahnfelt L, Nehmiz G, Stähle H, et al. Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement. *J Clin Pharmacol.* 2005;45(5):555-563.
11. Samama MM, Martinoli J-L, LeFlem L, Guinet C, Plu-Bureau G, Depasse F, et al. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban-an oral, direct factor Xa inhibitor. *Thromb Haemost.* 2010;103(4):815-825.
12. Barrett YC, Wang Z, Frost C, Shenker A. Clinical laboratory measurement of direct factor Xa inhibitors: anti-Xa assay is preferable to prothrombin time assay. *Thromb Haemost.* 2010;104(6):1263-1271.
13. Eerenberg ES, Kamphuisen PW, Sijpkens MK, Meijers JC, Buller HR, Levi M. Reversal of rivaroxaban and dabigatran by prothrombin complex concentrate: a randomized, placebo-controlled, crossover study in healthy subjects. *Circulation.* 2011;124(14):1573-1579.
14. Marlu R, Hodaj E, Paris A, Albaladejo P, Cracowski JL, Crackowski JL, et al. Effect of non-specific reversal agents on anticoagulant activity of dabigatran and rivaroxaban: a randomised crossover ex vivo study in healthy volunteers. *Thromb Haemost.* 2012;108(2):217-224.

15. Wagenvoord RJ, Deinum J, Elg M, Hemker HC. The paradoxical stimulation by a reversible thrombin inhibitor of thrombin generation in plasma measured with thrombinography is caused by alpha-macroglobulin-thrombin. *J Thromb Haemost.* 2010;8(6):1281-1289.