

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 216**

51 Int. Cl.:  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03730064 .7**  
96 Fecha de presentación: **16.05.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1507558**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2005**

54 Título: **COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN INHIBIDOR DE RENINA, UN BLOQUEADOR DEL CANAL DE CALCIO Y UN DIURÉTICO.**

30 Prioridad:  
**17.05.2002 US 381546 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.11.2011**

73 Titular/es:  
**Novartis Pharma AG  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**FELDMAN, David, Louis y  
WEBB, Randy, Lee**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 369 216 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

Composición farmacéutica que comprende un inhibidor de renina, un bloqueador del canal de calcio y un diurético

El sistema angiotensina renina (RAS) es un sistema hormonal complejo comprendido de un precursor de alto peso molecular, angiotensinógeno, dos enzimas de procesamiento, enzima de conversión angiotensina y renina (ACE), y el mediador vasoactivo de angiotensina II (Ang II) (J. Cardiovasc. Pharmacol., 15 (Supp B) (1990) p. S1-S5). La enzima renina cataliza la división del angiotensinógeno en el decapeptido angiotensina I, que tiene mínima actividad biológica por sí misma y se convierte en el octapéptido activo Ang II por ACE. El Ang II tiene múltiples acciones biológicas en el sistema cardiovascular, que incluye vasoconstricción, activación del sistema nervioso simpático, estimulación de la producción de aldosterona, antinatriuresis, estimulación del crecimiento vascular (es decir, estimulación de la proliferación de células de músculo liso y la sedimentación del exceso de material de matriz extracelular en la pared vascular), y estimulación del crecimiento cardiaco. El Ang II funciona como una hormona vasotensora y está involucrada en la patofisiología de diversas formas de hipertensión.

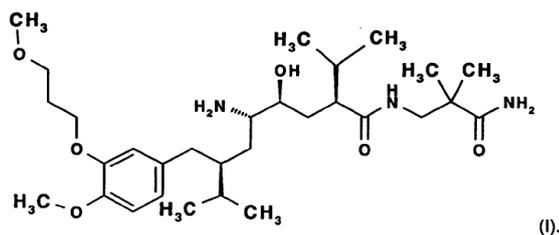
Los efectos vasoconstrictores de la angiotensina II se producen debido a su acción en las células del músculo liso no estriadas, a la estimulación de la formación de las hormonas adrenérgicas, epinefrina y norepinefrina, así como también al aumento de la actividad del sistema nervioso simpático como resultado de la formación de norepinefrina. La angiotensina II también tiene una influencia sobre el balance de electrolitos, produce por ejemplo efectos antinatriuréticos y antiuréticos en el riñón y promueve por lo tanto la liberación, de una parte, el péptido vasopresina de la glándula pituitaria y, por otra parte, de aldosterona de glomerulosa suprarrenal. Todas estas influencias tienen una función importante en la regulación de la presión sanguínea, en el aumento del volumen de circulación y la resistencia periférica. La angiotensina II también está involucrada en el crecimiento celular y en la formación de matriz extracelular.

La angiotensina II interactúa con receptores específicos sobre la superficie de la célula objetivo. Ha sido posible identificar subtipos de receptor que se denominan por ejemplo receptores AT1- y AT 2. En tiempos recientes se han hecho grandes esfuerzos para identificar sustancias que se unan al receptor AT1. Tales ingredientes activos se denominan frecuentemente antagonistas de angiotensina II. Debido a la inhibición del receptor AT1 se pueden utilizar tales antagonistas por ejemplo como antihipertensivos o para el tratamiento de falla cardiaca congestiva, entre otras indicaciones. Por lo tanto se entiende que los antagonistas de angiotensina II son aquellos ingredientes activos que unen al subtipo del receptor AT1.

Los inhibidores del sistema angiotensina renina son fármacos bien conocidos que disminuyen la presión sanguínea y ejercen acciones beneficiosas en la hipertensión y en la falla cardiaca congestiva como se describe, por ejemplo, en N. Eng. J. Med. 316, 23 (1987) p. 1429-1435. Se conoce un gran número de inhibidores de péptido y no péptido del sistema de angiotensina renina, los más estudiados son los inhibidores ACE, que incluyen los fármacos captopril, enalapril, lisinopril, benazepril y espirapril. Aunque un modo principal de acción de los inhibidores ACE implica la prevención de la formación del péptido vasoconstrictor Ang II, se ha reportado en Hypertension, 16, 4 (1990) p. 363-370 que el ACE divide una variedad de sustratos de péptido, que incluyen los péptidos vasoactivos bradikinina y la sustancia P. Se ha demostrado la prevención de la degradación de bradikinina mediante los inhibidores ACE, y se ha reportado la actividad de los inhibidores ACE en algunas afecciones en Circ. Res., 66, 1 (1990) p. 242-248 que van a ser mediados por la elevación de los niveles de bradikinina a diferencia de la inhibición de la formación de Ang II. Por consiguiente, no se puede presumir que el efecto de un inhibidor ACE se deba únicamente a la prevención de la formación de angiotensina y la inhibición posterior del sistema de angiotensina renina.

Además de inhibir la conversión de angiotensina I a angiotensina II, o bloquear el receptor AT1, se puede detener el RAS al inicio de esta ruta. Esta etapa inicial (es decir, la conversión de angiotensinógeno a angiotensina I) está mediada por renina y se puede inhibir mediante los inhibidores de renina (RI). Los inhibidores de renina cierran completamente la formación de angiotensina II debido a que actúan en la etapa de limitación del índice en la cascada. Debido al bloqueo virtualmente completo de la formación de angiotensina II con RI, se puede demostrar que estos agentes tienen eficacia mejorada sobre los inhibidores ACE o los bloqueadores del receptor AT1. Adicionalmente, debido a su alto grado de especificidad, los RI se asocian con menos efectos colaterales que los inhibidores ACE. Uno de tal RI es alisquireno. Otros son detiquireno, terlaquireno, y zanquireno.

