

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional
WO 2019/243653 A1

(43) Fecha de publicación internacional
26 de diciembre de 2019 (26.12.2019) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación internacional de patentes:
A61K 31/45 (2006.01) *A61K 31/18* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2019/070434
- (22) Fecha de presentación internacional:
21 de junio de 2019 (21.06.2019)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201830607 21 de junio de 2018 (21.06.2018) ES
- (71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES). **FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA DE L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU** [ES/ES]; C/ St. Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona (ES).
- (72) Inventores: **MARTÍNEZ GONZÁLEZ, José**; IIBB, C/ Rosellon, 161. 6 y 7 Planta, 08036 Barcelona (ES). **CAÑES ESTEVE, Laia**; IIBB, C/Rosellon, 161. 6 y 7 Planta, 08036 Barcelona (ES). **RODRÍGUEZ SINOVAS, Cristina**; C/ St. Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona (ES).
- (74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Dario, 4, 28010 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,

(54) Title: USE OF TYROSINE HYDROXYLASE INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF AORTIC ANEURYSM

(54) Título: USO DE INHIBIDORES DE LA TIROSINA HIDROXILASA PARA EL TRATAMIENTO DEL ANEURISMA DE AORTA

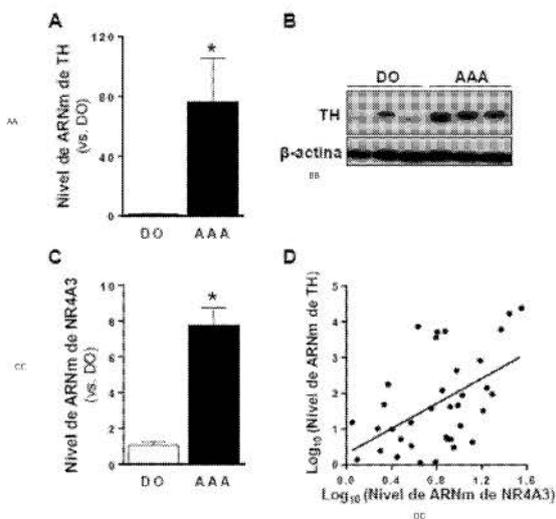


FIG. 1

AA... Level of mRNA of TH (vs. DO)
BB... β -actin
CC... Level of mRNA of NR4A3 (vs. DO)
DD... Log_{10} (Level of mRNA of TH)
 Log_{10} (Level of mRNA of NR4A3)

(57) Abstract: The present invention relates to the use of a compound that can inhibit tyrosine hydroxylase, such as alpha-methyl-p-tyrosine (AMPT), for the prevention or treatment of aortic aneurysm, preferably of the abdominal aorta.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso de un compuesto que es capaz de inhibir la tirosina hidroxilasa, tal como la alfa-metil-p-tirosina (AMPT), para la prevención o el tratamiento del aneurisma de aorta, preferiblemente el de aorta abdominal.

WO 2019/243653 A1

LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

DESCRIPCIÓN

USO DE INHIBIDORES DE LA TIROSINA HIDROXILASA PARA EL TRATAMIENTO DEL ANEURISMA DE AORTA

5

La presente invención se refiere al uso de un compuesto que es capaz de inhibir la tirosina hidroxilasa para la prevención o el tratamiento del aneurisma de aorta, preferiblemente de aorta abdominal. Por tanto, la presente invención puede englobarse en el campo de la farmacología.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una enfermedad con una elevada tasa de morbimortalidad y una prevalencia que, en varones de más de 65 años, puede alcanzar el 8%. En esta patología, habitualmente asintomática, se produce una degeneración irreversible de la pared vascular que provoca la dilatación progresiva de la aorta y su eventual ruptura (mortal en más de un 80% de los casos). Entre los aspectos más destacados del remodelado vascular en esta patología se encuentran la inflamación, la neovascularización, la degradación de los componentes de la matriz extracelular por un aumento de la actividad de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y la muerte por apoptosis de las células musculares lisas vasculares (CMLV). Actualmente no existen estrategias farmacológicas que limiten el desarrollo del AAA. La única medida terapéutica disponible es la intervención quirúrgica (cirugía abierta o endovascular) de aquellos aneurismas que presentan un alto riesgo de ruptura (diámetro aórtico > 5,5 cm). Aunque se ha sugerido que las estatinas, la doxiciclina, los inhibidores de COX-2 o del enzima convertidora de angiotensina, entre otros, podrían reducir la progresión del AAA, ninguno de ellos ha demostrado un beneficio clínico de forma concluyente. Por tanto, existe la necesidad en este ámbito de desarrollar nuevas herramientas farmacológicas para el tratamiento y prevención de esta patología.

30

La expresión del receptor nuclear NR4A3 (también conocido como NOR-1) está aumentada en las arterias coronarias y en la aorta con aterosclerosis de pacientes con cardiopatía isquémica. NR4A3 pertenece a la subfamilia de receptores nucleares NR4A, que son receptores nucleares singulares, ya que se comportan como genes de

35

respuesta temprana cuya expresión es inducida de forma rápida y muy acentuada por diferentes estímulos. Estos receptores regulan la expresión de genes uniéndose como monómeros a un elemento NBRE (Nerve growth Factor Responsive Element) o como dímeros a un elemento NuRE (repetición palíndroma de NBRE). Asimismo, pueden regular la expresión génica de forma indirecta a través de la modulación de vías de señalización y de la actividad de otros factores de transcripción. NR4A3 modula la respuesta migratoria y proliferativa de las CMLV inducida por diferentes agentes pro-aterogénicos como factores de crecimiento, trombina, lipoproteínas de baja densidad (LDL) nativas y LDL oxidadas. NR4A3 es también crítico en la proliferación y en la respuesta pro-angiogénica inducida por VEGF y trombina en células endoteliales vasculares. Para ejercer estas funciones NR4A3 regula la expresión de genes/proteínas como la ciclina D1 y SKP2 (S phase kinase-associated protein 2) que participan en la proliferación celular, la vitronectina que contribuye a la migración celular o la alfa-2-macroglobulina (A2M) que regula la actividad de MMPs que participan en el remodelado vascular. El papel de NR4A3 en la aterosclerosis es complejo, ya que además de regular la migración/proliferación y la supervivencia/apoptosis de las células vasculares, también regula la activación y expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales que favorecen la infiltración de células inflamatorias y la captación lipídica de los monocitos/macrófagos. La deficiencia de NR4A3 reduce la aterosclerosis en un modelo de ratón ApoE^{-/-} tratado con dieta hipercolesterolémica. Recientemente, hemos observado que la expresión de NR4A3 está incrementada en el AAA humano y que la sobreexpresión de la proteína NR4A3 funcional en la pared vascular de la aorta en ratón (animales TgNR4A3) desarrolla aneurisma de aorta tras ser infundido con angiotensina II, sin requerir un fondo genético hiperlipémico y en ausencia de aterosclerosis como ocurre con los modelos animales descritos hasta la fecha.

