



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 276 423**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **97919499 .0**
⑧6 Fecha de presentación : **18.04.1997**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0898707**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.1999**

⑤4 Título: **Metabolismo oxidativo en células de músculos lisos y procedimientos asociados.**

③0 Prioridad: **18.04.1996 GB 9608046**
24.05.1996 GB 9610915
07.02.1997 GB 9702509

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

⑦3 Titular/es: **Medical Research Council**
20 Park Crescent
London W1B 1AL, GB

⑦2 Inventor/es: **Clark, Joseph, Floyd y**
Cadoux-Hudson, Thomas, Andrew, Daniel

⑦4 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Metabolismo oxidativo en células de músculos lisos y procedimientos asociados.

5 La presente invención se refiere al metabolismo oxidativo de las células musculares lisas y a los procedimientos y materiales relacionados.

En particular, la presente invención se refiere a los procedimientos y materiales relacionados, vasoespasmo o vasoconstricción, con

10

(i) el diagnóstico de la existencia o la aparición de vasoespasmo o vasoconstricción crónicos.

(ii) control del tratamiento del vasoespasmo o vasoconstricción crónicos

15

(iii) identificación de nuevos fármacos eficaces para el tratamiento del vasoespasmo o vasoconstricción crónicos.

(iv) determinación de agentes ("espasminógenos") causantes de vasoespasmo o vasoconstricción crónicos.

20 El término vasoespasmo o vasoconstricción representa una causa prevenible de forma significativa de la morbilidad y mortalidad. La célula muscular lisa (CML) vascular es capaz de mantener la tensión durante períodos prolongados con un coste energético bajo (el fenómeno se conoce como "bloqueo". Ello es esencial para la regulación autónoma y continua del flujo sanguíneo a los órganos, etc. Sin embargo, en el vasoespasmo o vasoconstricción existe una contracción anómala de los vasos sanguíneos hacia un lecho vascular combinado con los vasos sanguíneos que tienen una capacidad de relajación disminuida. Ello restringe el flujo sanguíneo y en consecuencia el aporte de oxígeno. 25 Diversos lechos vasculares incluyendo vasoespasmo o vasoconstricción el cardíaco, el mesentérico, el placentario, el uterino y el cerebral pueden verse afectados con las consecuentes implicaciones clínicas graves tal como lesión de órganos, ictus, muerte o fallo cardíaco (Rajani, R.M., B.V. Dalvi S.A. D'Silva, Y.Y. Lokhandwari y P.A. Kale (1991) Postgrad. Medical Journal 67 (783) 78-80 y Gerwertz B.L. y C.K. Zarins (1991) J. vasc. Surg. 14 382-385.)

30 El término "vasoespasmo" se utiliza generalmente en relación con la contracción de los vasos sanguíneos asociados en particular con el cerebro. Por el contrario, el término "vasoconstricción" se utiliza generalmente en relación con las constricciones de los vasos sanguíneos asociados con los órganos a excepción del cerebro. De ahora en adelante, cuando se utilice el término vasoespasmo no debe interpretarse únicamente como referencia a un espasmo vascular asociado con el cerebro salvo que se indique lo contrario en el contexto.

35

La invención de la presente solicitud se describe con referencia a un número de las condiciones clínicas unidas con el metabolismo anómalo asociado con el vasoespasmo o vasoconstricción, a saber: vasoespasmo cerebral como consecuencia de una hemorragia subaracnoidea; pre-eclampsia y enfermedad de Alzheimer. Otras condiciones distintas a las aquí especificadas, asociadas con espasmo/constricción crónicos de células musculares lisas, como el vasoespasmo 40 o vasoconstricción crónicos, serán evidentes para los expertos en la materia.

El vasoespasmo cerebral tiene lugar como resultado de una hemorragia subaracnoidea. El episodio hemorrágico ocurre sin previo aviso, principalmente en adultos jóvenes y afecta aproximadamente a 16 de cada 100.000 personas anualmente. Dicha condición patológica representa aproximadamente el 10% de todas las enfermedades cerebrovasculares. 45

La capa aracnoidea se halla entre la pia mater (que envuelve el cerebro y resigue estrechamente su contorno) y la capa dural última. Comprende dos membranas aracnoideas separadas por el espacio subaracnoideo que es una cavidad rellena por un fluido cerebro espinal (CSF, del inglés *cerebral spinal fluid*) que contiene los vasos sanguíneos 50 que aportan el oxígeno al cerebro. Por ello, estos vasos sanguíneos que suministran al cerebro están bañados por el CSF. Una hemorragia subaracnoidea tiene lugar cuando un vaso sanguíneo se rompe en el espacio subaracnoideo. Típicamente, la ruptura da lugar a un aneurisma. La sangre se escapa del vaso al espacio subaracnoideo en donde se mezcla con el CSF.

