

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 035**

51 Int. Cl.:

A61K 31/37 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 35/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2009 E 09783852 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2346503**

54 Título: **Sustancias bloqueadoras de los canales Kv1.3 para el tratamiento de enfermedades asociadas a hiperplasia de la íntima**

30 Prioridad:

08.10.2008 EP 08105518

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

26.12.2013

73 Titular/es:

**HOSPITAL CLINIC I PROVINCIAL DE
BARCELONA (50.0%)**

C/ Villarroel 170

08036 Barcelona, ES y

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (50.0%)

72 Inventor/es:

HERAS FORTUNY, M^a MAGDALENA;

ROQUÉ MORENO, MERCÉ;

PÉREZ GARCÍA, M^a TERESA;

LÓPEZ LÓPEZ, JOSÉ RAMÓN y

CIDAD VELASCO, PILAR

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 436 035 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

Sustancias bloqueadoras de los canales Kv1.3 para el tratamiento de enfermedades asociadas a hiperplasia de la íntima.

Campo de la invención

- 5 La presente invención está comprendida en el campo de las patologías cardiovasculares, en particular en el campo de las enfermedades derivadas de la hiperplasia de la túnica íntima.

Antecedentes de la invención.

10 La pared de los vasos sanguíneos está constituida por tres estratos o túnicas concéntricas (la íntima, la media y la adventicia) de estructura y composición bien diferenciadas. La túnica íntima está compuesta por una monocapa de células endoteliales asentadas sobre una membrana basal rica en colágeno y proteoglicanos y separada de la media por la lámina elástica interna. La túnica media está formada por células del músculo liso vasculares (CMLV) y matriz extracelular y la adventicia, la capa más externa, está compuesta fundamentalmente por tejido conectivo y fibroblastos.

15 Las CMLV se localizan fisiológicamente en la túnica media. Sin embargo, se pueden encontrar CMLV en la capa íntima como consecuencia de una desorganización de la estructura de la pared vascular debida a lesiones o patologías vasculares, tales como la aterosclerosis, hiperplasia de la túnica íntima.

20 La hiperplasia de la íntima es un cambio en la estructura vascular que se produce a consecuencia de los mecanismos biológicos de reparación tras una lesión vascular, bien sea de tipo mecánico, quirúrgico, inflamatorio o inmunológico. El hallazgo más característico de este cambio estructural es el engrosamiento de la capa íntima, debido tanto a un incremento en el número de células como a un aumento en la síntesis de matriz extracelular en la que se hallan inmersas estas células (*Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. British Journal of Surgery 1994;81:1254-1269*). En última instancia este proceso deriva en un estrechamiento o estenosis del lumen vascular.

25 Existen diversas situaciones patológicas asociadas a hiperplasia de la íntima y, en general, los factores desencadenantes se pueden agrupar como lesiones físicas (en muchos casos lesiones yatrogénicas por la cirugía vascular), inflamatorias (como en las lesiones ateroscleróticas) o por aumento de la tensión de la pared (como en el caso de la hipertensión pulmonar o la utilización de injertos venosos en la cirugía de by-pass). Entre las enfermedades asociadas a hiperplasia de la íntima se encuentran:

Oclusión tardía de by-pass:

30 La revascularización con injertos venosos es la terapia estándar para las enfermedades arteriales oclusivas cuando el segmento ocluido es grande y no se puede practicar una endarterectomía. La técnica más utilizada es el trasplante autogénico de un segmento de vena safena, y se utiliza tanto en cirugía coronaria como en la cirugía vascular periférica (claudicación intermitente, tromboangéitis obliterante de la arteria tibial, etc.). Aunque el procedimiento tiene un resultado inmediato muy bueno, a largo plazo, el injerto venoso sufre una respuesta crónica de mala adaptación a un entorno arterial, cuyo componente primario es la proliferación descontrolada de las células del músculo liso vascular dando lugar a una hiperplasia de la íntima que se puede complicar posteriormente por el desarrollo de aterosclerosis y trombosis (*Murphy GJ, Angelini GD. Cardiovasc Ultrasound 2004;21:2-8*). La posibilidad de manipular los trasplantes venosos ex vivo de forma previa a su implantación, utilizando procedimientos farmacológicos, terapia génica o aplicación de recubrimientos sintéticos, es una alternativa que se ha intentado explotar para prevenir el fallo del injerto vascular (Mann MJ, Whittermore AD, Donaldson MC, et al, *Lancet 1999; 354: 1493-8*; Bhardwaj S, Roy H, Ylá Hertuala, *Expert Rev Cardiovasc Ther 2008;6:641-52*) y que en algunos casos ha demostrado ser efectiva en animales de experimentación.

Vasculopatía coronaria post-trasplante:

45 La vasculopatía coronaria post-trasplante es el principal factor limitante de la supervivencia a largo plazo después de un trasplante de corazón. Se manifiesta como una forma especialmente agresiva de enfermedad arterial coronaria diferente de la arteriosclerosis convencional, que se origina por la combinación de factores físicos, químicos e inmunológicos que producen una lesión endotelial, que a su vez desencadena la proliferación de las células del músculo liso vascular y la hiperplasia de la íntima. El análisis patológico de las lesiones revela un engrosamiento de la íntima en el que participan las células del músculo liso indiferenciadas y macrófagos y linfocitos. Este engrosamiento de la íntima lleva a la obstrucción de las arterias coronarias, lo que en último término conduce al fallo del injerto (*Aranda and Hill, Chest 2000, 118(6): 1792-1800; Schmauss and Weis, Circulation (2008) 117(16):2131-41M: Weiss et al., Front Biosci. (2008) 13:2980-8*).

55 Un aspecto importante de la patogenia de la vasculopatía es la interacción de factores inmunológicos y no inmunológicos. De hecho, durante muchos años se ha pensado que la hiperplasia de la íntima era debida exclusivamente a factores inmunológicos. Sin embargo, las terapias inmunosupresoras no han demostrado ser

capaces de reducir su incidencia. Más bien al contrario, se ha observado un aumento de la hiperplasia tras la introducción de tratamientos basados en el uso de inmunosupresores como la ciclosporina. En estudios realizados con modelos animales de experimentación se han obtenido resultados prometedores cuando estos agentes inmunosupresores se combinan con drogas como el MMF (mofetil micofenolato), que inhibe la síntesis de ADN y tiene por tanto un efecto antiproliferativo generalizado que se extiende más allá de las células inmunes. Aunque los procedimientos de revascularización (angioplastia coronaria percutánea, aterectomía coronaria, cirugía de bypass coronario o implantación de stents) se pueden utilizar en pacientes que presenten estenosis localizada, el carácter difuso de la arteriopatía hace que el uso de estas terapias sea limitado, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas dirigidas a controlar los factores que determinan la hiperplasia de la íntima en esta vasculopatía.

Nefropatía crónica post-trasplante:

Los factores desencadenantes de la vasculopatía coronaria están también presentes en otras vasculopatías post-trasplante, como es el caso de la nefropatía post-trasplante, que de nuevo representa la causa más frecuente de fallo del trasplante renal.

Además de las mencionadas, existen otras enfermedades derivadas de la hiperplasia de la íntima. Para identificar cuando una enfermedad se debe a hiperplasia de la íntima, el experto en la técnica utilizará técnicas de imagen. Concretamente, en el árbol coronario se utiliza la angiografía coronaria, con la inyección de contraste en el ostium de dichas arterias. Asimismo, el TAC multicorte de 64 coronas y la angioresonancia cardíaca también son capaces de visualizar lesiones ateroscleróticas en la circulación coronaria.

Las técnicas angiográficas se complementan con técnicas de ultrasonidos, como la ecografía intravascular, que permiten visualizar el grosor de la capa íntima arterial, y determinar si hay lesión aterosclerosa y sus características. En condiciones normales, el grosor de la íntima no se puede medir microscópicamente ya que se trata de una sola capa de células. Sin embargo, cualquier grosor medible (que sea superior a una monocapa celular) es patológico (Figura 1).

Hay otras técnicas como la histología virtual, que permite determinar la presencia de lípidos, calcio, trombo, tejido fibroso e hiperplasia, y la OCT (Tomografía de Coherencia Óptica) que utiliza tecnología láser para determinar todo el grosor de la pared vascular y así identificar las zonas de hiperplasia de la íntima (véase Figura 2). Tanto en especímenes arteriales humanos como en muestras experimentales de modelos animales, se utiliza la morfometría para el análisis histológico del grosor de las diversas capas de la pared arterial. Después del periodo de tratamiento adecuado, se procederá a la eutanasia del animal y extracción de los vasos estudiados y su fijación para su posterior análisis. Se obtendrán cortes histológicos y se teñirán con hematoxilina eosina. Se identificará la lámina elástica interna y se evaluarán las áreas de las diferentes capas vasculares (*Gallo et al., 1998 Circulation 97:581-588*)

Dada la incidencia y severidad de estas patologías, surge la necesidad de desarrollar una herramienta que limite o impida la hiperplasia de la íntima y las situaciones patológicas que se derivan de ella, especialmente tras intervenciones quirúrgicas o cirugía de trasplante.

Sorprendentemente, los inventores han comprobado que los bloqueadores del canal de potasio activado por voltaje 1.3 (Kv1.3) limitan significativamente la hiperplasia de la íntima.

