

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 989**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4985 (2006.01)

A61K 31/197 (2006.01)

A61K 31/416 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/5375 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/US2013/077254**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14100733**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13864299 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2938343**

54 Título: **Métodos y materiales para tratar estenosis de la válvula aórtica calcificada**

30 Prioridad:

21.12.2012 US 201261740680 P

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

20.02.2019

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**MILLER, JORDAN, D. y
ZHANG, BIN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 700 989 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

Métodos y materiales para tratar estenosis de la válvula aórtica calcificada

ANTECEDENTES

1. *Campo técnico*

5 El presente documento se refiere a métodos y materiales implicados en el tratamiento de afecciones cardiovasculares tales como estenosis de la válvula aórtica calcificada. Por ejemplo, el presente documento proporciona métodos y materiales para usar agonistas de guanilato ciclasa soluble (GCs) (por ejemplo, agonistas de GCs oxidados o no oxidados) o una combinación de agonistas de GCs e inhibidores de fosfodiesterasa 5A específica de GMPc (PDE5A) para reducir la calcificación de las válvulas del corazón y/o vasos o para ralentizar la progresión de la esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada.

2. *Información previa*

15 La estenosis de la válvula aórtica calcificada es una enfermedad donde se estrecha la abertura de la válvula aórtica. Los síntomas de la estenosis de la válvula aórtica calcificada varían dependiendo del grado de estenosis de la válvula. Los pacientes con estenosis de la válvula aórtica calcificada de leve a moderada pueden carecer de síntomas, ya que los síntomas normalmente aparecen en los pacientes con estenosis de la válvula aórtica calcificada grave. Los síntomas pueden incluir disnea progresiva de esfuerzo, síncope, dolor torácico y muerte súbita.

20 R. V. Freeman informa del espectro de la enfermedad de la válvula aórtica calcificada, su patogénesis, progresión de la enfermedad y estrategias de tratamiento (Circulation, vol. 111, Nº 24, 2005, páginas 3316 - 3326). El documento EP 2264017 A1 se refiere a un compuesto que tiene acción farmacológica superior, propiedades fisicoquímicas, y similares, y es útil como un fármaco de activación de GCs, o un agente para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades tales como hipertensión, enfermedad cardíaca isquémica, insuficiencia cardíaca, enfermedad renal, enfermedad arteriosclerótica, fibrilación auricular, hipertensión pulmonar, diabetes, complicaciones diabéticas, síndrome metabólico, obstrucción arterial periférica, disfunción eréctil. Mohler E.R. informa de los mecanismos de la calcificación de la válvula aórtica (American Journal of Cardiology, vol. 94, Nº 11, 2005, páginas 1396 - 1402. Nagayama T. et al. informan que la estimulación sostenida de guanilato ciclasa soluble compensa la inhibición de óxido nítrico sintasa para restaurar la modulación cardíaca aguda por sildenafilo (The J. Pharmacol. Exp. Ther., vol. 326, Nº 2, 2008, páginas 380 - 387).

SUMARIO

30 La invención se refiere a una composición que comprende un agonista de GCs para su uso en ralentizar la progresión de la calcificación de una válvula del corazón o vaso en un mamífero que ha sido identificado como que está en riesgo de calcificación de las válvulas del corazón o calcificación de vasos.

El mamífero puede ser un humano.

35 El agonista de GCs se puede seleccionar del grupo que consiste en YC-I, BAY 58-2667, BAY 41-2272, BAY-41-8543, BAY 63-2521 y HMR1766.

La composición puede comprender además un inhibidor de PDE5A.

La invención también se refiere a un agonista de GCs para su uso en ralentizar la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada en un mamífero que ha sido identificado como un mamífero que tiene esclerosis aórtica.

40 El mamífero puede ser un humano.

El agonista de GCs se puede seleccionar del grupo que consiste en YC-I, BAY 58-2667, BAY 41-2272, BAY-41-8543, BAY 63-2521 y HMR1766.

La composición puede comprender además un inhibidor de PDE5A.

45 El presente documento proporciona métodos y materiales implicados en el tratamiento de afecciones cardiovasculares tales como estenosis de la válvula aórtica calcificada. Por ejemplo, el presente documento proporciona métodos y materiales para usar agonistas de GCs o una combinación de agonistas de GCs e inhibidores de PDE5A para reducir la calcificación de las válvulas del corazón y/o vasos o para ralentizar la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada. Como se describe en el presente documento, se pueden usar agonistas de GCs tales como Ataciguat para ralentizar la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada. El tener la capacidad de ralentizar la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada puede permitir que los pacientes vivan más y tengan vidas más felices.

En general, un aspecto del presente documento caracteriza un método de ralentizamiento de la progresión de calcificación de una válvula del corazón o vaso. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) identificar un mamífero como que está en riesgo de calcificación de las válvulas del corazón o calcificación de vasos, y (b) administrar un agonista de GCs al mamífero, ralentizando así la progresión de calcificación de una válvula del corazón o vaso dentro del mamífero. El mamífero puede ser un humano. El agonista de GCs se puede seleccionar del grupo que consiste en YC-I, BAY 58-2667, BAY 41-2272, BAY-41-8543, BAY 63-2521 y HMR1766. El método puede comprender administrar un inhibidor de PDE5A al mamífero.

En otro aspecto, el presente documento caracteriza un método de ralentizamiento de la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) identificar un mamífero que tiene esclerosis aórtica, y (b) administrar un agonista de GCs al mamífero, ralentizando así la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada dentro del mamífero. El mamífero puede ser un humano. El agonista de GCs se puede seleccionar del grupo que consiste en YC-I, BAY 58-2667, BAY 41-2272, BAY-41-8543, BAY 63-2521 y HMR1766. El método puede comprender administrar un inhibidor de PDE5A al mamífero.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a que se refiere la presente invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un gráfico que representa la evolución temporal del desarrollo de la estenosis de la válvula aórtica calcificada en ratones $Ildr^{-/-}/apoB^{100/100}$.

