



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 802**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/202** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05710637 .9**  
96 Fecha de presentación : **24.02.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1733723**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Medicamento capaz de inhibir la activación del factor de transcripción KLF5.**

30 Prioridad: **25.02.2004 JP 2004-49282**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.11.2011**

73 Titular/es: **The University of Tokyo**  
**3-1, Hongo 7-chome**  
**Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, ES**  
**NIKKEN CHEMICALS COMPANY, LIMITED**

72 Inventor/es: **Nagai, Ryozo y**  
**Suzuki, Toru**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 802 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Medicamento capaz de inhibir la activación del factor de transcripción KLF5

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un medicamento que comprende un compuesto de poliprenilo acíclico como principio activo y que tiene una acción inhibitoria frente a la activación del factor de transcripción KLF5.

**Antecedentes de la técnica**

10 En los últimos años, ha aumentado de manera creciente la incidencia de enfermedades vasculares incluyendo la arterioesclerosis, y el desarrollo de medicamentos para el tratamiento profiláctico o terapéutico de las enfermedades vasculares es un tema muy importante en Japón debido al envejecimiento de la población. El crecimiento de las células vasculares del músculo liso está profundamente implicado en la aparición de restenosis tras la cirugía reconstructiva vascular de las arterias coronarias, que se lleva a cabo como tratamiento de la arterioesclerosis y de las cardiopatías isquémicas. Sin embargo, las características de los músculos lisos de los vasos sanguíneos lesionados y las características y propiedades de los vasos sanguíneos en el proceso de la ontogenia permanecen aún sin aclarar. El esclarecimiento del mecanismo molecular responsable de la diferenciación y el desarrollo de los músculos lisos puede posiblemente estimular el desarrollo de agentes para el tratamiento profiláctico/terapéutico de las enfermedades vasculares que implican a los músculos lisos vasculares, un ejemplo típico de las cuales es la arterioesclerosis. Además, las células del músculo liso se caracterizan por la plasticidad de sus rasgos. Aunque se observan células diferenciadas de tipo constrictivo en vasos sanguíneos normales, en las lesiones vasculares se observa la conversión de sus rasgos en los de células del músculo liso diferenciadas que tienen potencia de proliferación. La comprensión del mecanismo de diferenciación de las células del músculo liso puede convertirse en una pista para el esclarecimiento de dolencias patológicas de enfermedades vasculares, y además, para el desarrollo de terapias novedosas.

25 Durante los estudios del control de la expresión del gen de la cadena pesada de miosina del músculo liso, que se expresa específicamente en células del músculo liso desdiferenciadas, los inventores de la presente invención aislaron satisfactoriamente el factor KLF5 de regulación de la transcripción (factores 5 de tipo Kruppel) BTEB2/IKLF (de ahora en adelante denominado "KLF5" en la memoria descriptiva), que es responsable de la regulación de la expresión de este gen (Circulation Research, 85, pp.182-191, 1999). KLF5 se expresa en los vasos sanguíneos durante los periodos fetal y neonatal, y su nivel de expresión disminuye en adultos. Sin embargo, su expresión está inducida en lesiones de los vasos sanguíneos tales como las de arterioesclerosis. Sin embargo, el crecimiento de los músculos lisos está inhibido específicamente en el experimento de sentido contrario en el que se inhibe la expresión de KLF5. Se considera que KLF5 es un importante factor responsable del crecimiento de los músculos lisos. Por tanto, se espera que si se desarrolla un medicamento que tenga una acción inhibitoria frente a la actividad de KLF5, el medicamento sería útil como un medicamento novedoso para los tratamientos profiláctico y terapéutico de las enfermedades vasculares.

35 Los inventores de la presente invención han encontrado un procedimiento para evaluar una sustancia que regula la conversión de los rasgos de las células del músculo liso, utilizando la característica de KLF5 de que se une a un promotor de una proteína que agrava la arterioesclerosis para inducir una elevada actividad de expresión de la misma, y un procedimiento para proporcionar una célula huésped usada para dicho procedimiento de evaluación (Publicación de Patente Japonesa no examinada por el público (Kokai) N° 11-318450). Además, los inventores de la presente invención construyeron también satisfactoriamente un ratón con el KLF5 inactivado (Nature Medicine, 8, pp.856-863, 2002). Se observó letalidad embrionaria en homocigotos de este ratón inactivado (knock-out), y aunque los nacimientos heterocigóticos vivos parecían aparentemente normales, se encontró una notable disminución en la reacción de hiperplasia de la íntima en respuesta a lesión vascular, una disminución en la hipertrofia cardíaca y fibrosis inducida por angiotensina II, y similares. Además, el nivel del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en los heterocigotos disminuyó hasta aproximadamente la mitad del nivel en los animales tipo silvestre, y de esta manera, se encontró que PDGF era un gen diana de la regulación de la transcripción por KLF5. Además, un derivado de ácido retinoico (agonista de ácido retinoico, Am80) inhibió la transcripción de PDGF-A inducida por KLF5 en un ensayo usando células indicadoras, e inhibió también la formación de la nueva íntima en los vasos sanguíneos lesionados cuando se administró a ratones tipo silvestre. Por el contrario, un antagonista de ácido retinoico promovió la transcripción de PDGF-A, y promovió también la formación de la nueva íntima en vasos sanguíneos lesionados cuando se administró a ratones tipo silvestre (Nature Medicine, 8, pp.856-863, 2002).