El alisquireno tiene la siguiente fórmula química (I):



El inhibidor de renina de la fórmula (I), químicamente definido como 2(S),4(S),5(S),7(S)-N-(3-amino-2,2-dimetil-3-oxopropil)-2,7-di(1-metiletil)-4-hidroxi-5-amino-8-[4-metoxi-3-(3-metoxi-propoxi)fenil]-octanamida, se describe específicamente en la EP 678503 A. Se prefiere especialmente la sal de hemi-fumarato del mismo.

5 Una desventaja en el tratamiento de hipertensión y enfermedades y afecciones relacionadas con estas es que la monoterapia frecuentemente estimula los reflejos compensatorios que contrarrestan la reducción inducida farmacológicamente en la presión sanguínea. Esta compensación tiende a obstaculizar exitosamente la disminución de la presión sanguínea. Por lo tanto es deseable desarrollar medios de tratamiento adicionales para esta aplicación.

10 La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) el inhibidor de renina alisquireno, (ii) el bloqueador del canal de calcio (CCB) amlodipina y (iii) la hidroclorotiazida diurética, o, según sea apropiado, en cada caso una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, especialmente para el tratamiento de una enfermedad o afección como se establece aquí.

15 La invención de forma similar se relaciona con el uso de (i) el inhibidor de renina alisquireno, (ii) el bloqueador del canal de calcio (CCB) amlodipina y (iii) la hidroclorotiazida diurética, o, según sea apropiado, en cada caso una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección como se establece aquí.

20 La invención de forma similar describe el tratamiento de una enfermedad o afección como se establece aquí que comprende administrar a un animal, que incluye un hombre una cantidad terapéuticamente efectiva de (i) el inhibidor de renina alisquireno, (ii) el bloqueador del canal de calcio (CCB) amlodipina, y (iii) la hidroclorotiazida diurética, o, según sea apropiado, en cada caso una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. La presente invención adicionalmente se relaciona con un equipo de partes que comprende (i) una composición farmacéutica del inhibidor de renina alisquireno o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, (ii) una composición farmacéutica del bloqueador del canal de calcio (CCB) amlodipina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (iii) una composición farmacéutica de la hidroclorotiazida diurética, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la forma de dos o tres unidades separadas de los componentes (i) a (iii).

25 En cada caso según sea apropiado, por ejemplo si los compuestos no está presentes como una sal farmacéuticamente aceptable per se como en el caso de hidroclorotiazida, estos compuestos también incluyen sus sales farmacéuticamente aceptables.

30 La estructura de los agentes activos identificados mediante nombres comerciales o genéricos se puede tomar de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o de las bases de datos, por ejemplo las Patentes Internacionales de LifeCycle (por ejemplo IMS World Publications). Cualquier persona experta en la técnica es completamente capaz de identificar los agentes activos y, con base en estas referencias, de forma similar capaz de fabricar y probar las indicaciones y propiedades farmacéuticas en los modelos de prueba estándar, in vitro e in vivo.

35 La presente invención se relaciona adicionalmente con la composición farmacéutica anterior para el tratamiento de falla cardiaca tal como falla cardiaca congestiva (aguda y crónica), disfunción ventricular izquierda y cardiomiopatía hipertrófica, miopatía cardiaca diabética, arritmias supraventricular y ventricular, fibrilación auricular, flúter auricular o remodelamiento vascular perjudicial. Se puede mostrar adicionalmente que la terapia de combinación con la combinación de la invención y en particular con alisquireno, especialmente la sal hemi-fumarato de la misma, amlodipina, especialmente el maleato o más preferiblemente el besilato de la misma, e hidroclorotiazida (HCTZ) prueban ser benéficos en el tratamiento y prevención de infarto del miocardio y sus secuelas. Tal terapia de combinación también es útil en el tratamiento de aterosclerosis, angina (si es estable o inestable), e insuficiencia renal (diabética o no diabética). Adicionalmente, tal terapia de combinación puede mejorar la disfunción endotelial, proporcionando por lo tanto beneficio en las enfermedades en las que se interrumpe la función endotelial normal tal como falla cardiaca, angina de pecho y diabetes. Adicionalmente, se puede utilizar la combinación de la presente invención para el tratamiento o prevención de aldosteronismo secundario, hipertensión pulmonar primaria y secundaria, afecciones de falla renal, tal como nefropatía diabética, glomerulonefritis (que incluye nefropatía IgA), fibrosis renal, escleroderma, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal, y también hipertensión vascular renal, retinopatía diabética, el manejo de otros trastornos vasculares, tal como migraña, enfermedad vascular periférica, enfermedad de Raynaud, hiperplasia luminal, disfunción cognitiva (tal como Alzheimer), glaucoma y apoplejía, fibrosis hepática y pulmonar, enfermedades fibróticas que resultan de la acumulación de exceso de matriz extracelular inducida por TGF- $\beta$  y enfermedades proliferativas de células de músculo liso (tal como fibroides uterinos).