Las Figuras 2A-C contienen resultados que demuestran los efectos de la activación de GCs y la señalización de NO en la señalización osteogénica y la progresión de la disfunción de la válvula aórtica *in vitro* e *in vivo*. La Figura 2A demuestra el efecto de Ataciguat sobre los niveles de pVASP239 en células intersticiales de la válvula aórtica *in vitro*, y la Figura 2B demuestra el efecto de Ataciguat sobre la expresión de Sp7 inducida por BMP2 en células intersticiales de la válvula aórtica *in vitro*. La Figura 2C demuestra los efectos de la expresión en exceso de DDAH1 sobre la función de la válvula aórtica en ratones deficientes en $Ildr$, $apoB100$ -only. La expresión en exceso de DDAH1 reduce los inhibidores endógenos de NOS, aumenta la producción de NO y aumenta la señalización de GCs, dando como resultado por último lugar una progresión más lenta de CAVS.

Las Figuras 3A-B contienen resultados que demuestran los efectos de la expresión en exceso o delección de catalasa (que aumentaría o disminuiría la oxidación de GCs, respectivamente) en la expresión génica pro-osteogénica y la función de la válvula aórtica en ratones. La expresión en exceso de catalasa reduce la expresión de osteocalcina (un gen pro-osteogénico, Figura 3A) y ralentiza la progresión de CAVS (círculos blancos, Figura 3B). La delección de catalasa acelera la enfermedad de las válvulas (cuadrados blancos, Figura 3B).

La Figura 4 es un gráfico que representa los niveles de p-VASP²³⁹ detectados en células intersticiales de la válvula aórtica tratadas con BMP2 (100 ng/ml), TGFβ1 (10 ng/ml), o ninguno (control; CTRL), en presencia o ausencia de Ataciguat (1 μmol) durante 18 horas a 37 °C. Ataciguat (HMR1766) activó eficazmente la señalización de GCs en células intersticiales de la válvula aórtica.

La Figura 5 es un gráfico que representa los niveles de p-Smad1/5/8 detectados en células intersticiales de la válvula aórtica tratadas con BMP2 (100 ng/ml), TGFβ1 (10 ng/ml), o ninguno (control; CTRL), en presencia o ausencia de Ataciguat (1 μmol) durante 18 horas a 37 °C. Ataciguat (HMR1766) atenuó la señalización canónica de BMP2 en células intersticiales de la válvula aórtica.

La Figura 6 es un gráfico que representa los niveles de Sp7 detectados en células intersticiales de la válvula aórtica tratadas con BMP2 (100 μg/ml), TGFβ1 (10 μg/ml), o ninguno (control; CTRL), en presencia o ausencia de Ataciguat (1 μmol) durante 18 horas a 37 °C. Ataciguat (HMR1766) atenuó la inducción de diana de BMP en células intersticiales de la válvula aórtica.

La Figura 7 es un gráfico que representa los niveles de p-Smad2 detectados en células intersticiales de la válvula aórtica tratadas con BMP2 (100 μg/ml), TGFβ1 (10 μg/ml), o ninguno (control; CTRL), en presencia o ausencia de Ataciguat (1 μmol) durante 18 horas a 37 °C. Ataciguat (HMR1766) atenuó parcialmente la señalización fibrogénica en células intersticiales de la válvula aórtica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El presente documento proporciona métodos y materiales implicados en el tratamiento de afecciones cardiovasculares tales como estenosis de la válvula aórtica calcificada. Por ejemplo, el presente documento proporciona métodos y materiales para usar uno o más agonistas de GCs o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A para reducir la calcificación de las válvulas del corazón y/o vasos o para ralentizar la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada.

Cualquier tipo de mamífero que tenga una afección cardiovascular, tal como estenosis de la válvula aórtica calcificada, se puede tratar como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los seres humanos y otros primates, tales como monos que tienen una afección cardiovascular, tal como estenosis de la válvula aórtica calcificada, se pueden tratar con uno o más agonistas de GCs o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A. En algunos casos, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, ratones y ratas se pueden tratar con uno o más agonistas de GCs o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A como se describe en el presente documento.

Se puede usar cualquier método apropiado para identificar un mamífero que tiene una afección cardiovascular tal como estenosis de la válvula aórtica calcificada o esclerosis aórtica. Por ejemplo, se puede usar ecocardiografía o tomografía computerizada para identificar un humano que tiene esclerosis aórtica que está en riesgo de progresar a estenosis de la válvula aórtica calcificada.

Una vez se ha identificado que tiene una afección cardiovascular, tal como estenosis de la válvula aórtica calcificada o esclerosis aórtica con el potencial de progreso a estenosis de la válvula aórtica calcificada, el mamífero se puede administrar o se puede instruir para que se autoadministre con uno o más agonistas de GCs, o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A. Ejemplos de agonistas de GCs incluyen, sin limitación, Ataciguat, YC-I, BAY 58-2667, BAY 41-2272 y BAY-41-8543. Ejemplos de inhibidores de PDE5A incluyen, sin limitación, sildenafil, vardenafil, tadalafil, EMD 360527, DA 8159, UK-343-664 (Walker et al., *Xenobiotica*, 31:651-664 (2001)), UK-427-387, UK-357903 ([1-etil-4-{3-[3-etil-6,7-dihidro-7-oxo-2-(2-piridilmetil)-2H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il]-2-(2-metoxietoxi)-5-piridilsulfonil}piperazina]) (Gardinar et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312:265-271 (2005)), UK-371800 (Pfizer), UK-313794 (Pfizer), UK-343664 (Abel et al., *Xenobiotica*, 31:665-76 (2001)), TA-1790 (Tanabe Seiyaku), CP-248 (Osi Pharmaceuticals), CP-461 (Osi Pharmaceuticals), exisulind (Deguchi et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, 803-809 (2002); (Osi Pharmaceuticals)), pirazolinona, EMD82639 (Merck KgaA, Darmstadt, DE; ácido (4-(4-[2-etil-fenilamino]-metil)-3-metil-5-oxo-4,5-di-hidro-pirazol-1-il)-benzoico; Senzaki et al., *FASEB J.*, 15:1718-1726 (2001), y Scutt et al., *BMC Pharmacol.*, 4:10 (2004)), EMD360527 (Merck KgaA, Darmstadt, DE; ácido [7-(3-cloro-4-metoxi-bencilamino)-1-metil-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-ilmetoxil]-acético; Scutt et al., *BMC Pharmacol.*, 4:10 (2004)), EMD221829 (Merck KgaA, Darmstadt, DE; ácido 4-[4-(3-cloro-4-metoxi-bencilamino)-benzo[4,5]tieno[2,3-d]-pirimidin-2-il]-ciclohexanocarboxílico, sal de etanolamina; Scutt et al., *BMC Pharmacol.*, 4:10 (2004)), EMD1 71827 (Merck KgaA, Darmstadt, DE; ácido 5-[4-(3-cloro-4-metoxi-bencilamino)-5,6,7,8-tetrahidro-benzo[4,5]tieno[2,3-d]pirimidin-2-il]-pentanoico; Scutt et al., *BMC Pharmacol.*, 4:10 (2004)), DA-8259 (3-(1-metil-7-oxo-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo-[4,3-d]pirimidin-5-il)-N-[2-(1-metilpirrolidin-2-il)etil]-4-propoxibencenosulfonamida), E-4021 (Dukarm et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160:858-865 (1999)), pentoxifilina y FR22934 (Fujisawa). Ejemplos adicionales de inhibidores de PDE5A se pueden exponer en las patentes de EE.UU. N°: 6.916.927, 6.911.542, 6.903.099, 6.878.711, 6.872.721, 6.858.620, 6.825.197, 6.774.128, 6.723.719, 6.699.870, 6.670.366, 5.859.006 y 5.250.534 y las publicaciones de solicitud de patente internacional N° WO 03/063875, WO 03/1012761, WO 2004/037183 y WO 98/38168. En algunos casos, un agonista de GCs usado como se describe en el presente documento puede ser un activador de una forma oxidada o no oxidada de GCs.

