

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 708**

21 Número de solicitud: 201301020

51 Int. Cl.:

A61K 31/165 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

25.10.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.04.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (67.0%)

Po. de las Delicias s/n

41013 Sevilla ES;

FUNDACIÓN PÚBLICA ANDALUZA PARA LA

GESTIÓN DE LA INVESTIGACIÓN EN SALUD EN

SEVILLA (1.0%) y

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (32.0%)

72 Inventor/es:

UREÑA LÓPEZ , Juan ;

PORRAS GONZÁLEZ , Cristina y

GONZÁLEZ MONTOLONGO, María Del Carmen

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Composiciones y preparaciones combinadas para el tratamiento del vasoespasmio arterial**

57 Resumen:

Composición farmacéutica y preparación combinada que comprende un inhibidor de la proteína quinasa C junto a un inhibidor de Rho quinasa, y/o un inhibidor de los canales de Ca²⁺ tipo L voltaje dependientes, para su uso en la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento del vasoespasmio arterial.

ES 2 534 708 A2

DESCRIPCIÓN

**COMPOSICIONES Y PREPARACIONES COMBINADAS PARA EL
TRATAMIENTO DEL VASOESPASMO ARTERIAL.****CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la Medicina y la Farmacia, y se refiere a una composición y/o una preparación combinada que comprende un inhibidor de proteína quinasa C junto con un inhibidor de Rho quinasa y/o un inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L para el tratamiento del vasoespasmo arterial. Particularmente, se refiere a las composiciones que
- 10 comprenden el inhibidor GFX junto con el inhibidor Y27632 y/o la nifedipina y, a las preparaciones combinadas con inhibidor GFX junto con el inhibidor Y27632 y/o nifedipina, para el tratamiento vasoespasmo arterial.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Las enfermedades cardiovasculares derivadas de la reducción mantenida del diámetro arterial constituyen una causa importante de mortalidad y morbilidad en humanos. La contracción arterial suele estar mediada por un incremento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol ($[Ca^{2+}]_i$) de los miocitos arteriales debido, como factor fundamental, a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+}
- 20 tipo L voltaje dependientes (CCVDs) o a la liberación de almacenes intracelulares. La entrada de Ca^{2+} a través de los CCVDs es un evento muy importante para la vasocontracción, por lo que la inhibición del flujo de Ca^{2+} a través de los CCVDs con calcio antagonistas (CCBs, "Calcium Channels Blockers"), se utiliza desde hace años en el tratamiento de procesos
- 25 fisiopatológicos como la hipertensión, angina y hemorragia subaracnoidea (Abernethy y Schwartz, 1999. *N. Engl. J. Med.* 341:1447-57; Kiriş, T. y Zhang, J.H., 2008. *Springer Wien, New York*). Los CCBs utilizados de forma rutinaria en clínica pertenecen a las familias de las dihidropiridinas (nifedipina), fenilalquilaminas (verapamil) o benzotiazepina (diltiazem), suelen tener efectos
- 30 secundarios que dependen de las dosis utilizadas.

Aunque el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ puede provocar la contracción del músculo liso a través de la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC), este ión puede, además, regular la contracción arterial aunque su concentración permanezca constante. Este mecanismo, denominado “sensibilización a Ca^{2+} de la contracción”, participa en la contracción mantenida debido a la inhibición de la actividad fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) responsable de la relajación arterial. La activación de la ruta RhoA-Rho quinasa (ROCK) y de proteína quinasa C (PKC) constituyen dos vías de sensibilización a Ca^{2+} . La primera vía puede ser activada por una gran variedad de agentes/estímulos vasoactivos como la acetilcolina, angiotensina II, endotelina I, norepinefrina y por la despolarización (Uehata, M. *et al.*, 1997. *Nature* 389, 990-4; Fernández-Tenorio, M. *et al.*, 2011. *Circ. Res.* 108, 1348-57). ROCK inhibe la subunidad reguladora de la MLCP (MYPT1), favoreciendo la contracción del músculo liso. Los inhibidores de ROCK como fasudil e Y27632 suprimen la contracción *in vivo* de arterias en humanos (Kandabashi, T. *et al.*, 2002. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 243-8).

La aplicación intravenosa de Y27632 provoca vasodilatación sistémica (Uehata *et al.*, 1997. *Nature* 389, 990-4) y su administración oral tiene un efecto hipotensor importante en ratas. El fasudil se ha utilizado para tratar el vasoespasmo cerebral después de una hemorragia subaracnoidea (Shibuya, M. *et al.*, 1992. *J. Neurosurgery* 76, 571-7) y previene la isquemia inducida por acetilcolina en pacientes (Masumoto, A. *et al.*, 2002. *Circulation* 105, 1545-7). Existen varias patentes que protegen el uso de diferentes métodos o formas de aplicación de fasudil para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Lampe, J.W. *et al.*, 2010. Patente US2010008968 (A1); Sorensen, S., 2010. Patente US2010204210). Aunque todavía no se ha establecido la dosis óptima de tratamiento de angina estable con fasudil, la eficacia y seguridad de este agente justifica la realización de investigaciones acerca de su uso en ésta y otras patologías cardiovasculares que requieran provocar la relajación arterial.