Tradicionalmente, los inhibidores de Kv1.3 se han utilizado en terapias contra enfermedades de origen inmunológico, como la encefalomiелitis o la esclerosis múltiple (*Wulff, H. et al., 2003. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 6: 640-647. Cahalan, M. D., et al., 2001. J. Clin. Immunol. 21:235-252*). El Kv1.3 se identificó por primera vez en las células T (*Hu et al., The Journal of Immunology, 2007, 179: 4563-4570. Grissmer et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 87: 9411-9415, 1990*). En estas células, el canal Kv1.3 es tetrahomomérico, mientras que en otros tipos de células, Kv1.3 se asocia con subunidades de otros canales activados por voltaje de la familia Kv1 para formar canales de potasio heteroméricos (*Hu et al., The Journal of Immunology, 2007, 179: 4563-4570*). Como consecuencia, la regulación de los flujos de K^+ a través de la membrana de las células es, a menudo, el resultado combinatorial de múltiples vías de señalización molecular. La importancia de Kv1.3 en enfermedades relacionadas con el sistema inmune se ha evidenciado en diversos estudios.

El documento WO2008088422 divulga la utilidad de los péptidos inhibidores del Kv1.3 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, alergias, diabetes y obesidad y describe la fabricación y purificación de derivados de las toxinas ShK, MgTx₁, MTX₁, HsTx1, wGVIA, HaTx1, etc. Según los datos mostrados, los péptidos derivados de ShK son capaces de inhibir la corriente del Kv1.3 humano con una IC de -150 pM. ShK es, además, un potente inhibidor de la proliferación de las células T, por lo que proponen su utilización en terapias para el tratamiento de enfermedades de origen inmunológico, tales como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la dermatitis, la diabetes tipo I, etc.

Canales de K^+ en el músculo liso vascular

Los canales de potasio juegan un papel muy relevante también en la regulación, inmediata y a largo plazo, de la

función de las células del músculo liso vascular. Las CMLV de las paredes de los vasos son células que expresan un repertorio único de proteínas contráctiles, canales iónicos y moléculas señalizadoras dirigidas a mantener el tono vascular. Se han identificado al menos cuatro tipos de canales de K^+ en las CMLV: canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv) como Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6 y Kv2.1, canales de K^+ activados por calcio (como los canales maxiK ó BK), canales de K^+ rectificadores hacia adentro (como los canales K_{IR} y los canales K_{ATP}) y canales de K^+ de doble poro, responsables de las corrientes de fondo como los canales TASK y TWIK (revisado en Jackson WF, *Microcirculation* 12,113-127, 2005). La existencia además de subunidades reguladoras de estos canales junto con las variaciones en su expresión en función del lecho vascular, contribuye a la fina regulación de la fisiología del músculo liso. Así, los procesos patológicos pueden estar asociados a la desregulación de múltiples mecanismos de control que actúan en paralelo o de forma combinada. Determinar qué mecanismo conduce a una enfermedad vascular concreta es una tarea ardua de experimentación científica.

Según lo expuesto, y debido a la localización difusa y distal de las lesiones hiperplásicas, el campo de la técnica no puede proporcionar terapias efectivas para el tratamiento de la hiperplasia de la íntima. Por ello sería conveniente desarrollar una herramienta terapéutica dirigida a controlar los factores que determinan la hiperplasia de la túnica íntima y capaz de frenar la migración y proliferación de las CMLV en ella, así como la secreción de componentes de la matriz celular.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Microfotografías representativas de secciones de una arteria normal (panel izquierdo) y de una arteria con hiperplasia de la íntima (panel derecho), donde se puede observar la mayor densidad de células musculares lisas en la pared arterial.

Figura 2. Micrografía de OCT (Tomografía de Coherencia Óptica) identificando zonas de hiperplasia de la íntima mediante tecnología láser.

Figura 3. Ejemplo del ensayo para determinar si una sustancia es bloqueadora del canal Kv1.3. En el panel A se muestran trazos representativos de las corrientes evocadas por los distintos pulsos despolarizantes (desde -60 hasta +80 mV) en una célula HEK transfectada con el canal Kv1.3, en condiciones de registro control, en presencia de 10 nM de PAP-1 en la solución del baño y tras lavar la droga. El diagrama inferior muestra el esquema del protocolo de pulsos aplicado. La amplitud de la corriente máxima evocada por cada pulso de voltaje se representa en el panel B en función del valor del potencial de membrana, con lo cual se construye la curva corriente (I) voltaje (V) para las tres situaciones.

Figura 4. Niveles de ARNm del canal Kv1.3 en células en fenotipo contráctil y en los dos modelos de fenotipo proliferativo estudiados. Se muestra la cuantificación de los niveles de ARNm del canal Kv1.3 obtenidos en las distintas preparaciones con los procedimientos descritos en el ejemplo. Los valores se han normalizado con relación a los niveles de expresión obtenidos en células en fenotipo contráctil. Los datos muestran la media de 3-4 experimentos en cada situación. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figura 5. Expresión de la proteína del canal Kv1.3 determinada por inmunocitoquímica en células aisladas (panel A) o inmunohistoquímica en secciones de arterias controles y dañadas a distintos tiempos (panel B). En la parte A se muestra el marcaje del anticuerpo combinado con el marcaje de los núcleos con DAPI para estimar el número de células en el campo. La parte B muestra un ejemplo de marcaje con el anticuerpo anti Kv1.3 como un punteado con mayor intensidad de grises-negros) en una arteria sin lesionar y en una arteria lesionada a dos tiempos distintos. Las barras son el promedio del área marcada (en porcentaje) observada en 15-30 cortes en cada condición. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 6. Caracterización de la expresión funcional de los canales Kv1.3. La parte superior muestra registros representativos de corrientes inducidas por la aplicación de un pulso despolarizante desde un potencial de reposo de -80 mV hasta un potencial de +40 mV en condiciones control y en presencia de un bloqueador de los canales Kv1.3, la Margatoxina, a una concentración de 10 nM. Se muestran trazos representativos obtenidos en una CMLV recién disociada de la pared de la arteria (contráctil) y en una CMLV en cultivo. En el panel inferior se muestra las medias (\pm error estándar de la media) obtenidas en 10-12 células en cada grupo, en las que se aplicaron tanto bloqueadores selectivos de los canales Kv1.3 como 10 nM margatoxina o 10 nM PAP-1) como bloqueadores de todos los canales Kv1 (como correolide).

Figura 7. Efecto de los bloqueadores del canal Kv1.3 sobre la migración de CMLV de arteria uterina humana. Los paneles de la izquierda muestran fotografías representativas de la migración observada en cultivos controles y tratados con las drogas indicadas. La superficie irregular creada por la línea punteada se ha dibujado bordeando el área libre de células al tiempo 0, y esa misma superficie se ha transpuesto al cultivo al cabo de 24 h para ofrecer una estimación visual del área invadida en cada uno de los tres ejemplos. Los resultados obtenidos en 8-10 experimentos similares se han expresado como porcentaje del área a tiempo 0 que está cubierta de células a 24 h y se muestran en la parte derecha de la figura (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Figura 8. Efecto de los bloqueadores del canal Kv1.3 sobre la proliferación de CMLV de arteria uterina humana. La figura muestra un ejemplo representativo, en el que se ilustran fotos tomadas con el marcaje con DAPI (para

contar el número de células) y el mismo campo con el marcaje con BrdU (para determinar el número de células proliferando). De nuevo se realizaron estos experimentos en células en medio control y células en las que se añadió al medio margatoxina o PAP. Como se ve en el ejemplo, en estos dos últimos casos se observa un menor número de núcleos marcados. La cuantificación de 8-12 campos en 6 experimentos diferentes indicó que estas variaciones eran estadísticamente significativas. La gráfica de barras de la derecha muestra las medias de estos experimentos (**p<0,01)

Figura 9. Ejemplo de una micrografía de una sección de un vaso coronario teñida en la que se pueden diferenciar las distintas capas vasculares para realizar análisis morfométricos, midiendo el grado de endotelización de la zona del stent, el contenido de CMLV en la íntima y su grosor en relación con el grosor del vaso y el área de la luz

Sumario de la invención

De acuerdo con la necesidad de desarrollar una herramienta para una terapia efectiva contra la hiperplasia de la túnica íntima vascular, los inventores proponen la utilización de sustancias bloqueadoras de los canales Kv1.3 en la fabricación de una herramienta farmacológica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la hiperplasia de la íntima.

Una ventaja de la presente invención es el bloqueo selectivo de los canales Kv1.3 de las CMLV mediante la utilización de sustancias bloqueadoras pertenecientes al grupo de margatoxina, toxina ShK, psoralen, kaliotoxin, correolide, J123 y derivados y combinaciones de los mismos, para la fabricación de una herramienta farmacológica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la hiperplasia de la túnica íntima vascular. Según esto, una realización posible de la presente invención es la utilización de bloqueadores de Kv1.3 en la fabricación de una herramienta farmacológica para el tratamiento de enfermedades vasculares que producen restenosis y comprenden la nefropatía crónica post-trasplante, la oclusión tardía de by-pass y la vasculopatía coronaria post-trasplante y equivalentes y combinaciones de los mismos. En particular, la presente invención comprende el uso de Shk-L5, PAP-1 o ambas, en la fabricación de una herramienta farmacológica para el tratamiento de dichas enfermedades vasculares. Una realización ventajosa de la presente invención es la utilización de dichas sustancias bloqueadoras en la fabricación de una herramienta farmacológica para el tratamiento y/o la prevención de la restenosis.