En algunos casos, pueden administrar uno o más agonistas de GCs (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más agonistas de GCs) o una combinación de uno o más agonistas de GCs (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más agonistas de GCs) y uno o más inhibidores de PDE5A (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más inhibidores de PDE5A) se a un mamífero para reducir la calcificación de las válvulas del corazón y/o vasos o para ralentizar la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada. En algunos casos, se pueden formular uno o más agonistas de GCs o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A en una composición farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, se puede formular una cantidad terapéuticamente eficaz de Ataciguat junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes. Se puede formular una composición farmacéutica para administración en forma sólida o líquida que incluye, sin limitación, disoluciones estériles, suspensiones, formulaciones de liberación sostenida, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos.

Excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de

polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina. Si se requiere, se pueden potenciar la solubilidad y biodisponibilidad de un agonista de GCs y/o un inhibidor de PDE5A en una composición farmacéutica usando excipientes lipídicos y/o copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 7.014.866 y las publicaciones de patente de EE.UU. N° 20060094744 y 20060079502.

- 5 Se puede diseñar una composición farmacéutica descrita en el presente documento para administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las composiciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y
- 10 espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en dosis unitaria o recipientes multi-dosis, por ejemplo, ampollas y viales cerrados, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de uso. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.
- 15 Dichas disoluciones para inyección pueden estar en la forma, por ejemplo, de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular según técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable por vía parenteral no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y
- 20 disolventes aceptables que se pueden usar están manitol, agua, disolución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede usar cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o di-glicéridos sintéticos. Se pueden usar ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados de glicérido, en la preparación de inyectables, como pueden ser aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, que incluyen aquellos en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones en aceite pueden contener un diluyente de alcohol de cadena larga o dispersante.

En algunos casos, se puede administrar por vía local o por vía sistémica una composición farmacéuticamente aceptable que incluye uno o más agonistas de GCs y/o uno o más inhibidores de PDE5A. Por ejemplo, se puede administrar por vía sistémica por inyección a un mamífero (por ejemplo, un humano) una composición que contiene

30 un agonista de GCs. En algunos casos, se pueden administrar por las mismas vías o diferentes cada agonista de GCs que se va a administrar cuando se van a administrar dos o más agonistas de GCs. Por ejemplo, Ataciguat se puede administrar por vía oral, y YC-I se puede administrar por inyección. En algunos casos, uno o más agonistas de GCs se pueden administrar por una vía, y uno o más inhibidores de PDE5A se pueden administrar por la misma vía o una diferente.

35 Se puede administrar una composición que contiene uno o más agonistas de GCs o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A a un mamífero en cualquier cantidad, a cualquier frecuencia, y durante cualquier duración eficaz para lograr un resultado deseado (por ejemplo, para reducir la calcificación de las válvulas del corazón y/o vasos o para ralentizar la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada).

40 Las dosis eficaces pueden variar, como se reconoce por los expertos en la técnica, dependiendo de la gravedad de la afección (por ejemplo, estenosis de la válvula aórtica calcificada), la vía de administración, el sexo, edad y condición de salud general del sujeto, uso de excipientes, la posibilidad de co-uso con otros tratamientos terapéuticos tales como uso de otros agentes y el criterio del médico práctico.

Una cantidad eficaz de una composición que contiene uno o más agonistas de GCs, o una combinación de uno o

45 más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A, puede ser cualquier cantidad que reduzca la gravedad de un síntoma de una afección que está tratándose (por ejemplo, estenosis de la válvula aórtica calcificada) sin producir toxicidad significativa al mamífero. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un agonista de GCs tal como YC-I puede ser desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 80 mg/kg (por ejemplo, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 70 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 60 mg/kg,

50 desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg, desde aproximadamente 0,75 mg/kg hasta

55 aproximadamente 10 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, o desde aproximadamente 2 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg). En algunos casos, se puede administrar entre aproximadamente 50 mg y 200 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 mg y 180 mg, entre aproximadamente 50 mg y 150 mg, entre aproximadamente 50 mg y 125 mg, entre aproximadamente 60 mg y 200 mg, entre aproximadamente 75 mg y 200 mg, entre aproximadamente 100 mg y 200 mg, entre aproximadamente 75 mg y

60 150 mg, o entre aproximadamente 100 mg y 150 mg) de un agonista de GCs tal como Ataciguat a un humano de tamaño promedio (por ejemplo, humano de aproximadamente 70 kg) diariamente durante aproximadamente