Otra vía de sensibilización a Ca^{2+} actualmente aceptada requiere la activación de receptores acoplados a proteína G e inhibición de MLCP por PKC a través

de CPI-17 (Somlyo y Somlyo, 2003. *Physiol. Rev.* 83,1325-58; Nobe y Paul, 2001. *Circ. Res.* 88, 1283-90; Eto *et al.*, 2001. *J. Biol. Chem.* 276, 29072-8) provocando el incremento en la fosforilación de MLC y la fuerza contráctil. Aunque ambas cascadas, RhoA/ROCK y PKC provocan la inhibición de MLCP, la fosforilación de ambas proteínas no se lleva a cabo necesariamente en paralelo. En la fase mantenida de la contracción del músculo liso vascular MYPT1 y CPI-17 están fosforiladas, mientras que en la fase inicial, sólo está CPI-17 (Dimopoulos, G.J. *et al.*, 2007. *Circ. Res.* 100, 121-9). Las vías de señalización mediadas por PKC y RhoA pueden ser vías paralelas o pueden interaccionar. RhoA puede activar PKC (Murthy, K.S. *et al.*, 2000. *Am. J. Physiol.* 279, G201-G10), mientras que al contrario, PKC puede activar RhoA (Pang, H. y Bitar, K.N., 2005. *Am. J. Physiol.*, 289, C982-C93).

Atendiendo al estado de la técnica, las actuales terapias farmacológicas usadas en el tratamiento del vasoespasmo arterial presentan efectos secundarios como consecuencia de la dosis utilizada. Por lo tanto, sería necesario disponer de un nuevo compuesto, una nueva composición y/o combinación de fármacos, preferiblemente a dosis más bajas, que tengan un importante poder vasorrelajante sobre la arterias contraídas con el mínimo efecto secundario y toxicidad. Un posible abordaje del tratamiento del vasoespasmo arterial se podría llevar a cabo con la terapia combinada de bajas dosis de inhibidores de PKC, ROCK y CCVDs.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición y una preparación combinada con inhibidores de PKC, ROCK y CCVDs, y en concreto con el inhibidor GFX junto con el inhibidor Y27632 y/o la nifedipina, que es útil para el tratamiento del vasoespasmo arterial.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende:

- a) un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) junto con
- b) un inhibidor de Rho quinasa (ROCK) y/o
- c) un inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes (CCVDs)

5

En una realización preferida este aspecto de la invención, los componentes a) y b) y/o c) se encuentran yuxtapuestos, en forma de preparación combinada.

En otra realización preferida el inhibidor de la proteína quinasa C es GFX.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la Rho quinasa se selecciona de la lista que comprende fasudil y Y27632 o cualquiera de sus combinaciones. En una realización particular, el inhibidor de la Rho quinasa es el Y27632.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes se selecciona de la lista que comprenden las familias de las dihidropiridinas, fenilquilaminas, benzotiazepinas o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida, el inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes es la nifedipina (dihidropiridina).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición es una composición farmacéutica. En otra realización preferida, la composición además comprende otro principio activo.

Otro aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada que comprende:

- a) un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC) junto con
- b) un inhibidor de Rho quinasa y/o
- c) un inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes (CCVDs)

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la proteína quinasa C es GFX.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la Rho quinasa se selecciona de la lista que comprende fasudil e Y27632 o cualquiera de sus combinaciones. En una realización particular, el inhibidor de la Rho quinasa es el Y27632.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes se selecciona de la familia de las dihidropiridinas, fenilquilaminas o benzotiazepinas. En una realización aún más preferida, el inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes es la nifedipina (dihidropiridina).

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende la composición de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición, de la preparación combinada o de la forma farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la composición, la preparación combinada o a la forma farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición, la preparación combinada o de la forma farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del vasoespasma arterial, o alternativamente, a la composición, a la preparación combinada o a la forma farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento del vasoespasma arterial.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

COMPOSICIONES DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención proporcionan una composición y una preparación combinada con el inhibidor GFX junto con el inhibidor Y27632 y/o la nifedipina, que es útil para el tratamiento del vasoespasma arterial.

5 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende:

- a) un inhibidor de la proteína quinasa C,
- b) un inhibidor de Rho quinasa y/o
- c) un inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes

10

En una realización preferida este aspecto de la invención, los componentes a) y b) y/o c) se encuentran yuxtapuestos, en forma de preparación combinada.

Los inhibidores comprendidos en la composición de la invención pueden ser seleccionados de la lista que comprende: una molécula orgánica, una molécula
15 de ARN, un oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, una ribozima o una combinación de los mismos.

Un experto en la materia podría preparar moléculas orgánicas que pueden unirse específicamente a los sitios de inhibición sin unirse a otros polipéptidos o proteínas. Las moléculas orgánicas tendrán preferiblemente un peso de 100 a
20 20.000 daltons, más preferiblemente 500 a 15.000 daltons, y más preferiblemente 1000 a 10.000 daltons. Las librerías de moléculas orgánicas se encuentran disponibles comercialmente.