Actualmente, se desconoce el mecanismo específico a través del cual el receptor NR4A3 incide en el desarrollo del aneurisma de aorta. Los genes regulados por este receptor nuclear en la pared vascular constituyen potenciales nuevas dianas terapéuticas en la patología aneurismática y su identificación es uno de los objetivos de la presente invención ante la ausencia de estrategias farmacológicas útiles en esta enfermedad. También es objeto de la presente invención proporcionar un nuevo método terapéutico eficaz para el tratamiento del aneurisma de aorta humano.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han demostrado un incremento en la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en muestras de aorta de pacientes con aneurisma de aorta abdominal en comparación con donantes sanos. Además, tanto en la aorta de los ratones transgénicos para NR4A3 como en la de ratones deficientes en la apolipoproteína E (Apo E-/-), ambos modelos susceptibles al desarrollo de aneurismas de aorta, los autores detectan una fuerte inducción de la expresión de la TH en comparación con ratones control resistentes al desarrollo de esta patología. La TH es el enzima limitante en la síntesis de catecolaminas; cataliza la hidroxilación de la tirosina a dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a partir de la cual se sintetizan las catecolaminas dopamina, epinefrina y norepinefrina. En la regulación de la TH participan los factores de transcripción de la familia NR4A

La presente invención se refiere al uso de inhibidores de la TH como fármacos para el tratamiento de la enfermedad aneurismática y proporciona un método para el tratamiento, la prevención, regresión o la ralentización del desarrollo de la enfermedad aneurismática humana que comprende administrar al individuo una cantidad de un inhibidor de la TH suficiente para reducir el diámetro vascular o ralentizar su dilatación, disminuir la inflamación y/o la degeneración aórtica. Tal y como se usan aquí, los términos terapia y tratamiento se definen de forma general de manera que comprendan la cura de la enfermedad, o cualquier mejora, inhibición, mitigación o control de la presencia, prevalencia, gravedad, síntomas etc. de la enfermedad.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto inhibidor de la tirosina hidroxilasa para uso en el tratamiento o prevención del aneurisma aórtico.

El "aneurisma aórtico", "aneurisma de aorta" o "enfermedad aneurismática de la aorta" es la enfermedad, habitualmente asintomática, que cursa con un ensanchamiento anormal de las paredes de la aorta, siendo la aorta la arteria principal que va desde el corazón por el pecho y el abdomen. En esta enfermedad se produce una degeneración de la pared vascular que provoca la dilatación progresiva de la aorta y su eventual ruptura. Por tanto, si un aneurisma crece puede llegar a romperse y provocar una hemorragia peligrosa e incluso la muerte. Preferiblemente, se consideran aneurisma aórtico aquellas dilataciones que dan lugar a un incremento del diámetro

aórtico externo superior o igual a 1,5 veces con respecto al diámetro externo de la aorta de un individuo sano de la misma especie que no presenta aneurisma. Los aspectos más destacados del remodelado vascular que ocurre en presencia de la enfermedad aneurismática son, aunque sin limitarnos, inflamación, neovascularización, degradación de los componentes de la matriz extracelular por un aumento de la actividad de metaloproteinasas de matriz y la muerte por apoptosis de las CMLV. Hay dos tipos de aneurisma aórtico, ambos incluidos en el contexto de la presente invención: el aneurisma aórtico torácico, que ocurre en la parte de la aorta que pasa por el pecho, y el aneurisma aórtico abdominal, que ocurre en la parte de la aorta que pasa por el abdomen.

En una realización preferida, dicho aneurisma aórtico se presenta en la aorta torácica o en la aorta abdominal. En una realización más preferida, el aneurisma aórtico se presenta en la aorta abdominal.

En una realización preferida, dicho compuesto inhibidor de la TH es alfa-metil-p-tirosina (AMPT).

El compuesto inhibidor de la TH debe estar en una forma farmacéuticamente aceptable para uso terapéutico de la invención. Como se usa en el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" significa adecuado para el uso en contacto con los tejidos humanos y animales sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, acorde con una relación beneficio / riesgo razonable, y eficaz para su uso previsto dentro del alcance del buen juicio médico.

Para el propósito de la presente invención, el compuesto inhibidor de la TH puede estar en forma de solvato o sales.

Como se usa en este documento, "solvato" significa un complejo formado por solvatación (la combinación de moléculas de disolvente con moléculas o iones del agente activo de la presente invención), o un agregado que consiste en un ion o molécula de soluto (el agente activo de la presente invención) con una o más moléculas de disolvente. En la presente invención, el solvato preferido es hidrato. Los ejemplos de hidrato incluyen, pero sin limitación, hemihidrato, monohidrato, deshidrato, trihidrato, hexahidrato, etc. Un experto en la técnica debe entender que la sal

farmacéuticamente aceptable del presente compuesto también puede existir en un solvato.

El término "sales" incluye derivados de un agente activo, en donde el agente activo se modifica haciendo sales de adición de ácido o base del mismo. Preferentemente, las sales son sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales incluyen, pero no se limitan a, sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, sales de metales farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y sales de amonio alquilado. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, hidrobromico, hidroyódico, fosfórico, sulfúrico, nítrico y similares.

En otra realización preferida, dicho compuesto se administra en combinación con al menos uno de otros agentes seleccionados de entre fármacos hipolipemiantes, antihipertensivos, betabloqueantes, bloqueantes de canales de calcio, diuréticos, nitratos o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

En otra realización preferida, dicho compuesto se administra en una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente biocompatible.

En la presente invención, se entiende por "composición farmacéutica" aquella composición que contiene al menos un excipiente y uno o más agentes activos en los que al menos uno de ellos es un inhibidor de la TH. El inhibidor de la TH puede inhibir el gen y/o la proteína y/o la actividad de la TH. Tales inhibidores pueden ser moléculas o compuestos de cualquier naturaleza (biológica, sintética/química o una combinación de ambas), disponibles comercialmente o moléculas en desarrollo.

La composición puede administrarse por cualquier ruta incluyendo, aunque sin limitarnos, por vía oral o parenteral, tales como intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracapsular, intraperitoneal, intrarectal, intranasal, o dérmica o intradérmica, mediante por ejemplo un parche dérmico o transdérmico. Además, el sistema de administración puede ser, por ejemplo, aunque sin limitarnos, inyección, oral, spray o inhalador. Sin embargo, la vía de administración de un agente candidato en particular dependerá en parte de su estructura química y puede ser determinada

por los expertos en la materia. El inhibidor de la TH además podrá combinarse con un excipiente, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptable y formularse para su adecuada administración. Formulaciones apropiadas son, aunque sin limitarnos, formas sólidas (cápsulas, pastillas, píldoras, comprimidos, etc.), semisólidas (polvos, formas granuladas, geles o hidrogeles, cremas, ungüentos, bálsamos, mousses, pomadas, espumas, lociones, etc.) o líquidas (solución, suspensión, emulsión, aceite, linimento, jarabe, suero, vaporizador, aerosol, etc.), o el inhibidor puede ir incluido en un sistema de liberación sostenida.

10 Los compuestos inhibidores de TH de la presente invención se pueden administrar por vía oral a seres humanos en un intervalo de dosificación de 1 a 100 mg/kg de peso corporal en dosis divididas. Sin embargo, se ha de entender que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular puede variar y dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y duración de acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, dieta, modo y momento de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular, y la terapia que experimenta el hospedador.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un inhibidor de la TH para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del aneurisma aórtico. En una realización preferida, dicho inhibidor es el AMPT.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento o prevención del aneurisma aórtico que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto inhibidor de la tirosina hidroxilasa a un paciente que lo necesite. Preferiblemente, dicho compuesto es el AMPT.

Se entiende por "cantidad terapéuticamente efectiva" de una composición farmacéutica, una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a las dosis y por los periodos de tiempo necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado, que es una mejora en el fenotipo de la aorta o cualquier mejora, inhibición, mitigación o control de la presencia, prevalencia, gravedad, síntomas etc. de la enfermedad. La cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto puede variar según factores

como el estadio de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto. El régimen de dosificación debe ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. La cantidad terapéuticamente efectiva es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o adverso sea compensada con creces por el efecto terapéutico beneficioso.

5 Una cantidad "profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado, tal como una mejora en el fenotipo de la aorta. Habitualmente, una dosis profiláctica se usa en sujetos en un estadio temprano de la enfermedad en el que la cantidad profilácticamente efectiva es menor que la cantidad terapéuticamente efectiva. Los valores de dosis pueden variar con la gravedad de la condición a ser tratada. Para un sujeto en particular, el régimen de dosis debe ajustarse a lo largo del tiempo, según las necesidades individuales y el criterio de los profesionales responsables de su administración, y ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

15

Se entiende por "mejora en el fenotipo de la aorta" cualquier cambio fenotípico (anatómico) en la aorta que suponga una mejora con respecto al fenotipo (anatomía) de la aorta en presencia de aneurisma y en ausencia de la molécula o compuesto a analizar. Dicha mejora puede ser, por ejemplo, pero sin limitarnos, una reducción en el diámetro de la aorta, o en los parámetros de inflamación, neovascularización, degradación de los componentes de la matriz extracelular o muerte de las CMLV o una reducción en la gravedad de la patología preferiblemente de acuerdo con la escala de Manning.