20 semanas. Si un mamífero particular deja de responder a una cantidad particular, entonces la cantidad de agonista de GCs o inhibidor de PDE5A se puede aumentar, por ejemplo, dos veces. Después de recibir esta cantidad más alta, el mamífero se puede monitorizar para tanto sensibilidad al tratamiento como síntomas de toxicidad, y se hacen ajustes en consecuencia. La cantidad eficaz puede seguir siendo constante o se puede ajustar como una dosis ajustable o dosis variable dependiendo de la respuesta del mamífero al tratamiento. Diversos factores pueden influir en la cantidad eficaz real usada para una aplicación particular. Por ejemplo, la frecuencia de administración, duración del tratamiento, uso de múltiples agentes de tratamiento, vía de administración y gravedad de la afección (por ejemplo, estenosis de la válvula aórtica calcificada) pueden requerir un aumento o disminución en la cantidad eficaz real administrada.

La frecuencia de administración puede ser cualquier frecuencia que reduzca la gravedad de un síntoma de una afección que se va a tratar (por ejemplo, estenosis de la válvula aórtica calcificada) sin producir toxicidad significativa al mamífero. Por ejemplo, la frecuencia de administración puede ser desde aproximadamente una vez a la semana hasta aproximadamente tres veces al día, o desde aproximadamente dos veces al mes hasta aproximadamente seis veces al día, o desde aproximadamente dos veces a la semana hasta aproximadamente una vez al día. La frecuencia de administración puede seguir siendo constante o puede ser variable durante la duración del tratamiento. Una evolución del tratamiento con una composición que contiene uno o más agonistas de GCs o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A puede incluir periodos de descanso. Por ejemplo, una composición que contiene uno o más agonistas de GCs o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A se puede administrar diariamente durante un periodo de dos semanas, seguido por un periodo de descanso de dos semanas, y dicha pauta se puede repetir múltiples veces. Al igual que con la cantidad eficaz, diversos factores pueden influir en la frecuencia de administración real usada para una aplicación particular. Por ejemplo, la cantidad eficaz, duración del tratamiento, uso de múltiples agentes de tratamiento, vía de administración y gravedad de la afección (por ejemplo, estenosis de la válvula aórtica calcificada) pueden requerir un aumento o disminución en la frecuencia de administración. Una duración eficaz para administrar una composición que contiene uno o más agonistas de GCs o una combinación de uno o más agonistas de GCs y uno o más inhibidores de PDE5A puede ser cualquier duración que reduzca la gravedad de un síntoma de la afección que se va a tratar (por ejemplo, estenosis de la válvula aórtica calcificada) sin producir toxicidad significativa al mamífero. Así, la duración eficaz puede variar desde varios días hasta varias semanas, meses, o años. En general, la duración eficaz para el tratamiento de la estenosis de la válvula aórtica calcificada puede variar en duración desde varios meses hasta varios años. En algunos casos, una duración eficaz puede ser mientras que un mamífero individual esté vivo. Múltiples factores pueden influir en la duración eficaz real usada para un tratamiento particular. Por ejemplo, una duración eficaz puede variar con la frecuencia de administración, cantidad eficaz, uso de múltiples agentes de tratamiento, vía de administración y gravedad de la afección que está tratándose.

En ciertos casos, se puede monitorizar un transcurso del tratamiento y la gravedad de uno o más síntomas relacionados con la afección que está tratándose. Se puede usar cualquier método apropiado para determinar si se reduce o no la gravedad de un síntoma. Por ejemplo, se puede evaluar la gravedad de un síntoma de estenosis de la válvula aórtica calcificada usando técnicas de obtención de imágenes en diferentes momentos de tiempo.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Ratones LDLR^{-/-}/apoB^{100/100} imitan la estenosis humana de la válvula aórtica calcificada

Los ratones LDLR^{-/-}/apoB^{100/100} son ratones apolipoproteína B100-only deficientes en el receptor de lipoproteína de baja densidad. Se encontró que desarrollaban coherentemente estenosis de la válvula aórtica calcificada grave, hemodinámicamente significativa. La velocidad máxima fue aproximadamente 4 m/s (Figura 1). Estos resultados indican que estos ratones desarrollan estenosis de un modo adecuado para estudiar los efectos de intervenciones farmacológicas tras el inicio y la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada.

Ejemplo 2 - Activadores de guanilato ciclasa soluble aumentan la señalización de NO que puede ralentizar la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada

Para determinar si la inducción de la señalización de GCs redujo la señalización osteogénica *in vitro*, se trataron células intersticiales de la válvula aórtica con BMP2 en presencia o ausencia de Ataciguat (HMR1766, 5-cloro-2-[[[5-cloro-2-tienil]sulfonil]amino]-N-[4-(4-morfolinilsulfonil)fenil]benzamida) durante 24 horas. Ataciguat activó la señalización de GCs (indicada por niveles de pVASP239) y suprimió profundamente la señalización osteogénica en células intersticiales de la válvula aórtica *in vitro* (Figuras 2A y 2B).

Para determinar si el aumento de la producción de NO y la señalización de GCs pueden ralentizar la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada *in vivo*, se examinaron los efectos de expresar en exceso DDAH1 humano (DDAH1TG, una enzima que degrada los inhibidores endógenos de NOS) sobre la función de la válvula aórtica en ratones apoB100-only deficiente en Ildr. El aumentar la producción de NO y la señalización de GCs en ratones DDAH1TG redujo la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada (Figura 2C).

Estos resultados demuestran que los activadores de guanilato ciclasa solubles, tales como Ataciguat, activan la guanilato ciclasa soluble en células intersticiales de la válvula aórtica y que aumentar la señalización de NO ralentiza la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada en mamíferos.