La práctica clínica se beneficiaría de la aplicación de un protocolo preventivo y/o terapéutico contra la hiperplasia de la túnica íntima. Correspondientemente, una posible realización de la presente invención consiste en un procedimiento para la prevención o el tratamiento de la hiperplasia de la íntima, que comprende la administración de una sustancia bloqueadora de Kv1.3. Ventajosamente, este procedimiento se emplea para el bloqueo selectivo de los canales Kv1.3 de las CMLV mediante la utilización de herramientas farmacológicas fabricadas con sustancias bloqueadoras pertenecientes al grupo de margatoxina, toxina ShK, psoralen, kaliotoxin, correolide, J123 y derivados y combinaciones de los mismos, preferentemente Shk-L5, PAP-1 o ambas. En particular, este procedimiento se puede aplicar en el tratamiento de enfermedades que provoquen restenosis tales como la nefropatía crónica post-trasplante, la oclusión tardía de by-pass y la vasculopatía coronaria post-trasplante y equivalentes y combinaciones de los mismos.

La farmacología cardiovascular carece de herramientas eficaces diseñadas para el tratamiento de enfermedades derivadas de la hiperplasia de la túnica íntima. Con el objeto de solventar esta carencia, una posible realización de la presente invención consiste en un dispositivo de dosificación, para implante en un vaso arterial de un animal, que puede ser un humano, que comprende un sistema contenedor de una sustancia bloqueadora de Kv1.3. Una ventaja de este dispositivo es que el principio activo que dosifica es un bloqueador selectivo de los canales Kv1.3 de las CMLV perteneciente al grupo de margatoxina, toxina ShK, psoralen, kaliotoxin, correolide, J123 y derivados y combinaciones de los mismos. Preferentemente, la presente invención comprende las sustancias Shk-L5, PAP-1 o ambas. En particular, este aparato se puede aplicar en el tratamiento de enfermedades que producen restenosis, tales como la nefropatía crónica post-trasplante, la oclusión tardía de by-pass y la vasculopatía coronaria post-trasplante.

Descripción detallada de la invención

Los inventores proponen el uso de sustancias bloqueadoras de Kv1.3, tal y como se describe a continuación, para el tratamiento de las enfermedades derivadas del engrosamiento de la íntima.

La invención está basada en el descubrimiento de que las células musculares lisas localizadas en la íntima hiperplasia expresan preferentemente Kv1.3 (figuras 3, 4, 5 y 6) y que utilizando sustancias bloqueadoras específicas para los canales Kv1.3 se reduce la tasa de división celular y migración de las CMLV (figuras 7 y 8) y el consiguiente engrosamiento de la íntima tras una lesión vascular.

De acuerdo con la presente invención, las sustancias bloqueadoras de los canales Kv1.3 se pueden utilizar como herramientas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades vasculares. En el contexto de la presente invención, una herramienta farmacológica es cualquier sustancia, composición, utensilio, dispositivo, mecanismo, ingenio, artilugio, instrumento, máquina, o aparato adaptado, estudiado o diseñado para ser utilizado en el tratamiento, la curación, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso

fisiológico no deseado.

Las enfermedades vasculares pueden ser consecuencia de la desorganización de la estructura normal de la pared vascular. Las tres capas concéntricas de la pared vascular o tunicas, se pueden desorganizar durante procesos patológicos o como consecuencia de lesiones físicas, originando un estrechamiento de la luz vascular (Figura 1). En particular, en muchas enfermedades, incluyendo la nefropatía crónica post-trasplante, la oclusión tardía de by-pass y la vasculopatía coronaria post-trasplante, la desorganización de la estructura de la pared vascular se manifiesta mediante la hiperplasia de la túnica íntima (Figura 1). En el contexto de la presente invención, hiperplasia se refiere a cualquier engrosamiento valorable de la capa íntima (más allá de una monocapa celular) Ultraestructuralmente, se observa en la íntima hiperplásica, un aumento de componentes del tejido conectivo, específicamente de la matriz celular, incluyendo colágeno, proteoglicanos y fibras elásticas, así como el incremento en el número de células de origen mesodérmico. Las células que se pueden encontrar en la íntima hiperplásica incluyen, aparte de células endoteliales monocapa, células del sistema inmune y células del músculo liso cardiovascular. Estas últimas, ausentes de la túnica íntima en situaciones fisiológicas, han sufrido procesos de migración celular y proliferación en la túnica íntima. Debido a esta actividad celular, que conlleva la secreción de matriz celular, se produce el citado engrosamiento y, consecuentemente, la reducción de la luz vascular. En el contexto de la presente invención, el término restenosis se refiere a esta reducción en diámetro de la luz vascular. La restenosis es una consecuencia de la desorganización de la pared vascular y es por tanto común a muchas enfermedades vasculares, incluyendo la nefropatía crónica post-trasplante, la oclusión tardía de by-pass y la vasculopatía coronaria post-trasplante. En el contexto de la presente invención, por tanto, enfermedades equivalentes a la nefropatía crónica post-trasplante, la oclusión tardía de by-pass y la vasculopatía coronaria post-trasplante son aquellas que presentan una desorganización de la estructura de la pared vascular que se manifiesta mediante hiperplasia de la íntima y provoca un estrechamiento de la luz vascular o restenosis. En el contexto de la presente invención, se considera asimismo que estenosis y restenosis son términos equivalentes entre si y se refieren a una obstrucción $\geq 50\%$ de la luz vascular en un segmento dado.

A continuación se detallan las instrucciones y procedimientos para el adecuado uso de sustancias bloqueadoras de Kv1.3 en terapias contra enfermedades relacionadas con la hiperplasia de la íntima. Este documento recoge en sus diferentes secciones las enseñanzas para que el experto en la técnica pueda identificar este tipo de enfermedades y las sustancias que ejercen como bloqueadoras de los canales Kv1.3. Los bloqueadores del canal Kv1.3 han de ser capaces de disminuir de forma dependiente de la dosis el flujo de corriente a través de estos canales, evocado por un pulso de voltaje despolarizante. La presente solicitud describe en el Ejemplo 1 uno estos procedimientos conocidos.

Para demostrar que una sustancia actúa como bloqueadora de los canales Kv1.3, el experto en la técnica utiliza un sistema de expresión heterólogo. En el campo de la técnica se han descrito, y están disponibles, algunas líneas celulares estables que expresan el canal Kv1.3 por ejemplo las descritas en *Grissmer et al., Mol. Pharmacol 44, 1227-34, 1994*. Estas u otras células equivalentes se pueden solicitar a sus inventores.

Alternativamente, el experto en la técnica conoce las técnicas apropiadas para desarrollar un sistema heterólogo de expresión en mamíferos. Para ello, puede comprar alguna línea celular de la colección de células de ATCC, como por ejemplo las células HEK293 (Human Embryonic Kidney, n.º catálogo ATCC CRC-1573), las células CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary, n.º catálogo ATCC CCL-61) o las células COS-7 (fibroblastos de riñón de mono, n.º catálogo ATCC CRC-1651) comercializadas en Europa a través de LGC Standards, UK. A modo de ejemplo, el canal Kv1.3 se puede expresar en las células HEK293 mediante transfección con Lipofectamina de un plásmido apropiado para expresión en mamíferos, que contenga el ADNc de la secuencia codificante del canal Kv1.3. Opcionalmente, el experto en la técnica puede realizar una co-transfección con moléculas marcadoras para identificar las células que expresan efectivamente el canal transfectado.

La utilización de experimentos como el descrito en el ejemplo 1, ha permitido en el campo de la técnica la identificación de un gran número de compuestos descritos como bloqueadores de los canales Kv1.3 Algunos de estos compuestos y sus respectivas afinidades por el canal Kv1.3 se especifican en la tabla 1:

Tabla 1. Valores de Kd para péptidos y pequeñas moléculas bloqueadores de los canales Kv1.3. Abreviaturas: 4-AP, 4-aminopiridina; ShK-Dap22, toxina *Stichodactyla helianthus* con el ácido diaminopropiónico en posición 22 sustituyendo a la Lys nativa; ShK-F6CA, *Stichodactyla helianthus* toxina-ácido fluorescein-6-carboxílico; TEA, cloruro de tetraetilamonio. (Datos tomados de *Schmitz et al., Mol Pharmacol 2005, 68:1254-1270*; *Chandy et al., TIPS 2004, 25: 280-288*; *Abdel-Mottaleb et al., Toxicon 2008, 51:1424-1430*; *Shijin Y et al., Peptides 2008, 29:1514-1520*).