55 El ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentanoico (a partir de ahora en esta memoria descriptiva, esta sustancia se denomina también "NIK-33), uno de los compuestos de poliprenilo acíclicos, es conocido por presentar afinidad por las proteínas de unión a ácido retinoico y a los receptores de ácido retinoico, y tiene una acción inductora de la diferenciación y una acción inductora de la apoptosis en el carcinoma

hepatocelular. Clínicamente, NIK-333 inhibió significativamente la incidencia de hepatoma tras tratamiento radical en una administración a largo plazo durante un año, y por tanto se ha sugerido que la sustancia tiene una acción inhibidora frente a la aparición del hepatoma. Además, NIK-333 no induce sustancialmente la insuficiencia de la función hepática y los efectos secundarios adversos observados con otros retinoides, y por tanto, la sustancia es de utilidad como un medicamento muy seguro (N. Eng. J. Med., 334, pp.1561-1567, 1996). Sin embargo, no se sabía hasta el momento que los compuestos de poliprenilo acíclicos inhibían la activación del factor de transcripción KLF5, y además, no se sabía que estas sustancias tenían acciones inhibidoras frente a la remodelación vascular y la arterioesclerosis.

### **Divulgación de la invención**

#### **Objetivo que debe conseguirse mediante la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un medicamento que tenga una acción inhibidora frente a la activación del factor KLF5 de control de la transcripción. Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un medicamento que tenga una acción inhibidora frente a la activación del factor KLF5 de control de la transcripción y una acción inhibidora frente a la remodelación vascular y la arterioesclerosis.

#### **Medios para conseguir el objetivo**

Con el fin de conseguir los objetivos anteriormente mencionados, los inventores de la presente invención han realizado algunas investigaciones de los compuestos que tienen una acción inhibidora frente a la activación del factor KLF5 de control de la transcripción. Como resultado, han encontrado que los compuestos de poliprenilo acíclicos tales como NIK-333 inhibían la activación del factor KLF5 de control de la transcripción, y los compuestos de poliprenilo acíclicos tenían una acción inhibidora frente a la remodelación vascular y la arterioesclerosis. La presente invención se llevó a cabo sobre la base de los hallazgos anteriormente mencionados.

La presente invención proporciona por tanto un medicamento que tiene una acción inhibidora frente a la activación del factor de transcripción KLF5, que comprende un compuesto de poliprenilo acíclico como principio activo. La presente invención proporciona también un medicamento que tiene una acción inhibidora frente a la remodelación vascular, que comprende un compuesto de poliprenilo acíclico como principio activo, y un medicamento que tiene una acción inhibidora frente a la arterioesclerosis, que comprende un compuesto de poliprenilo acíclico como principio activo.

De acuerdo con las formas de realización preferidas, la presente invención proporciona el medicamento anteriormente mencionado, en el que el compuesto de poliprenilo acíclico es un ácido poliprenilcarboxílico; el anteriormente mencionado medicamento, en el que el compuesto de poliprenilo acíclico es ácido 3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentanoico; y el anteriormente mencionado medicamento, en el que el compuesto de poliprenilo acíclico es ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentanoico. De acuerdo con las formas de realización más preferidas, la presente invención proporciona el medicamento anteriormente mencionado, que está en la forma de una composición farmacéutica que comprende un aditivo farmacéuticamente aceptable de las formulaciones junto con el compuesto de poliprenilo acíclico como principio activo; y el medicamento anteriormente mencionado, que está en la forma de una composición farmacéutica para administración oral.

Desde otro aspecto, la presente invención proporciona también el uso de un compuesto de poliprenilo acíclico para la fabricación del medicamento anteriormente mencionado; un procedimiento para inhibir la activación del factor de transcripción KLF5 en un mamífero, incluyendo un ser humano, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un compuesto de poliprenilo acíclico al mamífero, incluyendo un ser humano; un procedimiento para inhibir la remodelación vascular, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un compuesto de poliprenilo acíclico a un mamífero incluyendo un ser humano; y un procedimiento para evitar la arterioesclerosis, que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un compuesto de poliprenilo acíclico a un mamífero incluyendo un ser humano.

### **Efecto de la invención**

El medicamento de la presente invención tiene una acción inhibidora frente a la activación del factor de transcripción KLF5 y es útil para la inhibición de la remodelación vascular, la arterioesclerosis y similares.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra los resultados de un ensayo de la luciferasa llevado a cabo en células COS1 transfectadas simultáneamente con KLF5 y RAR $\alpha$  y cargadas con NIK-33.

La Fig. 2 muestra los resultados de un ensayo de la luciferasa llevado a cabo en células COS1 transfectadas simultáneamente con KLF5 y RAR $\alpha$  y cargadas con NIK-33 y ATRA.

La Fig. 3 muestra los resultados de un ensayo de la luciferasa llevado a cabo en células COS1 transfectadas simultáneamente con KLF5, RAR $\beta$  y RAR $\gamma$  y cargadas con NIK-33 y ATRA.

5 La Fig. 4 muestra los resultados del recuento de células vivas de células 3T3 llevado a cabo 24, 36 y 48 horas después de la carga de NIK-333 o ATRA.

La Fig. 5 muestra los resultados del recuento de células vivas de células 3T3-KLF5 y de células del control llevado a cabo después de la carga de NIK-333 o ATRA.

