

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 823**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 31/661** (2006.01)

**A61K 31/688** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2007** **E 07719817 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013** **EP 2026829**

54 Título: **Compuesto para uso en el tratamiento de estenosis valvular**

30 Prioridad:

**01.06.2006 US 809850 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.05.2013**

73 Titular/es:

**INSTITUT DE CARDIOLOGIE DE MONTREAL  
(100.0%)  
5000 RUE BELANGER EST  
MONTREAL QC H1T 1C8, CA**

72 Inventor/es:

**TARDIF, JEAN-CLAUDE**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 402 823 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

Compuesto para uso en el tratamiento de estenosis valvular

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere al campo genérico de los compuestos médicos para uso en el tratamiento de enfermedades valvulares.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] La función del corazón es suministrar la energía requerida para la circulación de la sangre en el sistema cardiovascular. El flujo de sangre a través de todos los órganos es pasivo y ocurre solo porque la presión arterial se mantiene más alta que la presión venosa por la acción de bombeo del corazón. La bomba del corazón derecho proporciona la energía necesaria para mover la sangre a través de los vasos pulmonares y la bomba del corazón izquierdo proporciona la energía que causa el flujo a través de los órganos sistémicos.

[0003] La sangre venosa vuelve de los órganos sistémicos a la aurícula derecha por las venas cavas superior e inferior. Pasa a través de la válvula tricúspide al ventrículo derecho y desde allí se bombea a través de la válvula pulmonar a la circulación pulmonar por las arterias pulmonares. La sangre venosa pulmonar oxigenada fluye por las venas pulmonares a la aurícula izquierda y pasa a través de la válvula mitral al ventrículo izquierdo. Desde allí, se bombea a través de la válvula aórtica a la aorta para distribuirse por los órganos sistémicos.

[0004] Por tanto, en su funcionamiento normal, el ventrículo izquierdo del corazón bombea sangre rica en oxígeno a las arterias de los vasos del cuerpo a través de la aorta. A medida que el corazón bombea, la válvula aórtica, que está localizada entre el ventrículo izquierdo y la aorta, se abre y se cierra para controlar la dirección del flujo sanguíneo. Más específicamente, durante el latido o sístole, la válvula aórtica se abre para permitir que la sangre fluya desde el ventrículo izquierdo a la aorta. Entre latidos, o durante la diástole, sin embargo, la válvula aórtica se cierra formando un sello estrecho que evita que la sangre escape de vuelta al ventrículo.

[0005] Las válvulas están diseñadas estructuralmente para permitir el flujo en solo una dirección y abrirse y cerrarse pasivamente en respuesta a la dirección de las diferencias de presión a su través. Típicamente, la válvula aórtica está compuesta por tres valvas o cúspides fibrosas. Las valvas se abren forzosamente contra las paredes de la aorta durante la eyección ventricular de sangre, pero vuelven a caer durante la diástole, coaptando sus bordes libres para evitar que la sangre vuelva al corazón.

[0006] La pared aórtica detrás de cada cúspide de la válvula aórtica sobresale hacia fuera, formando tres estructuras conocidas como senos de Valsalva. Las dos cúspides aórticas valvulares más anteriores son conocidas como las cúspides coronarias izquierda y derecha debido al origen de las arterias coronarias izquierda y derecha de los respectivos senos de Valsalva, y la cúspide valvular posterior es conocida como la cúspide no coronaria.

[0007] Por cualquiera de varias razones, puede suceder que la válvula aórtica esté algo dañada y pueda resultar estenósada. Cuando sucede esto, la válvula aórtica no se abre en su extensión normal y el flujo de sangre del corazón a la aorta se reduce. Esto conduce a una afección cardíaca que es conocida comúnmente como estenosis valvular aórtica.

[0008] Las etiologías comunes para estenosis valvular aórtica incluyen anomalía congénita, fiebre reumática o degeneración con calcificación en pacientes de edad. Una válvula bicúspide es la anomalía congénita más común, y a menudo un rafe en una de las cúspides indica fallo en el desarrollo de la comisura. Rara vez, puede estar presente una válvula unicúspide o cuadrícúspide de nacimiento. Aunque la válvula bicúspide puede no ser inicialmente estenótica, la fibrosis y engrosamiento conducen dado el caso a un tamaño de orificio reducido con calcificación. Es más, el estrés de cizalladura mecánica conduce típicamente a lesión por calcificación.

[0009] La fiebre reumática deja cicatriz en los bordes de la valva y, dado el caso, las comisuras se funden y calcifican. Se ha encontrado que más de un 50% de los adultos con estenosis aórtica tienen una válvula bicúspide, pero la fibrosis y calcificación pueden hacer difícil determinar si la válvula es bicúspide o tricúspide.

[0010] En el paciente de edad con estenosis valvular aórtica degenerativa, los depósitos de calcio se desarrollan habitualmente en los senos y anillo fibroso, mientras que los bordes de las valvas permanecen a menudo libres de calcificaciones.

[0011] Actualmente, hay muchas teorías propuestas para la fisiopatología celular de la estenosis valvular aórtica. Dichas teorías incluyen factores de riesgo cardiovasculares que inician una respuesta a lesión, estrés de cizalladura mecánica, fenómenos autoinmunitarios que causan degeneración, volumen sistólico elevado crónicamente y metabolismo del calcio alterado (tal como el encontrado en insuficiencia renal, enfermedad de Paget, etc.).

**[0012]** Independientemente de su etiología, la estenosis aórtica produce un aumento en la presión ventricular izquierda sistólica. La hipertensión sistólica en la cámara ventricular se compensa por una hipertrofia concéntrica de la pared miocárdica, permitiendo que el estrés de pared permanezca normal. El ventrículo izquierdo engrosado  
5 menos distendido se vuelve más dependiente de la contribución auricular al llenado diastólico, de tal modo que el funcionamiento ventricular izquierdo puede deteriorarse cuando se pierde contracción auricular, por ejemplo durante la fibrilación auricular o la disociación auricular-ventricular. La relajación anormal y rigidez aumentada del ventrículo izquierdo engrosado durante la diástole dan también como resultado disfunción diastólica y elevaciones de las presiones diastólicas ventricular izquierda y auricular izquierda.

10

**[0013]** Puede desarrollarse eventualmente infarto de miocardio a partir de una obstrucción valvular grave crónica y depresión del estado contráctil. Puede ocurrir también en algunos pacientes dilatación ventricular izquierda. El consumo de oxígeno del miocardio permanece alto debido a la elevación de la presión sistólica en el ventrículo izquierdo y al aumento de la masa ventricular izquierda. Además, la presión diastólica ventricular izquierda  
15 aumentada reduce el gradiente de presión necesario para la perfusión del miocardio. Por tanto, una estenosis aórtica significativa crea condiciones en que las demandas de oxígeno del miocardio están mantenidas inadecuadamente por un suministro de oxígeno reducido, que conduce a isquemia subendocárdica.

**[0014]** Dado el caso, con la reducción del estado inotrópico del miocardio, se reduce la fracción de eyección por debajo del intervalo normal (con o sin dilatación del ventrículo izquierdo asociada). Una elevación adicional de la presión diastólica final ventricular izquierda (consecuencia de disfunción diastólica con o sin disfunción sistólica) da como resultado una hipertensión venosa pulmonar. La demanda aumentada de oxígeno del miocardio en estenosis aórtica con el miocardio subendocárdico subperfundido puede producir angina de pecho, arritmias e incluso muerte súbita.

25

**[0015]** El desarrollo de cualquiera de los síntomas esenciales del entorno de estenosis aórtica grave indica un riesgo de mortalidad sustancial y es indicativo de terapia quirúrgica. La esperanza de vida media después del inicio de los síntomas es de 2-3 años, menos si los síntomas son debidos a insuficiencia cardiaca. Debido a que los síntomas, y quizás la muerte súbita, acompañan a menudo al ejercicio físico, deberían evitarse actividades vigorosas  
30 y deportes competitivos por pacientes con estenosis aórtica, incluso si es solo de gravedad leve a moderada. Por tanto, la estenosis aórtica está asociada no solo con una alta mortalidad sino también con una morbilidad sustancial.