20

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

30

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **FIG. 1.** Expresión de NR4A3 y tirosina hidroxilasa (TH) en la aorta de pacientes con aneurisma de aorta abdominal (AAA). (A y B) Niveles de ARNm (A) y de proteína (B)

TH en aorta abdominal de pacientes con AAA. A) Nivel de expresión de TH en pacientes con AAA (n=42) y en donantes sanos (n=10) analizados mediante PCR a tiempo real. Los resultados se expresan como la media \pm SEM relativos a los niveles de expresión en donantes. *P < 0,001 vs. Donantes. B) Niveles de proteína de TH analizados por western-blot en dichas muestras. Se muestra la imagen de un resultado representativo. Los niveles de la β -actina se utilizaron como control de carga. C) Niveles de ARNm de NR4A3 analizado por PCR a tiempo real en las muestras descritas en (A). Los resultados se expresan como la media \pm SEM relativos a los niveles de expresión en donantes. *P < 0,001 vs. Donantes. D) Correlación entre los niveles de mRNA de TH y NR4A3 en dichas muestras (r=0,4484, P< 0,005, Spearman Rank-Order Correlation).

FIG. 2. Expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en modelos animales de aneurisma aórtico. Niveles de ARNm de la TH analizados mediante PCR a tiempo real en la aorta de dos modelos susceptibles al desarrollo de aneurisma por infusión de Ang II (ratones TgNR4A3^{CML} y deficientes para la apolipoproteína E (ApoE^{-/-})), y en ratones C57BL/6J (control no transgénico, WT) resistentes al desarrollo de AAA. Los datos relativos a los animales WT se expresan como la media \pm SEM (al menos n=7). * P < 0,001 vs. ratones WT.

FIG. 3. El tratamiento con AMPT inhibe el desarrollo de aneurisma de aorta en ratones ApoE^{-/-} infundidos con angiotensina II. (A) Gráfica en la que se representa la evolución semanal del diámetro aórtico de los ratones ApoE^{-/-} infundidos con suero salino (s. salino) o angiotensina II (Ang II; 1000 ng/kg/min durante 28 días) analizado por ultrasonografía. Los animales infundidos con Ang II fueron tratados o no con AMPT (100 mg/kg vía i.p., administrado dos veces al día desde el día anterior a la implantación de la bomba de Ang II). Los valores corresponden a la media \pm SEM (suero salino, n = 9; Ang II, n= 14; Ang II+AMPT, n=19). P < 0,05: * vs. tiempo 0 del mismo grupo experimental; # vs. animales infundidos con suero salino al mismo tiempo; \$ vs. animales infundidos con Ang II (no tratados con AMPT) al mismo tiempo. (B) Imágenes representativas obtenidas mediante ultrasonografía de la visión transversal de la aorta de cada uno de los grupos experimentales indicados en (A) al cabo de las 4 semanas de tratamiento. (C) Fotografías representativas de las aortas de los ratones en los 3 grupos de estudio al finalizar el estudio.

FIG. 4. El tratamiento con AMPT limita las alteraciones estructurales y el infiltrado inflamatorio en la aorta de los ratones ApoE^{-/-} infundidos con angiotensina II. Se infundieron ratones ApoE^{-/-} con suero salino (s. salino) o angiotensina II (Ang II; 1000 ng/kg/min durante 28 días). Los animales infundidos con Ang II fueron tratados o no con AMPT (100 mg/kg, vía i.p., administrado dos veces al día desde el día anterior a la implantación de la bomba de Ang II). (A y B) Imágenes representativas del análisis histológico mediante tinción de tricrómico de Masson (A) y de orceína (B) en secciones de la aorta abdominal de los grupos de estudio indicados. Las flechas indican rupturas de las fibras elásticas. (C) Tinción representativa para MAC3 (marcador de macrófagos) en secciones de la aorta abdominal de cada uno de los grupos experimentales. Las flechas indican regiones positivas para MAC3. Barra: 100 micras.

FIG. 5 El tratamiento con AMPT inhibe el desarrollo de aneurisma de aorta en ratones TgNR4A3^{CML} infundidos con angiotensina II. (A) Diámetro de la aorta de los ratones no transgénicos (controles; C57BL/6J; WT) y transgénicos para NR4A3 humano (TgNR4A3^{CML}) infundidos con suero salino (s. salino) o angiotensina II (Ang II; 1000 ng/kg/min durante 28 días). Un grupo de ratones TgNR4A3^{CML} infundidos con Ang II fue tratado con AMPT (100 mg/kg, vía i.p., administrado dos veces al día desde el día anterior a la implantación de la bomba de Ang II). El diámetro de la aorta se determinó mediante ultrasonografía. Los valores se expresan como media ± SEM (al menos n=7). P < 0,05: * vs. tiempo 0 del mismo grupo experimental; # vs. el mismo animal infundido con suero salino al mismo tiempo; φ vs. TgNR4A3^{CML} infundidos con Ang II y tratados con AMPT. (B) Imágenes representativas obtenidas mediante ultrasonografía de la visión transversal de la aorta de cada uno de los grupos experimentales indicados en (A) al cabo de las 4 semanas de tratamiento. (C) Fotografías representativas de las aortas de los ratones de los 5 grupos al finalizar el estudio.

FIG. 6. El tratamiento con AMPT limita las alteraciones estructurales y el infiltrado inflamatorio en la aorta de los ratones TgNR4A3^{CML} infundidos con angiotensina II. Se infundieron ratones no transgénicos (controles; C57BL/6J; WT) y transgénicos para NR4A3 humano (TgNR4A3^{CML}) con suero salino (s. salino) o angiotensina II (Ang II; 1000 ng/kg/min durante 28 días). Un grupo de animales transgénicos infundidos con Ang II fueron tratados o no con AMPT (100 mg/kg, vía i.p., administrado dos veces al día desde el día anterior a la implantación de la bomba de Ang II). (A y B) Imágenes

representativas del análisis histológico mediante tinción de tricrómico de Masson (A) y de orceína (B) en secciones de la aorta abdominal de los grupos de estudio indicados. Las flechas indican rupturas de las fibras elásticas. (C) Tinción representativa para MAC3 (marcador de macrófagos) en secciones de la aorta abdominal de cada uno de los grupos experimentales. Las flechas indican regiones positivas para MAC3. Barra: 100 micras.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del tratamiento con AMPT, un inhibidor de la TH, para reducir la incidencia y gravedad de los aneurismas aórticos desarrollados en respuesta a la infusión con Ang II en ratones transgénicos para NOR-1 y ratones Apo E^{-/-}.

15

Ejemplo 1. Análisis de los niveles de expresión de NR4A3 y TH en la aorta de pacientes con AAA y donantes sanos.