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

10 El compuesto de poliprenilo acíclico usado como principio activo del medicamento de la presente invención significa un compuesto que contiene varias unidades de isopreno de cadena lineal. El tipo de grupo funcional en el extremo del compuesto de poliprenilo acíclico no está particularmente limitado. Entre los ejemplos se incluyen alcoholes poliprenílicos (poliprenoles) que tienen un grupo alilhidroxilo primario en el extremo, compuestos constituidos por un poliprenol cuyo grupo hidroxilo del extremo forma un éster con un ácido orgánico, ácidos poliprenilcarboxílicos que  
15 tienen un grupo carboxilo en el extremo y similares, pero sin limitarse a estos ejemplos. Se pueden usar preferiblemente ácidos poliprenilcarboxílicos. Como compuestos de poliprenilo acíclicos, se pueden usar isómeros geométricos arbitrarios en formas puras, o mezclas arbitrarias de isómeros geométricos. Los compuestos de poliprenilo acíclicos preferiblemente usados para la presente invención son los ácidos 3,7,11,15-tetramethyl-2,4,6,10,14-hexadecapentanoicos y se puede usar más preferiblemente el ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-  
20 tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentanoico. Este compuesto es una sustancia conocida descrita en la Publicación de Patente Japonesa (Kokoku) N° 63-32058 y en J. Chem. Soc. (c), 2154, 1966, y se puede preparar fácilmente mediante los procedimientos descritos en las publicaciones anteriormente mencionadas. Además, los expertos en la materia pueden preparar fácilmente otros compuestos de poliprenilo acíclicos por referencia a los procedimientos descritos en las publicaciones anteriormente mencionadas.

25 Aunque los propios compuestos de poliprenilo acíclicos se pueden administrar como el medicamento de la presente invención, es normalmente deseable preparar una composición farmacéutica junto con uno o más tipos de aditivos para las formulaciones y administrar la composición. La ruta de administración del medicamento de la presente invención no está particularmente limitada, y se pueden escoger tanto la administración oral como la administración parenteral. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen comprimidos (comprimidos sin revestir o revestidos de azúcar y similares), gránulos, gránulos sublimados, polvos,  
30 jarabes, disoluciones, cápsulas (cápsulas duras o blandas y similares, suspensiones, y similares. Los ejemplos de preparaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen inyecciones, infusiones por goteo, inhalaciones, pulverizaciones, supositorios, agentes de absorción percutánea, agentes de absorción transmucosal, y similares.

35 Ejemplos de aditivos para las formulaciones incluyen, por ejemplo, estabilizantes, tensioactivos, plastificantes, lubricantes, solubilizantes, tampones, edulcorantes, bases, adsorbentes, correctores, aglutinantes, agentes suspensores, agentes abrillantadores, agentes de revestimiento, agentes saborizantes / agentes aromatizantes, agentes humectantes, agentes de control, modificadores del pH, agentes suavizantes, emulsificantes, adherentes, agentes potenciadores de la adhesión, espesantes, agentes de espesamiento, agentes espumantes, excipientes,  
40 agentes dispersantes, propelentes, agentes desintegrantes, adyuvantes de la desintegración, agentes fluidificantes y similares, y se pueden usar en combinación dos o más tipos de estos aditivos. Debido a que los ejemplos específicos de estos aditivos para formulaciones se explican en, por ejemplo, Pharmaceutical Excipients Directory (ed. by Japan Pharmaceutical Excipients Council, Yakuji Nippo, Ltd.), los expertos en la materia pueden seleccionar aditivos adecuados para las formulaciones dependiendo de la forma de la composición farmacéutica y preparar una  
45 composición farmacéutica en una forma deseada de acuerdo con los procedimientos comúnmente usados en este campo. Por ejemplo, se pueden usar derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicol, disolventes biológicamente compatibles y similares, como aditivos para las formulaciones. Además, la memoria descriptiva del documento PCT/JP03/10440 da a conocer una cápsula blanda que contiene ácido 3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentanoico, y esta cápsula blanda se puede usar adecuadamente como el medicamento de la presente  
50 invención.

El medicamento de la presente invención tiene una acción inhibitoria frente a la activación del factor de transcripción KLF5 en un mamífero, incluyendo un ser humano. El experto en la materia puede confirmar fácilmente la acción anteriormente mencionada del medicamento de la presente invención de acuerdo con los procedimientos específicamente explicados en los ejemplo de la presente memoria descriptiva. Además, el medicamento de la  
55 presente invención tiene una acción inhibitoria frente a la remodelación vascular y/o la arterioesclerosis basada en

la acción inhibitoria anteriormente mencionada frente a la activación del factor de transcripción KLF5. Se sabe que, en dolencias patológicas de hipertensión relacionadas con la progresión de la arterioesclerosis y similares, la arquitectura celular de las paredes de los vasos sanguíneos cambia en respuesta a cargas diversas en los vasos sanguíneos, y se produce la remodelación vascular. La remodelación vascular significa cambios en la estructura vascular resultantes de cambios hemodinámicos tales como cambios en el caudal de la sangre y la tensión de la pared del vaso sanguíneo. Los expertos en la materia pueden confirmar también fácilmente la acción inhibitoria del medicamento de la presente invención sobre la remodelación vascular y/o la arterioesclerosis de acuerdo con los procedimientos específicamente descritos en los ejemplos de la presente memoria descriptiva (por ejemplo, la evaluación usando una acción inhibitoria frente al crecimiento celular de los fibroblastos y el modelo de lesión inducido por manguito y similares) o similar.