5 Se realizaron experimentos adicionales para confirmar que Ataciguat activa la señalización de GCs, atenúa la señalización de BMP2, atenúa la inducción de diana BMP2 y atenúa la señalización fibrogénica en células de la válvula intersticial. En resumen, se mantuvieron células en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 20 % de suero bovino fetal (FBS) y se expandieron hasta confluencia en 6 placas de pocillos en una estufa de incubación convencional con 5 % de CO₂ a 37 °C. Entonces, las células se trataron con BMP2 (100 ng/ml), TGFβ1 (10 ng/ml) o vehículo (solución salina tamponada con fosfato) en ausencia o presencia de Ataciguat (1 μmol) durante 18 horas. 10 Las células se lisaron usando tampón de lisis de proteína estándar que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa, y se realizó transferencia Western para evaluar los cambios en los niveles de proteína de BMP, TGFβ y señalización de GCs.

Ataciguat activó la señalización de GCs (niveles de p-VASP²³⁹, Figura 4), atenuó la señalización de BMP2 (p-Smad1/5/8, Figura 5), atenuó la inducción diana de BMP2 (Sp7, Figura 6), y atenuó parcialmente la señalización fibrogénica (p-Smad2, Figura 7) en células intersticiales de la válvula. Estos resultados se duplicaron en líneas celulares humanas (HAV-001, HAV-002, HAV-003) y líneas celulares de ratón (MAV1, MAV2 y MAV4). 15

Ejemplo 3 - La reducción del estrés oxidativo ralentiza la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada

Para determinar si los niveles de peróxido de hidrógeno están asociados con expresión génica osteogénica alterada y disfunción de la válvula aórtica, se generaron ratones apoB100-only deficientes en Ildlr, que o bien expresan en exceso catalasa humana o bien son deficientes en catalasa. La expresión en exceso de catalasa, que reduce el estrés oxidativo, redujo la oxidación de guanilato ciclasa soluble, aumentó la señalización de NO, redujo la expresión de genes pro-osteogénicos y ralentizó la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada (Figuras 3A y 3B). La delección de catalasa, que aumenta el estrés oxidativo, aumentó la oxidación de GCs, redujo la señalización de NO y aceleró la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada en ratones hipercolesterolémicos (Figura 3B). 20 25

Estos resultados indican que los aumentos en el estrés oxidativo contribuyen a la oxidación de guanilato cilasa soluble, expresión génica pro-osteogénica y progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada en ratones hipercolesterolémicos.

Ejemplo 4 - Reducción de la señalización pro-osteogénica y ralentización de la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada

Para confirmar que la administración de activadores de guanilato ciclasa soluble (por ejemplo, Ataciguat) reduce la señalización pro-osteogénica y ralentiza la progresión de la estenosis de la válvula aórtica calcificada en mamíferos, se mantienen ratones Ildlr^{-/-}/apoB^{100/100} en una dieta occidental durante 6 meses, y luego se ponen en uno de cuatro grupos: 1) Vehículo, 2) 5 mg/kg de Ataciguat/día, o 3) 10 mg/kg de Ataciguat/día, o 4) 15 mg/kg de Ataciguat/día durante 3 meses adicionales. Se administra diariamente por sonda nasogástrica oral el vehículo o Ataciguat. Se evalúan los cambios en la función cardíaca y de la válvula aórtica a los 3, 6 y 9 meses en los cuatro grupos de ratones. Se sacrifican 20 ratones de cada grupo de tratamiento en el momento de tiempo de 9 meses, que normalmente representa una etapa de estenosis de la válvula aórtica calcificada de moderada a grave en ratones de por lo demás sin tratar. Se usa un grupo de 10 ratones para la evaluación semicuantitativa histológica/inmunoquímica de la válvula aórtica (calcio, moléculas de señalización osteogénica; n = 10). Se usa el segundo grupo para la medición de la expresión génica pro-osteogénica y pro-fibrótica usando qRT-PCR (n = 10). 35 40

Para confirmar que los activadores de guanilato ciclasa solubles (por ejemplo, Ataciguat) atenúan eficazmente las respuestas a señales específicas que inducen osteogénesis en células intersticiales de la válvula aórtica, se examinan respuestas transcripcionales a diversas moléculas pro-osteogénicas en presencia y ausencia de estrés oxidativo exógeno (que induce la oxidación de guanilato ciclasa soluble). En resumen, se examinan las respuestas a la proteína morfogenética ósea 2, proteína morfogenética ósea 4 y factor de crecimiento transformante β-1 (todos con o sin H₂O₂ 100 μM) para la capacidad para ser alterados por Ataciguat (1 μM). Se sabe que estos estímulos aumentan en estenosis humana de la válvula aórtica calcificada. 45

Para confirmar la tolerancia de Ataciguat en seres humanos con estenosis de la válvula aórtica calcificada, se monitorizan los pacientes que reciben Ataciguat. En resumen, sujetos con estenosis de la válvula aórtica calcificada asintomática de leve a moderada se administran con placebo, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, o 10 mg/kg de Ataciguat (por vía oral) en visitas separadas y se monitorizan durante 12 horas. La tensión arterial se monitoriza no invasivamente y continuamente usando el equipo Dinamap™ y Finapres™. Cada 2 horas, se pide a los sujetos que se levanten de estar sentados o tumbados para determinar la tolerancia ortostática. Se reclutan 40 pacientes para este estudio. 50

Para confirmar que Ataciguat se puede usar para tratar estenosis de la válvula aórtica calcificada, seres humanos con estenosis de la válvula aórtica calcificada grave se administran con placebo o la mayor dosis tolerada de Ataciguat 24 horas antes de la cirugía de sustitución de la válvula aórtica. Los pacientes son ingresados en el hospital el día de antes para garantizar la monitorización continua tras esta dosis. Cuando se corta el tejido de la 55

válvula durante la cirugía, un coordinador del estudio toma dos porciones pequeñas de una valva de la válvula calcificada. Una se incorpora en OCT para criosección, y la segunda se ultracongela en nitrógeno líquido. Se usa tejido incorporado en OCT para determinar cambios espaciales en la guanilato ciclasa soluble, p-VASP239, y niveles de proteína osteogénica. Se pulveriza el segundo trozo y se usa para el examen cuantitativo de la expresión génica (qRT-PCR) y niveles de proteína para moléculas pro-osteogénicas y moléculas relacionadas con la señalización de NO-guanilato ciclasa soluble.