Se obtuvieron muestras de pared arterial aneurismática procedentes de pacientes sometidos a cirugía abierta reparadora y de aorta abdominal de donantes multiorgánicos que fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido para posteriores análisis de ARNm y proteína. Se analizaron los niveles de expresión (ARNm) de NR4A3 y TH en dichas muestras mediante PCR a tiempo real. Para ello se extrajo el ARN total de las muestras de aorta indicadas con el sistema RNeasy Micro kit (Qiagen). El ARN (1 µg) se retrotranscribió a ADNc mediante el High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) en presencia de secuencias aleatorias. Asimismo, para la determinación de los niveles proteicos por Western blot, las muestras de tejido se homogeneizaron en un tampón de lisis frío que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (p/v) Triton X-100, 150 mM NaCl y 10 mM DTT, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche). Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (Immobilon, Millipore). El análisis por Western blot se realizó mediante anticuerpos contra la TH (ab75875, Abcam) y contra la β-actina (A5441, Sigma), y la detección usando el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano adecuado y el sistema de detección Supersignal (Pierce). La homogeneidad de carga proteica en cada carril se verificó mediante la tinción de

Ponceau y la determinación de los niveles de β -actina. Estos análisis evidenciaron un incremento en la expresión (ARNm y proteína) de TH en la aorta de pacientes con AAA frente a la de donantes sanos (Figura 1A y B), así como mayores niveles de ARNm de NR4A3 en la aorta aneurismática (Figura 1C). Además, observamos la existencia de una correlación positiva entre los niveles de ARNm de NR4A3 y los de la TH en dichas muestras tras aplicar el coeficiente de correlación de Spearman sobre los datos transformados a Log10 (Figura 1D).

10 Ejemplo 2. Análisis de los niveles de expresión de TH en modelos animales de susceptibles al desarrollo de aneurisma aórtico.

Los estudios se desarrollaron en dos modelos que desarrollan AAA tras la infusión con Ang II: ratones macho transgénicos que sobreexpresan el receptor humano NR43A específicamente en CMLV y ratones macho ApoE^{-/-}. En estos estudios se incluyó un grupo control de ratones macho no transgénicos (C57BL/6J, WT), animales que presentan una baja susceptibilidad al desarrollo de aneurisma por infusión de Ang II. Animales de los 3 grupos de estudio (ratones no transgénicos, transgénicos para NR4A3 y ApoE^{-/-}) fueron sacrificados mediante anestesia terminal por vía intraperitoneal con una mezcla de medetomidina (1 mg/kg) y ketamina (75 mg/kg) en suero salino (volumen final de 200 μ l), las aortas se recogieron inmediatamente, se eliminó el tejido conectivo y el exceso de grasa perivascular, se congelaron inmediatamente en nitrógeno y almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento para la extracción del ARN total tal y como se indica en el Ejemplo 1. El análisis de la expresión de la TH por PCR a tiempo real en la aorta de estos animals mostró que los dos modelos (ratones TgNR4A3^{CML} y ApoE^{-/-}) presentaban niveles de mRNA de la TH muy superiores a los detectados en ratones no transgénicos (Figura 2). El incremento en la expresión de la TH en ambos modelos fue de magnitud similar al observado en pacientes con AAA frente a donantes (Figura 1A). Por tanto, la expresión de TH está fuertemente incrementada en aquellos modelos animales susceptibles al desarrollo de AAA.

30

Ejemplo 3. Análisis del impacto de la inhibición farmacológica de la TH sobre el desarrollo de aneurisma inducido por la Ang II en ratones ApoE^{-/-}.

Los estudios se desarrollaron en ratones macho ApoE^{-/-} que se aclimataron a la instalación durante 1 semana antes del estudio. Los animales fueron infundidos con Ang II (1000 ng/kg/min) mediante minibombas osmóticas (modelo 1004, Alzet)

35

implantadas subcutáneamente en el espacio interescapular de los ratones previa anestesia con isoflurano. El procedimiento dura aproximadamente 15 minutos por animal. Inmediatamente tras la cirugía se administraron antibióticos (penicilina, 22.000 u/Kg, i.m.) y analgésicos (buprenorfina 0,05 mg/Kg, i.m.) para prevenir infecciones y limitar el malestar de los animales, los cuales se mantuvieron sobre una almohadilla térmica hasta que se despertaron tras la intervención y fueron cuidadosamente monitorizados durante el periodo post-cirugía. Un grupo de los ratones infundidos con Ang II recibió tratamiento con AMPT (100 mg/kg, vía i.p) administrado dos veces al día desde el día anterior a la implantación de la bomba de Ang II y a lo largo de todo el estudio (28 días). El grupo control estaba constituido por ratones ApoE^{-/-} infundidos con suero salino. La presión arterial se evaluó semanalmente (a los 0, 7, 14, 21 y 28 días) mediante el método de la pletismografía en la cola. El diámetro de la aorta también se evaluó semanalmente mediante ecografía abdominal utilizando un equipo de ultrasonidos (Vevo2100 Imaging systems; Visualsonics) con un transductor de 30 MHz. Para ello los ratones se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano al 1,5% y se aseguraron en posición supina sobre una plataforma térmica. Tras afeitar la región del precordio se aplicó el transductor a la pared abdominal para realizar las mediciones de la aorta abdominal. Aquellas aortas abdominales con diámetros externos superiores o iguales a 1,5 mm se consideraron aneurismáticas. Todas las medidas se realizaron a partir de las imágenes captadas mediante la utilización del software de análisis. Al cabo de 4 semanas los animales fueron sacrificados mediante anestesia terminal por vía intraperitoneal con una mezcla de medetomidina (1 mg/kg) y ketamina (75 mg/kg) en suero salino (volumen final de 200 µl), las aortas se recogieron inmediatamente, se examinaron para determinar la presencia de aneurismas y se congelaron inmediatamente en nitrógeno o se fijaron en paraformaldehído para la caracterización macroscópica o ser embebidos en parafina y procesados para los estudios histoquímicos. Estos análisis constataron que la infusión con Ang II incrementó la presión arterial, parámetro que no se vio significativamente alterado como consecuencia del tratamiento con AMPT (Tabla I).

30

Tiempo (días)	s. salina	Ang II	Ang II+AMPT
0	102,78±2,58	103,77± 1,39	100,55± 1,97
7	104,67±5,68	129,05±3,84	133,99±4,51

14	100,53±1,63	134,66±5,04*	136,36± 4,93*
21	103,08±4,44	145,59± 4,49*	143,34±4,86*
28	103,09±2,30	151,58±6,60*	154,46±5,72*

s. sal: solución salina. Los valores expresados en mm Hg corresponden a la media ± SEM, *p < 0.001 vs. ratones infundidos con s. salina

Tabla I. Efecto de la administración de AMPT sobre la presión sistólica en ratones Apo E^{-/-} infundidos con solución salina o Ang II

5

Los estudios por ultrasonografía demostraron que la infusión con Ang II en ratones ApoE^{-/-} incrementó significativamente el diámetro de la aorta respecto a los animales control infundidos con suero salino, y que este efecto se atenuó por el tratamiento con AMPT (Figura 3A y B). La administración de AMPT redujo el incremento en el diámetro aórtico a valores similares a los de los animales control, un efecto significativo a los 14 días de tratamiento y que se acentuó de forma progresiva hasta la finalización del estudio tras 28 días, tal y como puede determinarse también a través de la visualización macroscópica de la aorta (Figura 3C).

15

Los análisis histológicos mediante la tinción de tricrómico de Masson de secciones de 5 µm de las muestras de aorta fijadas y embebidas en parafina, demostró que en los ratones ApoE^{-/-} la infusión de Ang II produce un importante remodelado vascular caracterizado por un incremento en la deposición de colágeno que se atenúa por el tratamiento con AMPT (Figura 4A). Asimismo, la tinción de orceína mostró que el AMPT limitaba la desorganización y ruptura de las fibras elásticas inducida por la infusión de Ang II en estos animales (Figura 4B). La inhibición de la TH mediante el tratamiento con AMPT también previno el importante infiltrado de macrófagos (células positivas para MAC3) en la pared vascular inducido por la infusión de Ang II en los ratones ApoE^{-/-} (Figura 4C).