La dosis y el número de administraciones del medicamento de la presente invención no están particularmente limitados y se puede seleccionar normalmente la dosis diaria en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 1200 mg en términos de peso del principio activo, y la dosis diaria para adultos es normalmente de aproximadamente 100 a 1000 mg. Las dosis anteriormente mencionadas se ajustan deseablemente de manera apropiada a las condiciones de los pacientes, tales como la edad y el peso corporal, el tipo de enfermedad, y similares. Además, la dosis diaria anteriormente mencionada se puede dividir en algunas porciones y administrarse varias veces al día.

### **Ejemplos**

Se explicará más específicamente la presente invención con referencia a los ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a los siguientes ejemplos.

#### **Ejemplo 1-1: Efecto sobre la activación del factor de transcripción KLF5**

Se sembraron células COS1 en una placa de 24 pocillos a una relación de  $5 \times 10^4$  células/pocillo y se cultivaron a 37 °C en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 12 horas. Se llevó a cabo la transfección usando el reactivo de transfección TransFast (nombre comercial registrado, Promega), de acuerdo con el protocolo suministrado con el reactivo. Específicamente, se añadieron las células con pCAG/KLF5 o uno de sus vectores vacíos (pCAG), pCMX/RAR $\alpha$  o uno de sus vectores vacíos (pCMX) y el promotor PDGF-A de la (-900)-Luciferasa, y se cultivaron a 37 °C en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 48 horas se disolvió NIK-333 en dimetil sulfóxido (DMSO), y se añadió a  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M. A continuación, se llevó a cabo el ensayo de la luciferasa usando un kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). En la Fig 1 se muestran los resultados. A diferencia de la transfección del vector vacío de KLF5 y del vector vacío de RAR  $\alpha$  (Banda 1), la transfección únicamente del gen KLF5 (Banda 2) y la transfección únicamente del gen RAR  $\alpha$  (Banda 3), la transfección de los genes KLF5 y RAR  $\alpha$  (Banda 4) activó el promotor PDGF-A. Esta acción de activación del promotor PDGF-A dependiente de KLF5 con expresión en exceso de RAR  $\alpha$  fue inhibida por NIK-333 (Bandas 5 a 7). Además, la acción de NIK-333 mostró dependencia de la concentración a partir de  $10^{-7}$  M. De acuerdo con esto, se encontró que NIK-333 tenía una acción inhibitoria frente a la activación del factor de transcripción KLF5.

#### **Ejemplo 1-2: Efecto sobre la activación del factor de transcripción KLF5**

Se sembraron células COS1 en una placa de 24 pocillos a una tasa de  $5 \times 10^4$  células/pocillo y se cultivaron durante la noche a 37 °C en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se llevó a cabo la transfección usando reactivo de transfección TransFast (nombre comercial registrado, Promega) de acuerdo con el protocolo suministrado con el reactivo. Específicamente, se añadieron las células con pCAG/KLF5 o uno de sus vectores vacíos (pCAG), pRSh/RAR  $\alpha$ , pRSh/RAR  $\beta$ , pRSh/RAR  $\gamma$  o uno de sus vectores vacíos (pRS-RSV) y el promotor PDGF-A de la (-900)-Luciferasa y se cultivaron a 37 °C en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 48 horas. Se disolvió NIK-333 en dimetil sulfóxido (DMSO), y se añadió a  $10^{-12}$  a  $10^{-5}$  M. A continuación, se llevó a cabo el ensayo de la luciferasa usando el kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). En las Figs. 2 y 3 se muestran los resultados. A diferencia de la transfección del vector vacío de KLF5 y del vector vacío de RAR  $\alpha$  (Banda 1), la transfección únicamente del gen RAR  $\alpha$  (Banda 2) y la transfección únicamente del gen KLF5 (Banda 3), la transfección de los genes KLF5 y RAR $\alpha$  (Banda 4) mostró la activación del promotor PDGF-A. Esta activación del promotor PDGF-A dependiente de KLF5 con expresión en exceso de RAR  $\alpha$  fue inhibida por NIK-333 (Bandas 5 a 12). Esta acción inhibitoria fue significativamente de manera dependiente a la concentración a partir de  $10^{-10}$  M y se encontró que era más potente que la de todo el ácido transretinoico (ATRA). De manera similar, la activación dependiente de KLF5 del promotor PDGF-A con expresión en exceso de RAR  $\gamma$  fue inhibida por NIK-333, y se encontró que esta acción inhibitoria era más potente que la de ATRA. Por otra parte, se señaló que la acción de activación del promotor PDGF-A dependiente de KLF5 con expresión en exceso de RAR  $\beta$  no fue afectada por NIK-333. Se desveló que NIK-333 inhibió la acción de activación del promotor PDGF-A de KLF5 con expresión en exceso de RAR ( $\alpha$  o  $\gamma$ ) y que esta acción inhibitoria fue más potente que la de ATRA. Por tanto, se encontró que NIK-333 tenía una acción inhibitoria frente a la activación del factor de transcripción KLF5.