Se diseña un estudio aleatorizado de doble ciego con pacientes diagnosticados con estenosis de la válvula aórtica calcificada de leve a moderada. Los pacientes reciben ya sea placebo o Ataciguat. Antes del enrolamiento en el ensayo, los pacientes experimentan evaluaciones rutinarias clínicamente indicadas de la válvula aórtica y función ventricular usando ecocardiografía y calcio en la válvula aórtica usando TAC. También se extrae sangre de los pacientes para la evaluación de cambios en citocinas inflamatorias y niveles de p-VASP239 circulante. Tras 1 mes de tratamiento inicial, los pacientes vuelven para la evaluación de la tolerancia y eficacia humoral (es decir, aumento en los niveles de p-VASP239 circulante en grupos tratados). Se evalúan la carga de la función de la válvula aórtica y el calcio de la válvula aórtica cada 6 meses por ecocardiografía y TAC, respectivamente.

Ejemplo 5 - Uso de agonistas de guanilato ciclasa soluble para ralentizar la progresión de la calcificación de las válvulas del corazón y vasos

Se identifica un paciente que tiene calcificación de la válvula aórtica o vascular mediante cribado ecocardiográfico regular (típico para un examen físico a la edad de 65 o mayor) o tras tomografía computerizada del pecho. El paciente con evidencia de calcificación cardiovascular (áreas ecogénicas normalmente brillantes en la válvula/vasos) se trata con Ataciguat oral diariamente (50 mg/día, 100 mg/día o 200 mg/día) para ralentizar la progresión de la calcificación cardiovascular. Se usan los niveles de fosforilación de P-VASP239 en sangre periférica para monitorizar la biodisponibilidad del fármaco tras 1-2 semanas de tratamiento. El paciente se somete a la prueba de seguimiento en 1 año con tomografía computerizada para evaluar cuantitativamente la progresión de la válvula del corazón o la calcificación de vasos. El tratamiento con Ataciguat oral avanza durante el resto de la vida de un sujeto, mientras que sea bien tolerado.

Ejemplo 6 - El uso de una combinación de agonistas de guanilato ciclasa soluble e inhibidores de fosfodiesterasa 5A específica de GMPc ralentiza la progresión de la calcificación de las válvulas del corazón y vasos

Se identifica un paciente que tiene calcificación de la válvula aórtica o vascular mediante cribado ecocardiográfico regular (típico para un examen físico a la edad de 65 o mayor) o tras tomografía computerizada del pecho. El paciente con evidencia de calcificación cardiovascular (áreas ecogénicas normalmente brillantes en la válvula/vasos) se trata con una combinación de Ataciguat oral (50 mg/día, 100 mg/día o 200 mg/día) y una dosis baja de un inhibidor de PDE5A (por ejemplo, sildenafil o tadalafilo, 2,5 mg/día, 5 mg/día o 10 mg/día) para ralentizar la progresión de la calcificación cardiovascular. Se usan los niveles de fosforilación de P-VASP239 en sangre periférica para monitorizar la biodisponibilidad de fármacos tras 1-2 semanas de tratamiento. El sujeto se somete a la prueba de seguimiento en 1 año con tomografía computerizada para evaluar cuantitativamente la progresión de la válvula del corazón o la calcificación de vasos. El tratamiento con una combinación de agonista de GCs oral/inhibidor de PDE5A continúa durante el resto de la vida de un sujeto, en tanto que sea bien tolerado.

Ejemplo 7 - El uso de agonistas de guanilato ciclasa soluble ralentiza la progresión de la esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada

Se identifica un paciente que tiene esclerosis de la válvula aórtica (o estenosis de la válvula aórtica leve) mediante cribado ecocardiográfico regular (típico para un examen físico a la edad de 65 o mayor). El paciente con evidencia de calcificación cardiovascular (áreas ecogénicas normalmente brillantes en la válvula) se trata con activadores/estimulantes de GCs orales (50 mg/día, 100 mg/día o 200 mg/día) para ralentizar la progresión de la calcificación de la válvula aórtica y fibrosis, que también puede ralentizar la progresión de la disfunción de la válvula aórtica y la progresión a estenosis de la válvula aórtica. Se usan los niveles de fosforilación de P-VASP239 en sangre periférica para monitorizar la biodisponibilidad del fármaco tras 1-2 semanas de tratamiento. El sujeto se somete a la prueba de seguimiento en 1 año con obtención de imágenes ecocardiográficas para evaluar cuantitativamente la progresión de la disfunción de la válvula del corazón (es decir, reducciones en el área de la válvula aórtica o aumentos en la velocidad transvalvular). El tratamiento con un agonista de GCs oral continúa durante el resto de la vida de un sujeto, en tanto que sea bien tolerado.

Ejemplo 8 - Uso de una combinación de agonistas de guanilato ciclasa soluble e inhibidores de fosfodiesterasa 5A específica de GMPc para ralentizar la progresión de la esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada

Se identifica un paciente que tiene esclerosis de la válvula aórtica (o estenosis de la válvula aórtica leve) mediante cribado ecocardiográfico regular (típico para un examen físico a la edad de 65 o mayor). El paciente con evidencia de calcificación cardiovascular (áreas ecogénicas normalmente brillantes en la válvula/vasos) se trata con una combinación de Ataciguat oral (50 mg/día, 100 mg/día o 200 mg/día) y una dosis baja de un inhibidor de PDE5A (por ejemplo, sildenafil o tadalafilo, 2,5 mg/día, 5 mg/día o 10 mg/día) para ralentizar la progresión de la calcificación de la válvula aórtica y la fibrosis, que también puede ralentizar la progresión de la disfunción de la válvula aórtica y la