55 En el 30% de los pacientes con hemorragia subaracnoidea, la ruptura del vaso sanguíneo da como resultado la muerte antes de que el paciente ingrese en el hospital. El 70% restante sobrevive a la lesión inicial del vaso sanguíneo y son admitidos en el hospital. En estos pacientes ingresados, el vaso lesionado se constriñe para prevenir una pérdida de sangre excesiva y reducir el flujo sanguíneo. Esta constricción inicial en la fase aguda de la condición es conocida como una vasoconstricción y es parte del proceso de respuesta de reparación de un vaso normal. Con la constricción, la 60 reparación de la ruptura se inicia con la formación de un coágulo. En algunos pacientes (el 60% aproximadamente de los ingresados) el vaso se redilata eventualmente tras la oclusión de la ruptura y se normaliza el flujo sanguíneo con el consiguiente buen resultado clínico y el retorno a un estado saludable. Desafortunadamente, y a pesar de los esfuerzos clínicos considerables, otros pacientes (el 40% restante de los ingresados) empeoran. El empeoramiento puede dar como resultado que un vaso vuelva a sangrar o a un hidrocéfalo (exceso de CSF en la cavidad craneal), y en tales 65 circunstancias el paciente puede ser tratado por cirugía y tener una probabilidad de supervivencia relativamente buena. Alternativamente, el empeoramiento puede ser debido a una aparición retardada de vasoespasmo prolongado e irreversible (referido aquí como vasoespasmo crónico). Salvo que la condición se diagnostique antes de su aparición y se trate eficazmente con una terapia de fármacos o con cirugía, se puede producir un ictus, un edema cerebral o la muerte.

Con el fin de prevenir la aparición de vasoconstricción crónica en pacientes con hemorragia subaracnoidea, es necesario ser capaz de diagnosticar de forma precisa aquellos pacientes que probablemente sufrirán la condición. Los procedimientos diagnósticos disponibles en la actualidad no permiten predecir la aparición probable de vasoespasmo crónico en los pacientes con hemorragia subaracnoidea. Únicamente es posible diagnosticar la presencia real de vasoespasmo crónico mediante la realización de un angiograma con el fin de determinar la causa del sangrado y también para buscar evidencias de constricciones vasculares.

Del 70% de los pacientes que sobreviven al sangrado inicial y se someten a un angiograma, el 60% muestra evidencias de vasoespasmo. Únicamente el 40% de éstos presentarán un empeoramiento neurológico. Sin embargo, algunos pacientes pueden desarrollar un empeoramiento neurológico sin evidencias de vasoespasmo angiográfico, pero con una circulación sanguínea reducida. En consecuencia, en este grupo de pacientes los resultados sugieren que un angiograma no es un procedimiento preciso de diagnóstico de la aparición del vasoespasmo crónico.

También existe un tiempo prudencial para realizar una intervención quirúrgica con éxito, ya que, si la intervención se realiza entre 3 y 14 días después de la hemorragia subaracnoidea, se incrementa el riesgo de un vasoespasmo crónico. Los resultados de los angiogramas no son suficientemente predictivos del momento óptimo para practicar la cirugía.

Por tanto, existe la necesidad de un procedimiento que permita predecir lo más pronto posible aquellos pacientes que probablemente entrarán en vasoespasmo crónico, de modo que dicha intervención apropiada y/o requerida pueda iniciarse dentro de los primeros tres días tras la hemorragia cerebral.

Además de la ausencia de procedimientos de diagnóstico adecuados, en el momento actual no hay un tratamiento efectivo para el vasoespasmo cerebral crónico. Hasta el momento, la condición es tratada mediante angioplastia en la arteria estrechada y mediante el uso del antagonista del Ca^{2+} , Nimodipino (Nimotop*, Bayer). Sin embargo, los resultados han mostrado que aunque el tratamiento con Nimodipino produce una pequeña (20%) pero significativa mejora en el resultado clínico de los pacientes, no se altera el tamaño del lumen vascular y por tanto no revierten los efectos constrictores del vasoespasmo cerebral (Pickard, J.D., G.D. Murray y R. Illingworth (1989) Brit. Med. Journal 298 636-642).

Es posible que el uso de antagonistas del calcio sea contraproducente. Los datos previos de la materia indican que el vasoespasmo cerebral es el resultado de un fallo metabólico de las células CML y que la liberación de productos de lisis de las células rojas de la sangre al CSF puede alterar el metabolismo energético de las CML tal y como se evidencia por la disminución de fosfocreatina y ATP (Kim, P., J. Jones y T. M. Sundt (1992) J. Neurosurg. 76 991-996) y en un incremento de ADP. Se ha demostrado que el ADP inhibe los puentes cruzados de las CML (Clark J.F., Z. Khuchua, A.V. Kuznetsov, A.E. Boehm y R. Ventura-Clapier (1994) J. Musc. Res. Cell Motil. 15 432-439 y Clark J.F., G.J. Kemp y G.K. Radda (1995) J. Theor. Biol. 173 207-211) y por tanto la elevación del ADP puede llevar a una incapacidad de las células musculares vasculares (CML) para relajarse. Esta sugerencia concuerda con la observación de que un antagonista del Ca^{2+} como el Nimodipino no puede modificar el estado contráctil, puesto que el mantenimiento de la tensión por ADP es independiente del Ca^{2+} (Clark y col., (1994) *supra*). Por tanto, el uso de cualquier compuesto que resulte en la elevación del ADP es indeseable. Un antagonista del Ca^{2+} puede disminuir el Ca^{2+} citosólico. La disminución en el calcio citosólico puede llevar a una elevación del ADP debido a la disminución de la función mitocondrial por la falta de estimulación del Ca^{2+} .