**Ejemplo 2: Efecto sobre el crecimiento celular de fibroblastos 3T3**

Se sembraron células 3T3 derivadas de fibroblastos en una placa de 24 pocillos a una tasa de  $1 \times 10^6$  células/pocillo y se mantuvieron durante 12 horas. A continuación, se añadieron NIK-333 y ATRA a  $10^{-7}$  a  $10^{-4}$ , y se llevó a cabo el recuento de células vivas 24, 36 y 48 horas después. Se disolvieron NIK-333 y ATRA en DMSO. Como resultado, NIK-333 inhibió el crecimiento celular de una manera dependiente de la concentración a partir de  $10^{-7}$  M, y se confirmó que esta acción fue más potente que la de ATRA (Fig. 4). Por tanto, se considera que NIK-333 inhibe el crecimiento celular de los fibroblastos, que se piensa que es una causa de arterioesclerosis, y por tanto tiene una acción inhibitoria frente a la arterioesclerosis.

**Ejemplo 3-1: Efecto sobre el modelo de lesión inducida por manguito en el ratón**

Se llevó a cabo el análisis de remodelación vascular usando un modelo de lesión inducida por manguito. Se ha informado de la utilidad de este modelo en relación con la remodelación vascular (Physiol. Genomics, 2, pp.13-30, 2000; Circulation, 104, pp. 2716-2721, 2001; Circulation, 106, pp.847-853, 2002). Para este experimento, se utilizaron ratones C57BL6/N machos de 8 semanas de edad (10 animales/grupo). Se proporcionó por vía oral una cantidad de 50 mg/kg de NIK-333 disuelto en aceite de soja una vez al día y cada día de 7 días antes de la colocación de un manguito (colocación de un tubo de polietileno alrededor del vaso sanguíneo), en el día antes del sacrificio. El grupo del control recibió solo aceite de soja de la misma manera. Después de 7 días de pretratamiento, se cubrió la arteria femoral derecha con PE50 (tubo de polietileno 50) como manguito. Se sacrificaron los animales después de 5 semanas. Se recogió la sangre, y se retiró el manguito con fijación por perfusión mediante punción del ventrículo izquierdo. Para la evaluación patológica, se llevó a cabo la tinción de hematoxilina/eosina (HE). Como resultado, la relación de I/M (íntima/medios) en la hiperplasia de la íntima vascular resultado de lesión vascular debida al manguito disminuyó en el grupo de tratamiento con NIK-333 en comparación con el grupo del control.

[Tabla 1]

Tratamiento	Relación I/M
Disolvente (aceite de soja)	0,93 ± 0,35
50 mg/kg de NIK-333	0,87 ± 0,29
100 mg/kg de NIK-333	0,75 ± 0,31

**Ejemplo 3-2: Efecto en modelo de lesión inducida por manguito en ratón**

Se llevó a cabo el análisis de remodelación vascular usando un modelo de lesión inducida por manguito. Se ha informado de la utilidad de este modelo en relación con la remodelación vascular (Physiol. Genomics, 2, pp.13-30, 2000; Circulation, 104, pp. 2716-2721, 2001; Circulation, 106, pp.847-853, 2002). Para este experimento, se utilizaron ratones C57BL6/N machos de 8 semanas de edad (10 animales/grupo). Se proporcionó por vía oral una cantidad de 100 o 200 mg/kg de NIK-333 o 5 o 10 mg/kg de ATRA suspendidos en aceite de soja una vez al día cada día de 7 días antes de la colocación de un manguito (colocación de un tubo de polietileno alrededor del vaso sanguíneo) en el día antes del sacrificio. El grupo del control recibió solo aceite de soja de la misma manera. Después de 7 días de pretratamiento, se cubrió la arteria femoral derecha con PE50 (tubo de polietileno 50, diámetro externo: 0,965 mm, longitud; aproximadamente 1,5 mm) como un manguito. Se sacrificaron los animales después de 5 semanas. Se recogió la sangre, y se retiró el manguito con fijación por perfusión mediante punción del ventrículo izquierdo. Para la evaluación patológica, se llevó a cabo la tinción elástica de van Gieson (EVG). Como resultado, la relación de I/M (íntima/medios) en la hiperplasia de la íntima vascular resultado de la lesión vascular debida al manguito disminuyó en los grupos de tratamiento con NIK-333 en comparación con el grupo del control. Por otra parte, no se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento con ATRA y el grupo del control.

[Tabla 2]

Tratamiento	Relación I/M (promedio ± D.E.)	
Disolvente (aceite de soja)	0,62 ± 0,2	
100 mg/kg de NIK-333	0,38 ± 0,2	P < 0,05
200 mg/kg de NIK-333	0,09 ± 0,1	P < 0,01
5 mg/kg de ATRA	0,64 ± 0,3	Sin diferencias significativas

(continuación)

Tratamiento	Relación I/M (promedio $\pm$ D.E.)	
10 mg/kg de ATRA	0,63 $\pm$ 0,2	Sin diferencias significativas

**Ejemplo 4: Influencia en el peso de los testículos de ratón**

5 Se utilizaron ratones C57BL6/N machos de ocho semanas de edad (10 animales/grupo). Se proporcionó por vía oral una cantidad de 50 mg/kg o 100 mg/kg de NIK-333 disuelto en aceite de soja una vez al día cada día durante 5 semanas. El grupo del control recibió solo aceite de soja de la misma manera. Se midieron los pesos corporales después de 5 semanas. Se sacrificaron los animales, a continuación se observaron los testículos mediante observación visual, y se midieron los pesos de los testículos. Como resultado, no se observaron diferencias en el peso corporal y el peso de los testículos en los grupos de tratamiento con NIK-333 durante 5 semanas (50 o 100 mg/kg) en comparación con el grupo del control. Además no se observaron hallazgos anormales en los testículos mediante la observación visual.