**[0016]** La estenosis aórtica calcificada da cuenta de un gran porcentaje de casos de estenosis aórtica. La afección se caracteriza por la acumulación de nódulos calcificados en la superficie de arriba o superior de las valvas de la válvula aórtica. Estos nódulos reducen la flexibilidad de las valvas, limitando así su movilidad y capacidad de abrirse totalmente.

35

**[0017]** Se han empleado tres técnicas para corregir la estenosis aórtica, a saber, reemplazo de válvula, descalcificación intraoperativa o desbridamiento de la válvula cardiaca y valvuloplastia de globo.

40

**[0018]** El reemplazo de válvula, durante una cirugía a corazón abierto, es actualmente la terapia estándar para estenosis aórtica sintomática. Las tasas de supervivencia a 10 años para el reemplazo de válvula aórtica aislada son relativamente buenas, incluso en pacientes ancianos. Sin embargo, esta técnica requiere que el paciente esté suficientemente sano para experimentar esternotomía (apertura del pecho) y cirugía a corazón abierto. La mortalidad  
45 operativa para este procedimiento, particularmente en ancianos, es relativamente alta.

**[0019]** Hay dos tipos de válvulas cardiacas protésicas, a saber, válvulas mecánicas que están compuestas solo por materiales que no derivan de organismos vivos y válvulas bioprotésicas que están compuestas total o parcialmente por material biológico. Las válvulas mecánicas actualmente en uso tienen una construcción de jaula de  
50 bolas, una construcción de disco oblicuo (1 o 2 discos) o una construcción de valva con bisagra.

**[0020]** Las válvulas bioprotésicas comprenden generalmente una endoprótesis de soporte y una pluralidad de valvas. Las valvas están compuestas generalmente por material biológico, mientras que la endoprótesis, cuando está presente, comprende generalmente material no biológico, al menos en parte. El material biológico de las valvas  
55 puede ser de tejidos autólogos tales como pericardio, aponeurosis femoral o válvulas cardiacas. Como alternativa, este material puede derivar de tejido homólogo tal como tejido humano no autólogo para implante humano o puede ser xenogénico.

**[0021]** Cada tipo de válvula cardiaca protésica tiene ventajas y desventajas. Las válvulas cardiacas mecánicas son duraderas y, por tanto, más probable que den como resultado un funcionamiento de larga duración, pero requieren una cuidadosa anticoagulación crónica debido al riesgo tromboembólico. La terapia de anticoagulación crónica, sin embargo, conlleva un riesgo de hemorragia similar en incidencia al riesgo residual de eventos trombóticos.

60

**[0022]** Las válvulas bioprotésicas inicialmente se aproximan a las propiedades hemodinámicas de la válvula natural. Tienen un menor riesgo de complicaciones como consecuencia de trombos que las válvulas mecánicas. Sin

65

embargo, dichas válvulas pueden tener un riesgo significativamente mayor de calcificación que las válvulas mecánicas. Puesto que el tratamiento de una válvula cardíaca bioprotésica funcionalmente comprometida requiere frecuentemente el reemplazo por una nueva válvula (y por tanto una segunda cirugía a corazón abierto), las limitaciones sobre la esperanza de vida útil de una válvula bioprotésica son tanto un grave problema médico para el  
5 paciente como un sumidero financiero para el sistema médico.

**[0023]** Además, todas las válvulas cardíacas protésicas son algo estenóticas. La disfunción protésica como consecuencia de trombosis o calcificación puede conducir a una obstrucción aumentada o al desarrollo de insuficiencia valvular. La insuficiencia valvular puede dar como resultado también un escape perivalvular, es decir un  
10 escape en el área del anillo de sutura de la válvula. La turbulencia asociada a la disfunción valvular puede causar hemólisis y anemia. Incluso las válvulas protésicas de funcionamiento normal pueden causar hemólisis en algunos pacientes.

**[0024]** La endocarditis es otra complicación potencial e importante en pacientes con válvulas cardíacas protésicas. Ha de administrarse profilaxis antibiótica antes de cirugía dental, gastrointestinal, genitourinaria y otros  
15 procedimientos asociados a la bacteremia.

**[0025]** Además, algunos pacientes tienen dimensiones aórticas que no son suficientemente grandes para acomodar fácilmente válvulas de reemplazo convencionales. Por tanto, existe un número significativo de pacientes  
20 para los que el reemplazo de válvula es imposible, impracticable o indeseable.

**[0026]** El desbridamiento o descalcificación mecánicos intraoperativos de la válvula aórtica se han usado durante muchos años antes de la llegada de las válvulas de reemplazo mecánicas. En esta técnica, se entra quirúrgicamente en la aorta pero, en lugar de reemplazar la válvula manualmente, el cirujano retira los depósitos  
25 calcificados usando herramientas quirúrgicas adecuadas. Recientemente, se ha demostrado que el desbridamiento ultrasónico es también eficaz para retirar depósitos calcificados. No obstante, esta técnica sigue requiriendo que el paciente esté suficientemente sano para sobrevivir a y recuperarse de la cirugía torácica, e implica todos los costes y riesgos que acompañan a dicha cirugía.

**[0027]** Una tercera técnica para corregir la estenosis aórtica implica la valvuloplastia aórtica por globo percutáneo. En este procedimiento, se inserta un catéter de globo inflable en la válvula aórtica y se infla para comprimir y fracturar los nódulos calcificados en un intento de aumentar la movilidad de las valvas. Aunque este procedimiento elimina muchos de los riesgos y desventajas acompañantes de las dos técnicas precedentes, la reestenosis es muy común al cabo de un año, limitando la utilidad de la técnica a mitigar temporalmente los  
30 síntomas para aquellos pacientes que son malos candidatos quirúrgicos o rechazan la cirugía.

**[0028]** Por tanto, sigue existiendo la necesidad de un tratamiento no quirúrgico de estenosis valvular aórtica y otras enfermedades valvulares.

**[0029]** La presente invención difiere significativamente de la técnica anterior y las tendencias actuales al proporcionar un procedimiento para no solo evitar la progresión de la estenosis aórtica, sino también para reducir el grado de estenosis usando un agonista de transporte lipídico inverso.

**[0030]** Es por lo tanto un objetivo de la presente invención proporcionar un tratamiento no quirúrgico novedoso  
45 de enfermedades valvulares.

### **Resumen de la invención**

**[0031]** La invención proporciona un complejo de péptido mimético de apoA-I/fosfolípido para uso en la  
50 prevención, tratamiento, control o reversión de estenosis valvular en un sujeto, en el que dicho péptido tiene la secuencia expuesta como SEQ ID NO: 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

**[0032]** En algunas realizaciones de la invención, la estenosis valvular es una estenosis valvular aórtica o una estenosis valvular calcificada.

**[0033]** En este último caso, administrar un complejo de péptido mimético de ApoA-I/fosfolípido puede incluir  
55 inyectar el complejo de péptido mimético de ApoA-I/fosfolípido al sujeto. Son ejemplos de dosificaciones en este caso de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 g por kg de peso corporal del sujeto, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 0,5 g por kg de peso corporal del sujeto y de aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal del sujeto.

**[0034]** En algunas realizaciones, el péptido mimético de ApoA-I se compleja con esfingomielina de huevo y/o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC).

**[0035]** En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, por ejemplo un ser humano.

**[0036]** Ventajosamente, el procedimiento propuesto reemplaza los tratamientos relativamente invasivos o relativamente ineficaces existentes para enfermedades valvulares. También, además de retardar la progresión de enfermedades valvulares, el procedimiento propuesto revierte también la estenosis valvular. Por consiguiente, el tratamiento propuesto no solo tiene el potencial de retardar o detener la progresión de estenosis valvular aórtica y otras enfermedades valvulares, sino que también causa la regresión de estenosis valvular aórtica y otras enfermedades valvulares.