55 La presente invención adicionalmente describe el tratamiento de una afección o enfermedad seleccionada del grupo que consiste de hipertensión, falla cardiaca tal como falla cardiaca congestiva (aguda y crónica), disfunción del ventrículo izquierdo y cardiomiopatía hipertrófica, miopatía cardiaca diabética, arritmias supraventricular y ventricular, fibrilación auricular, flúter auricular, remodelamiento vascular perjudicial, infarto del miocardio y sus secuelas, aterosclerosis, angina (si es estable o inestable), insuficiencia renal (diabética y no diabética), falla cardiaca, angina de pecho, diabetes, aldosteronismo secundario, hipertensión pulmonar primaria y secundaria, afecciones de falla renal, tal como nefropatía diabética, glomerulonefritis (que incluye nefropatía IgA), fibrosis renal, escleroderma, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal, y también hipertensión vascular renal, retinopatía diabética,

- 5 el manejo de otros trastornos vasculares, tal como migraña, enfermedad vascular periférica, enfermedad de Raynaud, hiperplasia luminal, disfunción cognitiva (tal como Alzheimer), glaucoma y apoplejía, fibrosis hepática y pulmonar, enfermedades fibróticas que resultan de la acumulación de exceso de matriz extracelular inducida por TGF, y enfermedades proliferativas de células de músculo liso, que incluye fibroides uterinos que comprende
- 10 administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una combinación de (i) un Inhibidor de renina, (ii) un CCB, y (iii) un diurético, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y un portador farmacéuticamente aceptable a un mamífero en necesidad de tal tratamiento. Preferiblemente, el inhibidor de renina es alisquireno, el CCB es amlodipina, y el diurético es HCTZ.
- 15 La invención de forma similar se relaciona con el uso de una combinación de (i) el inhibidor de renina alisquireno, (ii) el CCB amlodipina, y (iii) la hidroclorotiazida diurética, o sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de una enfermedad o afección como se describe aquí.
- 20 Como se utiliza a través de esta especificación y en las reivindicaciones, el término "tratamiento" abarca todas las diferentes formas o modos de tratamiento como se conoce por aquellos expertos de la técnica pertinente y en particular incluye tratamiento preventivo, curativo y paliativo.
- 25 Los diuréticos que activan el RAS, hacen así más efectiva la inhibición de RAS mediante el inhibidor de renina (RI). La adición de CCB a RI, cuya actividad se potencia mediante el diurético, disminuirá por ejemplo la presión sanguínea mediante un mecanismo separado de RAS. Se ha mostrado que el CCB es renoprotector por lo menos en parte a través de (i) la inhibición de la expresión glomerular de la actina de célula de músculo liso alfa y beta TGF (Nephron 2000 Nov; 86(3):315-26) y (ii) ejercer actividad inhibidora del crecimiento por medio de la inhibición de las
- 30 múltiples rutas de señal celular (J Hypertens 2002 Jan;20 (1):95-102).
- 35 De forma sorprendente se encuentra que el uso de la combinación de la invención de mecanismos divergentes maximiza la oportunidad de evitar la activación de los mecanismos compensatorios que regulan la presión sanguínea que se estimulan con tratamiento anti-hipertensivo mono-terapia. Inesperadamente, el bloqueo de RAS es más efectivo cuando se activa el sistema. Así, es posible lograr mayor inhibición farmacológica del RAS cuando los bloqueadores de este sistema se administran simultáneamente con activadores leves del RAS. Tal activación del RAS se puede llevar a cabo con el bloqueador del canal de calcio y los diuréticos. Adicionalmente, cada una de estas terapias solas es antihipertensiva. El uso de un RI en esta combinación proporciona bloqueo completo y más efectivo del RAS. La ventaja inesperada de una combinación triple vs doble es el (i) efecto potenciado de reducción de la presión sanguínea y (ii) el efecto anti-proliferativo más efectivo a través de las acciones combinadas de la
- 40 inhibición de renina (potenciadas por el diurético) y CCB. Ambas actividades se traducen en protección de tejido mejorada. La actividad mejorada y el beneficio sobre el combo doble resultan de una potenciación o aún interacciones sinérgicas entre 3 componentes. Adicionalmente, se pueden manifestar menos efectos colaterales por la capacidad de utilizar dosis menores de los patrones que se van a combinar. Por ejemplo, las dosis de los componentes individuales se puede reducir 2-7 veces o reducir 3-7, 4-7, 5-7 o 6-7 veces, cuando se da en combinación y aún alcanza actividad de disminución de la presión sanguínea comparable en cada agente individual. En los humanos, la superioridad o las ventajas sorprendentes de los combos triples sobre los combos dobles se pueden demostrar por ejemplo mediante al probar los beneficios de la combinación sobre la reducción de la presión sanguínea, hipertrofia de ventrículo izquierdo, protección renal (por ejemplo, revertir, aliviar, o retrasar el empeoramiento de proteinuria; disminución del índice de filtración glomerular o depuración de creatinina, duplicación de retraso de creatinina en suero).
- 45 La enfermedad vascular hipertensiva prolongada y no controlada finalmente conduce a una variedad de cambios patológicos en los órganos objetivos tal como el corazón y el riñón. La presencia de diabetes exacerba estos cambios. La hipertensión sostenida puede conducir también a una ocurrencia incrementada de apoplejía. Por lo tanto, existe una fuerte necesidad para evaluar la eficacia de la terapia antihipertensiva, un examen de los criterios de valoración cardiovasculares adicionales, más allá de los de reducción de la presión sanguínea, para obtener una mayor comprensión de los beneficios del tratamiento combinado. La naturaleza de las enfermedades vasculares hipertensivas es multifactorial. Bajo ciertas circunstancias, se han combinado fármacos con diferentes mecanismos de acción. Sin embargo, simplemente utilizar cualquier combinación de fármacos que tengan diferentes modos de acción no conduce necesariamente a combinaciones con efectos ventajosos.
- 50 La potenciación es el mejoramiento del efecto biológico de un agente por otro agente para producir un efecto aditivo o más de un efecto biológico aditivo, comparado con los efectos de los agentes individuales, mientras que la sinergia es el mejoramiento del efecto biológico de un agente mediante otro agente para producir un efecto biológico que es mayor que el predicho al agregar los efectos de los componentes individuales.
- 55 La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende (i) alisquireno, (ii) amlodipina, y (iii) hidroclorotiazida (HCTZ) o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- La presente invención se puede utilizar para tratar afecciones cardíacas y renales relacionadas mediante la administración de la composición farmacéutica que comprende (i) alisquireno, especialmente la sal hemi-fumarato del mismo, amlodipina, especialmente el maleato o más preferiblemente el besilato del mismo, y HCTZ.