25

Ejemplo 4. Análisis del impacto de la inhibición farmacológica de la TH sobre el desarrollo de aneurisma inducido por la Ang II en ratones transgénicos para NR4A3

Los estudios se desarrollaron de modo similar a como se ha descrito en el Ejemplo 3. En este caso se analizó el efecto de la infusión de Ang II sobre el diámetro de la aorta

30

en animales control (C57BL/6J; WT) y en ratones transgénicos para NR4A3 (TgNR4A3^{CML}). Los ratones transgénicos infundidos con Ang II fueron divididos en dos grupos, uno de los cuales recibió tratamiento con AMPT desde el día anterior a la implantación de las bombas de Ang II, tal y como se indicó en el Ejemplo 3, mientras el segundo grupo sólo recibió el vehículo en el que se administró este fármaco (solución salina). Los grupos control estaban constituidos por ratones transgénicos y por controles no transgénicos infundidos con suero salino. Estos estudios mostraron que la infusión con Ang II incrementó la presión arterial tanto en animales WT como en los ratones transgénicos sin que se observaran diferencias significativas entre ellos o como consecuencia del tratamiento con AMPT (Tabla II).

Tiempo (días)	WT+sal	TG+sal	WT+Ang II	TG+Ang II	TG+Ang II+AMPT
0	105,45±1,12	97,22±4,22	98,571± 6,57	99,88±1,19	100,19±1,32
7	100,20±1,6	98,29±5,38	115,37±2,87*	113,67±1,58*	111,79±1,91*
14	101,50±1,5	98,833±4,73	126,19±5,30*	132,48±2,57*	129,03±1,92*
21	103,37±2,62	103,72±1,28	143,96±16,6*	145,96±8,20*	146,44±6,42*
28	97,09±3,65	100,65±3,61	147,08±3,14*	157,80±12,53*	158,59±3,61*

WT: animales control no transgénicos; TG: ratones TgNR4A3^{CML+}; sal: solución salina. Los valores expresados en mm Hg corresponden a la media±SEM, p < 0.05, * vs. animales infundidos con solución salina.

15

Tabla II. Efecto del tratamiento con AMPT sobre la presión sistólica en ratones WT y TgNR4A3^{CML} infundidos con solución salina o Ang II

Los análisis por ultrasonografía demostraron que la infusión con Ang II incrementó de forma significativa el diámetro de la aorta de los animales transgénicos respecto a los animales WT. El tratamiento con AMPT previno este efecto de forma significativa al cabo de 21 y 28 días (Figura 5A y B) alcanzando valores similares a los de los ratones WT infundidos con Ang II. La atenuación de la dilatación aórtica inducida por la Ang II en los los ratones TgNR4A3^{CML} tratados con AMPT se visualizó también a punto final tras la extracción y fijación de la aorta (Figura 5C).

25

Análogamente a lo descrito en el Ejemplo 3, el tratamiento con AMPT en ratones

TgNR4A3^{CML} atenuó el exacerbado remodelado vascular y la deposición de colágeno inducido por la Ang II en los animales transgénicos, tal y como se observa tras la tinción de tricrómico de Masson (Figura 6A). La tinción de orceína constató que la inhibición de la TH mediante AMPT en animales infundidos con Ang II limitó la

5 desestructuración y ruptura de las láminas elásticas observada en la aorta de los ratones TgNR4A3^{CML} y los estudios inmunohistoquímicos para MAC3 demostraron que este fármaco redujo el importante infiltrado inflamatorio vascular desencadenado por la Ang II en estos animales.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto inhibidor de la tirosina hidroxilasa para uso en el tratamiento o prevención del aneurisma aórtico.
5
2. Compuesto inhibidor de la tirosina hidroxilasa para uso según la reivindicación 1, donde dicho compuesto es alfa-metil-p-tirosina (AMPT).
3. Compuesto inhibidor de la tirosina hidroxilasa para uso según cualquiera de las
10 reivindicaciones 1 o 2, donde dicho aneurisma aórtico se presenta en la aorta torácica o en la aorta abdominal.
4. Compuesto inhibidor de la tirosina hidroxilasa para uso según cualquiera de
15 las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho compuesto se administra en combinación con al menos uno de otros agentes seleccionados de entre fármacos hipolipemiantes, antihipertensivos, betabloqueantes, bloqueantes de canales de calcio, diuréticos, nitratos o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.
5. Compuesto inhibidor de la tirosina hidroxilasa para uso según cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 4, donde dicho compuesto se administra en una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente biocompatible.