- 5 progresión a estenosis de la válvula aórtica. Se usan los niveles de fosforilación de P-VASP239 en sangre periférica para monitorizar la biodisponibilidad del fármaco tras 1-2 semanas de tratamiento. El sujeto se somete a la prueba de seguimiento en 1 año con obtención de imágenes ecocardiográficas para evaluar cuantitativamente la progresión de la disfunción de la válvula del corazón (es decir, reducciones en el área de la válvula aórtica o aumentos en la velocidad transvalvular). El tratamiento con una combinación de agonista de GCs oral/inhibidor de PDE5A continúa durante el resto de la vida de un sujeto, en tanto que sea bien tolerado.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un agonista de GCs para su uso en ralentizar la progresión de calcificación de una válvula del corazón o vaso en un mamífero que ha sido identificado que está en riesgo de calcificación de las válvulas del corazón o calcificación de vasos.
- 5 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dicho mamífero es un ser humano.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dicho agonista de GCs se selecciona del grupo que consiste en YC-I, BAY 58-2667, BAY 41-2272, BAY-41-8543, BAY 63-2521 y HMR1766.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además un inhibidor de PDE5A.
- 10 5. Composición que comprende un agonista de GCs para su uso en ralentizar la progresión de esclerosis aórtica a estenosis de la válvula aórtica calcificada en un mamífero que ha sido identificado como un mamífero que tiene esclerosis aórtica.
6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en la que dicho mamífero es un ser humano.
- 15 7. La composición para el uso de la reivindicación 5, en la que dicho agonista de GCs se selecciona del grupo que consiste en YC-I, BAY 58-2667, BAY 41-2272, BAY-41-8543, BAY 63-2521 y HMR1766.
8. La composición para el uso de la reivindicación 5, en la que dicha composición comprende además un inhibidor de PDE5A.