**[0037]** La estenosis valvular aórtica (EVA) es la enfermedad cardíaca valvular más común, y la terapia curativa estándar sigue siendo el reemplazo quirúrgico de válvula a corazón abierto. Para determinar si los agonistas de transporte lipídico inverso tienen potencial para prevenir o tratar la EVA, se ensayaron infusiones de péptido mimético de ApoA-I para determinar si podían inducir la regresión de EVA. Con este fin, 15 conejos blancos macho de Nueva Zelanda recibieron una dieta enriquecida en colesterol y vitamina D2 hasta que se detectó una EVA significativa por ecocardiografía. Se asignaron entonces aleatoriamente los animales para recibir disolución salina (grupo de control, n= 8) o péptido mimético de ApoA-I (grupo tratado, n= 7) 3 veces por semana durante 2 semanas. Se efectuaron ecocardiogramas en serie e histología valvular *post mortem*. El área valvular aórtica mejoró significativamente en el grupo tratado en comparación con los controles después de 7 ( $21,9 \pm 3,6 \text{ mm}^2$  frente a  $19,6 \pm 1,8 \text{ mm}^2$ ,  $P= 0,019$ ) (aumentos de 14,2% y 3,9%), 10 ( $23,0 \pm 64,1 \text{ mm}^2$  frente a  $20,3 \pm 2,4 \text{ mm}^2$ ,  $P= 0,006$ ) (19,8% frente a 7,6%) y 14 días de tratamiento ( $23,8 \pm 3,1 \text{ mm}^2$  frente a  $21,3 \pm 2,4 \text{ mm}^2$ ,  $P= 0,012$ ) (24,6% frente a 12,9%). El grosor valvular aórtico se redujo un 21% al cabo de 14 días de tratamiento en el grupo tratado ( $0,094 \pm 0,034 \text{ cm}$  frente a  $0,075 \pm 0,033 \text{ cm}$ ), mientras que no cambió en los controles ( $P= 0,0006$ ). La extensión de la lesión en la base de las valvas valvulares y senos de Valsalva era menor en el grupo tratado en comparación con el de control ( $52,8 \pm 12,5\%$  frente a  $66,7 \pm 9,9\%$ ,  $P= 0,032$ ). Se observó también una fuerte tendencia hacia áreas de calcificación reducidas ( $1,6 \pm 2,0\%$  frente a  $6,9 \pm 6,7\%$ ,  $P= 0,063$ ). Por lo tanto, las infusiones de péptido mimético de ApoA-I conducen a la regresión de EVA experimental.

25

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

**[0038]** En los dibujos adjuntos:

**[0039]** La Figura 1 muestra los valores de área valvular aórtica obtenidos mediante medidas ecocardiográficas obtenidas durante el periodo de tratamiento con péptido mimético de ApoA-I. El día "0" corresponde al final de la dieta de colesterol más vitamina D2 y el comienzo del periodo de tratamiento con péptido mimético de ApoA-I,  $*P \leq 0,05$ ;  $**P \leq 0,01$ . (b), valores de grosor valvular aórtico,  $***P \leq 0,001$ ;

**[0040]** La Figura 2 muestra los valores de grosor valvular aórtico obtenidos mediante medidas ecocardiográficas durante el periodo de tratamiento con péptido mimético de ApoA-I. El día "0" corresponde al final de la dieta con colesterol más vitamina D2 y el inicio del tratamiento con péptido mimético de ApoA-I,  $*P \leq 0,05$ ;  $**P \leq 0,01$ ,  $***P \leq 0,001$ ;

**[0041]** la Figura 3 muestra una comparación del porcentaje de área de lesión (AL) en la región de análisis (RDA) en válvulas aórticas de grupos de control y tratados,  $*P= 0,032$ ;

**[0042]** la Figura 4 muestra la correlación entre el área valvular aórtica (AVA) y el porcentaje de área de lesión (AL) en la región de análisis (RDA) en válvulas aórticas de ambos grupos; y

45

**[0043]** la Figura 5 muestra la correlación entre el grosor valvular aórtico en la ecocardiografía y el porcentaje de área de calcificación en la área de senos de Valsalva en animales de ambos grupos. Obsérvese que un valor (cuadrado) de un animal de control está oculto detrás de dos triángulos en la parte inferior izquierda de la figura.

#### **Descripción detallada**

**[0044]** La presente descripción hace referencia a muchos documentos públicos cuyos contenidos se incorporan por la presente como referencia en su totalidad. Los datos histopatológicos, experimentales y clínicos sugieren que la estenosis valvular aórtica (EVA) calcificada es un proceso patológico activo con deposición de lipoproteína, inflamación y calcificación activa de valvas (1). Aunque hay algunas similitudes entre la EVA y la aterosclerosis, su fisiopatología y tratamientos difieren significativamente. En términos de fisiopatología, está presente una válvula aórtica bicúspide y contribuye a la enfermedad en aproximadamente la mitad de pacientes con EVA, mientras que la aterosclerosis no es debida a una anomalía estructural congénita. La enfermedad cardíaca reumática puede conducir también a EVA, mientras que no se ha ligado con aterosclerosis. La EVA calcificada en ancianos, el tipo más frecuente en los países occidentales, conduce a menudo a un reemplazo de válvula aórtica aislada sin necesidad de cirugía de derivación coronaria asociada. En términos de tratamientos médicos, las estatinas han mostrado ser protectoras en pacientes con enfermedad coronaria y detener la progresión o inducir la regresión de aterosclerosis (3); en contraposición, la progresión de la EVA no se evitó mediante una terapia intensiva con estatina en un ensayo clínico aleatorizado reciente (4). De forma similar, se ha mostrado que los inhibidores de enzima convertidora de angiotensina son cardioprotectores en varios ensayos clínicos a gran escala, pero no han conseguido frenar la progresión de EVA. En resumen, aterosclerosis y EVA son enfermedades distintas

que afectan a poblaciones de pacientes diferentes.

**[0045]** Existe una relación inversa entre los niveles plasmáticos de HDL-colesterol y la enfermedad arterial coronaria. Los estudios en animales con aterosclerosis experimental han demostrado que los complejos de ApoA-I  
5 Milano/fosfolípido movilizan rápidamente el colesterol y reducen así la carga de placas ateroscleróticas (5, 6). Además, dos estudios clínicos han sugerido que las infusiones de HDL reconstituido podrían inducir una rápida mejora de la aterosclerosis coronaria (7, 8). Se ha teorizado que una terapia basada en HDL puede inducir también la regresión de EVA. Si pudiera conseguirse esto con seguridad, el tratamiento clínico de EVA y su regresión pueden transformar nuestro enfoque clínico de esta enfermedad frecuente. La apolipoproteína A-I (ApoA-I) es un  
10 componente estructural de HDL que media muchos de sus efectos beneficiosos incluyendo el transporte de colesterol inverso potenciado (9). El péptido usado en este estudio es capaz de formar una hélice  $\alpha$  anfipática en presencia de lípidos, como es el caso de ApoA-I (10, 11). Por lo tanto, se ha ensayado la capacidad de este péptido mimético de ApoA-I, complejado con fosfolípidos que imitan HDL naciente, de inducir la regresión de EVA calcificada en un modelo de conejo anteriormente descrito (12).

15 **[0046]** Como es bien conocido, la función principal de las lipoproteínas en el plasma es transportar lípidos tales como colesterol y triglicéridos. Para el transporte en plasma, el colesterol, normalmente como ésteres de colesterol, y los triglicéridos se incluyen en partículas lipoproteicas en que forman un núcleo hidrófobo. El núcleo está rodeado por una cubierta superficial que contiene fosfolípidos, colesterol no esterificado y proteínas llamadas  
20 apolipoproteínas. Estas últimas son las responsables del transporte de lípidos y, además, algunas pueden interactuar con muchas de las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico. Hasta la fecha, se han identificado al menos 10 apolipoproteínas, a saber: A-1, A-2, A-4, B-48, B-100, C-I, C-II, C-III, D y E.

**[0047]** Se ha teorizado que una estrategia dirigida a aumentar la eficacia del mecanismo de transporte de  
25 lípidos inverso mediante el uso de un compuesto adecuado es un posible enfoque en el tratamiento de enfermedades valvulares. Existe también la posibilidad de que los depósitos calcificados pudieran retirarse, curando así eficazmente la estenosis valvular.

**[0048]** El compuesto usado para ensayar esta hipótesis, al que se hace referencia de aquí en adelante como  
30 compuesto A, es una lipoproteína que imita las propiedades biológicas de la apolipoproteína A-I (ApoA-I). Este tipo de compuestos, un mimético o agonista de ApoA-I, se describe con más detalle en la patente de EE.UU. nº 6.376.464 titulada "Lipid complexes of APO A-1 agonist compounds," expedida a Dasseux y col. el 23 de abril de 2002.