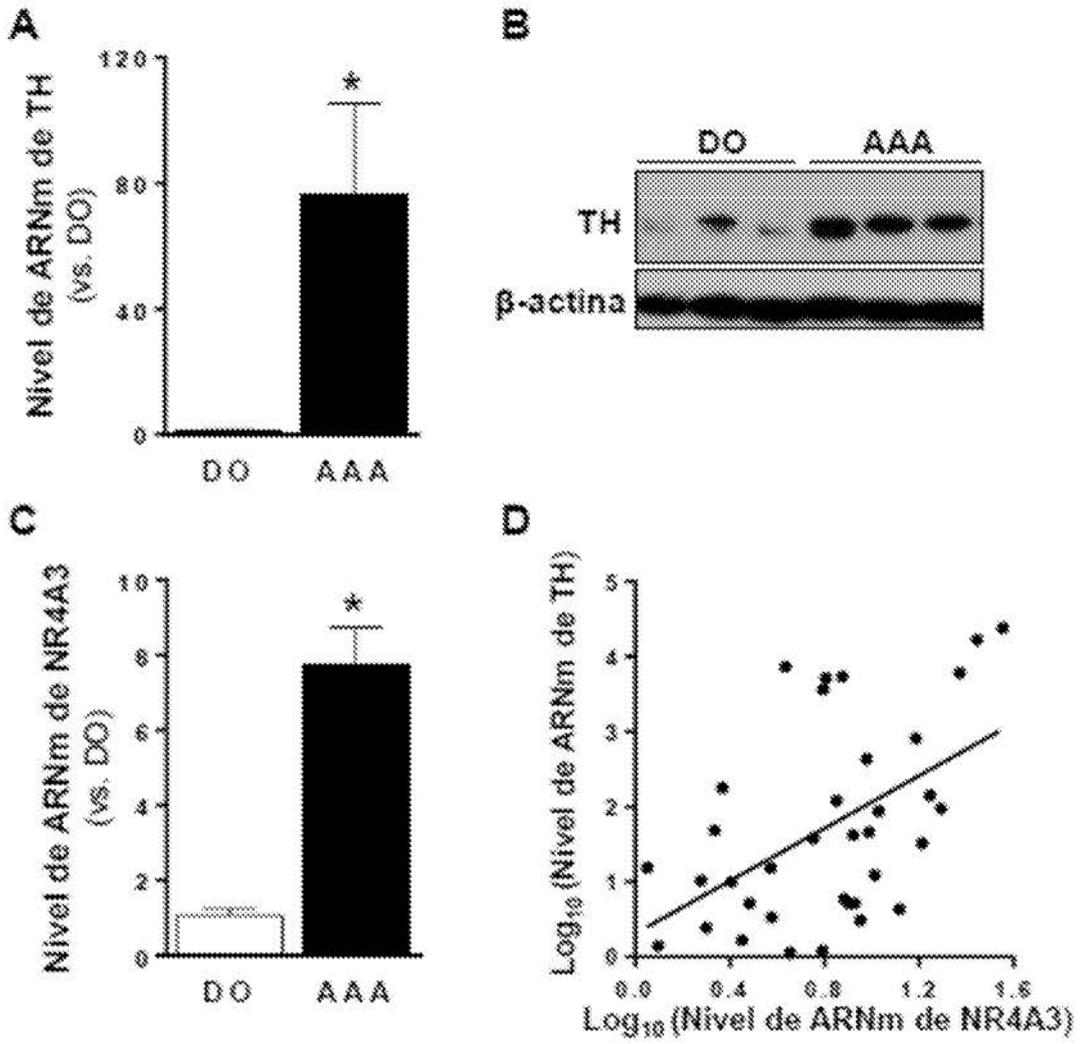


FIG. 1

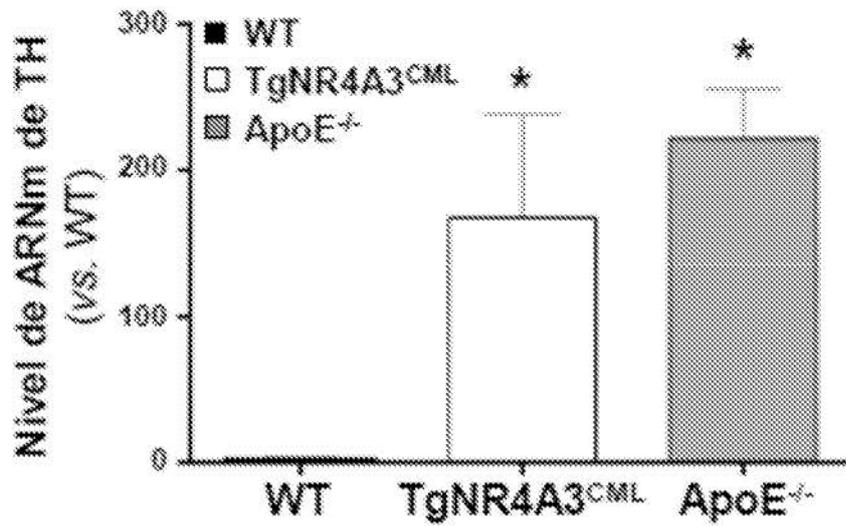


FIG. 2

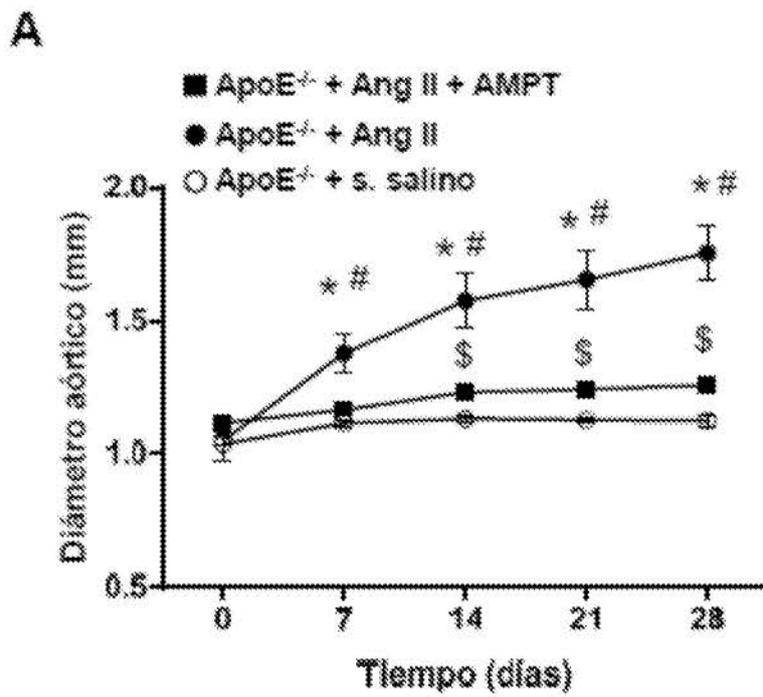


FIG. 3

B

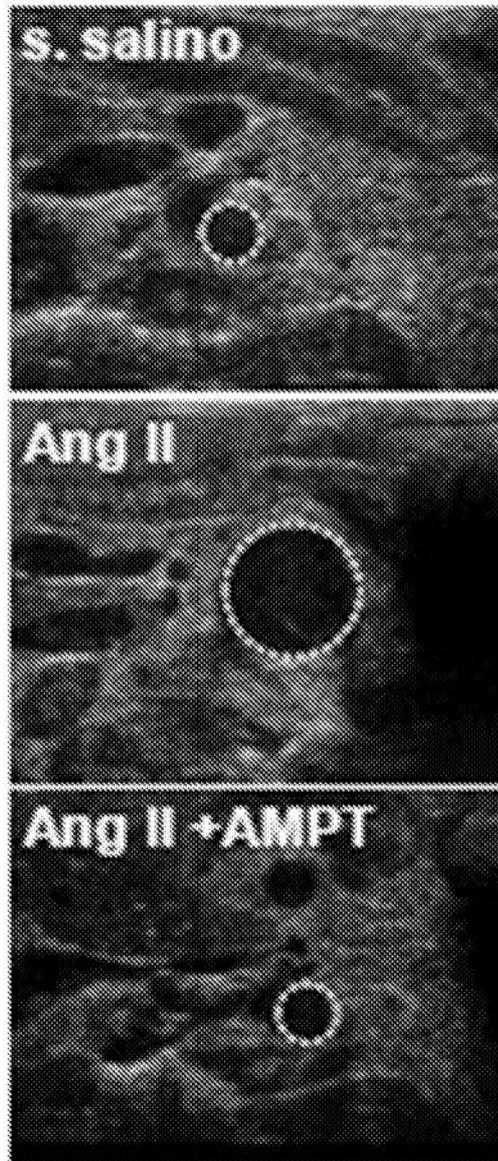


FIG. 3 cont.

C

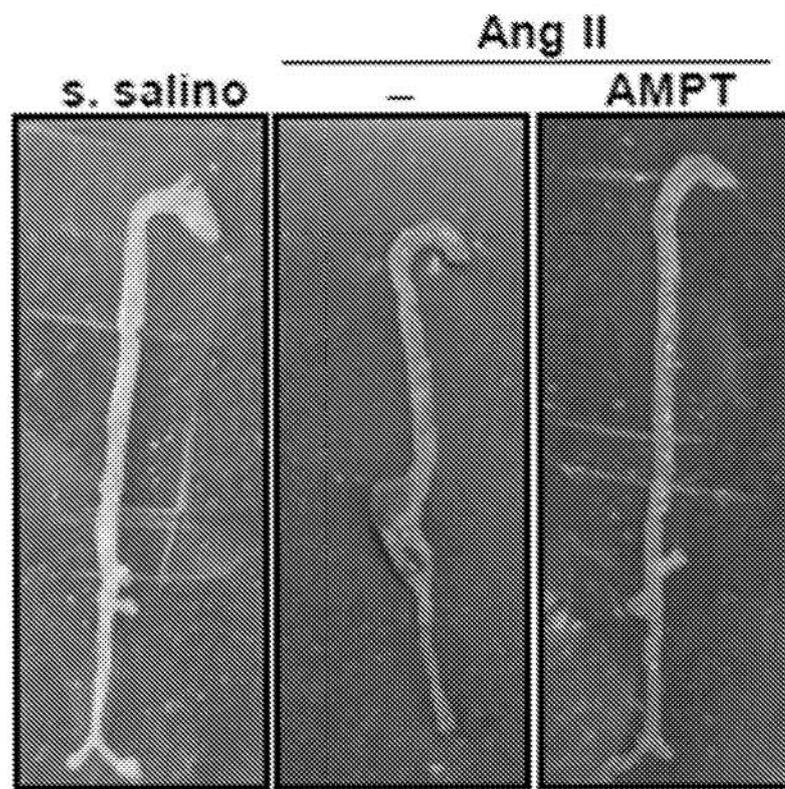


FIG. 3 cont.