Los esteroides glucocorticoides, los antioxidantes, los agentes anti-prostaglandina, los antagonistas de la endotelina y otros vasodilatadores han sido, todos ellos, incapaces de proporcionar un beneficio clínico a pesar de los alentadores estudios iniciales en animales.

Por tanto, existe una necesidad real de agentes eficaces en el tratamiento de condiciones clínicas asociadas con el vasoespasmo/vasoconstricción crónicos, tales como el vasoespasmo cerebral tras una hemorragia subaracnoidea.

Investigaciones acerca del significado patológico del fallo metabólico en arterias caninas basílicas tras una hemorragia subaracnoidea muestran que el contenido en ATP, GTP y PCr de las arterias disminuye rápidamente durante los 14 días post-hemorragia, con disminuciones significativas observadas a partir del día 3 (Kim y col., (1992) *supra*). Los mismos investigadores en un estudio en el que se analizaban los niveles de fosfato de alta energía en la arteria cerebral canina durante el vasoespasmo crónico, hallaron que los niveles de ATP, GTP y PCr disminuían también en estas arterias espásticas y que las relaciones ATP:ADP, GTP:GDP y PCr:Cr disminuían. Además, se reducía el contenido total de adenina y creatina.

Esta asociación entre el fallo metabólico y la contracción celular irreversible de CML está respaldada por las observaciones de que: (i) una disminución en el ATP lleva a un estado del tipo "rigor mortis" en las células CML; (ii) la exposición de células CML a 250 μM de ADP intracelular resulta en una incapacidad de las células para relajarse adecuadamente (Clark y col., (1994) *supra*); y (iii) la aplicación de ADP intracelular a células CML contraídas dificulta su capacidad para relajarse de forma dependiente de la dosis (Nishye, E., A.V. Somlyo, K. Torok y A.P. Somlyo y col., (1993) J. Physiol. 460 247-271).

Por tanto, la hipótesis considerada hasta la fecha, basada en los estudios previos en dicha materia, asume que la mitocondria es deficiente en la producción de ATP, disminuyendo así la relación ATP:ADP y causando un incremento relativo en los niveles de ADP celulares, con lo que de este modo se produce un fallo del metabolismo oxidativo. El incremento en los niveles de ADP celular lleva a una contracción prolongada de las células musculares lisas y a su incapacidad para relajarse. La reducción en fosfatos de alta energía se cuantificó en correlación con el vasoespasmo, e indicó que el comienzo del vasoespasmo crónico se correlaciona con una deficiencia en fosfatos de alta energía.

Sin embargo, contrariamente a las indicaciones anteriormente citadas, los presentes inventores han realizado el descubrimiento inesperado y sorprendente de que el incremento en los niveles de ADP en células CML tras una hemorragia subaracnoidea es consecuencia de un incremento en el flujo a través de la vía del metabolismo oxidativo, más que debido a una deficiencia mitocondrial.

Cuando las células CML se estimulan de forma máxima en las condiciones de trabajo, el metabolismo oxidativo es el doble que la tasa basal observada en condiciones de reposo. Las mitocondrias desacopladas con un agente como el dinitrofenol consumen oxígeno sin producir ATP. La tasa máxima de consumo de oxígeno observada en las mitocondrias desacopladas es 3 veces la tasa basal.

Los presentes inventores realizaron el descubrimiento inesperado de que si se aplica, por ejemplo, el sobrenadante del CSF del espacio subaracnoideo de un paciente que ha sufrido una hemorragia subaracnoidea, el sobrenadante del CSF de un paciente con enfermedad de Alzheimer o el suero de pacientes con preeclampsia, a una porción (por ejemplo, a una tira o anillo) de arteria carótida porcina (que contiene células CML) en condiciones de ausencia de carga tal que cualquier incremento en el consumo de oxígeno observado no pueda deberse a una contracción de la tira (sin carga significa sin demanda contráctil de ATP), se produce un aumento significativo (habitualmente un incremento de 5 veces) en la tasa de consumo de oxígeno comparado con la tasa basal de consumo junto con un aumento de la ATPasa. El incremento en la tasa de consumo de oxígeno se desarrolla durante varias horas, pero es claramente evidente tan solo al cabo de una hora y se mantiene durante 5 o más horas.

Este descubrimiento es contrario a la hipótesis anterior tal y como se describió anteriormente, es decir más que un fallo/muerte del sistema respiratorio, se produce un incremento en el flujo. Si, tal como se consideraba anteriormente, el incremento observado en ADP se produjera como consecuencia de un fallo metabólico, no debería esperarse un incremento en el consumo de oxígeno celular.

En Rosenfeld, M.E. (1982), "Studies of Oxidative Metabolism in Vascular Smooth-Muscle. I. Glycogen Utilization by the Medial Layer of Bovine Aorta. II Respiration Driven Calcium Transport in Bovine Aortic Smooth Muscle Mitochondria", DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL. B., THE SCIENCE AND ENGINEERING, ANN ARBOR, US ISSN 0419-4217, VOL 4, N°. 12, pág. 4732, se describe un sistema de análisis para el estudio del metabolismo oxidativo de células musculares lisas vasculares pero no se establece una conexión con un aumento en el metabolismo oxidativo no atribuible a una demanda contráctil de ATP.