35 **[0049]** Brevemente, estos compuestos incluyen péptidos, o análogos de los mismos, que son capaces de formar hélices  $\alpha$  anfipáticas en presencia de lípidos y que imitan la actividad de ApoA-I. Se hace referencia a ellos por lo tanto como agonistas de ApoA-I. Los agonistas tienen como rasgo principal un péptido "nuclear" compuesto por 15 a 29 residuos aminoacídicos, preferiblemente 22 residuos aminoacídicos, o un análogo del mismo en el que al menos un ligamiento amida del péptido está reemplazado por una amida sustituida, un isómero de amida o un  
40 mimético de amida.

**[0050]** Estos agonistas de ApoA-I están basados, en parte, en el descubrimiento de que alterar ciertos  
residuos aminoacídicos en la secuencia primaria de la secuencia consenso de 22 unidades dada a conocer en Venkatachalapathi y col., 1991, Mol. Conformation and Biol. Interactions, Indian Acad. Sci. B: 585-596  
45 (PVLDEFREKLNEELEALKQKLLK; de aquí en adelante "polímero de consenso de 22 unidades de Segrest" o "polímero de consenso de 22 unidades"), que se creía que eran críticos para la actividad, proporcionan péptidos sintéticos que exhiben actividades que se acercan, o en algunas realizaciones incluso superan, la actividad de la ApoA-I nativa. Se ha descubierto que reemplazar tres residuos aminoacídicos cargados en el péptido de consenso de 22 unidades de Segrest (Glu-5, Lys-9 y Glu-13) por un residuo hidrófobo de Leu proporciona péptidos que imitan  
50 las propiedades estructurales y funcionales de ApoA-I en un grado sin precedentes en la materia.

**[0051]** El compuesto A comprende un péptido que tiene la secuencia:

**[0052]** H-Pro-Val-Leu-Asp-Leu-Phe-Arg-Glu-Leu-Leu-Asn-Glu-Leu-Leu-Glu-Ala-Leu-Lys-Gln-Lys-Leu-Lys-OH  
55 (SEQ ID NO: 1)

**[0053]** y se ha sintetizado por Polypeptide Laboratories (Torrance, CA, EE.UU.). La pureza valorada por  
cromatografía líquida de alta resolución y análisis de espectro de masas era mayor del 98%. Se complejó el péptido con esfingomielina de huevo y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) (Avanti Polar Lipids) (10) a una  
60 relación en peso 1:1:1 mezclando los componentes en disolución salina y efectuando múltiples ciclos de calentamiento y enfriamiento hasta que la disolución parecía perfectamente transparente. Se liofilizó la disolución que contenía los complejos en alícuotas para almacenamiento a largo plazo. Se reconstituyó la disolución reciente cada semana en condiciones estériles y se mantuvo a 4°C. Se ensayó en ratas la actividad biológica del complejo de poder movilizar colesterol y elevar el HDL-colesterol en sangre después de una inyección intravenosa del péptido  
65 (datos no mostrados).

**[0054]** Basándose en su actividad biológica y estructuras conocidas, se cree que otros compuestos tales como los compuestos presentados en la patente de EE.UU. nº 6.376.464 anteriormente mencionada mostrarán efectos similares al compuesto A.

5 **[0055]** El término “tratar” o “tratamiento” de un estado patológico, enfermedad, trastorno o afección incluye:

**[0056]** (1) prevenir o retardar la aparición de síntomas clínicos del estado patológico, enfermedad, trastorno o afección que se desarrollan en un sujeto que puede estar aquejado de o predispuesto al estado patológico, enfermedad, trastorno o afección pero que todavía no experimenta o exhibe síntomas clínicos o subclínicos del  
10 estado patológico, enfermedad, trastorno o afección;

**[0057]** (2) inhibir el estado patológico, enfermedad, trastorno o afección, concretamente, detener o reducir el desarrollo del estado patológico, enfermedad, trastorno o afección o de al menos un síntoma clínico o subclínico del mismo; o  
15

**[0058]** (3) aliviar el estado patológico, enfermedad, trastorno o afección, concretamente, causar la regresión del estado patológico, enfermedad, trastorno o afección o de al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos.

**[0059]** El beneficio de un sujeto que recibe tratamiento es estadísticamente significativo o al menos perceptible por el sujeto o el médico.  
20

**[0060]** El término “sujeto” incluye mamíferos (especialmente seres humanos) y otros animales tales como animales domésticos (por ejemplo, mascotas domésticas incluyendo gatos y perros) y animales no domésticos (tales como silvestres).  
25

**[0061]** Una “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para tratar un estado patológico, enfermedad, trastorno o afección, es suficiente para efectuar dicho tratamiento. La “cantidad terapéuticamente eficaz” variará dependiendo del compuesto, el estado patológico, enfermedad, trastorno o afección y su gravedad y la edad, peso, estado físico y sensibilidad del sujeto que recibe  
30 tratamiento.

**[0062]** Composiciones farmacéuticas

**[0063]** La composición farmacéutica de la presente invención comprende el compuesto de la presente invención (compuesto A) y un excipiente farmacéuticamente aceptable (tal como un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable). Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto A de la presente invención. El compuesto de la presente invención puede estar asociado con un excipiente farmacéuticamente aceptable (tal como un portador o diluyente) o estar diluido en un portador o encerrado en un portador, que puede estar en forma de una cápsula, saquito, papel u otro envase.  
40

**[0064]** Los ejemplos de portadores adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, disoluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, gelatina, lactosa, arcilla blanca, sacarosa, dextrina, carbonato de magnesio, azúcar, ciclodextrina, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, ácido esteárico o alquiléteres inferiores de celulosa, ácido silícico, ácidos grasos, aminas de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos y, ésteres de ácido graso de pentaeritritol, polioxietileno, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.  
45

**[0065]** El portador o diluyente puede incluir un material de liberación prolongada, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o mezclado con una cera.  
50

**[0066]** La composición farmacéutica puede incluir también uno o más agentes auxiliares, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, agentes edulcorantes o colorantes farmacéuticamente aceptables o cualquier combinación de los anteriores. La composición farmacéutica de la invención puede formularse para proporcionar una liberación  
55 rápida, prolongada o retardada del ingrediente activo después de la administración al sujeto empleando procedimientos conocidos en la materia.

**[0067]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, 20ª ed.,  
60 2003 (Lippincott Williams & Wilkins). Por ejemplo, el compuesto activo puede mezclarse con un portador o diluirse en un portador o encerrarse en un portador, que puede estar en forma de una ampolla, cápsula, saquito, papel u otro envase. Cuando el portador sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo, excipiente o medio para el compuesto activo. El compuesto activo puede adsorberse sobre un envase sólido granular, por ejemplo un saquito.

**[0068]** Las composiciones farmacéuticas pueden estar en formas convencionales, por ejemplo, cápsulas,  
65

comprimidos, aerosoles, disoluciones, suspensiones o productos para aplicación tópica.

**[0069]** La vía de administración puede ser cualquier vía que transporte eficazmente el compuesto activo de la invención al sitio de acción apropiado o deseado. Las vías de administración adecuadas incluyen, pero sin limitación, oral, nasal, pulmonar, bucal, subdérmica, intradérmica, transdérmica, parenteral, rectal, de liberación prolongada, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal, oftálmica (tal como con una disolución oftálmica) o tópica (tal como con una pomada tópica).

**[0070] Ejemplo**

**[0071]** Se ha desarrollado un modelo animal complejo de estenosis valvular aórtica en conejos. El modelo daba como resultado una estenosis valvular aórtica caracterizada por una calcificación similar a la observada en un entorno clínico en seres humanos.

**[0072] Procedimientos**

**[0073] Animales y experimentos**

**[0074]** Se usó un modelo animal adaptado del descrito por Drolet y col. (12). Se alimentaron 15 conejos blancos macho de Nueva Zelanda (2,7-3,0 kg, de 12-13 semanas de edad) con una dieta enriquecida con colesterol al 0,5% (Harlan, Indianapolis, Indiana) más vitamina D2 (50.000 UI al día; Sigma, Markham, Canadá) en el agua de bebida hasta que pudo detectarse por ecocardiografía una EVA significativa definida por una reducción  $\geq 10\%$  de la área de válvula aórtica (AVA) o de la relación de velocidades transvalvulares (V1/V2) (12,9  $\pm$  2,4 semanas).