Figura 1

Función de la válvula aórtica
Ratones *ldlr^{-/-}/apoB^{100/100}*

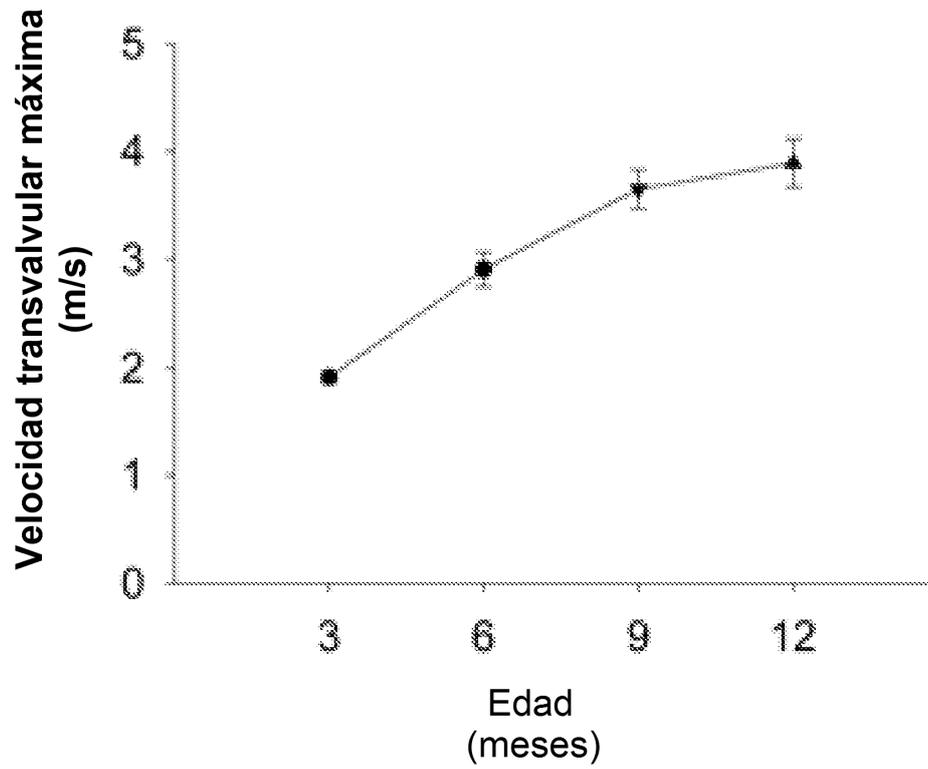


Figura 2

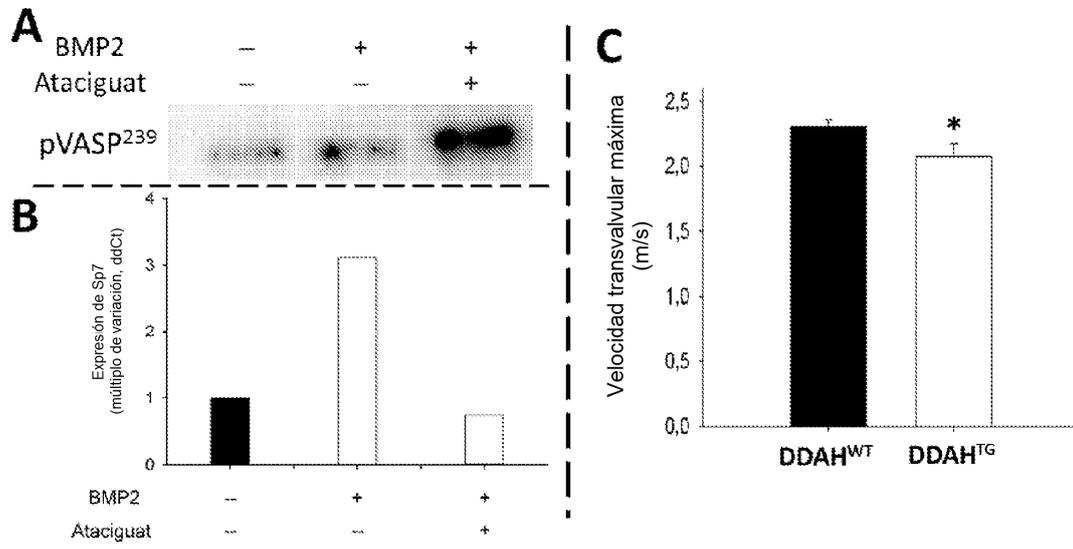


Figura 3

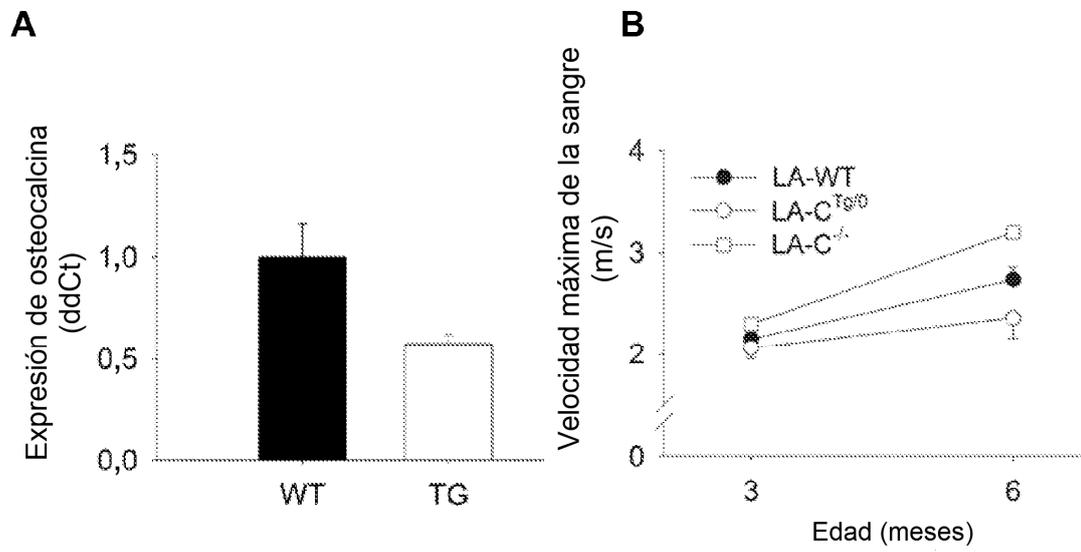


Figura 4

Ataciguat activa vigorosamente la señalización de GCs en células intersticiales de la válvula aórtica

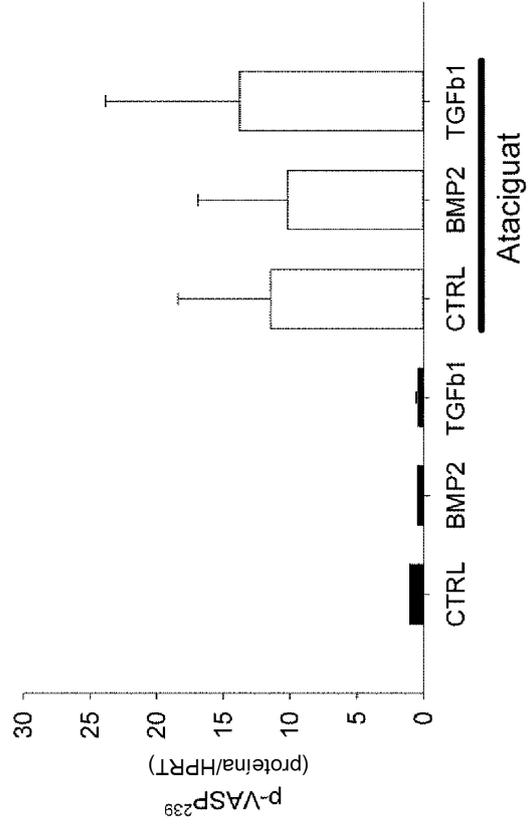


Figura 5

Ataciguat atenúa la señalización de proteínas morfogenéticas óseas en células intersticiales de la válvula aórtica

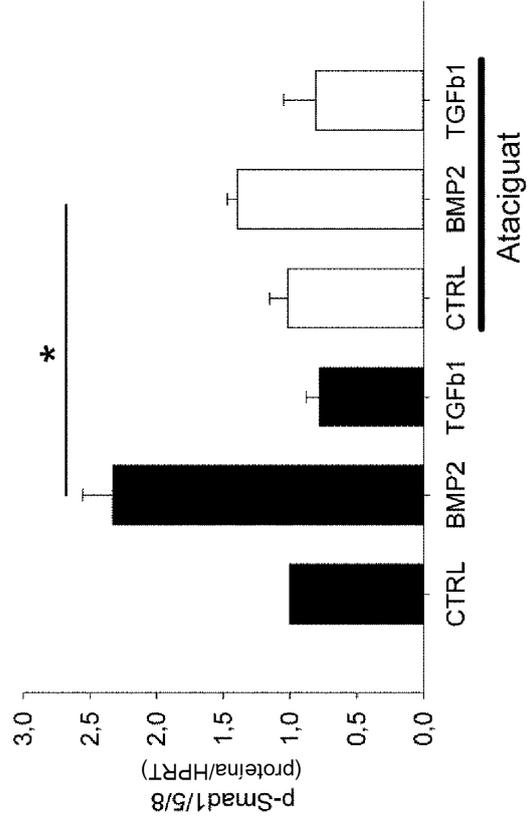


Figura 6

Ataciguat atenúa los niveles de moléculas diana/efectoras de proteína morfogenética ósea

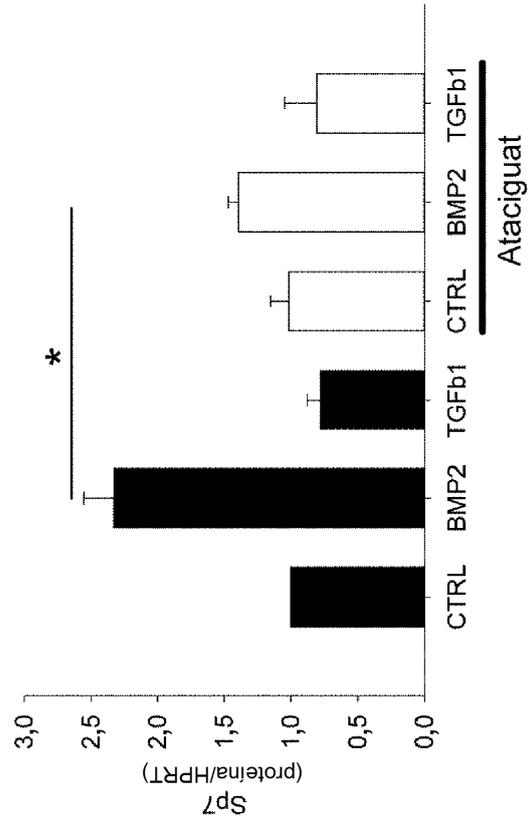


Figura 7

Ataciguat tiende a atenuar la señalización fibrogénica en células intersticiales de la válvula aórtica