Con el desarrollo de la tecnología antisentido, secuencias de nucleótidos específicamente complementarios a una determinada secuencia de ADN o
25 ARN, podrían formar complejos y bloquear la transcripción o traducción. Así, con el progreso del silenciamiento génico post-transcripcional, y en particular del ARN de interferencia (ARN interferente o ARNi), se han desarrollado herramientas que permiten la inhibición específica de la expresión de un gen. La inhibición de la expresión de la proteína quinasa C, de Rho quinasa y de los
30 componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes,

constituiría por ende la inhibición de su actividad biológica, y en concreto, de la actividad que está contribuyendo al vasoespasmo arterial.

Por "polinucleótidos antisentido" se entienden cadenas de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que pueden inhibir a la proteína quinasa C, a la Rho quinasa y a los componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes, por uno de estos tres mecanismos:

1.- Interfiriendo en la transcripción, al hibridar el gen estructural o en una región reguladora de los genes que codifican para la proteína quinasa C, para Rho quinasa y para los componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes. Puesto que la transcripción o expresión es bloqueada de manera efectiva por la hibridación del oligonucleótido antisentido con el ADN, disminuye la producción de los citados genes.

2.- La unión del oligonucleótido antisentido en el citoplasma con el ARNm, interfiriendo con la formación de la construcción de la traducción propiamente dicha, inhibiendo la traducción de ARNm a la proteína.

3.- La formación de un ARNm-antisentido dúplex que permite una rápida degradación del ARNm dúplex por ARNasas (como ARNasa H). Esto daría lugar a una menor producción de la proteína quinasa C, de Rho quinasa y de los componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes.

Cualquier ARNi capaz de inhibir la traducción de los ARNm de la proteína quinasa C, de Rho quinasa y de los componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes también forman parte de la invención.

La preparación de las secuencias de ARNi de la invención o de las construcciones de ARN de la invención serían evidentes para un experto en la materia, y se podría llevar a cabo por síntesis química, lo cual permite además la incorporación de otros compuestos químicos en cualquiera de los extremos. Por otro lado, la síntesis también podría realizarse enzimáticamente utilizando

cualquiera de las ARN polimerasas disponibles. La síntesis enzimática también permite alguna modificación química de los productos o ARNs inhibidores.

El diseño de las secuencias de nucleótidos del ARNi de la invención también sería evidente para un experto en la materia. Así se podría realizar mediante un
5 diseño aleatorio que se seleccionen 19-25 bases del ARNm diana sin tener en cuenta la secuencia o la información posicional que tiene el transcrito. Otra alternativa no limitativa de la presente invención sería el diseño convencional mediante parámetros simples desarrollados por los pioneros de la técnica (Calipel *et al.*, 2003. *J.Biol.Chem.* 278(43), 42409-42418) completados con un
10 análisis BLAST de nucleótidos. Otra posibilidad podría ser un diseño racional, en el que se emplee un procedimiento informático dirigido a identificar las dianas óptimas de ARNi en un ARNm. Las secuencias diana se analizan en grupos de 19 nucleótidos a la vez y se identifican las que tienen mejores características en función de un algoritmo que incorpora un gran número de
15 parámetros termodinámicos y de secuencia.

También podría formar parte de la composición de la invención una construcción genética de ADN, la cual dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia de ARNi o construcción de ARN de la invención, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a)
20 secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia de ARNi de la invención o de la construcción de ARN de la invención para su transcripción, o, b) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de la expresión génica que comprende la secuencia
25 codificante de ARN de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación,
30 activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc...para su uso en aquellos contextos patológicos en los que la

proteína quinasa C, de Rho quinasa y de los componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes están contribuyendo al vasoespasma arterial. Múltiples de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)

Las composiciones de la presente invención permiten la transfección del ARNi de la invención al interior de una célula, *in vivo* o *in vitro*. La transfección se podría llevar a cabo, pero sin limitarnos a, transfección directa o vectores que faciliten el acceso del ARNi al interior de la célula. Así, ejemplos de estos vectores son, sin limitarse a, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del *Herpes simplex*, plásmidos de ADN no virales, liposomas catiónicos y conjugados moleculares. Así, por ejemplo, los ARNi, pueden conjugarse con péptidos de liberación u otros compuestos para favorecer el transporte de estos ARNi al interior de la célula.

Los anticuerpos capaces de unirse a la proteína quinasa C, a Rho quinasa y a los componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes pueden ser empleados para inhibir la actividad de dichas proteínas. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la proteína quinasa C, de Rho quinasa y los componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores.

El término “anticuerpo” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones de inmunoglobulinas activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se unan específicamente (inmunorreacciona) con la proteína quinasa C, con Rho quinasa y con los componentes moleculares de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes. Puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es uno que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga.

Estos rAC se pueden expresar y dirigir hacia subcompartimentos celulares específicos cuando se les incorpora las secuencias apropiadas para el tráfico intracelular. Estos anticuerpos se denominan *intrabodies*, y han demostrado su eficacia no sólo para desviar proteínas de su compartimento habitual o bloquear interacciones entre proteínas implicadas en vías de señalización, sino también para activar proteínas intracelulares.