**[0075]** Se devolvieron entonces los animales a una dieta estándar (sin vitamina D2) para imitar la reducción de colesterol y se asignaron aleatoriamente a recibir disolución salina (grupo de control, n=8) o péptido mimético de ApoA-I (grupo tratado, n=7). Se administraron a los conejos inyecciones por la vena marginal de la oreja de disolución salina o péptido mimético de ApoA-I (25 mg/kg) complejado con fosfolípidos (compuesto A) 3 veces por semana durante 2 semanas. Se efectuaron en serie ecocardiogramas (véanse los Procedimientos de ecocardiografía) cada 3 o 4 días a lo largo del periodo de tratamiento aleatorizado. Dos días después de su última infusión, los animales experimentaron un ecocardiograma final, se sacrificaron, y se recogieron las válvulas aórticas para análisis histológicos. Se obtuvieron muestras de sangre por la arteria de la oreja en la situación inicial, antes del tratamiento y antes del sacrificio. Se midieron los niveles de colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos y calcio con un sistema fotométrico de filtro automatizado (Dimension RxL Max, Dade Behring, IL).

**[0076]** Los cuidados y procedimientos animales cumplían con las directrices del Canadian Council on Animal Care y se aprobaron por el comité ético institucional para investigación animal.

**[0077] Ecocardiografía**

**[0078]** Se efectuaron estudios ecocardiográficos transtorácicos como en la situación inicial, semanalmente empezando a las 8 semanas de dieta hipercolesterolémica hasta que se desarrolló una EVA significativa, y entonces después de 4, 7, 10 y 14 días de tratamientos con péptido mimético de ApoA-I o control salino. Se llevaron a cabo los estudios con una sonda S12 usando un sistema ecocardiográfico estándar (Sonos 5500, Philips Medical Imaging, MA). Se usaron para sedación inyecciones intramusculares de ketamina (45 mg/kg) y midazolam (0,75 mg/kg).

**[0079]** Se registraron vistas del eje paraesternal largo y corto de la válvula aórtica para valorar la morfología de las valvas. Se midió el diámetro del tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI) en una vista del eje paraesternal largo ampliada y se calculó el área transversal de TSVI ( $AT_{TSVI}$ ) según  $AT_{TSVI} = \pi(D_{TSVI}/2)^2$ . Se obtuvieron la velocidad de TSVI (V1) y la integral de tiempo de la velocidad (ITV<sub>TSVI</sub>) con un análisis Doppler de onda pulsada muestreado proximal a la válvula aórtica en la vista apical de 5 cámaras. Se usó interrogación con Doppler de onda continua (OC) a través de la válvula aórtica para obtener la velocidad transvalvular máxima (V2) e ITV (ITV<sub>AO</sub>) en la misma vista. Se calculó la relación de V1/V2 en el periodo pretratamiento para determinar el desarrollo de EVA. Se obtuvo la área valvular aórtica (AVA) en cada punto temporal mediante la ecuación de continuidad  $AVA = ITV_{TSVI} \times (ITV_{TSVI}/ITV_{AO})$ . Se midió el grosor de la válvula aórtica en su porción media al final de diástole en una vista de eje paraesternal largo ampliada en la situación inicial, antes de la terapia aleatorizada y en el examen ecocardiográfico final.

**[0080]** Se usó la media de tres ciclos cardiacos consecutivos para cada medida. Se tuvo un cuidado especial en obtener planos de imágenes similares en los exámenes en serie revisando los registros anteriores antes del estudio de seguimiento. Todas las imágenes y medidas ecocardiográficas se efectuaron a lo largo del protocolo por el mismo investigador experimentado con asignación de tratamiento aleatorizada con anonimato.

**[0081] Histomorfometría**

**[0082]** Se abrieron longitudinalmente la aorta ascendente y la válvula aórtica y se separaron las 3 cúspides

valvulares. Se congelaron inmediatamente dos cúspides en un medio de imbibición (OCT Tissue-Tek; Sakura, EE.UU.) y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La tercera cúspide se fijó por inmersión en formalina tamponada al 10% a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y se embebió en parafina. Se analizaron secciones de tejido teñidas o marcadas inmunohistoquímicamente obtenidas a partir del tercio central de cada cúspide con un sistema digitalizador de imágenes informatizado (Image Pro Plus, versión 5.1) usando un microscopio óptico (BX41, Olympus) conectado con una cámara de vídeo digital (Qcolor3, Olympus). La región de análisis (RDA) estaba compuesta por  $1000\ \mu\text{m}$  de seno de Valsalva de la base de la valva y por  $500\ \mu\text{m}$  de valva de la base de valva. Se midieron el área de lesión (AL) y longitud de lesión de la valva (LLV).

10 **[0083]** Histoquímica

**[0084]** Se prepararon secciones teñidas con hematoxilina-floxina-azafrán, von Kossa y rojo Sirius (F3B, BDH, RU) para examen rutinario, calcificación de tejido y estudios de colágeno, respectivamente. Se cuantificaron las fibras de colágeno de tipos I y III como se describe anteriormente (13) en secciones teñidas con rojo Sirius-ácido pícrico bajo luz polarizada. Para la evaluación inmunohistoquímica, se preincubaron todas las secciones con anticuerpo monoclonal de IgG2a de ratón contra macrófagos de conejo (RAM11, Dako, Canadá) (dilución 1:100) o  $\alpha$ -actina de célula de músculo liso de conejo (Clon 1A4, Dako, Canadá) (dilución 1:200). Se aplicaron los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados a la especie, seguido de complejo de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, se visualizaron con azoetilcarbazol (AEC) y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer. Se cuantificaron células de músculo liso, macrófagos y áreas de calcificación en la RDA con imágenes digitales adquiridas a 40x aumentos. Se capturaron digitalmente las imágenes de cada sección con los mismos ajustes de iluminación, y se efectuó el análisis informatizado automático con el mismo umbral de color para todos los especímenes. Se expresaron los datos como porcentaje de área marcada en la RDA.

25 **[0085]** Para la valoración del colesterol libre en tejido, se tiñeron con filipina (13) criosecciones de  $5\ \mu\text{m}$  fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4). Se incubaron las secciones durante 1 hora a temperatura ambiente en complejo de filipina (Sigma, Canadá), se disolvieron en DMSO y se diluyeron en PBS, se montaron en un Vectashield (Vector Laboratories, EE.UU.) y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia usando un microscopio Zeiss Axiovert 200M con un conjunto de filtros DAPI. Se adquirieron las imágenes con una cámara digital AxioCam MRm montada con un adaptador de montura C a 0,63X. Se expresaron los datos de filipina como unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia.

**[0086]** Análisis estadístico

35 **[0087]** Se presentan los datos como media  $\pm$  desviación estándar. Para el periodo "pretratamiento", se usaron modelos de análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para estudiar las medidas ecocardiográficas y séricas a lo largo del tiempo y entre grupos (grupos tratado frente a control). Se usaron modelos con tiempo, grupo e interacción grupo x tiempo como variables independientes y se realizaron comparaciones entre grupos en un punto temporal dado solo en presencia de una interacción grupo x tiempo significativa. Por otro lado, se extrajeron conclusiones globales basándose en los efectos del grupo principal del modelo. Para el periodo de tratamiento aleatorizado, se usaron modelos de análisis de covarianza (ANCOVA) de medidas repetidas para estudiar las medidas ecocardiográficas y séricas a lo largo del tiempo y entre grupos (grupos tratado frente a control), ajustadas para el valor de la situación inicial de la variable de respuesta. La interacción de grupo x tiempo se incluyó también en los modelos de ANCOVA y se realizaron comparaciones entre grupos en un punto temporal dado solo en presencia de una interacción grupo x tiempo significativa. De otro modo, se extrajeron conclusiones globales basándose en los efectos del grupo principal del modelo. Se compararon las variables histológicas entre grupos tratado y de control usando la prueba de t de Student. Se evaluaron las relaciones entre variables histomorfométricas y ecocardiográficas usando el coeficiente de correlación de Pearson. Se efectuaron todos los análisis con SAS edición 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC) y se realizaron a un nivel de significación de 0,05.