Por tanto, la evidencia de los presente inventores sugiere que en una condición clínica asociada con espasmo o contracción crónicos de células musculares lisas (por ejemplo, vasoespasmo o vasocontracción crónicos como en el vasoespasmo cerebral como consecuencia de una hemorragia subaracnoidea, una preeclampsia o la enfermedad de Alzheimer), hay un espasminógeno (refiriéndose este término a un agente o combinación de agentes que causan el incremento del metabolismo oxidativo en células musculares lisas [tales como las células musculares lisas vasculares que entran en vasoespasmo o vasoconstricción crónicos] no atribuible a una demanda contráctil de ATP) presente en fluidos corporales tales como el CSF o la sangre (en hemorragias cerebrales, la sangre se mezcla con CSF en el espacio subaracnoideo), que parece estimular la ATPasa, vasoespasmo o vasoconstricción la actinmiosina ATPasa en las células musculares lisas tales como las CML y es el probable iniciador del espasmo o constricción crónicos. La mitocondria responde al incremento de la actividad ATPasa aumentando el consumo de oxígeno para producir ATP, pero es incapaz de mantener la homeostasis metabólica y por tanto los niveles de ADP aumentan. El incremento de los niveles de ADP parece ser la causa del espasmo/constricción irreversible de los vasos sanguíneos.

En relación con el vasoespasmo cerebral, la investigación sobre la naturaleza del espasminógeno actualmente incluye dos grupos: (a) compuestos vasoactivos indirectos tales como los compuestos inflamatorios (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, y productos de lisis sanguínea); y (b) compuestos vasoactivos directos tales como iones Ca^{2+} , angiotensina y endotelina.

La teoría actual sugiere que en el vasoespasmo cerebral, el(los) espasminógeno(s) se libera en el CSF procedente de la sangre, en donde se facilitan los efectos que causan constricción de las células CML. La endotelina 1 que ha sido implicada en el vasoespasmo de la arteria coronaria (Igarashi K., M. Horimota y T. Takenaka, (1993) J. Cardiol. 23 257-262; Davies M.G., M.L. Klyachkin, J.H. Kim y P.O. Hagen (1993) J. Cardiovasc. Pharmacol. 22 Suppl.8 S348-S351; Chester A.H., G.S. O'Neil, S.P. Allen y T.N. Luu (1992) Eur. J. Clin. Invest. 22 210-213) y el vasoespasmo de arteria mesentérica (Yoshida M., A. Suzuki y T. Itoh (1994) J. Physiol. Lond. 477 253-265) se ha propuesto como un probable espasminógeno, aunque también hay evidencias de que la inducción del vasoespasmo puede estar mediada por una multitud de compuestos (Toyo-oka T., T. Aizawa, N. Suzuki, Y. Hirata, T. Miyauchi, W.S. Chin, M. Yanagisawa, T. Masaki y T. Sugimoto (1991) Circulation 83 476-483).

De aquí en adelante el texto hace referencia a la preeclampsia y la enfermedad de Alzheimer.

La preeclampsia es la principal causa de muerte materna y de prematuridad yatrogénica en U.K. Ésta predispone a una retardación del crecimiento intrauterino, asfixia fetal, y muerte fetal. Las características del síndrome fetal son muy diversas incluyendo la hipertensión la proteinuria, la coagulación anómala y la disfunción multiorgánica. La patología cerebral asociada con el síndrome comprende una de las causas más comunes de muerte maternal. Se considera que la eclampsia, caracterizada por convulsiones epileptiformes, surge de una vasoconstricción de una intensidad tal que pueda provocarse una isquemia cerebral focal, incluso un infarto. Los orígenes de la patología son oscuros, pero el vasoespasmo cerebral asociado se confirma mediante angiografía de resonancia magnética (Matsuda y col., 1995 Gynecol. Obstet. Invest. 40, 249-252) y tomografía por la imagen computerizada. La vasoconstricción patológica que ocurre durante el vasoespasmo cerebral, también es un componente de la hipertensión y de otros problemas de la preeclampsia, incluyendo, además de la preeclampsia en sí misma, la disfunción hepática y el sufrimiento fetal, que son todos ellos característicos del síndrome. Las diversas características del síndrome tienen como consecuencia que el diagnóstico de la condición sea muy subjetivo y en consecuencia inherentemente poco fiable. Existe la necesidad de más procedimientos fiables que permitan predecir tanto la probabilidad de que la condición tenga lugar, o como la propia presencia de la condición.

La enfermedad de Alzheimer es la mayor causa de pérdida de memoria o de demencia en las personas mayores. Las lesiones observadas en pacientes de Alzheimer se caracterizan por la deposición de dos tipos de filamentos anormales: el ovillo neurofibrilar principalmente intraneuronal formado por filamentos helicoidales apareados y las fibras amiloides extracelulares, y por la fosforilación anómala de la proteína τ (tau). Hasta la fecha, el diagnóstico firme de la enfermedad de Alzheimer se realiza en base a la presencia de un gran número de estas estructuras filamentosas anormales en el cerebro.

Sin embargo, el diagnóstico solo puede llevarse a cabo en conjunción con una cirugía importante de naturaleza invasiva. Generalmente, este diagnóstico se realiza post-mortem. Por tanto, existe una necesidad real de procedimientos diagnósticos alternativos/adicionales que sean menos invasivos.