Los compuestos que se van a combinar pueden estar presentes como sales farmacéuticamente aceptables. Si estos compuestos tienen, por ejemplo, por lo menos un centro básico, pueden formar sales de adición ácida. También se pueden formar sales de adición ácida correspondientes que tienen, si se desea, un centro básico adicionalmente presente. Los compuestos que tienen por lo menos un grupo ácido (por ejemplo COOH) también pueden formar sales con bases. Adicionalmente se pueden formar sales internas correspondientes, si un compuesto comprende por ejemplo un grupo carboxi y un grupo amino.

Se ha encontrado sorprendentemente que una combinación de alisquireno, amlodipina, y HCTZ alcanza mayor efecto terapéutico que la administración de cada uno de estos agentes solos. También se puede documentar mayor eficacia como una acción de duración prolongada. La duración de la acción se puede supervisar al momento de regresar a los valores iniciales antes de la siguiente dosis o como el área bajo la curva (AUC) y se expresa como el producto del cambio en la presión sanguínea en milímetros de mercurio (cambio en mmHg) y la duración del efecto (minutos, horas o días).

Los beneficios adicionales son menores dosis de los fármacos individuales que se van a combinar de acuerdo con la presente invención que se pueden utilizar para reducir la dosificación, por ejemplo, las dosificaciones no necesitan ser solo frecuentemente más pequeñas sino que también se aplican menos frecuentemente, o se pueden utilizar para disminuir la incidencia de los efectos colaterales. La administración combinada de alisquireno, amlodipina, y HCTZ o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos resulta en una respuesta significativa en un porcentaje mayor de los pacientes tratados, es decir, un índice de respuesta mayor que resulta, independiente de la etiología subyacente de la afección. Esto de acuerdo con los requerimientos y deseos de los pacientes que se van a tratar.

Se puede mostrar que la terapia de combinación con alisquireno, especialmente la sal hemi-fumarato del mismo, amlodipina, especialmente el maleato o más preferiblemente el besilato del mismo, y HCTZ resulta en una terapia antihipertensiva más efectiva (para hipertensión maligna, esencial, reno-vascular, diabética, sistólica aislada, u otro tipo secundario de hipertensión) a través de la eficacia mejorada así como también un mayor índice de respuesta. La combinación también es útil en el tratamiento o prevención de falla cardíaca tal como falla cardíaca congestiva (aguda y crónica), disfunción del ventrículo izquierdo y cardiomiopatía hipertrófica, miopatía cardíaca diabética, arritmias supraventricular y ventricular, fibrilación auricular, flúter auricular o remodelamiento vascular perjudicial. Se puede mostrar adicionalmente que la terapia de combinación con alisquireno, amlodipina, y HCTZ prueba ser beneficiosa en el tratamiento y prevención de infarto del miocardio y sus secuelas. Una terapia de combinación con alisquireno, amlodipina, y HCTZ también es útil en el tratamiento de aterosclerosis, angina (estable o no estable), e insuficiencia renal (diabética y no diabética). Adicionalmente, la terapia de combinación que utiliza alisquireno, amlodipina, y HCTZ puede mejorar la disfunción endotelial, proporcionando por lo tanto beneficio en las enfermedades en las que se interrumpe la función endotelial normal tal como falla cardíaca, angina de pecho y diabetes. Adicionalmente, la combinación de la presente invención se puede utilizar para el tratamiento o prevención de aldosteronismo secundario, hipertensión pulmonar primaria y secundaria, afecciones de falla renal, tal como nefropatía diabética, glomerulonefritis (que incluye nefropatía IgA), fibrosis renal, escleroderma, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal, y también hipertensión vascular renal, retinopatía diabética, el manejo de otros trastornos vasculares, tal como migraña, enfermedad vascular periférica, enfermedad de Raynaud, hiperplasia luminal, disfunción cognitiva (tal como Alzheimer), glaucoma y apoplejía, fibrosis hepática y pulmonar, enfermedades fibróticas que resultan de la acumulación de exceso de matriz extracelular inducida por TGF- $\beta$  y enfermedades proliferativas de células de músculo liso (tal como fibroides uterinos).

El experto en la técnica pertinente está completamente habilitado para seleccionar un modelo de prueba relevante para probar la eficacia de una combinación de la presente invención en las indicaciones terapéuticas aquí. Se llevan a cabo estudios representativos con una combinación de alisquireno, especialmente la sal hemi-fumarato del mismo, amlodipina, especialmente el maleato o más preferiblemente el besilato del mismo, y HCTZ aplicando la siguiente metodología.

Las ventajas de las presentes combinaciones, por ejemplo, se demuestran en un ensayo clínico o en el procedimiento de prueba como se describe esencialmente aquí adelante. Muchos protocolos de estudios clínicos para probar nuestras combinaciones se conocen por aquellos expertos en la técnica. Un ejemplo de un ensayo clínico útil para demostrar las ventajas inesperadas de nuestras nuevas combinaciones se describe por Nussberger J. et al. (Hypertension 2002 Jan; 39(1): E1-8). El mismo protocolo se desarrolla con nuestras combinaciones preferidas tal como se describe aquí. La eficiencia del fármaco se evalúa en diversos modelos de animal que incluyen aquellos encontrados adelante, utilizando las siguientes dosificaciones aproximadas. El alisquireno se administra en minibombas osmóticas subcutáneamente implantadas en aproximadamente 1-200 mg/kg/día (monoterapia), y aproximadamente 1-75 mg/kg/día (terapia de combinación). La amlodipina y HCTZ se administran oralmente en dosificaciones por debajo de 75 mg/kg/día como mono-terapia o terapia de combinación.