5

Sustancia Bloqueadora	Afinidad (Kd)
Toxina <i>Stichodactyla helianthus</i> (ShK)	11 pM
Toxina <i>Heterometrus spinnifer</i> 1	12 pM
ShK-F6CA	48 pM
Toxina <i>Pandinus imperator</i> 2	50 pM
ShK-Dap22	52 pM
Hongotoxina	86 pM
Margatoxina	110 pM
Agiotoxina-2	200 pM
Toxina <i>Pandinus imperator</i> 3	500 pM
Kaliotoxina	650 pM
Toxina <i>Buthus martensii</i> Karsch (J123 péptidos)	790 pM
Noxiustoxina	1 nM
Pap-1	2 nM
Psora4	3 nM
Charybdotoxina	3 nM
Titystoxin-K α	4 nM
Toxina <i>Odonthobthus doriae</i> 2 (OdK2)	7 nM
Toxina <i>Pandinus imperator</i> 1	11 nM
Toxina <i>Bunodosoma granulifera</i>	39 nM
trans-N-propil-carbamoiloxi-PAC	50 nM
Correolide	90 nM
Sulfamidobenzamidoindano	100 nM
Maurotoxina	150 nM
CP339818	150 nM
WIN173173	200 nM
UK78282	200 nM
Dendrotoxina	250 nM
PAC	270 nM
Toxina <i>Parabuthus</i> 3	492 nM

(continuación)

Sustancia Bloqueadora	Afinidad (Kd)
Toxina Parabuthus 1	800 nM
Resiniferatoxina	3 μ M
Nifedipino	5 μ M
Nitrendipino	5 μ M
Ibu8	5 μ M
Fenciclidina	5 μ M
Verapamilo	6 μ M
H37	10 μ M
Hg ²⁺	10 μ M
Quinina	14 μ M
Cicutotoxina	18 μ M
La ³⁺	20 μ M
Trifluoperazina	20 μ M
Capsaicina	26 μ M
Diltiazem	27 μ M
Progesterona	30 μ M
κ -Hefutoxina	40 μ M
Luteolin	50 μ M
Flecainida	60 μ M
4-AP	190 μ M
Zn ²⁺ , Co ²⁺	200 μ M
Ba ²⁺ , Cd ²⁺	2 mM
TEA	10 mM
Mn ²⁺	20 mM

5 Los bloqueadores descritos anteriormente se pueden utilizar, según la presente invención, en la fabricación de una herramienta farmacológica que puede ser comúnmente un medicamento que contiene cualquier excipiente farmacológicamente aceptable y el bloqueador de Kv1.3 como principio activo, solo o en combinación con otros principios activos. La presente invención comprende todas las dosis efectivas en cualquiera de las enfermedades comprendidas, así como cualquiera de los procedimientos de administración posibles independientemente de la raza, género, biotipo, peso o edad del individuo a tratar.

10 Una aplicación directa de la presente invención es el desarrollo de un nuevo procedimiento para la prevención y el tratamiento de enfermedades vasculares que son consecuencia de la desorganización de la estructura normal de la pared vascular. Este procedimiento consiste en la administración o el implante de una herramienta farmacológica que comprende al menos un principio activo de efecto bloqueador de los canales Kv1.3. Preferentemente, el procedimiento de la presente invención consiste en la administración de un bloqueador de los canales Kv1.3 del grupo de la margatoxina, toxina ShK, psoralen, kaliotoxin, correolide, J123 y derivados y combinaciones de los mismos. Muy preferentemente, las sustancias bloqueadoras comprenden las toxinas ShK-L5 o PAP-1. El ejemplo 4,

15

las figuras 6, 7 y 8 ilustran el efecto de estas toxinas sobre las CMLV y el ejemplo 5 describe el protocolo de administración.

Otra aplicación importante de la presente invención consiste en el diseño y elaboración de un sistema que permita la liberación controlada de la sustancia bloqueadora de Kv1.3, tal como un stent recubierto con un biopolímero, donde se encuentra alojado el bloqueador para su liberación paulatina. El ejemplo 5 describe los pormenores de esta aplicación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo para determinar si una sustancia es bloqueadora de los canales Kv1.3.

Para evaluar si una sustancia es capaz de disminuir, de forma dependiente de la dosis, el flujo de corriente a través de los Kv1.3 (es decir, si es una bloqueadora de Kv1.3). Las corrientes a través de los canales Kv1.3, expresados en el sistema heterólogo, se estudiaron mediante la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera. Las corrientes se registraron a temperatura ambiente (21-25°C). Las células, colocadas en una cámara de registro situada en un microscopio invertido, se perfundieron con una solución salina fisiológica (en mM: 141 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 10 glucosa y 10 HEPES (pH 7,4 con NaOH)). Las pipetas de registro se fabricaron a partir de vidrio de borosilicato (2,0 mm OD, WPI) con un estirador de pipetas (Narishige PP-83) para que tengan resistencias entre 2 y 5 MΩ al rellenarlas con una solución interna que contiene (en mM) 125 KCl, 4 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, 5 MgATP; (pH 7,2 con KOH). Las corrientes de célula entera se registraron con un amplificador Axopatch 200 o equivalente, filtrando a 2 kHz y muestreando a 10 kHz. Los registros se digitalizaron con una interfase Digidata 1200 A/D comandada por el software CLAMPEX 8 software (Axon Instruments) o un sistema equivalente, en un ordenador. Las células se mantuvieron a un potencial de reposo de -80 mV y desde ahí se aplicaron pulsos despolarizantes de 200 ms de duración desde -60 mV hasta +80 mV en intervalos de 10 mV cada 15 segundos. De esta forma el experto pudo construir una curva corriente-voltaje para el canal Kv1.3.

La figura 3 muestra un ejemplo de este tipo de experimentos. Como se puede observar, la aplicación de PAP-1 a una concentración de 10 nM produjo una reducción de la corriente de en torno a un 80-85% para potenciales desde +10 hasta +80 mV. El efecto de pulsos despolarizantes repetitivos desde -80 mV hasta +40 mV aplicados cada segundo se evaluó con el fin de caracterizar la inactivación acumulativa característica de las corrientes Kv1.3. Las potenciales sustancias bloqueadoras se aplican disueltas en la solución externa, para estudiar el efecto de su aplicación con los protocolos descritos arriba y conocidos en el campo de la técnica, de forma que se puedan caracterizar los posibles efectos de estas sustancias sobre la amplitud de la corriente, el curso temporal y la dependencia de voltaje de su activación e inactivación.

Al observar modificaciones en alguno de estos parámetros por la aplicación de un bloqueador putativo, ha de procederse al análisis de la curva dosis-respuesta del efecto bloqueador, así como de la reversibilidad del efecto tras el lavado del bloqueador. El análisis cuidadoso de la velocidad de instauración y lavado de los efectos permite obtener una estimación de la constante de afinidad de la sustancia por el canal.

Tomando el valor de la amplitud de la corriente a un voltaje determinado (por ejemplo +40 mV) en ausencia de bloqueador como la corriente total (100%) se puede definir la reducción porcentual de la amplitud de la corriente en presencia del bloqueador como un valor entre 0 y 1 (corriente con sustancia en análisis en el medio /corriente control). Si existe una reducción de la corriente en presencia de la sustancia en análisis, se construye una curva dosis-respuesta para tratar de definir la IC₅₀ (o Kd) del bloqueo de la corriente Kv1.3 por la sustancia en análisis.

Para determinar la especificidad de las sustancias que se definen, así como los bloqueadores del Kv1.3, se utiliza el mismo tipo de estrategia experimental.

Ejemplo 2

Modificación de la expresión de los canales Kv1.3 en CMLV de arterias femorales de ratón con fenotipo proliferativo.

Se estudiaron los cambios en la expresión de los canales Kv1.3 comparando CMLV de arterias femorales de ratón en fenotipo contráctil y proliferativo. El fenotipo contráctil son las células aisladas directamente de la capa media de la arteria femoral, y el efecto del cambio fenotípico se estudió en dos modelos de proliferación diferentes: un modelo *in vivo* en el que la hiperplasia de la íntima se induce por lesión endoluminal con el procedimiento previamente descrito (Roqué et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 335-342, 2000) y un modelo *in vitro* en el que se obtienen CMLV en cultivo a partir de explantes de arteria femoral de ratón (Miguel-Velado et al., *Circ Res* 97, 1280-1287, 2005).

Los ratones BPN se obtuvieron de Jackson Laboratories y se mantuvieron mediante cruces endogámicos en el animalario de la Facultad de Medicina o el animalario del IDIBAPS, en condiciones controladas de temperatura (21°C) con ciclos de 12h de luz y oscuridad y con libre acceso a agua y comida.

Para aislar las CMLV (modelo de células en fenotipo contráctil), los animales se sacrificaron por decapitación tras

anestesia con isoflurano (5 % a 2,5 l O₂ min⁻¹). Las arterias femorales se disecaron y se retiró el tejido conectivo y endotelial y se obtuvieron las células mediante una dispersión enzimática con el protocolo previamente descrito (Miguel-Velado et al., *Circ Res* 97, 1280-1287, 2005).

5 Para obtener las CMLV en cultivo (modelo de fenotipo proliferativo *in vitro*), pequeños fragmentos (0,5 mm) de arterias femorales limpias de endotelio y conectivo se colocaron en placas de cultivo Petri de 35 mm cubiertas de 2% gelatina (Tipo B, Sigma) en un medio de cultivo DMEM con 20% de suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomycin y 2 mM L-glutamina a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂. La migración y proliferación de CMLV a partir de estos explantes fue evidente a los 6-10 días, pero los explantes se mantuvieron hasta que la monocapa de CMLV se hizo confluyente. En este momento, mediante raspado mecánico con una espátula de goma las células se soltaron y se sembraron en una nueva placa de cultivo a 1/3 de su densidad original. Las CMLV se sometieron de esta forma a varios pases (3-4) sin mostrar cambios morfológicos aparentes.

10 Finalmente, para el modelo de proliferación *in vivo*, a la edad de 12-16 semanas los ratones BPN se sometieron a lesión transluminal unilateral de la arteria femoral mediante el pase repetido de un catéter de angioplastia de 0,25 mm de diámetro siguiendo el protocolo previamente descrito (Roqué et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 335-342, 2000). Al cabo de 48 h, 1 semana o 4 semanas los ratones se sacrificaron mediante sobredosis de pentobarbital para extraer las arterias femorales controles y lesionadas.