50 **[0088]** Resultados

**[0089]** Lípidos séricos y calcemia

55 **[0090]** No había diferencia significativa entre los grupos durante el periodo de pretratamiento (el periodo de dieta hipercolesterolemica) para los niveles séricos de colesterol total ( $P= 0,942$ ), HDL-colesterol ( $P= 0,787$ ), triglicéridos ( $P= 0,906$ ) y calcemia ( $P= 0,727$ ). Durante el periodo de tratamiento de 2 semanas, los niveles de colesterol total eran también estadísticamente similares en ambos grupos ( $P= 0,470$ ). Los valores eran de  $20,46 \pm 3,52\ \text{mmol/l}$  y  $20,13 \pm 5,18\ \text{mmol/l}$  en el momento de la aleatorización y de  $13,78 \pm 6,24\ \text{mmol/l}$  y  $17,57 \pm 10,32\ \text{mmol/l}$  al final del tratamiento en los grupos de control y tratado, respectivamente. No había una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos para los niveles de HDL-colesterol durante el periodo de tratamiento ( $P= 0,374$ ). El HDL-colesterol era de  $0,50 \pm 0,20\ \text{mmol/l}$  y  $0,50 \pm 0,15\ \text{mmol/l}$  en el momento de la aleatorización y de  $0,39 \pm 0,17\ \text{mmol/l}$  y  $0,45 \pm 0,17\ \text{mmol/l}$  al final del tratamiento. Durante este periodo, los niveles de triglicéridos eran también similares ( $P= 0,544$ ). No había una diferencia estadísticamente significativa entre grupos para calcemia durante el periodo de tratamiento ( $P= 0,832$ ), con valores de  $3,31 \pm 0,29\ \text{mmol/l}$  y  $3,15 \pm 0,37\ \text{mmol/l}$  antes de la aleatorización y de  $3,22 \pm 0,11\ \text{mmol/l}$  y  $3,22 \pm 0,12\ \text{mmol/l}$  al final del tratamiento en ambos grupos.

**[0091]** Desarrollo de EVA durante el periodo de dieta hipercolesterolémica y suplemento de vitamina D2

**[0092]** El tiempo de inducción de EVA por la dieta de colesterol más vitamina D2 era similar para los grupos de control y tratado ( $12,8 \pm 2,2$  frente a  $13,0 \pm 2,9$  semanas;  $P= 0,852$ ). Había una diferencia significativa entre el AVA en la situación inicial y al final del periodo de dieta hipercolesterolémica ( $P < 0,0001$ ). El AVA se reducía en ambos grupos, y los valores eran casi idénticos entre los conejos de control y tratados (de  $24,2 \pm 4,1 \text{ mm}^2$  en la situación inicial a  $19,0 \pm 2,7 \text{ mm}^2$  en los controles y de  $24,7 \pm 3,9 \text{ mm}^2$  a  $19,1 \pm 2,6 \text{ mm}^2$  en el grupo tratado). Por lo tanto, no había diferencias significativas en el AVA entre grupos durante el periodo de desarrollo de EVA ( $P= 0,852$ ).  
 10 Por tanto, el AVA se reducía un  $20,5 \pm 4,2\%$  y un  $21,6 \pm 3,7\%$  antes del tratamiento aleatorizado en los grupos de control y tratado.

**[0093]** La relación de V1/V2 era también significativamente diferente entre las medidas en la situación inicial y al final de la dieta hipercolesterolémica ( $P < 0,0001$ ). Las relaciones de V1/V2 se reducían entre estos puntos temporales sin diferencias significativas entre grupos ( $P= 0,914$ ).  
 15

**[0094]** Evolución de EVA con tratamiento- ecocardiografía

**[0095]** Como se muestra en la Figura 1, durante el periodo de tratamiento (desde la detección de EVA a después de 2 semanas de tratamiento), se observó una interacción de grupo x tiempo significativa para AVA ( $P= 0,013$ ). Usando modelos de ANCOVA de medidas repetidas, las medidas ecocardiográficas revelaron aumentos significativos de AVA en los grupos tratados en comparación con los controles después de 7 días ( $21,9 \pm 3,6 \text{ mm}^2$  frente a  $19,6 \pm 1,8 \text{ mm}^2$ ,  $P= 0,019$ ) (aumentos relativos de  $14,2 \pm 3,5\%$  frente a  $3,9 \pm 3,4\%$ ), 10 días ( $23,0 \pm 4,1 \text{ mm}^2$  frente a  $20,3 \pm 2,4 \text{ mm}^2$ ,  $P= 0,006$ ) (aumentos relativos de  $19,8 \pm 3,5\%$  frente a  $7,6 \pm 4,2\%$ ) y 14 días de tratamiento ( $23,8 \pm 3,1 \text{ mm}^2$  frente a  $21,3 \pm 2,4 \text{ mm}^2$ ,  $P= 0,012$ ) (aumentos relativos de  $24,6 \pm 2,0\%$  frente a  $12,9 \pm 3,5\%$ ).  
 20  
 25

**[0096]** Se valoró el grosor de la válvula aórtica mediante ecocardiografía y se midió antes de la terapia aleatorizada y después de 14 días de tratamiento. Se observó también una interacción de grupo x tiempo significativa para el grosor de válvula aórtica ( $P= 0,005$ ). No se encontró una diferencia significativa entre grupos en el punto temporal de aleatorización, pero se observó una reducción significativa del grosor de válvula aórtica en el grupo tratado en comparación con el grupo de control después de 14 días de tratamiento. El grosor de la válvula aórtica era de  $0,094 \pm 0,034 \text{ cm}$  antes de la aleatorización y de  $0,075 \pm 0,033 \text{ cm}$  al final del tratamiento en los conejos tratados, mientras que era de  $0,080 \pm 0,024 \text{ cm}$  y de  $0,080 \pm 0,026 \text{ cm}$  en ambos puntos temporales en los controles.  
 30  
 35

**[0097]** Histología

**[0098]** Todos los animales presentaban lesiones de válvula aórtica. Las lesiones consistían en un tapón de neottejido compuesto por múltiples capas de células espumosas que daban lugar gradualmente a material fibrótico con células espumosas dispersas aproximadamente a profundidad media en la lesión. Las lesiones progresaban generalmente a partir del área senotubular, cubriendo todo el seno de Valsalva y extendiéndose a la base de la cúspide y hasta la mitad a dos tercios de la arteria de valva proximal. En contraposición, las lesiones en la valva ventricular no eran comunes y eran menos graves.  
 40

**[0099]** Histomorfometría

**[0100]** Como se muestra en la Figura 3, el porcentaje de AL por RDA se reducía significativamente en el grupo tratado con péptido mimético de ApoA-I en comparación con el grupo de control ( $52,8 \pm 12,5\%/RDA$  frente a  $66,7 \pm 9,9\%/RDA$ ,  $P= 0,032$ ). De forma interesante, cuando los porcentajes de AL/RDA en histomorfometría y de AVA determinada por ecocardiografía de ambos grupos se agruparon, se encontró una correlación negativa entre el porcentaje de AL/RDA y AVA ( $r= -0,54$ ,  $P= 0,039$ , Figura 4). De forma similar, el análisis de datos agrupados de ambos grupos reveló una correlación negativa entre AVA y %LLV (concretamente, el porcentaje de longitud de valva total ocupada por la lesión o  $LVL_{\text{longitud de valva total}} \times 100$ ) ( $r= -0,70$ ,  $P= 0,004$ ). Sin embargo, la diferencia entre los grupos tratado y de control para %LLV no alcanzaba la significación estadística ( $55,7 \pm 24,3\%$  frente  $72,3 \pm 11,7\%$ ,  $P= 0,109$ ).  
 50  
 55

**[0101]** Histoquímica

**[0102]** Se observaron focos de calcificaciones en la mayoría de animales. Los porcentajes de conejos con depósitos de calcio en el núcleo de lesión en los senos de Valsalva eran de  $57\%$  (4/7) en el grupo tratado y de  $88\%$  (7/8) en los controles. La cuantificación del porcentaje de área de seno de Valsalva ocupada por calcificaciones por tinción con von Kossa reveló una fuerte tendencia hacia un  $77\%$  de reducción en el grupo tratado en comparación con los controles ( $1,6 \pm 2,0\%$  frente a  $6,9 \pm 6,7\%$ ;  $P= 0,063$ ). Este porcentaje de área de focos de calcificación en la área del seno estaba correlacionada significativamente con el grosor de válvula aórtica determinado por ecocardiografía ( $r= 0,63$ ,  $P= 0,012$ ), usando datos agrupados de ambos grupos de estudio (Figura 5).  
 60  
 65