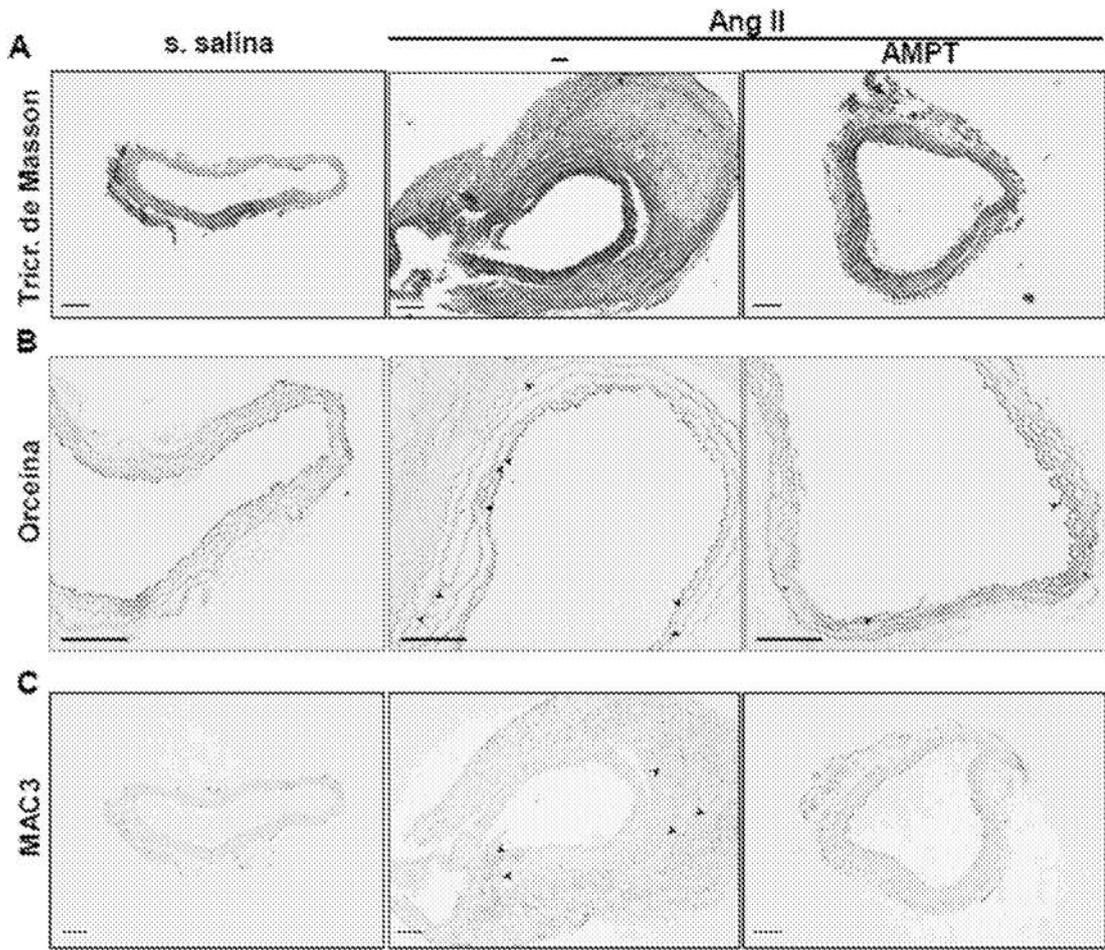


FIG. 4

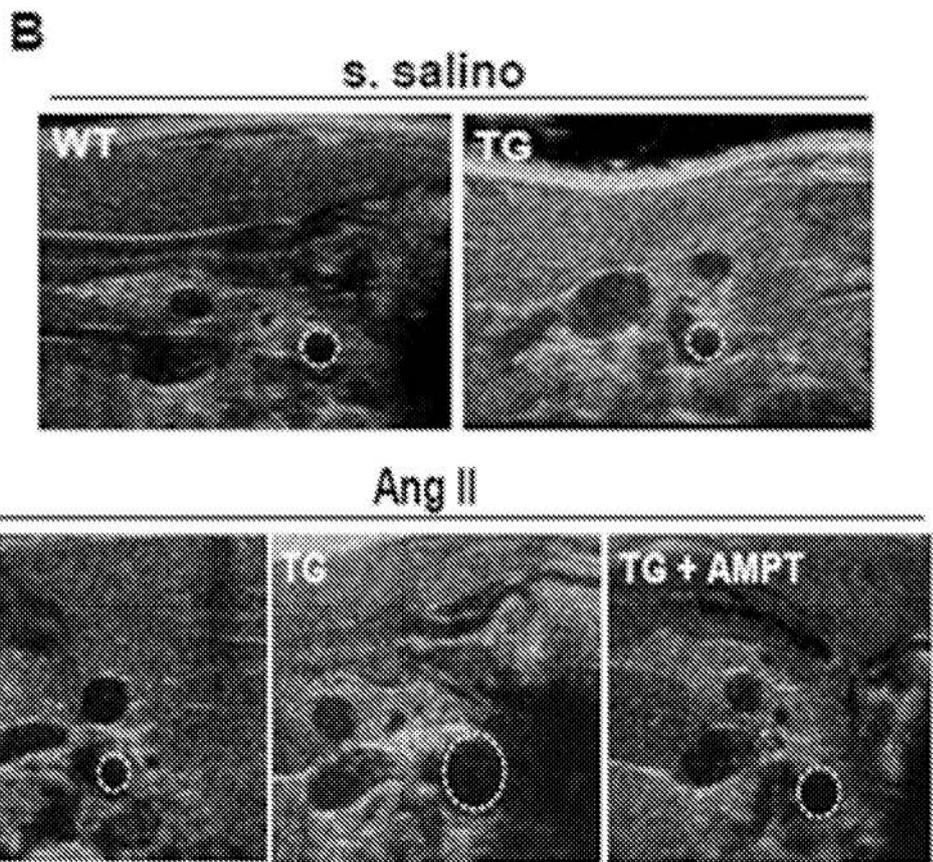
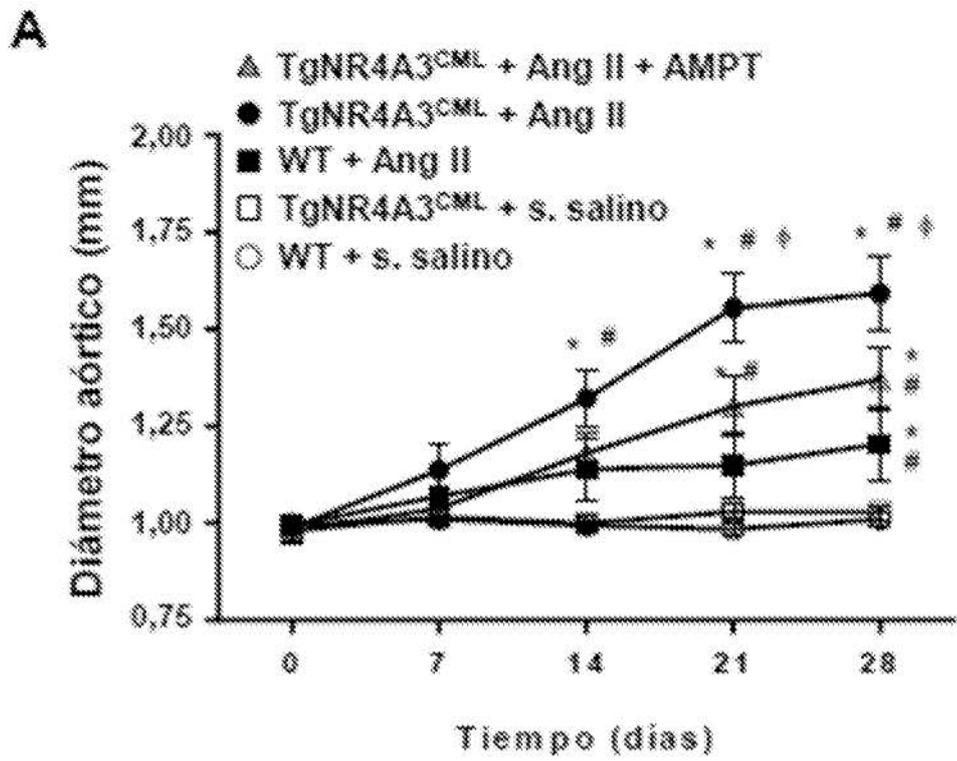