La discusión anterior pone en evidencia que se requieren procedimientos de diagnóstico y tratamiento mejorados en relación con ciertas condiciones médicas tales como el vasoespasmo cerebral crónico, la preeclampsia y la enfermedad de Alzheimer, las cuales se relacionan con la presencia de un agente o combinación de agentes capaces de causar un aumento en el metabolismo oxidativo en las células musculares lisas, tales como las células CML y en consecuencia un estado metabólico anormal asociado con espasmo o constricción crónicos (por ejemplo, vasoespasmo o vasoconstricción).

La presente invención proporciona una nueva manera de predecir la probabilidad de un paciente de sufrir una condición patológica, la cual es consecuencia de la presencia de un agente o combinación de agentes capaces de causar un incremento en el metabolismo oxidativo en las células musculares lisas (por ejemplo, células CML) y por tanto un estado metabólico anormal asociado con un espasmo de células musculares lisas (tales como el vasoespasmo cerebral crónico tras una hemorragia subaracnoidea, la preeclampsia o la enfermedad de Alzheimer). Asimismo, la presente invención también proporciona un diagnóstico de un paciente que tenga dicha condición patológica y/o estado metabólico anormal. La presente invención también proporciona sistemas para (i) identificar espasminógenos presentes en muestras biológicas que estén críticamente implicadas en la inducción de un espasmo o constricción crónicos; (ii) identificar nuevas drogas para la prevención o reducción de dichos espasmos o constricciones; (iii) monitorizar la efectividad de cualquier tratamiento administrado a un paciente para prevenir o reducir tales espasmos/constricciones.

El procedimiento predictivo o de diagnóstico comprende:

en un medio adecuado para el mantenimiento del metabolismo oxidativo, la incubación de una muestra de células o tejidos con un espécimen fluido derivado de un paciente, en donde la muestra comprende células musculares lisas;

la cuantificación de un marcador de metabolismo oxidativo de una muestra de células o tejidos y la detección de un aumento del metabolismo oxidativo que no es atribuible a una demanda contráctil de ATP, siendo dicho incremento indicativo de la existencia de un agente o combinación de agentes en el paciente capaces de causar un aumento del metabolismo oxidativo en células musculares lisas no atribuible a una demanda contráctil de ATP.

Si en un paciente existe un agente o combinación de agentes capaces de causar un incremento en el metabolismo oxidativo en células musculares lisas no atribuible a una demanda contráctil de ATP, el incremento en el metabolismo oxidativo puede ser inusual/anormal y de significado clínico.

El incremento del metabolismo oxidativo puede ser significativo y sostenido. Por tanto, el aumento en el metabolismo oxidativo puede estar representado por un aumento en el consumo de oxígeno de alrededor de 3 veces o superior. El incremento puede ser de un aumento en el consumo de oxígeno de aproximadamente cinco veces. El incremento del metabolismo oxidativo puede mantenerse durante más de una hora, habitualmente, varias horas, vasoespasmo o vasoconstricción 5 o más horas.

El procedimiento puede utilizarse para diagnosticar un paciente o para predecir que un paciente en un futuro presente un estado metabólico anormal (el cual incide sobre el estado contráctil ya que el metabolismo a través de la

producción de ADP alterará el estado contráctil de las células musculares lisas) caracterizado por una elevación del metabolismo oxidativo en las células musculares lisas no atribuible a una demanda contráctil de ATP. La muestra puede comprender células musculares lisas vasculares y el estado metabólico anormal puede estar asociado con vasoespasmo o vasoconstricción crónicos y condiciones clínicas relacionadas. Aunque también es posible utilizar especies y lechos vasculares distintos, tal como se ejemplifica aquí, las células musculares lisas vasculares pueden ser representativas de aquellas implicadas en la supuesta existencia o predicción del vasoespasmo o vasoconstricción de un lecho vascular. El procedimiento puede usarse en relación con el diagnóstico, pronóstico, predicción y/o cuantificación de una condición médica tal como la preeclampsia, la enfermedad de Alzheimer o el vasoespasmo cerebral crónico.

En relación con el vasoespasmo cerebral crónico, si el espécimen causa un aumento en el metabolismo oxidativo que no sea atribuible a una demanda contráctil de ATP (dicha muestra puede describirse como “caliente”) y se obtiene de un paciente dentro de los primeros tres días tras la hemorragia, esto indica que el paciente está en un alto riesgo de entrar en vasoespasmo. Sin embargo, bajo dichas circunstancias es recomendable volver a realizar el análisis diariamente o dos veces al día en las primeras semanas tras la hemorragia para controlar los cambios en la probabilidad de desarrollar un vasoespasmo. El riesgo de vasoespasmo puede aumentar o remitir.

Por el contrario, si el espécimen no tiene ningún efecto sobre el metabolismo oxidativo (dicha muestra puede describirse como “fría”), ello indica que el paciente no está en un alto riesgo de entrar en un vasoespasmo. Sin embargo, bajo tales circunstancias es deseable analizar regularmente al paciente (por ejemplo, diariamente o dos veces al día) dentro de las dos semanas siguientes a la hemorragia para controlar los cambios en la probabilidad de desarrollar un vasoespasmo.

Los resultados del análisis pueden influenciar el tratamiento médico o quirúrgico. En términos generales, cuando se demuestra que el espécimen es “frío” es probable que la cirugía sea segura.