Una “ribozima” tal y como se entiende en la presente invención, se refiere a un polinucleótido catalítico (típicamente ARN), que puede construirse para reconocer específicamente, por hibridación, un ARNm y fragmentarlo o eliminar su expresión. Las ribozimas pueden introducirse en la célula como moléculas de ARN catalíticas o como construcciones genéticas que expresan a moléculas catalíticas de ARN.

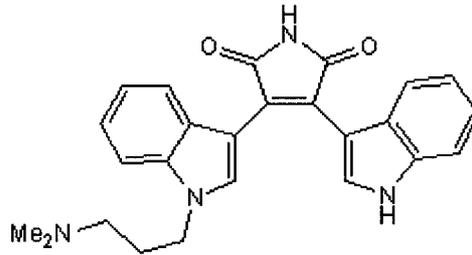
En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la proteína quinasa C es GFX.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la Rho quinasa se selecciona de la lista que comprende fasudil y Y27632 o cualquiera de sus combinaciones. En una realización particular, el inhibidor de la Rho quinasa es el Y27632.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependiente se selecciona de la lista que comprenden las familias de las dihidropiridinas, fenilquilaminas, benzotiazepinas o cualquiera de sus combinaciones. En una realización aún más preferida, el inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes es la nifedipina (dihidropiridina).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición o la preparación combinada es una composición farmacéutica. En otra realización preferida, la composición además comprende otro principio activo.

- 10 En esta memoria se entiende por “proteína quinasa C” o “PKC”, una enzima ubicua, dependiente de fosfolípidos, que está implicada procesos como la contracción del músculo liso además de proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Se han descrito al menos once isoformas de PKC que difieren en su estructura, propiedades bioquímicas, la distribución tisular, la localización subcelular, y la especificidad de sustrato. Se clasifican como isoformas convencionales (α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ), novel (δ , ϵ , η , θ , μ) y atípicas (ζ , λ). Las isoformas PKC convencionales son Ca^{2+} -dependiente, mientras que las demás no requieren Ca^{2+} para su activación. Todas las isoformas PKC, con la excepción de ζ y λ , se activan por diacilglicerol (DAG).
- 15
- 20 En esta memoria se consideran inhibidores de la proteína quinasa C, pero sin limitarlos, los que se seleccionan del grupo: Bisindolylmaleimida I, CGP41251, Gö 6976, Gö 6983, LY33353, PKC β Inhibitor, Ro-31-7549, Ro-31-8220, Ro-31-8425, Ro-32-0432, Rottlerin, Staurosporine, UCN01, o cualquiera de sus combinaciones.
- 25 En esta memoria se entiende por “GFX”, o también denominado “Gö 6850”, “Bisindolylmaleimide I” una molécula de nombre 2-[1-(3-dimetilaminopropil)indol-3-il]-3-(indol-3-il) maleimida, de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales, ésteres, taurómeros, profármacos, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables.



Fórmula (I)

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos
 5 farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos
 10 de los compuestos de fórmula (I). El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz
 15 de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica
 20 siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

En esta memoria se entiende por "Rho quinasa" o "*Rho-associated protein*
 25 *kinase*" una quinasa que pertenece a la de la familia de las quinasas serina -

treonina AGC (PKA/ PKG/PKC). Está implicada principalmente en la regulación de la forma y el movimiento de las células al actuar sobre el citoesqueleto. ROCKs (ROCK1 y ROCK2) están presentes en mamíferos (humano, rata, ratón, vaca), pez cebra, *Xenopus*, invertebrados (*C. elegans*, mosquito, *Drosophila*) y pollo. ROCK1 humano tiene una masa molecular de 158 kDa y es una de las principales efectoras de la pequeña GTPasa RhoA. La ROCK de mamíferos se activa cuando RhoA se disocia de GDP (guanina difosfato) y se une a GTP (guanina trifosfato). Entre los inhibidores de Rho quinasa se encuentran, pero sin limitarnos, Y-27632, Glycyl-H-1152, Fasudil, HA 1100, GSK 269962, H 1152, SB 772077B, SR 3677, GSK 429286, AS 1892802, o cualquiera de sus sales, ésteres, taurómeros, profármacos, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, o cualquiera de sus combinaciones.

En esta memoria, se entiende por "un inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes" un canal de calcio dependiente de voltaje, donde "L" es sinónimo de larga duración y hace referencia a la duración de la activación. Los canales de calcio de tipo L son responsables de acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético, liso, y cardíaca y de la secreción de las hormonas en las células endocrinas.

Al igual que con otros subtipos de canales de calcio dependientes de voltaje, la subunidad $\alpha 1$ es la que determina la mayor parte de las propiedades del canal.

Los fármacos del tipo bloqueadores o inhibidores de los canales de calcio tipo L se utilizan como antiarrítmicos cardíacos o antihipertensivos, dependiendo de si los fármacos tienen una afinidad más alta para el corazón (las fenilalquilaminas, como verapamilo), o para los vasos (las dihidropiridinas, como nifedipina).