Tabla 3

Tratamiento	Peso corporal (g)	Peso de ambos testículos (g)
Disolvente	21,1 $\pm$ 0,3	0,1437 $\pm$ 0,0036
50 mg/kg de NIK-333	20,8 $\pm$ 0,3	0,1465 $\pm$ 0,0043
100 mg/kg de NIK-333	21,2 $\pm$ 0,3	0,1360 $\pm$ 0,0026

**Ejemplo 5: Influencia sobre el crecimiento de células con KLF5 estable**

15 Se sembraron "células 3T3-KLF5", células en las que se KLF5 expresaba de manera estable (obtenido subclonando el ADNc de KLF5 en un vector de expresión 3xFLAG para preparar una construcción de 3xFLAG-KLF5, transfectando a continuación células 3T3 con la construcción, y cultivando los transfectantes en presencia de G418 durante 2 semanas para clonar las células resistentes al clon G418, las células del control que no contenían KLF5 que se prepararon de la misma manera se denominan células 3T3 simuladas), se sembraron en medio DMEM que contenía FBS al 10 % y penicilina G/estreptomicina a una velocidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo (placa de 6 pocillos) y se cultivaron durante la noche a 37 °C en una estufa incubadora con CO<sub>2</sub> al 5 %, y a continuación se cambió el medio a medio DMEM que contenía penicilina G/estreptomicina 8xenta de suero). Se añadieron las células con NIK-333 disuelto en DMSO después de 2 horas, se cultivaron durante 24 horas, y a continuación se realizó el recuento. En la Fig. 5 se muestran los resultados. Cuando se añadieron NIK-333 y ATRA disueltos en DMSO a las células 3T3 simuladas y a las células 3T3-KLF5 a una concentración de  $10^{-8}$  a  $10^{-5}$  M, se observó una disminución en el recuento de células vivas de una manera dependiente de la concentración para ambos tipos de células debido a la adición de NIK-333 y de ATRA. La acción de NIK-333 sobre las células 3T3 simuladas y las células 3T3-KLF5 fue más potente que la de ATRA. Tras la adición de NIK-333 el índice de supervivencia de las células 3T3-KLF5 fue mayor que el de las células 3T3 simuladas. El índice de supervivencia celular difirió dependiendo de la presencia o de la ausencia de KLF5 en presencia de NIK-333, y por tanto, esto sugirió que la acción de NIK-333 estaba relacionada con la acción de KLF5.

**Aplicabilidad industrial**

El medicamento de la presente invención tiene una acción inhibitoria frente a la activación del factor de transcripción KLF5 y es útil en la inhibición de la remodelación vascular, la arterioesclerosis y similares.

**REIVINDICACIONES**

1. Un medicamento para uso en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades vasculares teniendo una acción inhibitoria frente a la activación de un factor de transcripción KLF5, que comprende un poliprenilo acíclico como principio activo.
- 5 2. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene una acción inhibitoria frente a la remodelación vascular.
3. El medicamento de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene una acción inhibitoria frente a la arterioesclerosis.
4. El medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto de poliprenilo acíclico es un ácido poliprenilcarboxílico.
- 10 5. El medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto de poliprenilo acíclico es ácido 3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentanoico.
6. El medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto de poliprenilo acíclico es ácido (2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-tetrametil-2,4,6,10,14-hexadecapentanoico.
- 15 7. El medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que está en la forma de una composición farmacéutica que contiene un aditivo farmacéuticamente aceptable para las formulaciones junto con un compuesto de poliprenilo acíclico como principio activo.
8. El medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que está en la forma de una composición farmacéutica para administración oral.