Por tanto, cuando el espécimen es “frío” se puede actuar independientemente del momento de la cirugía con respecto a la hemorragia inicial (tradicionalmente se retrasaría 14 días antes de operar, pero dicho retraso puede ser innecesario cuando el espécimen es frío).

Si el espécimen es “caliente”, las opciones son retrasar la operación hasta el momento en que se obtenga una muestra “fría”, o proceder a la cirugía con el conocimiento de que hay un incremento del riesgo del paciente de entrar en vasoespasmo y que el paciente requerirá entrar en una unidad de cuidado intensivo para tener una estrecha vigilancia y tratamiento.

Por lo general, cuando interese identificar un espasminógeno (es decir, un agente o combinación de agentes capaces de causar un aumento en el metabolismo oxidativo de células musculares lisas tales como las células CML, no atribuible a una demanda contráctil de ATP), se puede recurrir a un procedimiento que implique:

en un medio adecuado para soportar el metabolismo oxidativo, la incubación de una muestra de células o tejidos que comprende células musculares lisas con un espécimen que se piensa contiene dicho espasminógeno y

la cuantificación de un marcador del metabolismo oxidativo de una muestra de células o tejidos; y

la detección de un aumento en el metabolismo oxidativo que no es atribuible a una demanda contráctil de ATP, tal como un incremento en el metabolismo oxidativo que sea indicativo de la presencia de dicho espasminógeno en el espécimen.

Las células musculares lisas pueden ser células musculares lisas vasculares. Las células musculares lisas vasculares pueden ser de un tipo representativo de aquellas que se consideren afectadas *in vivo* por el espasminógeno.

El espécimen biológico puede comprender una fracción de un espécimen derivado de un paciente. Pueden derivarse fracciones según técnicas de purificación de metabolitos o proteínas conocidas como la separación de fases, electroforesis, cromatografía y espectometría de masas. El procedimiento puede comprender el paso adicional de purificación del espasminógeno a partir de la muestra biológica según técnicas de purificación de proteínas y técnicas de purificación de pequeñas moléculas conocidos en la materia.

Espasminógenos o especímenes derivados de pacientes (por ejemplo, sueros) identificados como capaces de causar un aumento del metabolismo oxidativo en células musculares lisas, por ejemplo, células musculares lisas vasculares, no atribuibles a una demanda contráctil de ATP pueden utilizarse en los procedimientos descritos aquí para la búsqueda de compuestos útiles como fármacos para contrarrestar o bloquear los efectos del espasminógeno.

Generalmente, si se desea buscar compuestos con potencial eficacia como agentes terapéuticos el procedimiento comprende:

en un medio adecuado para mantener el metabolismo oxidativo, la incubación de una célula o muestra de tejido que comprende células musculares lisas con (a) un espécimen, agente o combinación de agentes que se sabe que causan un aumento en el metabolismo oxidativo de la célula o muestra de tejido que no es atribuible a una demanda contráctil de ATP; y (b) un compuesto a analizar;

la cuantificación de un marcador de metabolismo oxidativo; y la detección de la ausencia o reducción del aumento en el metabolismo oxidativo no atribuible a una demanda contráctil de ATP, la cual está normalmente generada por el espécimen, agente o combinación de agentes, siendo cualquiera de dichas ausencias o reducciones indicativa de la potencial eficacia del compuesto a analizar como un agente terapéutico.

La muestra de células o tejidos puede comprender células musculares lisas vasculares.

La muestra de células o tejidos puede incubarse con el compuesto a analizar antes de su incubación con el espécimen, agente o combinación de agentes.

Alternativamente, la célula o muestra de tejido puede incubarse con el compuesto a analizar y el espécimen, agente o combinación de agentes de forma esencialmente simultánea. En cualquiera de estas aproximaciones, la ausencia o reducción del incremento en el metabolismo oxidativo que no sea atribuible a una demanda contráctil de ATP, puede detectarse por comparación con un análisis control, que es idéntico excepto por no presentar el compuesto a analizar.

De modo alternativo, en un medio adecuado para el mantenimiento del metabolismo oxidativo de la muestra de células o tejidos puede incubarse con el espécimen, agente o combinación de agentes antes de la incubación con el compuesto a analizar y por el tiempo suficiente, para establecer un aumento en el metabolismo oxidativo que no sea atribuible a una demanda contráctil de ATP. El compuesto a analizar se añade entonces y se puede cuantificar el marcador de metabolismo oxidativo con el objetivo de detectar una reducción del incremento en el metabolismo oxidativo que no sea atribuible a una demanda contráctil de ATP asociada normalmente con el espécimen, agente o combinación de agentes.

Mediante la utilización de una de las aproximaciones que aquí se describen, es posible identificar nuevos compuestos y procedimientos de tratamiento siguiendo el uso de una aproximación como aquí se describe. Tales fármacos pueden usarse en la preparación de medicamentos para la prevención o tratamiento de estados metabólicos o contráctiles anormales caracterizados por un aumento en el metabolismo oxidativo en células musculares lisas (por ejemplo, células musculares lisas vasculares) no atribuible a una demanda contráctil de ATP. Puede ser la prevención/tratamiento del vasoespasmo o vasoconstricción crónicos. La prevención o tratamiento pueden estar relacionados con la preeclampsia, la enfermedad de Alzheimer o el vasoespasmo cerebral crónico.