15 El estudio de la expresión de los canales Kv1.3 en estas tres preparaciones experimentales se llevó a cabo determinando los niveles de ARNm del Kv1.3 mediante PCR a tiempo real (Figura 4) y la expresión de la proteína del Kv1.3 mediante inmunohistoquímica en CMLV en fenotipo contráctil y CMLV en cultivo o inmunocitoquímica en secciones de arterias femorales fijadas, para el modelo de proliferación *in vivo* con un anticuerpo anti-Kv1.3 (clon L23/27 de Neuromab UC Davis NIH and Antibodies Inc.) y marcado con un anticuerpo secundario fluorescente (Figura 5). El procesamiento de las muestras y la extracción de ARN se realizó con los protocolos previamente descritos (Miguel-Velado et al., *Circ Res* 97, 1280-1287, 2005) y los niveles de ARNm se determinaron utilizando sondas Taqman para el Kv1.3 que se obtuvieron de Applied Biosystems.

20 Para la inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-Kv1.3, las CMLV recién disociadas o en cultivo se sembraron en cubres de vidrio de 12 mm de diámetro, se fijaron con 4% de paraformaldehído en bufer de fosfato a pH 7,5 durante 15 minutos a 20°C, se lavaron con PBSTx (PBS 0,1% Tritón X-100) y se bloquearon con PBSTx conteniendo 10 mg/ml de albúmina bovina y 2% de suero de cabra no inmune durante 10 min. El anticuerpo anti-Kv1.3 se diluyó en la solución de bloqueo a una concentración 1:100 durante 40-60 min a 21°C. Después de tres lavados de 5 minutos en PBSTx las células se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 488 goat anti-mouse de Molecular Probes) a una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo durante 30 minutos. Tras otros tres lavados con PBSTx los cubres se montaron con VectaShield H100-DAPI (vector Labs) y las células se examinaron en un microscopio de fluorescencia Nikon con un filtro de longitud de onda de 488 nm.

25 Para los estudios de inmunohistoquímica, los animales eutanizados se fijaron con perfusión intravenosa de 4% de paraformaldehído en PBS durante 5 minutos a 100 mmHg para obtener secciones de parafina de las arterias femorales tal y como está descrito (Roqué et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 335-342, 2000). Las secciones fueron posteriormente desparafinadas, rehidratadas y tratadas con 1% de ácido cítrico y bloqueadas con 3% de peróxido de hidrógeno (DakoCytomatation) antes de la incubación con el anticuerpo primario durante 12h a 4°C. Después, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa (DakoCytomatation) durante 30 minutos a temperatura ambiente y la señal se detectó utilizando 3,3 diaminobencidina (DakoCytomatation). Tras lavar las secciones en agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina (Roqué et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 335-342, 2000) y se observaron al microscopio.

30 Finalmente, tanto en las CMLV en fenotipo contráctil como las CMLV en cultivo se estudió la contribución funcional de los canales Kv1.3 a las corrientes de membrana mediante la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera con los protocolos previamente descritos (véase ejemplo 1 y también Miguel-Velado et al., *Circ Res* 97, 1280-1287, 2005). Los bloqueadores utilizados fueron correolide en una concentración 10µM (generosamente proporcionado por los laboratorios Merck), Margatoxina 10 nM (obtenida de Alomone labs) (Figura 6) y PAP-1 10 nM (obtenido de Sigma). Las drogas se prepararon a las concentraciones finales indicadas en la solución salina del baño siguiendo las instrucciones de los proveedores y se aplicaron a las células durante un periodo de 1-2 min. Se registraron las corrientes antes de aplicar la droga (control) y en presencia de la droga, y se calculó el porcentaje de reducción en la amplitud de las corrientes inducido por los distintos bloqueadores.

Resultados:

35 El análisis de la expresión del ARNm del canal Kv1.3 muestra un aumento muy significativo de los niveles de expresión en las dos condiciones de proliferación (cultivo y lesión endoluminal) con respecto a las células contráctiles tal y como se ilustra en la figura 4.

El estudio de la expresión de la proteína Kv1.3 mostró que mientras que sólo una pequeña fracción de las CMLV en fenotipo contráctil se marcaban con el anticuerpo frente al Kv1.3, la práctica totalidad de las CMLV en cultivo mostraban un marcaje intenso (Figura 5, panel A). Resultados similares se obtuvieron con la inmunohistoquímica

con el anticuerpo anti-KKv1.3 en secciones de arterias femorales (Figura 5, panel B). El marcaje en las arterias controles, sin lesión y por tanto con CMLV en fenotipo contráctil, fue escaso y limitado a la capa media, mientras que tras la lesión endoluminal se observa un aumento de la proliferación (la hiperplasia de la íntima) y un aumento del número de células inmunopositivas tanto en la neointima como en la capa muscular. La cuantificación de varios experimentos realizados en diferentes animales confirmó un aumento significativo del área marcada en las arterias lesionadas (Figura 5, panel B).

Finalmente, el estudio de la expresión funcional de los canales Kv1.3 registrados con técnicas electrofisiológicas nos permitió confirmar que este aumento de la expresión del ARNm y la proteína del Kv1.3 en CMLV en fenotipo proliferativo refleja un aumento de la expresión funcional de los canales, ya que las corrientes mediadas por el Kv1.3 fueron significativamente mayores en CMLV en cultivo que en CMLV recién disociadas, contráctiles (Figura 6).

Tal como se aprecia en el panel B de la figura 6, el efecto de estos bloqueadores (y por tanto la fracción de la corriente que representan los canales Kv1.3) fue significativamente mayor en las CMLV en cultivo en todos los casos. Por ejemplo, en el caso de la Margatoxina, la corriente bloqueada por esta droga fue el $10,6 \pm 2,03$ de la corriente Kv en las CMLV contráctiles y el $58,15 \pm 4,54$ de la corriente Kv en las CMLV en cultivo, y en el caso del PAP-1 (es decir, los canales Kv1.3 contribuyen al 10% de la corriente total en las células diferenciadas y casi el 60% de la corriente total en las células en cultivo).

Todos estos datos en su conjunto apuntan a un aumento de la contribución de estos canales a las corrientes de las CMLV proliferantes, y evidencian que estos canales podrían representar valiosas herramientas terapéuticas para el bloqueo de la proliferación ya que el aumento en su expresión participa en los cambios que llevan a las CMLV a proliferar.

Ejemplo 4

Efecto del bloqueo específico de canal Kv1.3 con Margatoxina y con PAP-1 sobre la velocidad de migración y proliferación de las CMLV en cultivo.

Procedimientos: Los estudios de migración se han realizado en cultivos de células de músculo liso obtenidas a partir de explantes de arterias uterinas humanas confluentes, mantenidas en un medio de cultivo DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino, 100U/ml de penicilina y estreptomycinina y 2 mM de L-glutamina a 37°C en un incubador humidificado con una atmósfera de 5% CO₂. En estos cultivos, mediante la punta de una pipeta P10 estéril se rasca una pequeña superficie de la monocapa creando un espacio sin células y se dejan 24-48 h en el mismo medio de cultivo pero sin suplementar con suero fetal bovino para bloquear la proliferación. El área de la superficie sin células creada por la punta de la pipeta se cuantificó mediante el software de análisis de imagen del programa Image J, midiéndolo a 0, 24 y 48 h. El área libre de células a 0 h se toma como control y el área a 24 o 48 h se expresa como fracción del área control, lo que nos permite determinar el grado de migración como el porcentaje de área libre de células a las 24 o 48 h respecto del área libre de células a las 0h (el 100%). Se estudió la migración en estos cultivos en situación control y en presencia de margatoxina (10 nM) o PAP-1 (10 nM). Las drogas se preparan en solución salina estéril a una concentración de 10 µM y se añaden al medio de cultivo sin suero (1 µl/ml para obtener la concentración final de 10 nM).

Para los estudios de proliferación hemos determinado la fracción de células que incorporan 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). La BrdU es un análogo de la timidina que se puede incorporar en su lugar durante la fase de síntesis del ciclo celular. Las células que han incorporado BrdU se pueden detectar mediante observación al microscopio de fluorescencia al utilizar un anticuerpo monoclonal frente a esta molécula y un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. El ensayo se realizó con un kit comercial (5-Bromo-2'-deoxy-uridine labeling and Detection Kit I; Roche Applied Science, Germany). Las células de músculo liso de arteria uterina humana se dejaron crecer durante 48 h en cubres de cristal de 12 mm de diámetro en medio DMEM suplementado con suero y antibióticos como se ha descrito anteriormente, hasta conseguir una confluencia cercana al 50%. En este momento, los cubres se mantienen durante 24 h a 37°C y en atmósfera de 5% CO₂ en medio de cultivo con 5% de suero fetal bovino (control), medio con 5% de suero y 10 nM de PAP-1 y medio con 5% de suero y 10 nM de Margatoxina, tras lo cual se realiza el ensayo de incorporación de BrdU siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para cuantificar los resultados, se cuentan en 10-20 campos en cada experimento el número de células positivas para BrdU respecto al número total de células en el campo (que se determina marcando los núcleos con el colorante fluorescente DAPI).

Resultados: La migración de las CMLV de arteria uterina se redujo significativamente en presencia de estos bloqueadores de los canales Kv1.3. La figura 7 muestra en los paneles de la izquierda las imágenes tomadas en un cultivo representativo, en el cual se estudió el efecto de estas dos drogas sobre la migración de las CMLV a 24 h, así como resultados promedio (panel derecho).