Entre los modelos de animales utilizados para evaluar la eficacia del fármaco están los modelos de rata de sal de acetato de desoxicorticosterona (DOCA-sal) y los modelos de rata espontáneamente hipertensas (SHR), mantenida en una dieta de sal normal o con carga de sal (4-8% de sal en concentrado para rata o 1% de NaCl como agua potable). El modelo de prueba de DOCA-sal utiliza un protocolo de estudio crónico o agudo. Un procedimiento de estudio agudo implica la evaluación de los efectos de diversas sustancias de prueba durante un periodo

5 experimental de seis horas utilizando ratas con catéteres venosos y arteriales femorales permanentes. El Procedimiento de Estudio Agudo evalúa las sustancias de prueba por su capacidad de reducir la presión sanguínea durante la fase establecida de hipertensión de DOCA-sal. En contraste, el Procedimiento de Estudio Crónico evalúa la capacidad de las sustancias de prueba para evitar o retrasar la elevación de la presión sanguínea durante la fase de desarrollo de hipertensión de DOCA-sal. Por lo tanto, se supervisará la presión sanguínea en el procedimiento de estudio crónico por medio de un radiotransmisor. El radiotransmisor se implanta quirúrgicamente dentro de la aorta abdominal de las ratas, antes del inicio de tratamiento con DOCA-sal y así, antes de la inducción de la hipertensión. La presión sanguínea se monitorea crónicamente durante periodos de hasta 6 semanas (aproximadamente una semana antes de la administración de DOCA-sal y durante 5 semanas después).

10 Las ratas se anestesian con inhalación de 2-3% de isoflurano en oxígeno seguido por Amytal sódico (amobarbital) 100 mg/kg, ip. El nivel de anestesia se evalúa mediante un patrón de respiración rítmica constante.

Procedimiento de estudio agudo:

15 Las ratas experimentan nefrectomía unilateral al momento del implante de DOCA. El pelo se sujeta sobre el flanco izquierdo y la parte trasera del cuello y se lava con hisopos de alcohol estériles y povidona/yodo. Durante la cirugía las ratas se colocan en una almohadilla de calentamiento para mantener la temperatura corporal 37° C.

20 Se hace una incisión de 20 mm a través de la piel y el músculo subyacente para exponer el riñón izquierdo. El riñón se libera del tejido circundante, se exterioriza y se atan de forma segura dos ligaduras (seda 3-0) alrededor de la arteria renal y la vena proximal en su unión con la aorta. Luego se corta la vena y la arteria renal y se retiran del riñón. Las heridas del músculo y la piel se cierran con sutura de seda 4-0 y clips para herida en acero inoxidable, respectivamente. Al mismo tiempo, se hace una incisión de 15 mm en la parte trasera del cuello y se implanta subcutáneamente un glóbulo de liberación de 3 semanas (Innovative Research of America, Sarasota, Florida) que contiene acetato de desoxicorticosterona (100 mg/kg). Luego se cierra la herida con clips en acero inoxidable y ambas heridas se tratan con povidona/yodo, a las ratas se les da una inyección intramuscular post-quirúrgica de penicilina G procaína (100,000 U) y buprenorfina (0.05 - 0.1 mg/kg) s.c. A las ratas se les coloca inmediatamente en 25 1% de NaCl + 0.2% de KCl en el agua potable; este tratamiento continúa durante por lo menos 3 semanas en cuyo tiempo los animales se han vuelto hipertensos y están disponibles para experimentación.

30 Cuarenta y ocho horas antes de experimentación, los animales se anestesian con isoflurano y se implantan catéteres en la arteria femoral y la vena para medir la presión arterial, recolección de sangre, y la administración de los compuestos de prueba. Las ratas se dejan recuperar durante 48 horas mientras se mantienen en una jaula de Plexiglas, que también sirve como la cámara experimental.

Procedimiento de estudio crónico:

35 Este procedimiento es igual que el anterior excepto que a las ratas se les implanta un radiotransmisor, 7-10 días antes de la nefrectomía unilateral y el inicio de DOCA y sal. Adicionalmente, las ratas no experimentan cirugía para la colocación de los catéteres venosos y arteriofemorales. Los radiotransmisores se implantan como se describe en M.K. Bazil, C. Krulan y R.L. Webb., Telemetric monitoring of cardiovascular parameters in conscious spontaneously hypertensive rats, J.Cardiovasc. Pharmacol. 22: 897-905, 1993.

40 Los protocolos luego se configuran en el ordenador para la medición de la presión sanguínea, índice cardiaco, etc., en puntos de tiempo predeterminados. Se recolectan datos de valores iniciales en diversos puntos de tiempo y durante diversos intervalos de tiempo. Por ejemplo, los valores pre-dosis o los valores iniciales consisten usualmente de recolección de datos y promedio durante 3 periodos de 24 horas, consecutivos, antes de la administración del fármaco.

45 La presión sanguínea, la frecuencia cardiaca y la actividad se determinan en diversos puntos de tiempo pre-seleccionados antes, durante, y después de la administración del fármaco. Todas las mediciones se desarrollan en animales sin restricciones ni alteraciones. El tiempo máximo de estudio, determinado por la vida de la batería, puede ser de hasta nueve meses.