Si se desea controlar la efectividad de cualquier tratamiento administrado a un paciente para prevenir o paliar un estado metabólico o un espasmo/constricción anómalos (por ejemplo, vasoespasmo o vasoconstricción crónicos) o los síntomas de la preeclampsia, la enfermedad de Alzheimer o el vasoespasmo crónico cerebral, el procedimiento implica desarrollar un procedimiento de diagnóstico, tal como se describió más arriba y repetir el procedimiento en uno o más intervalos de tiempo seleccionados apropiadamente para detectar una alteración del aumento en el metabolismo oxidativo que no sea atribuible a una demanda contráctil de ATP y en donde una reducción del aumento indica que el tratamiento está siendo terapéuticamente ventajoso.

Las incubaciones pueden llevarse a cabo en cualquier medio adecuado para mantener el metabolismo oxidativo. Un medio apropiado para la incubación es el tampón Krebs con 11 mM de glucosa y/o 5 mM de piruvato. Otro es el tampón Krebs-Hensleit que contiene 0,5 mM de KH_2PO_4 con 11 mM de glucosa o 5 mM de piruvato como sustrato. Las incubaciones pueden ser aireadas con 95% O_2 - 5% CO_2 . El pH debe ser 7.4. Otros medios y condiciones de incubación adecuados para los procedimientos aquí descritos están disponibles y son conocidos por los expertos en la materia.

La muestra de células o tejidos utilizada debe ser una que representativa de las implicadas en el espasmo. Vasoespasmo o vasoconstricción, si el espasmo es de células musculares lisas vasculares, la muestra debe comprender células CML y por tanto la muestra tisular debe comprender un cultivo adecuado de células CML o una tira de tejido de, por ejemplo, arterias basílicas, carótidas, coronarias o mesentéricas de cerdo, cobaya o humanas o aorta de rata. Si nos ceñimos a la cuantificación del espasmo asociado con un órgano en particular, se debe seleccionar el cultivo celular o el tejido correspondiente, vasoespasmo o vasoconstricción, para el vasoespasmo cerebral crónico es posible seleccionar arterias carótidas o arterias basílicas y para el vasoespasmo cardíaco se puede seleccionar la arteria coronaria o la aorta. En relación con la preeclampsia se pueden usar muestras de células o tejidos derivadas de lechos vasculares uterinos o placentarios o procedentes de la arteria umbilical.

En lo que concierne al espasmo de células musculares lisas no vasculares, la muestra se seleccionaría en consonancia y el cultivo celular/tejidos pueden derivarse de, por ejemplo, el intestino, el endometrio, el miocardio, o tejido del músculo esquelético. Entre las muestras de cultivo celular que pueden usarse se hallan, vasoespasmo o vasoconstricción, las células CML A7R5 derivadas de aorta de embrión de rata (ECACC, PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Salisbury, Wiltshire, United Kingdom SP4 OJG).

En términos generales, el espécimen puede ser una muestra de fluido cualquiera procedente de un paciente (vasoespasmo o vasoconstricción, CSF, sangre, orina, suero, plasma, fluido peritoneal, fluido pericárdico, fluido pleural) y que probablemente contiene el espasminógeno si está presente. Obviamente, la selección de un espécimen de fluido para el análisis debe estar dictada por la naturaleza de la condición del paciente, pero en muchos casos la muestra de fluido será sangre o suero. Para el vasoespasmo cerebral crónico resultante de una hemorragia subaracnoidea, el espécimen

de fluido podría ser el CSF que se ha mezclado con la sangre en el espacio subaracnoideo como consecuencia de la hemorragia.

El marcador del metabolismo oxidativo puede ser la tasa de consumo de oxígeno, la actividad ATPasa (véase el ejemplo 6 y Clark, J.F. y Dillon, P.F., 1995 J. Vasc. Res. 32, 24-30), la actividad cinasa y la concentración de ADP (Fisher, M.J., y Dillon, P.F., 1988 NMR en Biomed. 1, 121-126), los cuales, todos ellos se incrementarán paralelamente al aumento en el metabolismo oxidativo. El estado de fosforilación de la miosina es un marcador alternativo del metabolismo oxidativo (Dillon, P.F. y col., 1981 Science 211, 495-497) y otros marcadores adecuados que son conocidos por los expertos en la materia. Las técnicas para la cuantificación de varios marcadores indicadores del estado del metabolismo oxidativo son conocidas por los expertos en la materia. Vasoespasmo o vasoconstricción, si se elige cuantificar la tasa de consumo de oxígeno como un marcador del metabolismo oxidativo, la incubación puede realizarse en un vaso hermético que incorpore un sensor para la cuantificación de la concentración de oxígeno en la solución de incubación. Alternativamente, pueden cuantificarse marcadores tales como la actividad ATPasa en muestra de células o tejidos, la concentración de ADP en el modelo de célula o tejido, el estado de fosforilación de la miosina u otras proteínas contráctiles asociadas con la miosina en la célula o tejido, todo ello en concordancia con técnicas conocidas, y tal como se refiere en los artículos citados anteriormente.