**[0103]** El colesterol libre, detectado por tinción con filipina, estaba presente a lo largo de todas las áreas de lesión de válvula aórtica en casi todos los animales de control, mientras que la señal fluorescente tendía a ser menor en el extremo luminal de las lesiones en la mayoría de animales tratados con el péptido mimético de ApoA-I. La valoración de la señal fluorescente en los primeros 10  $\mu\text{m}$  del borde luminal de las lesiones mostró un 41% de reducción en el colesterol libre en animales tratados en comparación con los controles, pero esta diferencia no alcanzaba significación estadística ( $221 \pm 54$  frente a  $377 \pm 229$  unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia,  $P= 0,231$ ). Las áreas de macrófagos (34,5%) eran aproximadamente dos veces más grandes que las áreas positivas de  $\alpha$ -actina (17,1%), sin diferencias significativas entre grupos. El porcentaje de fibras de colágeno de tipo III (verde claro) era mayor que el de fibras de colágeno de tipo I (rojo-amarillo) en la RDA ( $19,7 \pm 5,5\%/RDA$  para tipo III frente a  $6,6 \pm 4,1\%/RDA$  para tipo I en controles,  $P= 0,00009$ ;  $19,1 \pm 11,3\%/RDA$  para tipo III frente a  $5,5 \pm 5,6\%/RDA$  para tipo I en conejos tratados,  $P= 0,015$ ). Sin embargo, los porcentajes de fibras de colágeno (de tipos I y III) en la RDA eran similares entre ambos grupos ( $P= 0,671$  y  $P= 0,883$  respectivamente).

**[0104]** Discusión

**[0105]** Estos experimentos demuestran que las infusiones de un péptido mimético de ApoA-I conducen a una regresión significativa de la EVA experimental. En comparación con el grupo de control, las infusiones con péptido mimético de ApoA-I inducían una mayor mejora de EVA y una reducción significativa del grosor de válvula aórtica. Estos cambios favorables en la gravedad de EVA en la ecocardiografía estaban acompañados por secciones histológicas con una reducción significativa de la extensión de la lesión en la región de base de la valva y una fuerte tendencia hacia calcificaciones reducidas.

**[0106]** Se usó un modelo de conejo de EVA desarrollado por Drolet y col. (12) en el que ocurre calcificación de válvula aórtica significativa y reproduciblemente, permitiendo imitar la afección clínica. Después de una dieta enriquecida en colesterol y suplemento de vitamina D2 durante aproximadamente 13 semanas, las medidas ecocardiográficas revelaron un 21% de reducción de AVA. La formación de imágenes bidimensionales mostró un grosor de válvula aumentado y una ecogenicidad compatible con esclerosis de valva y áreas de calcificación. El examen histológico confirmó el engrosamiento de valva y la deposición de calcio tanto en los senos de Valsalva como en la base de valva. Este estudio proporciona evidencias ecocardiográficas e histológicas de los efectos beneficiosos de un péptido mimético de ApoA-I sobre EVA calcificada experimental. Se observó un aumento del AVA tan pronto como 7 días después del inicio del tratamiento activo, alcanzando una mejora del 24% a los 14 días. El AVA misma casi volvió, con las infusiones de péptido mimético de ApoA-I, al valor normal presente antes de empezar la dieta hipercolesterolémica. En contraposición, la interrupción de la dieta enriquecida con colesterol con suplemento de vitamina D2 en el grupo de control (para imitar la reducción de lípidos) condujo solo a un leve aumento del AVA, que confirma los efectos beneficiosos del péptido. El grosor de válvula aórtica se redujo también significativamente después de solo 14 días de tratamiento con el péptido, como se muestra por ecocardiografía. De forma interesante, el AVA determinada por ecocardiografía se correlacionaba inversamente con los índices de extensión de la lesión en histología. Las infusiones de péptido mimético de ApoA-I conducían también a una reducción significativa del porcentaje de área de lesión en la región de análisis histológico alrededor de la base de valva valvular. Además, la gran reducción en la extensión de las calcificaciones valvulares, que casi alcanzó significación estadística al nivel elegido arbitrariamente de 0,05, es probable que sea de importancia clínica, dado que la EVA calcificada de los ancianos es la forma más frecuente de estenosis encontrada en los países desarrollados. Esto sugiere que la presencia de calcificaciones en la válvula aórtica no solo no impide obtener resultados favorables con el péptido, sino que este enfoque puede incluso revertir las calcificaciones valvulares mismas. Este descubrimiento puede ser también aplicable a calcificaciones en la válvula mitral y/o anulares.

**[0107]** Un péptido mimético de ApoA-I complejoado con fosfolípidos estimula el transporte de colesterol inverso de manera similar al ApoA-I nativo (14). Los mayores niveles de colesterol total en circulación en conejos tratados con el péptido en comparación con los controles (observados después de 2 semanas de tratamiento) pueden indicar una movilización potenciada del colesterol de tejido.

#### Referencias

- [0108]**
1. Freeman RV, Otto CM. "Spectrum of calcific aortic valve disease: pathogenesis, disease progression, and treatment strategies". *Circulation* 2005; 111: 3316-26.
  2. Carabello BA. "Aortic stenosis". *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 677-82.
  3. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I. "Effect of very high intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis. The ASTEROID trial". *JAMA.* 2006; 295: 1556-65.
  4. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ y col. "Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression (SALTIRE) Investigators. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis". *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 2389-97.
  5. Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, y col. "Recombinant apolipoprotein A-I Milano reduces intimal thickening after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits". *Circulation* 1994; 90: 1935-41.
  6. Shah PK, Yano J, Reyes O y col. "High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential

- implications for acute plaque stabilization". Circulation 2001; 103: 3047-50.
7. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM y col. "Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial". JAMA 2003; 290: 2292-300.
- 5 8. Tardif JC, Grégoire J, L'Allier PL y col. "Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial". JAMA 2007; 297: 1675-82.
9. Meyers CD, Kashyap ML. "Pharmacologic augmentation of high-density lipoproteins: mechanisms of currently available and emerging therapies". Curr. Opin. Cardiol. 2005; 20: 307-12.
10. Khan M, Lalwani ND, Drake SL, Crockatt JG, Dasseux JLH. "Single-dose intravenous infusion of ETC-642, a 22-Mer ApoA-I analogue and phospholipids complex, elevates HDL-C in atherosclerosis patients". Circulation 2003; 108 (supl): IV-563-4.
11. Bodary PF, Shen Y, Westrick RJ, y col. "Gene transfer of an APO-A-I mimetic peptide reduces atherosclerosis in mice". J. Am. Coll. Cardiol. 2004; 43 (supl. A): 465A-6.
12. Drolet MC, Arsenault M, Couet J. "Experimental aortic valve stenosis in rabbits". J. Am. Coll. Cardiol. 15 2003; 41: 1211-7.
13. Busseuil D, Zeller M, Cottin Y, y col. "Late neointimal tissue growth behind the stent after intravascular gamma-radiation". Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004; 58: 259-66.
14. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, y col. "Apolipoprotein A-I mimetic peptides". Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005; 25: 1325-31.
- 20 15. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, y col. "Human apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: potential for atherosclerosis reversal". Curr. Opin. Lipidol. 2004; 15: 645-9.

**REIVINDICACIONES**

1. Un complejo de péptido mimético de apolipoproteína A-I (ApoA-I)/fosfolípido para uso en la prevención, tratamiento, control o reversión de una estenosis valvular en un sujeto, en el que dicho péptido tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El complejo de péptido mimético de apolipoproteína A-I (ApoA-I)/fosfolípido para uso según la reivindicación 1, en el que el componente fosfolípido del complejo es esfingomielina de huevo y/o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina.
3. El complejo de péptido mimético de apolipoproteína A-I (ApoA-I)/fosfolípido para uso según la reivindicación 2, en el que el componente peptídico, la esfingomielina de huevo y la 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina están presentes a una relación en peso de 1:1:1.
4. El complejo de péptido mimético de apolipoproteína A-I (ApoA-I)/fosfolípido para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha estenosis valvular es una estenosis valvular aórtica o una estenosis valvular calcificada.
5. El complejo de péptido mimético de apolipoproteína A-I (ApoA-I)/fosfolípido para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sujeto es un mamífero.
6. El complejo de péptido mimético de apolipoproteína A-I (ApoA-I)/fosfolípido para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho sujeto es un ser humano.