50 Adicionalmente, se utilizan SHR para estudiar los efectos de alisquireno en combinación con amlodipina y HCTZ. El antecedente de hipertensión del SHR se modifica mediante carga crónica de sal en un esfuerzo para suprimir el sistema de angiotensina de renina (RAS) o el agotamiento de sal crónica para activar el RAS en el SHR. Estas manipulaciones se pueden llevar a cabo para evaluar más extensamente la eficacia de las diversas sustancias de prueba. Para experimentos realizados en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), esos animales se suministran por Taconic Farms, Germantown, New York (Tac:N(SHR)fBR). Se implanta un dispositivo radiotelemétrico (Data Sciences International, Inc., St. Paul, Minnesota) en una aorta abdominal inferior de todos los animales de prueba entre edades de 14 a 16 semanas. Todos los SHR se les permiten recuperar del procedimiento de implantación quirúrgica durante por lo menos 2 semanas antes del inicio de los experimentos. Los parámetros cardiovasculares se supervisan continuamente por medio del radiotransmisor y se transmiten a un receptor en donde la señal digitalizada luego se recolecta y se almacena utilizando un sistema de adquisición de datos computarizado. La presión sanguínea (presión arterial media, sistólica y diastólica) y la frecuencia cardiaca se supervisan en estado de 55

- conciencia, de movimiento libre y SHR no interrumpido en sus jaulas. La presión sanguínea arterial y la frecuencia cardiaca se miden cada 10 minutos durante 10 segundos y se registran. Los datos reportados para cada rata representan los valores medios promediados durante un periodo de 24 horas y se hacen de muestras recolectadas hasta de 144-10 minutos cada día. Los valores iniciales para la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca consisten del promedio de tres lecturas consecutivas de 24 horas tomadas antes del inicio de los tratamientos de fármacos. Todas las ratas se alojan individualmente en una sala con temperatura y humedad controlada y se mantienen en un ciclo de oscuridad luz de 12 horas.
- Además de los parámetros cardiovasculares, también se registran las determinaciones semanales del peso corporal en todas las ratas. Los tratamientos se administran en el agua potable, por medio de alimentación forzosa oral diaria o en minibombas osmóticas como se indicó anteriormente. Si se da en el agua potable, se mide el consumo de agua cinco veces por semana. Las dosis de los fármacos para cada rata luego se calculan con base en el consumo de agua para cada rata, la concentración de la sustancia de fármaco en el agua potable, y los pesos corporales individuales. Todas las soluciones de fármaco en el agua potable se refrescan cada tres a cuatro días.
- Luego de la terminación de los estudios crónicos, las ratas de SHR o DOCA-sal se anestesian y se retira rápidamente el corazón. Después de la separación y la remoción de los apéndices auriculares, se pesan y se registran el ventrículo izquierdo y el ventrículo derecho más el ventrículo izquierdo (total). La masa ventricular izquierda y la masa ventricular total luego se normalizan al peso corporal y se reportan. Todos los valores reportados para la presión sanguínea y la masa cardiaca representan la media del grupo  $\pm$  eem.
- Se evalúan la función vascular y la estructura después de tratamiento para evaluar los efectos beneficiosos de la combinación. Se estudian los SHR de acuerdo con los métodos descritos por Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL, *Circulation* 1999, 100 (22): 2267-2275. De forma similar, la metodología para evaluar la función vascular en ratas con DOCA-sal se describe en Intengan HD, Park JB, Schiffrin, EL, *Hypertension*, 1999, 34 (4 Parte 2): 907-913.
- La eficacia del fármaco para inhibir la enfermedad renal diabética se evalúa en diversos modelos de animal que incluyen ratones espontáneamente diabéticos (db/db) (Ziyadeh F, Hoffman B, Han D, Iglesias-de la Cruz M, Hong S, Isono M, Chen S, McGowan T, Sharma K. La prevención a largo plazo de la insuficiencia renal, el exceso de expresión de gen de matriz, y la expansión de la matriz mesangial glomerular mediante tratamiento con el anticuerpo de factor B de crecimiento anti-transformante monoclonal en ratones diabéticos db/db. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97:8015-8020). El ratón db/db es un modelo ampliamente utilizado para las lesiones glomerulares renales vistas en diabetes no dependiente de insulina (diabetes tipo 2). Los ratones se tratan diariamente con vehículo, monoterapia o terapia de combinación. Cada 2 semanas a lo largo del estudio se recolecta la orina para medir la excreción de albúmina urinaria. Al final del experimento se recolecta la sangre para determinar los niveles de creatinina en plasma. Los riñones se preservan in situ mediante fijación por perfusión, se retiran y se evalúa la patología renal cuantitativamente mediante microscopía de luz y análisis de imagen. La eficacia del fármaco se define mediante la reducción (vs controles de vehículo) de (i) excreción de albúmina urinaria, (ii) creatinina en plasma, y mediante (iii) la inhibición de la glomerulosclerosis renal.
- La eficacia del fármaco para inhibir la fibrosis renal se evalúa en diversos modelos de animal que incluyen el modelo de obstrucción de la uretra unilateral en ratas (Ishidoya, S; Morrissey, J; McCracken, R; Reyes, A; Klahr, S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kid Int*. 47:1285-1294, 1995). Este modelo implica ligar un uréter, lo que resulta en fibrosis renal luego de 5 días en el riñón drenado por ese uréter. Se evalúa la eficacia del fármaco al cuantificar con microscopía de luz y análisis de imagen, el grado de fibrosis renal entre los grupos tratados. Los inhibidores ACE y los bloqueadores del receptor AT1 inhiben la fibrosis renal en este modelo (Klar, S; Ishidoya, S; Morrissey, J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Amer J Kid Dis*. 26:141-146, 1995). Por lo tanto se puede demostrar que la terapia de combinación con alisquireno, amlodipina, y HCTZ proporciona protección incrementada vs monoterapia.
- Una cantidad terapéuticamente efectiva de cada uno de los componentes de la combinación de la presente invención se puede administrar separadamente, simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden. La forma de dosis unitaria también puede ser una combinación fija.
- El ingrediente activo correspondiente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo también se puede utilizar en forma de un hidrato o incluye otros solventes utilizados para cristalización.
- Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden preparar en una forma conocida per se y son aquellas adecuadas para administración entérica, tal como oral o rectal, y parenteral a los mamíferos (animales de sangre caliente), que incluye hombres, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto farmacológicamente activo, sola o en combinación con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, especialmente adecuados para aplicación entérica o parenteral. Las formulaciones orales típicas incluyen comprimidos, cápsulas, jarabes, elíxires y suspensiones. Las formulaciones inyectables típicas incluyen soluciones y suspensiones.