En relación con los experimentos de proliferación, observamos también una disminución en la fracción de células marcadas con BrdU en los grupos tratados con los bloqueadores del canal Kv1.3, indicando que el bloqueo del canal inhibe la proliferación (véase figura 8).

Estos resultados indican que de nuevo el aumento de la expresión del Kv1.3 está asociado a la proliferación y migración de las células en esta preparación, en la cual nuestros resultados previos mostraban que, al igual que en las CMLV de arteria femoral de ratón, la proliferación induce un aumento en la expresión de Kv1.3 tanto a nivel de ARNm como de proteína (Miguel-Velado et al., Circ Res 97, 1280-1287, 2005).

5 Ejemplo 5 (profético)

Modelo animal porcino para el tratamiento de la restenosis

Procedimientos: Se utilizan stents de acero inoxidable expansibles (Cordis Co) de 18 mm de largo recubiertos de una fina capa de un copolímero de poli-n-butil metacrilato y polietilen-vinil acetato conteniendo 200 µg de PAP-1 o 200 µg de ShK-L5. El peso total del polímero con la droga está en torno a 500µg y la relación droga: polímero es de un 30%. Los stents se empaquetan de forma individual, se codifican con un código de barras (para hacer un experimento doble ciego) y se esterilizan con óxido de etileno.

36 stents (12 con el polímero sólo, 12 con PAP y 12 con ShK) se implantan en 12 cerdos jóvenes (25-35 kg) en las ramas descendente anterior o circunfleja de la arteria coronaria izquierda o en la arteria coronaria derecha (a razón de 3 stents por animal). Los animales se recuperan de la operación y se devuelven al animalario donde reciben una dieta normal suplementada con aspirina (325 mg/d). Se obtienen muestras de sangre de los animales a las 6, 12, 24, 48 y 96 horas para determinar los niveles plasmáticos de PAP y ShK. A los 7 (n=4) o 28 días (n=8) los animales se eutanizan tras la realización de una arteriografía coronaria para el análisis cuantitativo. En un animal de cada grupo (7 y 28 d), tras la eutanasia se disecan las arterias coronarias, se retira el stent y se congelan las muestras en nitrógeno líquido, para determinación de distintos marcadores mediante western-blot de los tejidos y para determinaciones de los niveles de PAP y ShK en la pared arterial. En el resto de los animales, inmediatamente después de la eutanasia, se colectan los corazones y las arterias coronarias se fijan por perfusión de formalina al 10% durante 30 min. A continuación los vasos coronarios se disecan y se procesan para su análisis inmunohistológico y morfométrico realizando secciones de la zona donde se sitúa el stent y los márgenes superiores e inferiores.

Se realiza un análisis morfométrico midiendo el grado de endotelización de la zona del stent, el contenido de CMLV en la íntima y su grosor en relación con el grosor del vaso y el área de la luz (véase figura 9).

Los estudios farmacocinéticos muestran que los niveles de PAP-1 y ShK en sangre son máximos en la medida inicial a las 6 horas tras el implante del stent (en torno a 3 ng/ml) y disminuyen y se mantienen debajo del límite de detección a los 4 días (<0,2 ng/ml). El contenido de PAP y ShK en el tejido arterial es de 97 y 83 ng/arteria a los 7 días y de 30 y 25 ng/arteria a los 28 días.

Los estudios morfométricos indican que no se observan diferencias en el nivel de endotelización entre los stents controles y los stents con los bloqueadores. Sin embargo, el número de CMLV en la íntima se redujo significativamente en las arterias con los stents tratados con PAP y ShK, al igual que se redujo el grado de estenosis (45% en control frente a 27% en presencia de PAP-1 y 26.2% con ShK) y el área de la íntima (5,07 mm² en control frente a 2,23 mm² con PAP-1 y 2,06 mm² con ShK).

Las determinaciones de la expresión de proteínas marcadoras de la formación de la íntima como PCNa y pRb y de marcadores de inflamación como IL6 se realizan mediante Western-blot y se cuantifican por densitometría. Los resultados muestran de nuevo una disminución significativa de la presencia de todos estos marcadores en los segmentos arteriales donde se colocan los stents con los bloqueadores del Kv1.3, en los que los niveles de estas proteínas representan entre un 30 y un 50% de los niveles que se observan en las zonas donde se colocan los stents controles.

Los resultados indican que el procedimiento es eficaz para reducir la proliferación de la íntima y la respuesta inflamatoria sin producir reacciones alérgicas o inmunológicas locales. Asimismo, el sistema de liberación de los bloqueadores produce sus efectos localmente pero los niveles circulantes son indetectables, reduciendo la posibilidad de efectos secundarios. Este tipo de enfoque se podría plantear para su uso en seres humanos.

REIVINDICACIONES

1. Uso de PAP-1, como sustancia bloqueadora de los canales Kv1.3, en la fabricación de una herramienta farmacológica para el tratamiento de enfermedades vasculares relacionadas con la hiperplasia de la intima.
2. Uso según la reivindicación 1, que comprende PAP-1 y al menos un excipiente farmacológicamente aceptable.
- 5 3. Uso según la reivindicación 1, en el que dichas enfermedades vasculares comprenden, restenosis, nefropatía crónica post-trasplante, oclusión tardía de by-pass, vasculopatía coronaria post-trasplante y las equivalentes y combinaciones de las mismas.
4. Dispositivo de dosificación para implante en un vaso arterial de un animal, incluyendo un ser humano, que comprende un sistema contenedor que contiene PAP-1.
- 10 5. Dispositivo de suministro según la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento de restenosis, nefropatía crónica post-trasplante, oclusión tardía de by-pass, vasculopatía coronaria post-trasplante y las equivalentes y combinaciones de las mismas.