20

Fig.1

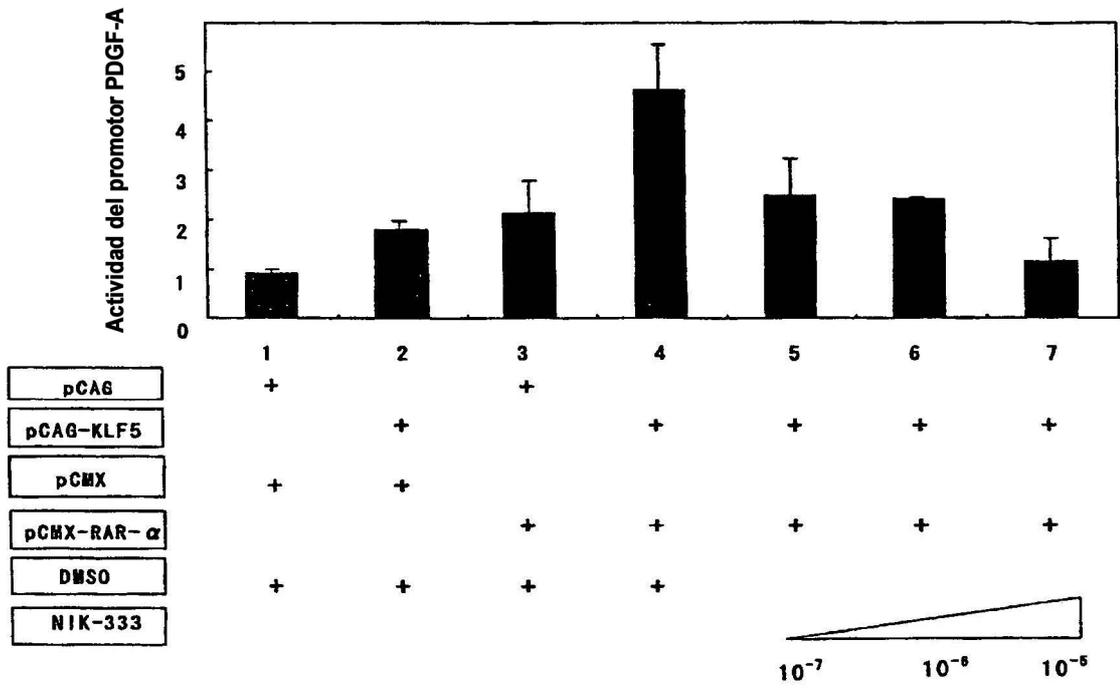


Fig.2

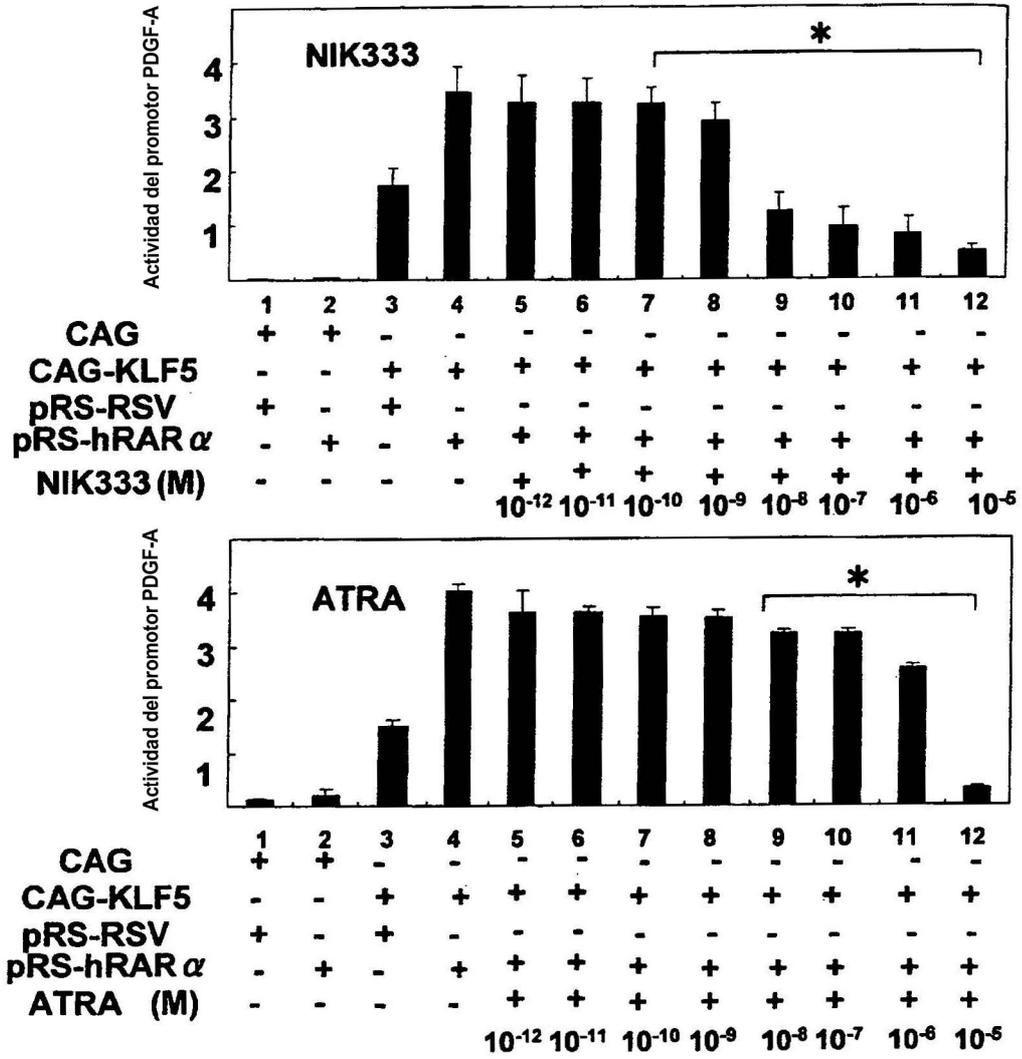