FIG. 5

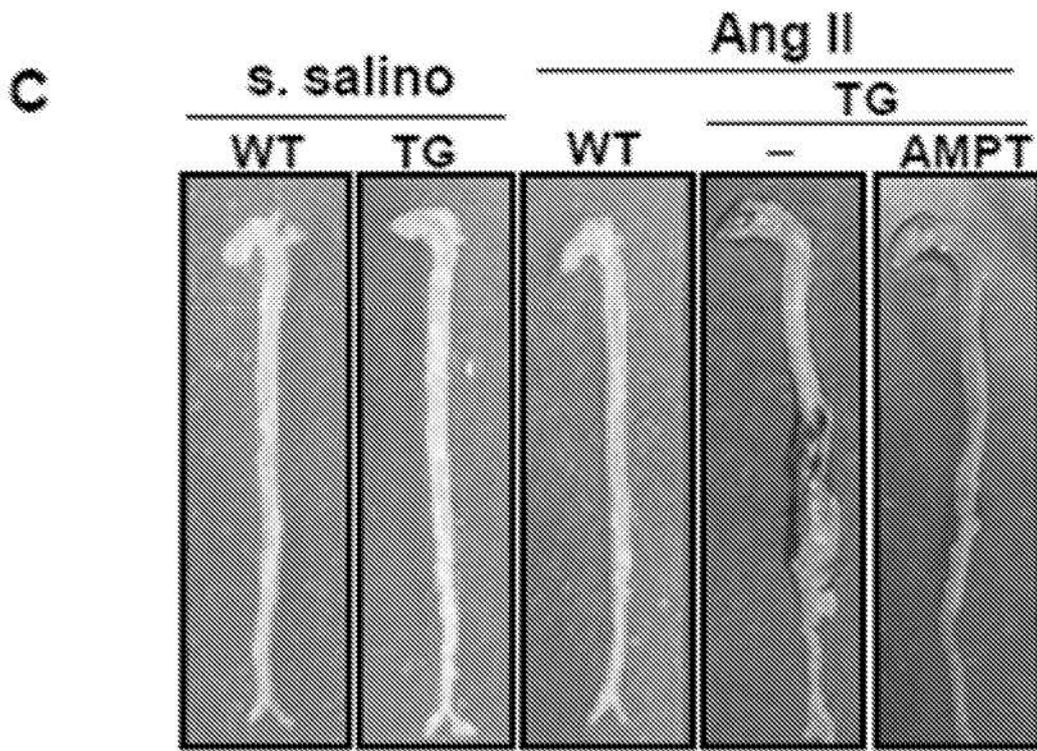


FIG. 5 cont.

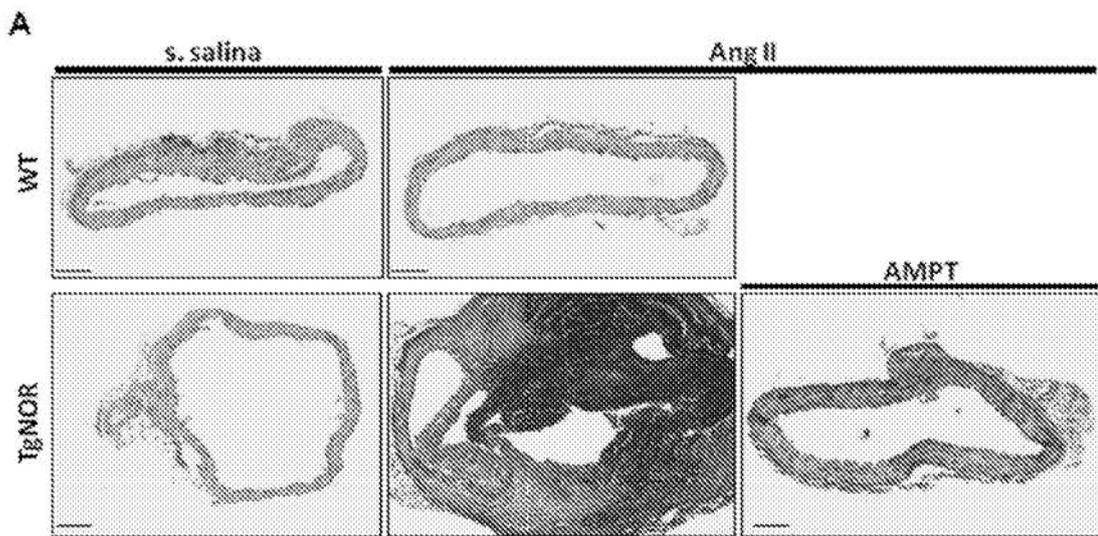


FIG. 6

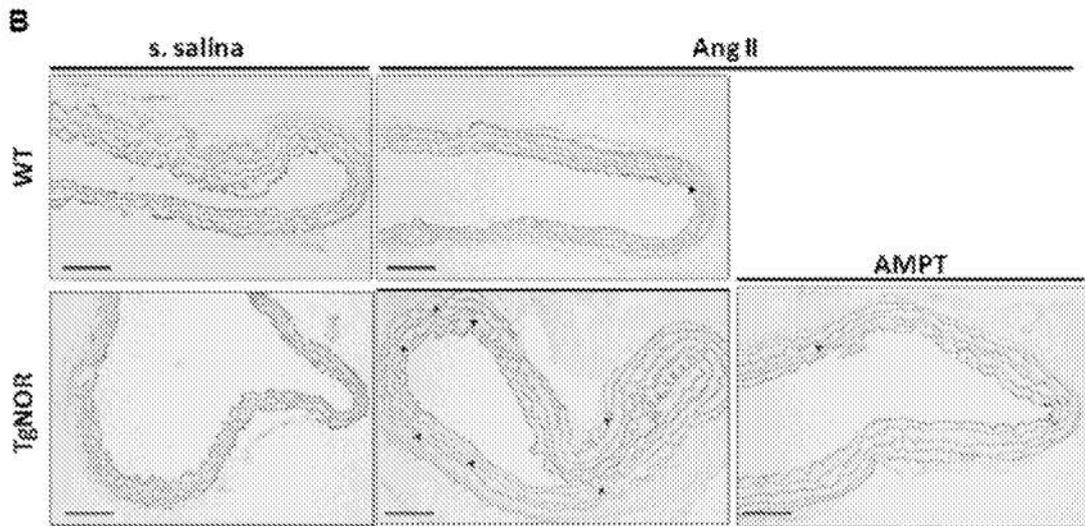


FIG. 6 cont.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2019/070434

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/45 (2006.01)
A61K31/18 (2006.01)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, GOOGLEPATENT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005187278 A1 (DUNCAN P. TAYLOR) 26/06/2005, page 2, paragraph [23] - page 4, paragraph [43]; claim 1, 18	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
29/10/2019

Date of mailing of the international search report
(30/10/2019)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. Ybarra Fernandez

Telephone No. 91 3493410

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2019/070434

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2005187278 A1	25.08.2005	WO2005041864 A2 WO2005041864 A3 WO2005020926 A2 WO2005020926 A3 MXPA06004499 A JP2007509154 A EP1691797 A2 CA2542277 A1 BRPI0415753 A	12.05.2005 18.05.2006 10.03.2005 06.05.2005 27.06.2006 12.04.2007 23.08.2006 12.05.2005 19.12.2006
<hr/>			

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2019/070434

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/45 (2006.01)

A61K31/18 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, GOOGLEPATENT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 2005187278 A1 (DUNCAN P. TAYLOR) 26/06/2005, página 2, párrafo [23] - página 4, párrafo [43]; reivindicación 1, 18	1-5

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
29/10/2019

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
30 de octubre de 2019 (30/10/2019)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Ybarra Fernandez
Nº de teléfono 91 3493410

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2019/070434

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2005187278 A1	25.08.2005	WO2005041864 A2	12.05.2005
		WO2005041864 A3	18.05.2006
		WO2005020926 A2	10.03.2005
		WO2005020926 A3	06.05.2005
		MXPA06004499 A	27.06.2006
		JP2007509154 A	12.04.2007
		EP1691797 A2	23.08.2006
		CA2542277 A1	12.05.2005
		BRPI0415753 A	19.12.2006
-----	-----	-----	-----