PREPARACIÓN COMBINADA DE LA INVENCION

Otro aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada que comprende, como principios activos:

- d) un inhibidor de la proteína quinasa C junto con
- e) un inhibidor de Rho quinasa y/o
- 5 f) un inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes.

Los inhibidores comprendidos en la preparación combinada de la invención también pueden ser seleccionados de la lista que comprende: una molécula orgánica, una molécula de ARN, un oligonucleótido antisentido, un anticuerpo, una ribozima o una combinación de los mismos, tal y como se han descrito
10 anteriormente.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la proteína quinasa C es GFX.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de la Rho quinasa se selecciona de la lista que comprende fasudil e Y27632 o cualquiera de sus combinaciones. En una realización particular, el inhibidor de
15 la Rho quinasa es el Y27632.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes se selecciona de la familia de las dihidropiridinas, fenilquilaminas o benzotiazepinas. En una realización aún
20 más preferida, el inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes es la nifedipina (dihidropiridina).

FORMA FARMACÉUTICA DE LA INVENCION

25 Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende la composición de la invención, o la preparación combinada de la invención, o simultáneamente, los componentes a) y b) y/o c) de la invención,

USOS DE LAS COMPOSICIONES, PREPARACIONES COMBINADAS Y FORMAS FARMACÉUTICAS DE LA INVENCION

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición, de la
5 preparación combinada o de la forma farmacéutica de la invención, en la
elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la composición, a la
preparación combinada o a la forma farmacéutica de la invención, para su uso
como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición, de la
10 preparación combinada o de la forma farmacéutica de la invención, en la
elaboración de un medicamento para el tratamiento del vasoespasma arterial, o
alternativamente, a la composición, a la preparación combinada o a la forma
farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento del vasoespasma
arterial.

15 Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa",
"sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente
farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente
proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el
diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o
20 que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El
término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la
elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma
modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Debe enfatizarse que el término "preparación combinada" o también
25 denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes
de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión,
por ejemplo en una composición verdadera, para poder encontrarse disponibles
para su aplicación combinada, separada o secuencial. De esta manera, la

expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

Tanto las composiciones de la presente invención, así como la preparación combinada o las formas farmacéuticas de la invención, pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones o preparaciones combinadas y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, por vía oral.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,... del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de los inhibidores, profármacos, derivados o análogos que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las

características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

- 5 En esta memoria se entiende por “vasoespasma arterial” la contracción súbita y mantenida de una arteria. El espasmo disminuye o detiene el flujo sanguíneo a través de la arteria y priva a un tejido u órgano de la sangre oxigenada. El vasoespasma arterial puede darse en patologías como la hipertensión sistémica arterial, hemorragia subaracnoidea a nivel cerebral y angina
- 10 coronaria.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y

15 en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 20 **Fig. 1.** Registros representativos de la fuerza isométrica generada por PMA (un agente activador de PKC) y efecto relajante acumulado de GFX sólo (trazo en negro) y aplicado en presencia de Y27632 (1 μ M) y nifedipina (50 nM) (trazo gris). Y27632 (1 μ M), no afecta la fuerza generada por PMA ($0\% \pm 3,8$; $n=10$) y nifedipina (50 nM) produce una débil vasorrelajación ($15\% \pm 7,8$; $n=3$). F_{max} es
- 25 la contracción inducida por PMA antes de aplicar los inhibidores. FR2 es la fuerza remanente tras la aplicación de dosis acumulada de GFX en presencia (línea continua) o ausencia (línea discontinua) de los inhibidores. FR1 es la fuerza remanente tras la aplicación de nifedipina y/o Y27632.

Fig. 2. Curva dosis respuesta neta de GFX aplicado solo (trazo negro) y en presencia del inhibidor de ROCK a dos concentraciones (Y27632, 1 μ M, trazo gris discontinuo; Y27632, 2 μ M, trazo gris continuo). Y27632 (1 μ M) tiene un efecto significativo sólo para 2 μ M de GFX. Y27632 (2 μ M), potencia sinérgicamente la relajación inducida por GFX a concentraciones de GFX iguales o superiores a 0,5 μ M.

Fig. 3. Curva dosis respuesta neta de GFX aplicado solo (trazo negro) o en presencia de Y27632 (1 μ M) y nifedipina (50 nM) (trazo gris). Aunque Y27632 (1 μ M) tiene un efecto relajante potenciador significativo sólo para 2 μ M de GFX (Figura 2), la presencia de nifedipina hace que 1 μ M de Y27632 potencie la vasorrelajación a todas las concentraciones de GFX estudiadas.

Fig. 4. Curva dosis respuesta neta de GFX en ausencia (trazo negro) o en presencia de nifedipina (50 nM) (trazo gris). El efecto neto vasorrelajante de la nifedipina en presencia de GFX no es significativamente diferente de la relajación inducida por GFX solo.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Se trata de estudiar si el efecto vasorrelajante de inhibidores de PKC se afecta con la presencia de inhibidores de ROCK y de los CCVDs. Los anillos de arteria basilar de rata se han contraído con PMA (500 nM), un éster de forbol que activa la PKC y favorece el vasoespasmo arterial. Como inhibidor de PKC se ha utilizado GF-109203X (GFX) a concentraciones entre 0,1 μ M y 2 μ M, Y27632 (1 μ M y 2 μ M) como inhibidor de ROCK y 50 nM de nifedipina para bloquear los canales de Ca^{2+} tipo L. Se ha cuantificado y representado en % la fuerza neta relativa remanente tras la aplicación de cada dosis de GFX.