15

20

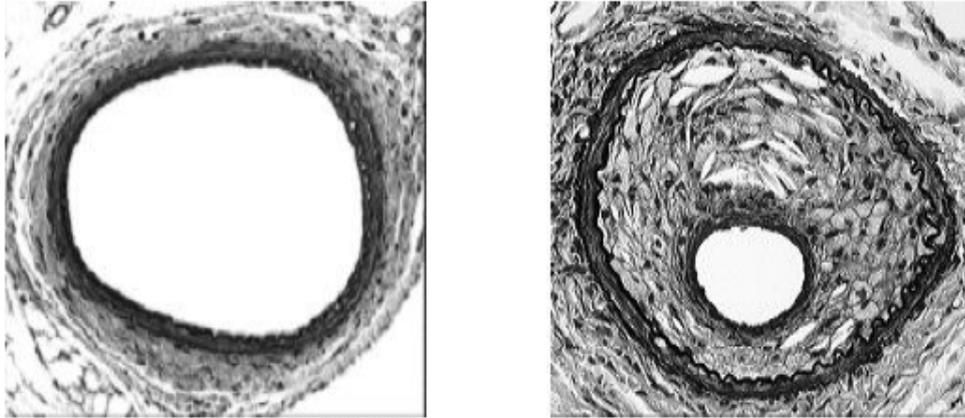


FIG. 1

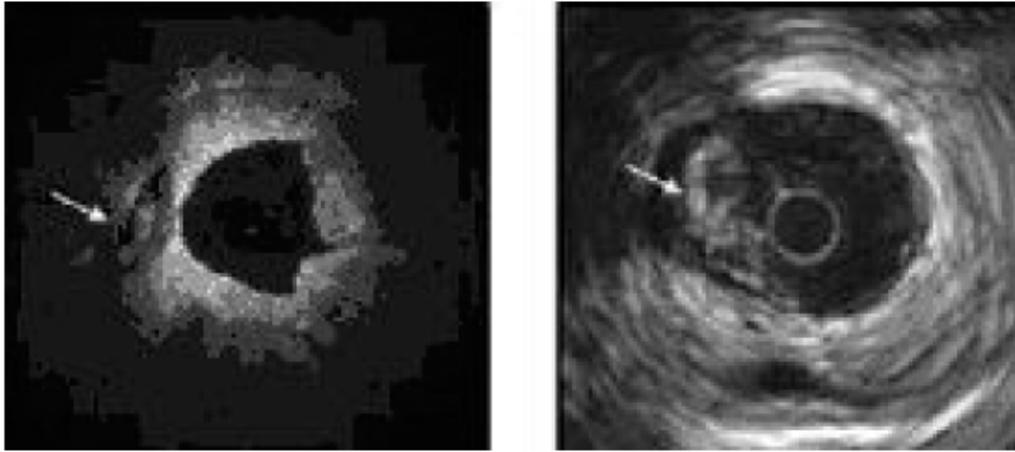


FIG. 2

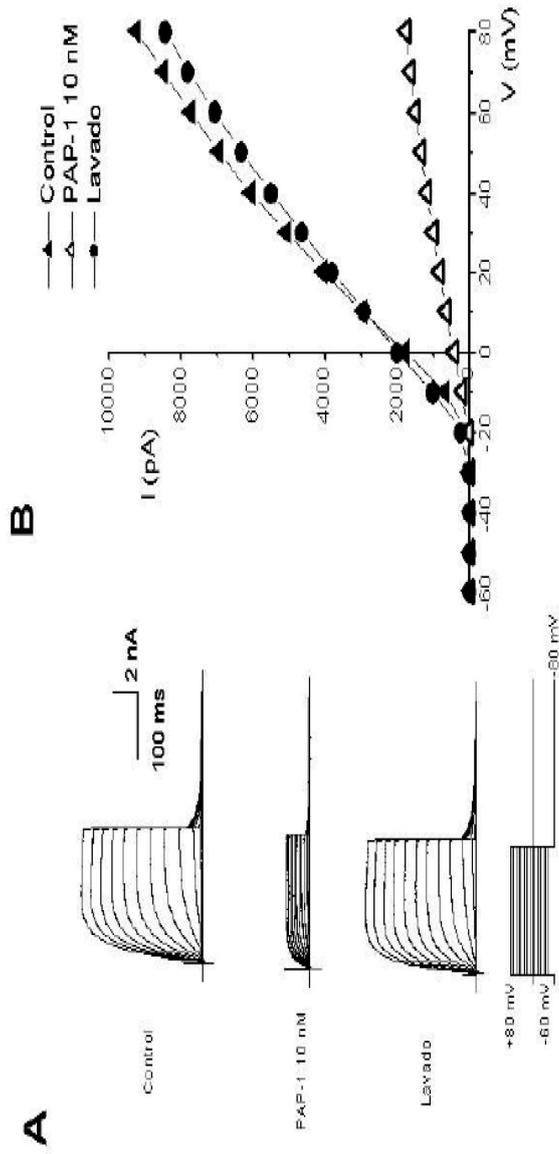


FIG.3

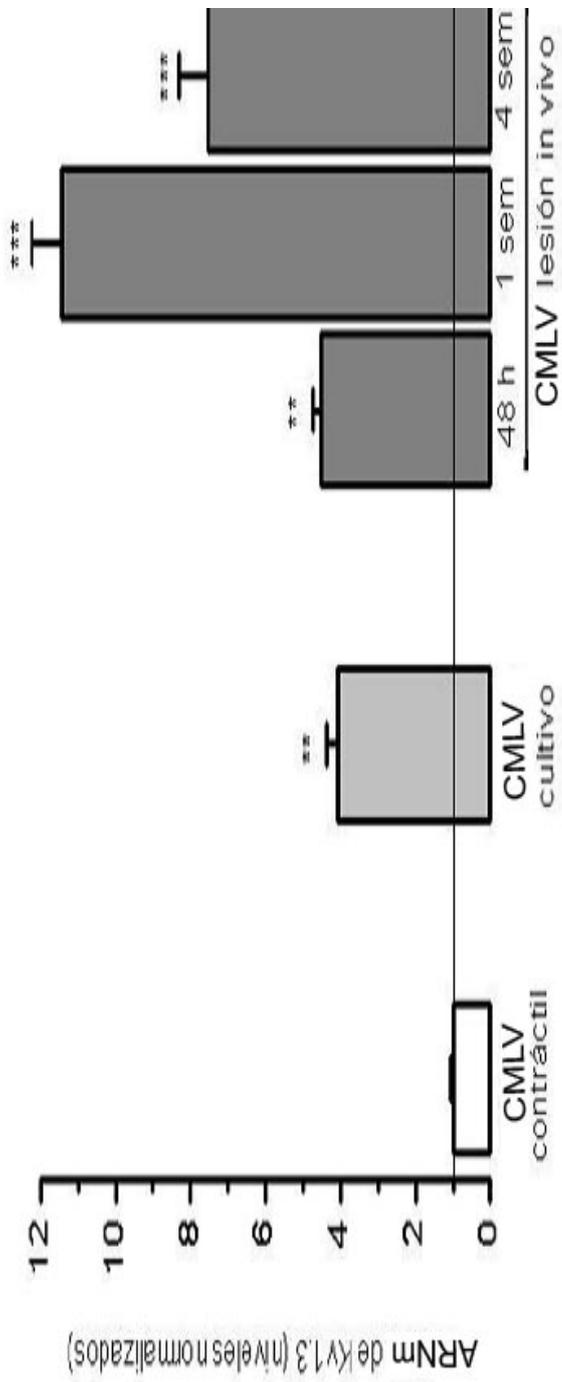


FIG. 4