- La invención también se relaciona con la combinación de las composiciones farmacéuticas separadas en forma de equipo. Es decir un equipo que combina dos o tres unidades separadas, por ejemplo una composición farmacéutica alisquireno, una composición farmacéutica amlodipina, y una composición farmacéutica HCTZ, o en el caso de dos unidades separadas un equipo combina una composición farmacéutica de dos de los agentes activos y una composición farmacéutica del ingrediente activo restante. La forma de equipo es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se pueden administrar en diferentes formas de dosificación (por ejemplo formulación parenteral alisquireno y amlodipina oral y las formulaciones HCTZ) o se administran en diferentes intervalos de dosificación.
- En una realización preferida, el producto (comercial) es un paquete comercial que comprende como ingredientes activos la combinación de acuerdo con la presente invención (en la forma de dos o tres unidades separadas de los componentes (i) a (iii)), junto con instrucciones para su uso simultáneo, separado o secuencial, o cualquier combinación de los mismos, en el retraso de la progresión o el tratamiento de las enfermedades mencionadas aquí.
- Estas preparaciones farmacéuticas son para administración entérica, tal como oral, y también rectal o parenteral, a homeotermos, con las preparaciones que comprenden el compuesto farmacológicamente activo solo o junto con las sustancias auxiliares farmacéuticas habituales. Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas consisten de aproximadamente 0.1 % a 90 %, preferiblemente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 80 %, de los compuestos activos. Las preparaciones farmacéuticas para administración entérica o parenteral están, por ejemplo, en formas de dosis unitarias, tal como comprimidos recubiertos, comprimidos, cápsulas o supositorios y también ampollas. Estos se preparan en una forma que se conoce per se, por ejemplo utilizando procesos de mezcla convencional, granulación, recubrimiento, solubilización o liofilización. Así, las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener al combinar los compuestos activos con excipientes sólidos, si se desea granular una mezcla que se ha obtenido, y, si se requiere o si es necesario, procesar la mezcla o el granulado en comprimidos o núcleos de comprimido recubiertos después de haber agregado sustancias auxiliares adecuadas.
- La dosificación del compuesto activo puede depender de una variedad de factores, tal como el modo de administración, especies homeotérmicas, edad y/o afección individual.
- Las dosificaciones preferidas para los ingredientes activos de la combinación farmacéutica de acuerdo con la presente invención son dosificaciones terapéuticamente efectivas, especialmente aquellas que están disponibles comercialmente.
- Alisquireno se suministra en una forma unitaria de dosificación adecuada, por ejemplo, una cápsula o comprimido, y que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,000 mg, preferiblemente de aproximadamente 150 a aproximadamente 500 mg, de alisquireno que se puede aplicar a los pacientes. Preferiblemente, se aplica alisquireno una vez al día.
- En el caso amlodipina, las formas unitarias de dosificación preferidas son, por ejemplo, comprimidos o cápsulas que comprenden por ejemplo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 40 mg, preferiblemente 2.5 a 20 mg diariamente cuando se administra oralmente. En el caso de HCTZ, las formas unitarias de dosificación preferidas son, por ejemplo, comprimidos o cápsulas que comprenden por ejemplo de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 200 mg, preferiblemente de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg, administradas oralmente una vez al día. Las dosis anteriores abarcan una cantidad terapéuticamente efectiva de los ingredientes activos de la presente invención.
- Un ejemplo de una composición preferida comprende una cantidad de Alisquireno entre 140 y 220 mg por ejemplo 160 mg, una cantidad de amlodipina entre 2 y 12 mg (por ejemplo 2.5 o 5 o 10 mg) y una cantidad de HCTZ entre 5 y 30 mg, preferiblemente entre 5 y 15 (por ejemplo 12.5 o 6.25 mg).
- Otro ejemplo de una composición preferida comprende una cantidad de Alisquireno entre 350 y 550 mg por ejemplo 450 mg, una cantidad de amlodipina entre 2 y 12 mg (por ejemplo 2.5 o 5 o 10 mg) y una cantidad de HCTZ entre 5 y 30 mg preferiblemente entre 10 y 30 (por ejemplo 12.5 mg o 25 mg).
- Otro ejemplo de una composición preferida comprende una cantidad de Alisquireno entre 550 y 700 mg por ejemplo 640 mg, una cantidad de amlodipina entre 2 y 12 mg (por ejemplo 2.5 o 5 o 10 mg) y una cantidad de HCTZ entre 5 y 30 mg preferiblemente entre 10 y 30 (por ejemplo 12.5 mg o 25 mg).