Para ello se han utilizado arterias basílicas extraídas del cerebro de rata. El animal se sacrificó con una dosis letal de tiopental sódico. Una vez que se extrajo la arteria se eliminó el tejido conectivo, se cortaron los anillos arteriales de aproximadamente 2 mm de longitud y se montaron en un miógrafo de Mulvany para medir la fuerza isométrica generada por los anillos en respuesta a estímulos externos. Los anillos están dispuestos en reservorios individuales y bañados con una solución conteniendo (en mM): NaCl 118,5; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25; Mg SO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; glucosa 5 y burbujeadas con 95% O₂ y 5% CO₂ a pH 7,4. Antes de los experimentos, los anillos fueron llevados a una tensión óptima (90% de la tensión equivalente a una presión de 100 mm Hg) y estabilizados durante 30 min. La contracción del anillo arterial se produjo con PMA. Los experimentos se realizaron a 30°C y todos los fármacos usados fueron añadidos directamente a la cámara donde se encontraban los anillos mientras se monitorizaba la fuerza. En las gráficas de las figuras aportadas se representa la fuerza neta relativa remanente registrada tras la aplicación de cada dosis de GFX.

Esta fuerza se determina con la siguiente expresión:

Fuerza neta relativa remanente = $[(FR2/F_{max}) * 100] + (\% \text{inhibición}_{\text{nif-Y27632}})$,
dónde:

- 20 - F_{max} es la contracción inducida por PMA antes de aplicar los inhibidores (Figura 1)
- FR2 es la fuerza remanente tras la aplicación de dosis acumulada de GFX en presencia (línea continua) o ausencia (línea discontinua) de los inhibidores
- 25 - % inhibición representa la vasorrelajación relativa producida por los inhibidores (nifedipina y/o Y27632) antes de la aplicación de GFX.

Este valor se determina a partir de la siguiente expresión % inhibición_{nif-Y27632} =100-[(FR1/Fmax)*100], donde FR1 es la fuerza remanente tras la aplicación de nifedipina y/o Y27632 (Figura 1).

El análisis estadístico de los resultados se obtuvo aplicando *t*-Student.

5 **P*<0,05; ***P*<0,01.

De esta forma se cuantifica el efecto producido por GFX sin tener en cuenta la relajación de otros agentes inhibidores (efecto neto).

Los resultados experimentales se muestran en las referidas figuras y en la Tabla 1 que se incluye a continuación.

10 **Tabla 1.** Fuerza remanente neta, expresada en %, obtenida tras la aplicación de cada dosis acumulada de GFX con los distintos tratamientos.

Concentración GFX (µM)	0,1	0,2	0,5	1	2	IC ₅₀ (µM)
GFX	83±2,9 (7)	72,3±3 (7)	52±3,5 (7)	32,3±4,8 (7)	22,3±4,3 (7)	0,5
GFX+Y27632 (2 µM)	65,8±7,2 (10)	50,8±8,4 (10)	26,2±7 (10)*	10,8±5,4 (10)*	0,3±4,6 (10)**	0,17
GFX+Y27632 (1 µM)	70,9±9,7 (7)	57,3±11,1 (7)	33,1±8,7 (7)	19,2±4,8 (7)	8,4±2,7 (7)*	0,26
GFX+NIF(50 nM)+ Y27632 (1 µM)	68,5±6,4 (5)*	48,6±9 (5)*	25,6±9 (5)*	9,4±6,4 (4)*	0,6±6,3 (4)*	0,17
GFX+NIF (50 nM)	95,7±11 (4)	83,1±11,4 (4)	60,7±14,9 (4)	52,6±14 (4)	40,2±17,5 (4)	0,5

Entre paréntesis se indica el número de anillos arteriales estudiados. Los valores se representan como $\text{media} \pm \text{error estándar}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

La Figura 1 muestra un registro típico de la fuerza isométrica inducida por PMA en un anillo arterial y la curva de relajación producida por GFX cuando se aplica sola (trazo negro) o después de haber añadido nifedipina (50 nM) e Y27632 (1 μM) (trazo gris). Obsérvese que Y27632 no induce relajación mientras que la nifedipina produce una débil vasorrelajación (~ 15%). La Figura 2 muestra la curva dosis respuesta de GFX en ausencia (trazo negro) o en presencia de 2 μM Y27632 (trazo gris continuo) o 1 μM Y27632 (trazo gris discontinuo). Se puede observar que el valor de IC_{50} para GFX es de 0,5 μM . Cuando éste se aplica en presencia de 1 μM Y27632 el IC_{50} tiende a disminuir mientras que cuando se aplica en presencia de 2 μM Y27632 la curva de relajación del GFX se desplaza de manera significativa hacia la izquierda siendo el valor de IC_{50} para GFX 0,17 μM . Es decir, la presencia del inhibidor de ROCK potencia de manera sinérgica la relajación inducida por GFX puesto que este inhibidor "*per se*" no induce relajación de la contracción inducida por PMA según Figura 1. Curiosamente la aplicación de nifedipina potencia el efecto vasorrelajante que se observa con el inhibidor de ROCK, de tal forma que con menos concentración de Y27632 (1 μM) se produce un desplazamiento significativo de la curva de relajación del GFX disminuyendo el IC_{50} a 0,17 μM (Figura 3). Este efecto potenciador de la nifedipina se pone de manifiesto aunque ésta "*per se*" no desplace la curva de relajación de GFX (Figura 4). La aplicación de los tres inhibidores no afecta al tono basal en arterias no tratadas con PMA.