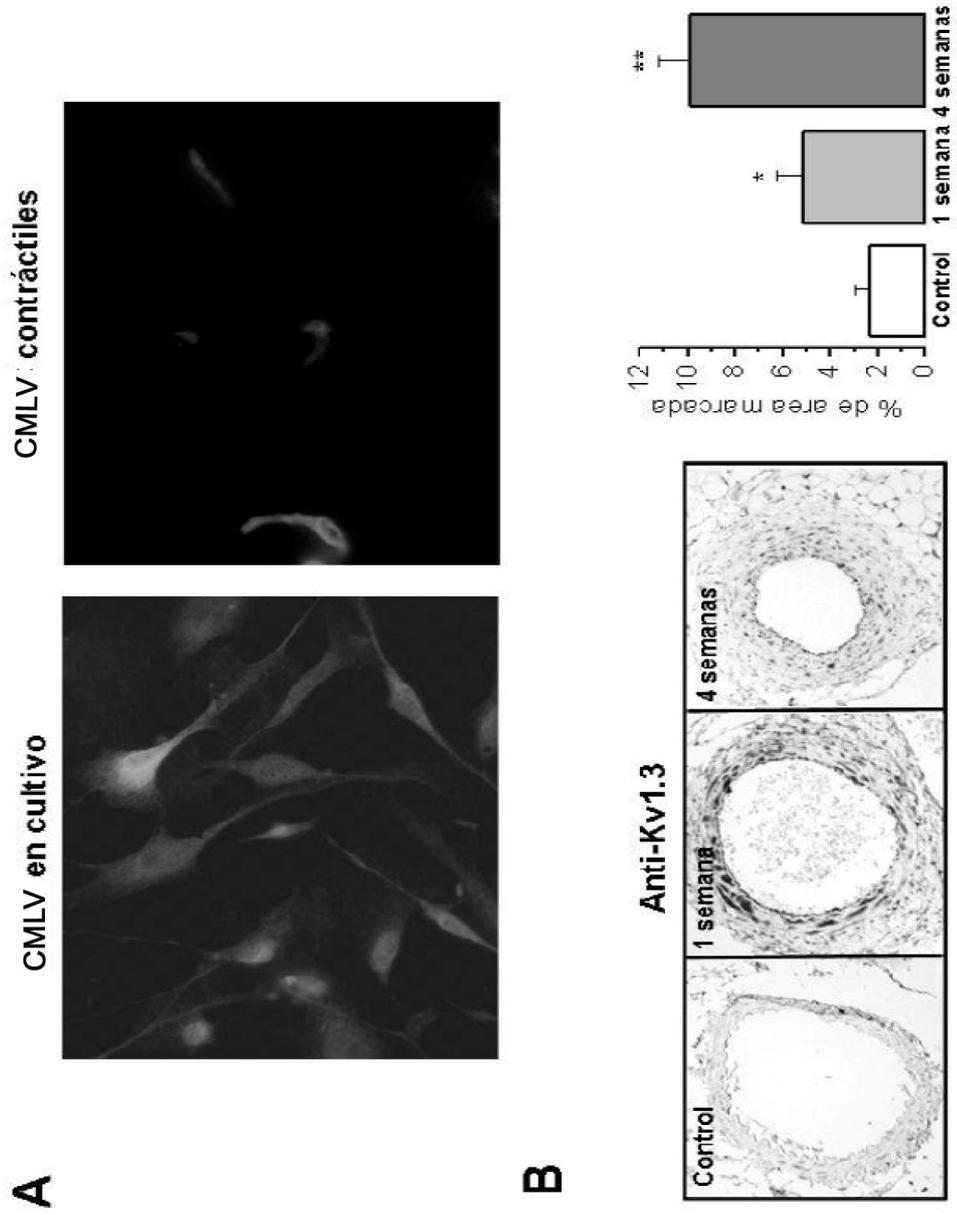


FIG. 5

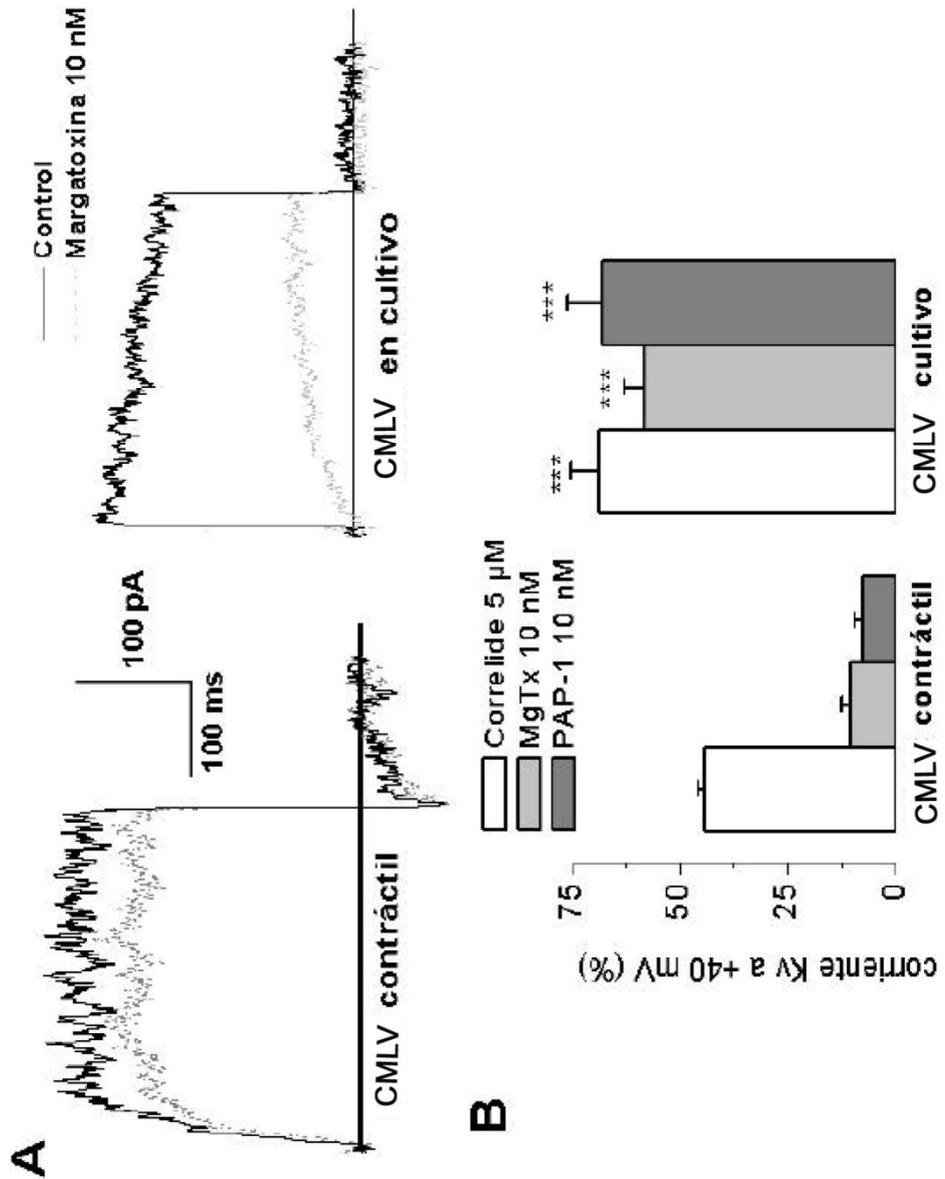


FIG. 6

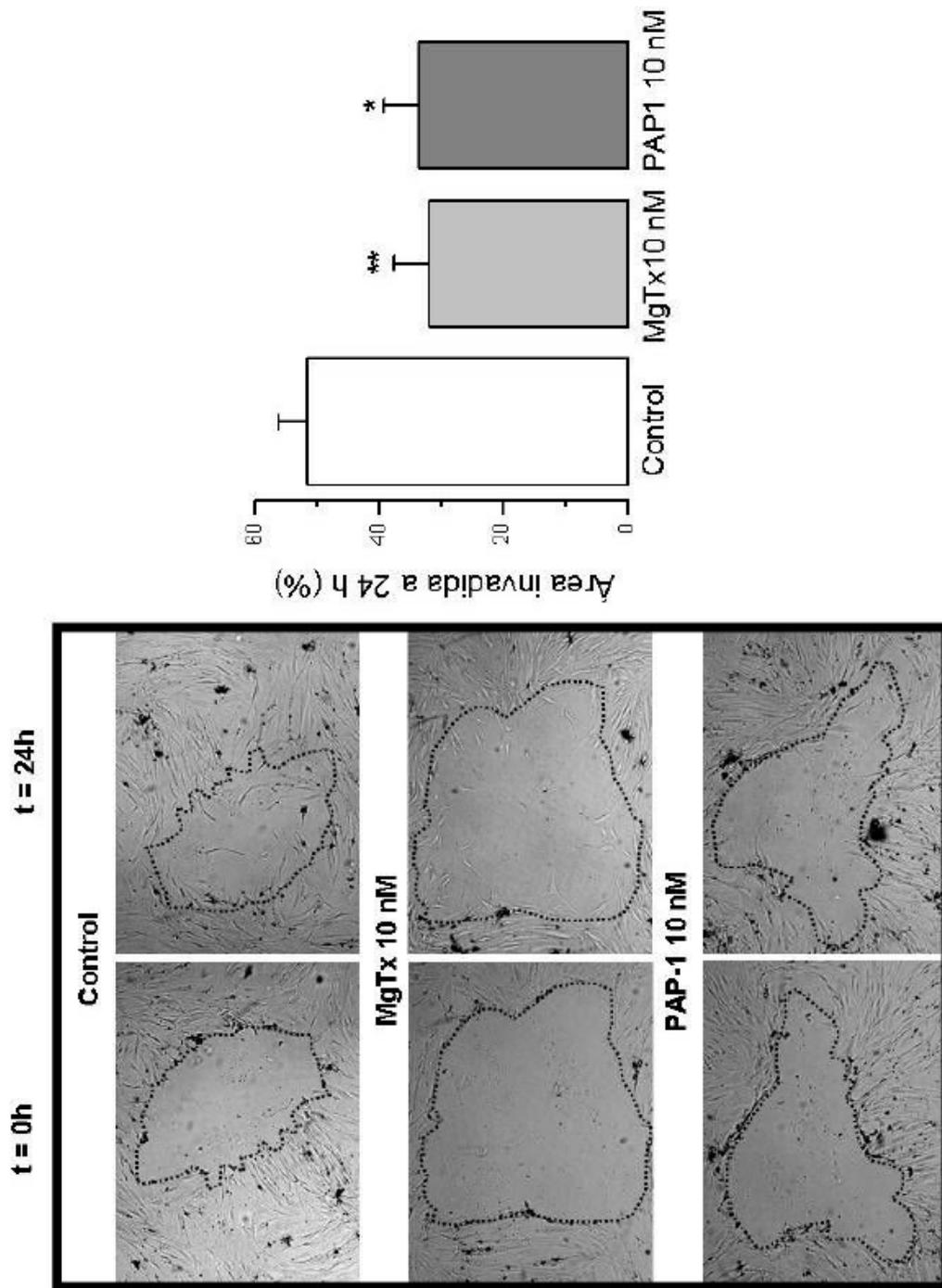


FIG. 7

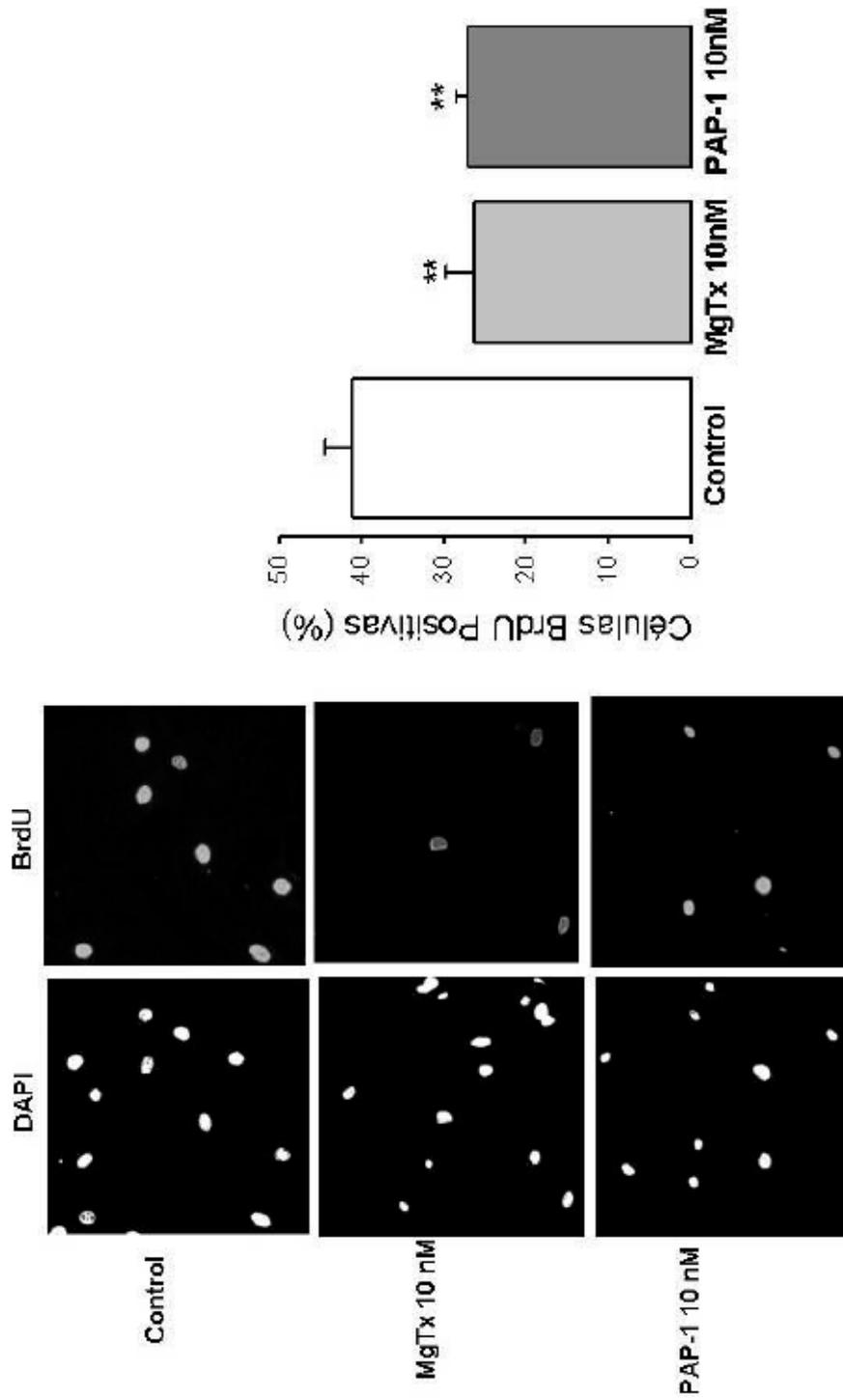


FIG. 8



FIG. 9