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica que comprende
  - (i) alisquireno,
  - 5 (ii) amlodipina, y
  - (iii) hidroclorotiazida

o, cuando sea apropiado, en cada caso una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 10 2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que contiene alisquireno en una cantidad en el rango de 1 a 1,000 mg, amlodipina en una cantidad en el rango de 1 a 40 mg, y hidroclorotiazida en una cantidad en el rango de 5 a 200 mg.
3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 que contiene alisquireno en una cantidad en el rango de 140 a 550 mg, amlodipina en una cantidad en el rango de 2 a 12 mg, y hidroclorotiazida en una cantidad en el rango de 5 a 30 mg.
- 15 4. Una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en el tratamiento de una afección o enfermedad seleccionada del grupo que consiste de hipertensión, falla cardíaca tal como falla cardíaca congestiva (aguda y crónica), disfunción del ventrículo izquierdo y cardiomiopatía hipertrófica, miopatía cardíaca diabética, arritmias supraventricular y ventricular, fibrilación auricular, flúter auricular, remodelamiento vascular perjudicial, infarto del miocardio y sus secuelas, aterosclerosis, angina (si es estable o inestable), insuficiencia renal (diabética y no diabética), falla cardíaca, angina de pecho, diabetes, aldosteronismo secundario, hipertensión pulmonar primaria y secundaria, hipertensión pulmonar primaria y secundaria, tal como nefropatía diabética, glomerulonefritis (que incluye nefropatía IgA), fibrosis renal, escleroderma, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal, y también hipertensión vascular renal, retinopatía diabética, el manejo de otros trastornos vasculares, tal como migraña, enfermedad vascular periférica, enfermedad de Raynaud, hiperplasia luminal, disfunción cognitiva (tal como Alzheimer), glaucoma y apoplejía, fibrosis hepática y pulmonar, enfermedades fibróticas que resultan de la acumulación de exceso de matriz extracelular inducida por TGF, y enfermedades proliferativas de células de músculo liso, que incluye fibroides uterinos.
- 20 25
5. El uso de una combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección o enfermedad seleccionada del grupo que consiste de hipertensión, falla cardíaca tal como falla cardíaca congestiva (aguda y crónica), disfunción del ventrículo izquierdo y cardiomiopatía hipertrófica, miopatía cardíaca diabética, arritmias supraventricular y ventricular, fibrilación auricular, flúter auricular, remodelamiento vascular perjudicial, infarto del miocardio y sus secuelas, aterosclerosis, angina (si es estable o inestable), insuficiencia renal (diabética y no diabética), falla cardíaca, angina de pecho, diabetes, aldosteronismo secundario, hipertensión pulmonar primaria y secundaria, afecciones de falla renal, tal como nefropatía diabética, glomerulonefritis (que incluye nefropatía IgA), fibrosis renal, escleroderma, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal, y también hipertensión vascular renal, retinopatía diabética, el manejo de otros trastornos vasculares, tal como migraña, enfermedad vascular periférica, enfermedad de Raynaud, hiperplasia luminal, disfunción cognitiva (tal como Alzheimer), glaucoma y apoplejía, fibrosis hepática y pulmonar, enfermedades fibróticas que resultan de la acumulación de exceso de matriz extracelular inducida por TGF, y enfermedades proliferativas de células de músculo liso, que incluye fibroides uterinos.
- 30 35
6. Un paquete comercial que comprende
  - (i) alisquireno o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
  - (ii) amlodipina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
  - (iii) hidroclorotiazida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la forma de dos o tres unidades separadas de los componentes (i) a (iii), junto con instrucciones para uso simultáneo, separado o secuencial de la misma en el retraso de la progresión o el tratamiento de una afección o enfermedad seleccionada del grupo que consiste de hipertensión, falla cardíaca tal como falla cardíaca congestiva (aguda y crónica), disfunción del ventrículo izquierdo y cardiomiopatía hipertrófica, miopatía cardíaca diabética, arritmias supraventricular y ventricular, fibrilación auricular, flúter auricular, remodelamiento vascular perjudicial, infarto del miocardio y sus secuelas, aterosclerosis, angina (si es estable o inestable), insuficiencia renal (diabética y no diabética), falla cardíaca, angina de pecho, diabetes, aldosteronismo secundario, hipertensión pulmonar primaria y secundaria, afecciones de falla renal, tal como nefropatía diabética, glomerulonefritis (que incluye nefropatía IgA), fibrosis renal, escleroderma, esclerosis glomerular, proteinuria de enfermedad renal, y también hipertensión vascular renal, retinopatía diabética, el manejo de otros trastornos vasculares, tal como migraña, enfermedad vascular
- 40 45 50

periférica, enfermedad de Raynaud, hiperplasia luminal, disfunción cognitiva (tal como Alzheimer), glaucoma y apoplejía, fibrosis hepática y pulmonar, enfermedades fibróticas que resultan de la acumulación de exceso de matriz extracelular inducida por TGF, y enfermedades proliferativas de células de músculo liso, que incluye fibroides uterinos.

- 5 7. Un equipo de partes que comprende
- (i) una composición farmacéutica de alisquireno o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,
  - (ii) una composición farmacéutica de amlodipina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y
  - (iii) una composición farmacéutica de hidroclorotiazida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma
- en la forma de dos o tres unidades separadas de los componentes (i) a (iii).
- 10 8. Un equipo de partes de acuerdo con la reivindicación 7, en donde alisquireno está en una cantidad en el rango de 1 a 1,000 mg, amlodipina en una cantidad en el rango de 1 a 40 mg, y hidroclorotiazida en una cantidad en el rango de 5 a 200 mg.
- 15 9. Un equipo de partes de acuerdo con la reivindicación 7, en donde alisquireno está en una cantidad en el rango de 140 a 550 mg, amlodipina en una cantidad en el rango de 2 a 12 mg, y hidroclorotiazida en una cantidad en el rango de 5 a 30 mg.