Como ya se ha explicado, la Tabla 1 representa la fuerza remanente neta obtenida tras la aplicación de dosis acumulada de GFX, el análisis de la misma permite resaltar:

- a. La relajación arterial inducida por altas concentraciones de GFX (2 μM) se potencia sinérgicamente con Y27632 (1 μM). La presencia

de Y27632 (1 μM), tiende a desplazar el IC_{50} de GFX de 0,5 μM a 0,26 μM .

- 5
- b. La relajación arterial inducida por GFX se potencia sinérgicamente con Y27632 (2 μM), cuando la concentración de GFX es superior a 0,5 μM . La presencia de Y27632 (2 μM), desplaza significativamente el IC_{50} de GFX de 0,5 μM a 0,17 μM .
- 10
- c. La relajación inducida por GFX se potencia sinérgicamente en presencia de nifedipina (50 nM) e Y27632 (1 μM) para cualquiera de las concentraciones de GFX estudiadas. IC_{50} se desplaza significativamente de 0,5 μM a 0,17 μM .
- d. La presencia de nifedipina (50 nM), no tiene un efecto neto significativo sobre la relajación inducida por GFX.

Los datos muestran un efecto sinérgico vasorrelajante, no aditivo, cuando se lleva a cabo la aplicación combinada de bajas dosis de inhibidores de PKC y

15

ROCK. Este efecto relajante es potenciado cuando además se aplica bajas dosis de un inhibidor de los canales de Ca^{2+} . Dado que el uso combinado de estos agentes no altera el tono en arterias que no han sido precontraídas, se propone este abordaje farmacológico para relajar selectivamente arterias contraídas sin afectar a las arterias no patológicas en base a las siguientes

20

aplicaciones:

- a. Los inhibidores de ROCK potencian de manera sinérgica, no aditiva, la relajación inducida por inhibidores de PKC. Así, una aplicación farmacológica podría estar constituida por inhibidores de PKC como GFX en combinación con inhibidores de ROCK como el Y27632, fasudil
- 25
- u otros.
- b. Los inhibidores de los canales de Ca^{2+} y ROCK usados conjuntamente, potencian de manera sinérgica, no aditiva, la relajación inducida por bajas dosis de inhibidores de PKC. En esta aplicación el inhibidor de PKC como GFX, se aplicaría conjuntamente con inhibidores de los

canales de Ca^{2+} tipo L de las tres familias de las dihidropiridina, fenilalquilamina o benzotiazepina y de ROCK como el fasudil, Y27632 y otros.

- 5 c. Efecto vasorrelajante aditivo de inhibidores de PKC y de canales de Ca^{2+} . En esta aplicación el inhibidor de PKC como GFX, se aplicaría con inhibidores de los canales de Ca^{2+} tipo L de las tres familias de las dihidropiridina, fenilalquilamina o benzotiazepina.

10 Es importante aclarar que ninguna de las tres aplicaciones afectaría al tono basal arterial en arterias no estimuladas. Así mismo, los agentes activos podrían formularse y administrarse juntos e independientes.

15

20

25

REIVINDICACIONES

1.- Una composición que comprende:

- 5
- a) un inhibidor de la proteína quinasa C, que es GFX, junto con
 - b) un inhibidor de Rho quinasa que se selecciona de la lista que comprende fasudil, Y2763 o cualquiera de sus combinaciones, y/o
 - c) un inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo L voltaje dependientes que se selecciona de la lista que comprende las familias de las dihidropiridinas, fenilalquilaminas o benzotiazepinas.

10

2.- Una composición según la reivindicación anterior donde los componentes a) y b) y/o c) se encuentran yuxtapuestos, en forma de preparación combinada.

15 3.- La composición o la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la composición o la preparación combinada es una composición farmacéutica o una preparación combinada farmacéutica.

20 4.- Una forma farmacéutica que comprende la composición o los componentes a) o b) o c) de la preparación combinada o simultáneamente los componentes a) y b) y/o c) según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

25 5.- El uso de la composición, de la preparación combinada o de la forma farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la elaboración de un medicamento.

6.- El uso de la composición, de la preparación combinada o de la forma farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del vasoespasma arterial.