Fig.3

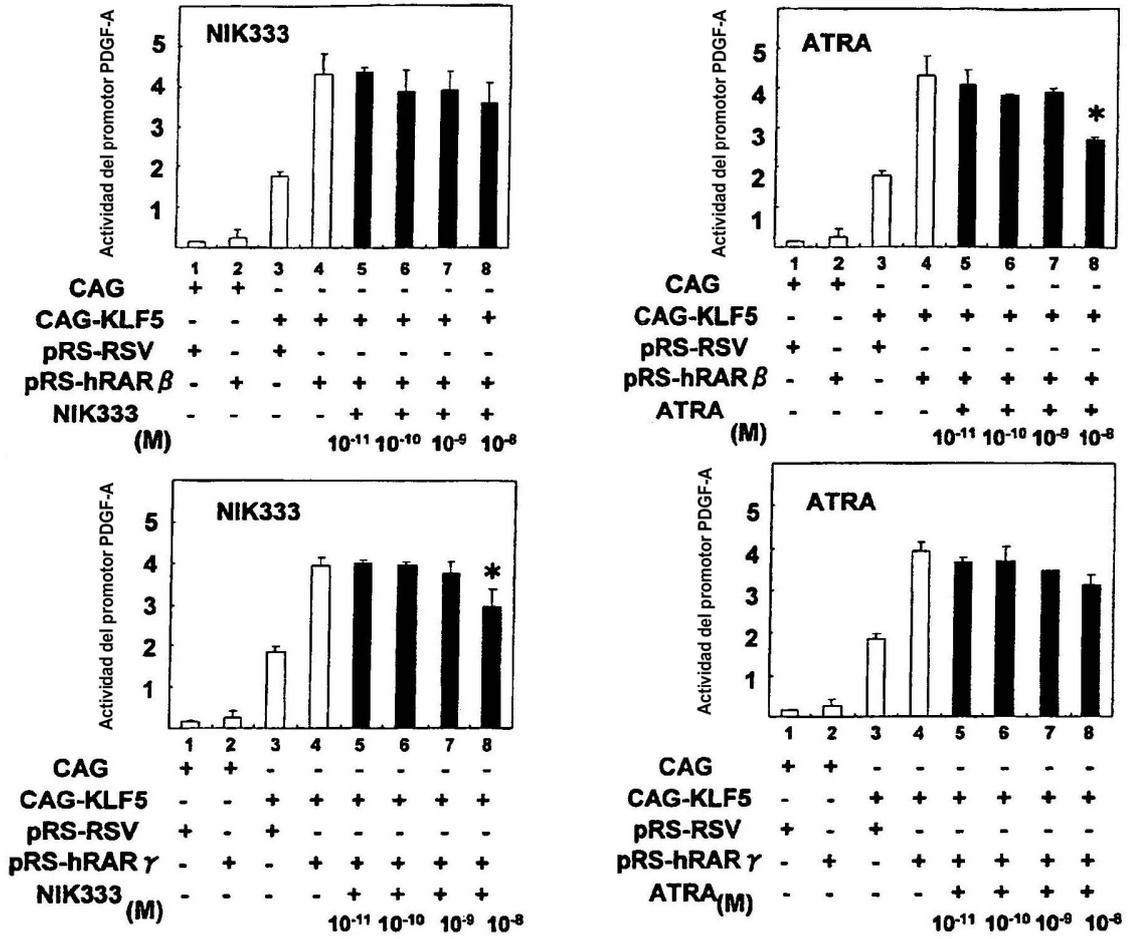


Fig.4

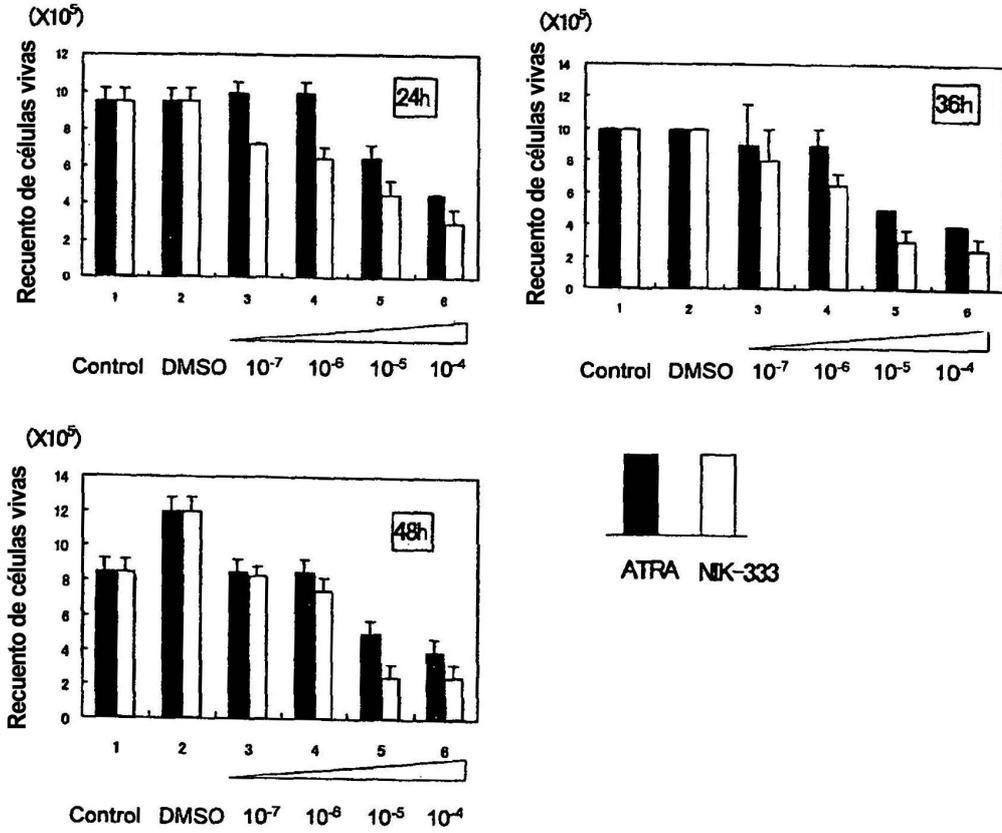


Fig.5