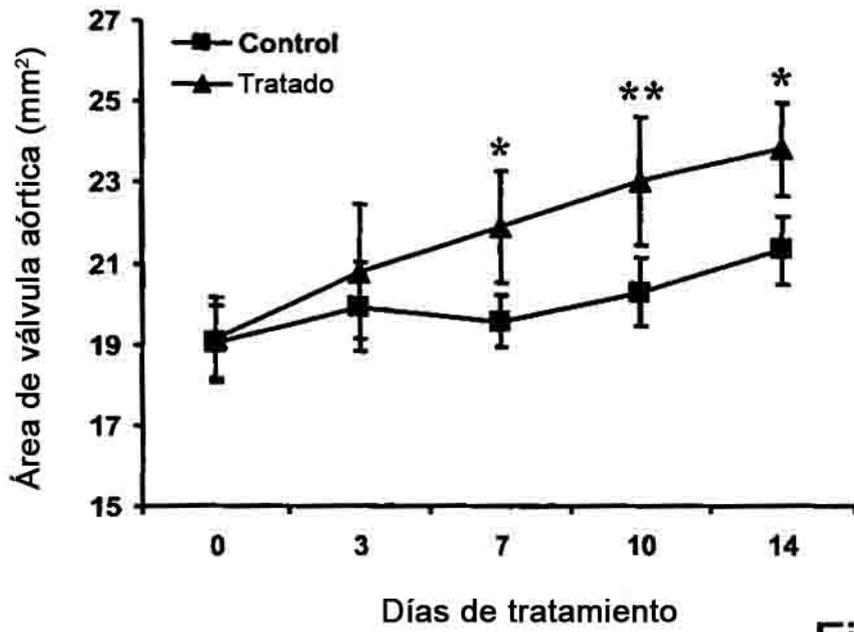


Fig 1

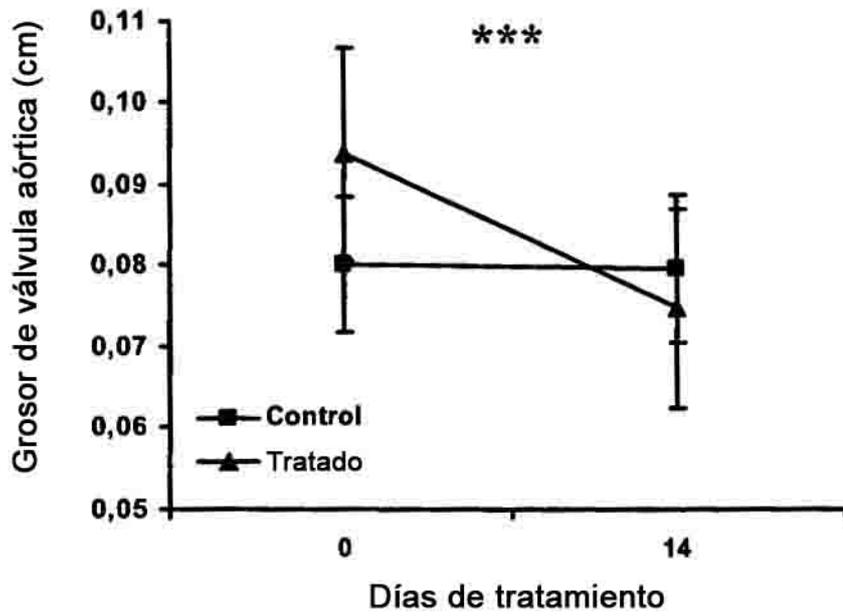


Fig 2

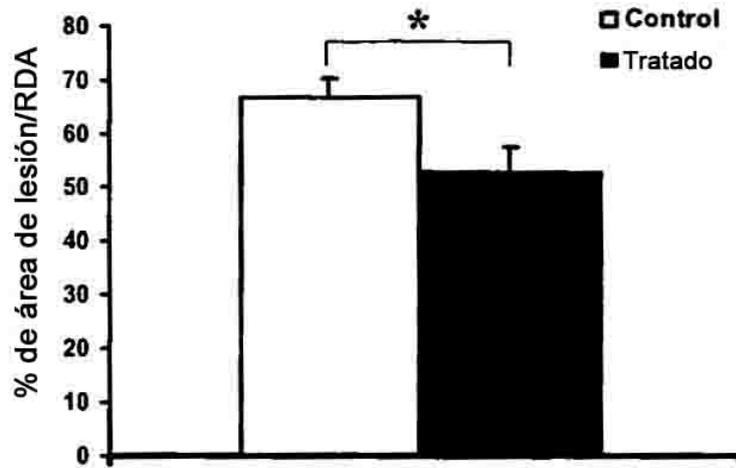


Fig 3

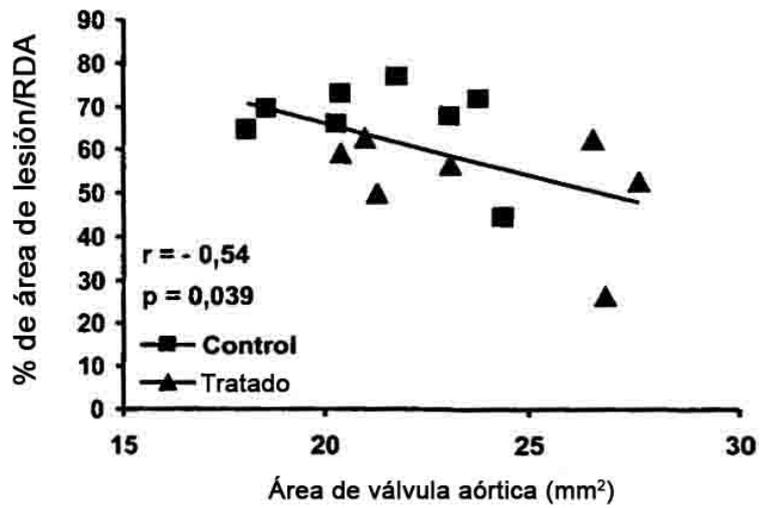


Fig 4

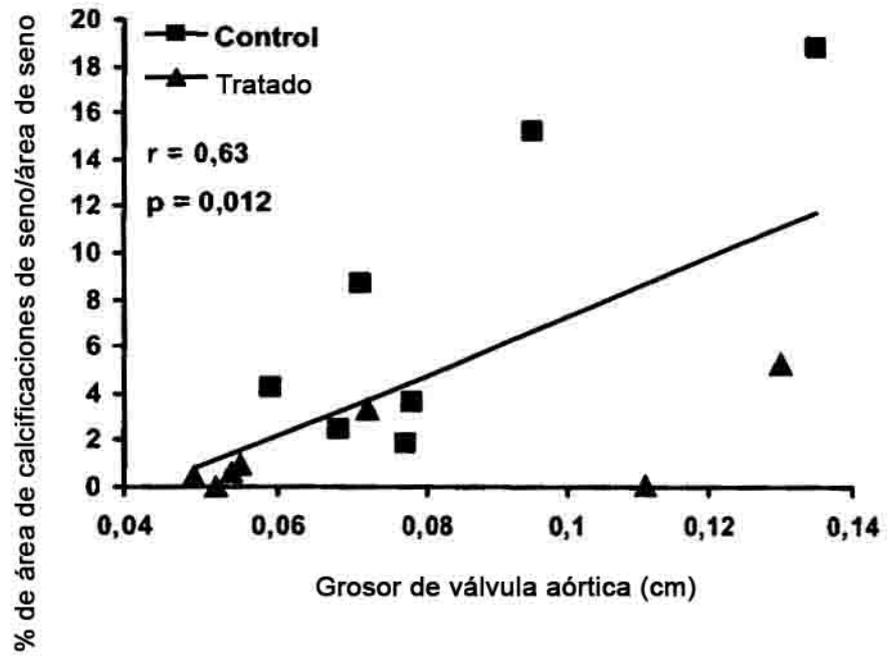


Fig 5