Fig. 1

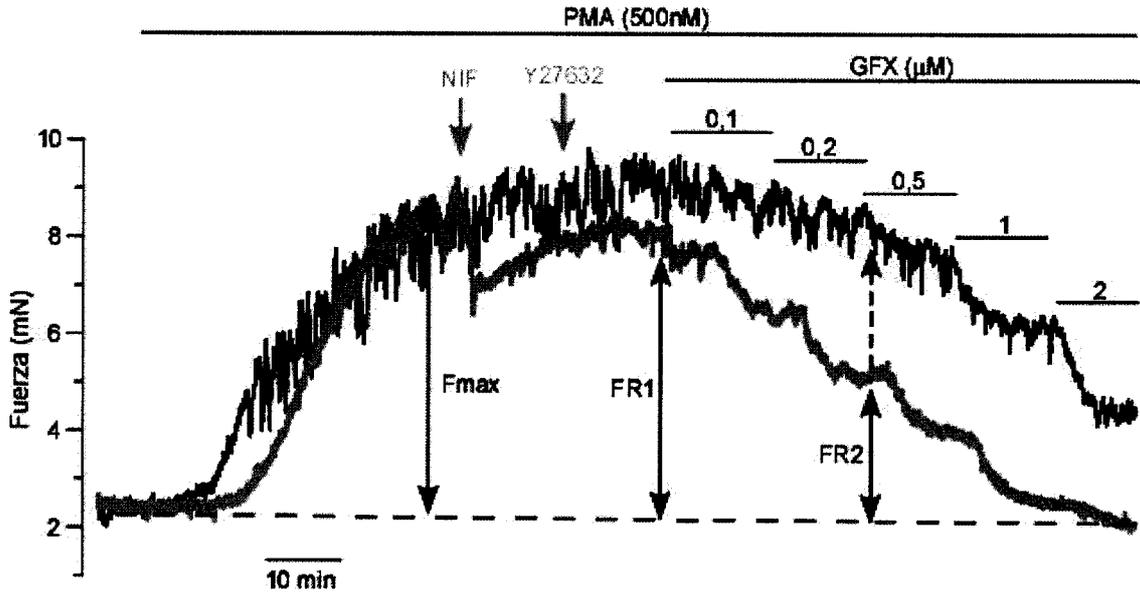


Fig. 2

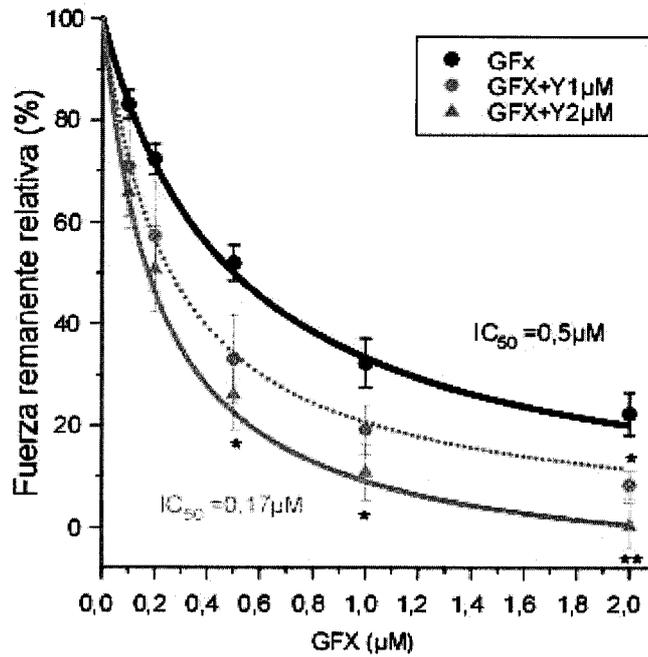


Fig. 3

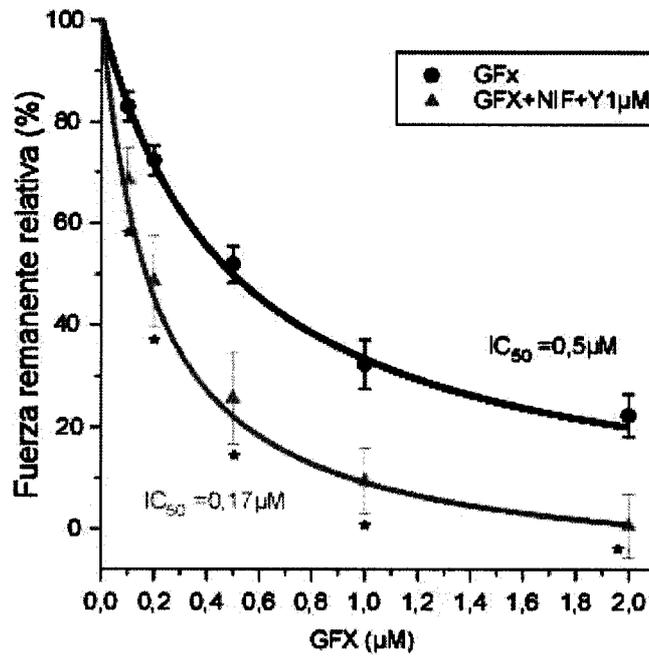


Fig. 4