El periodo de incubación puede ser cualquier periodo suficiente como para permitir la detección de un aumento en el metabolismo oxidativo. Los ejemplos incluidos aquí proporcionan a los expertos en la materia una cierta orientación, pero éstos deberían ser capaces de determinar el periodo de incubación apropiado. Generalmente, cuando el espécimen es sangre periférica y el tejido es músculo liso vascular en forma de una tira de arteria carótida porcina, puede ser necesario un periodo de incubación superior a 120 minutos. En relación con el vasoespasmo cerebral crónico, y el CSF como espécimen, el periodo de incubación puede ser más corto que el anterior. Otro tipo de análisis más minuciosos pueden necesitar hasta 2 días de incubación. Por supuesto, tal como se indicó anteriormente, es posible utilizar formas alternativas al tejido específico, por ejemplo tejido muscular liso vascular, para ejemplificar los descubrimientos y la invención, por ejemplo, células musculares lisas procedentes de cultivo celular.

En los apartados anteriores, se buscaba por ejemplo cualquier incremento en el metabolismo oxidativo que no sea atribuible a una demanda contráctil de ATP. Por tanto, puede ser que las células musculares lisas de la muestra presenten o no una demanda contráctil de ATP, es decir no se estén contrayendo. Si las células musculares lisas del modelo de la muestra de células o tejidos no presentan una demanda contráctil de ATP, cualquier incremento en el metabolismo oxidativo es indicativo de la presencia de un espasminógeno en el espécimen. Un aumento del metabolismo oxidativo 3 veces superior a la tasa basal debe considerarse como altamente indicativo de la presencia de un espasminógeno en el espécimen.

Alternativamente, las células musculares lisas de la muestra pueden tener una demanda contráctil de ATP. En este caso, se buscará un incremento en el metabolismo oxidativo que no sea atribuible a esa demanda contráctil. Esto puede realizarse por comparación con un control de incubación en el que las células presenten una demanda contráctil de ATP antes de la aplicación de un espécimen fluido. A continuación, es posible comparar cualquier aumento en el metabolismo oxidativo antes y después de la adición de la muestra de fluido. Como alternativa, puede compararse una prueba de incubación con un control de incubación "separado". "Separado" en el sentido de que es una incubación diferente que comprende una muestra separada pero comparable de células o tejidos, tratada/incubada de forma idéntica excepto por la adición de la muestra de fluido.

La presente invención puede continuarse por un procedimiento para el tratamiento de un paciente con una hemorragia subaracnoidea y bajo riesgo de entrar en vasoespasmo vascular crónico que comprende la administración al paciente de: (a) un compuesto que lleva a las células CML al estado contraído y/o (b) un compuesto que bloquea los efectos del espasminógeno.

La histamina es un ejemplo de un compuesto que lleva a las células al estado de defosforilación tras la contracción (conocido como el estado de "bloqueo"). La contracción del músculo liso vascular requiere que la cinasa de la cadena ligera de la miosina fosforile la miosina ATPasa, y que la miosina ATPasa interaccione con la actina antes de que se pueda generar tensión. Ello es una característica única, cuando se compara con otros músculos, ya que permite mantener la tensión durante periodos prolongados con un bajo coste de energía (Dillon, P.F. y col., 1981 Science 211, 495-497; Lynch, R.M. y Paul R.J. 1987 Am. J. Physiol. 256, c328-c334; Hai, C.M. y Murphy, R.A. 1988 Am. J. Physiol. 254, c99-c106). El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, que estimula la cinasa de la cadena ligera de la miosina, es necesario para generar pero no para mantener la tensión (Dillon, P.F. y col., 1981 *supra*). En realidad, una tensión próxima a la máxima puede mantenerse con concentraciones de Ca^{2+} por debajo de las necesarias para logar una activación máxima del 50% de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (Hai, C.M. y Murphy, R.A. 1988). Esta condición se alcanza por defosforilación de la miosina ATPasa, cuando unida a la actina, "bloquea" efectivamente las dos proteínas juntas. Este estado de cierre conjunto se denomina "bloqueo" y no es sensible a la estimulación por Ca^{2+} (Hai, C.M. y Murphy, R.A. 1988). Sin embargo, otras muchas enzimas son sensibles al Ca^{2+} tales como las enzimas del ciclo de Krebs (Drummond, R.M.J.V. y col., 1995 Biophysics J. 68, A230) y se considera que la activación por calcio de la mitocondria puede ser esencial durante periodos de flujo metabólico intenso.

El colocar las células CML en un estado de "bloqueo" parece evitar que las células CML experimenten un incremento del flujo respiratorio y en consecuencia se evite el contacto con el espasminógeno.

La dobutamina que también sitúa las células en el estado de “bloqueo”, parece que bloquea los efectos del espasminógeno.

En consecuencia, la presente invención puede continuarse con los procedimientos de tratamiento basados tanto en la histamina como en la dobutamina.

Un tratamiento adecuado puede comprender la utilización de 500 mg de dobutamina en 50 ml de solución salina fisiológica. La infusión se inicia con 1 mg/h hasta proporcionar 10-15 mg/h. La infusión puede continuarse durante un período (generalmente de 24-48 hora) suficiente para proporcionar la respuesta adecuada de presión sanguínea (vasoespasma o vasoconstricción, 120/80) o de la excreción renal.

La presente invención puede utilizar un mecanismo compuesto por un aparato diseñado para la realización de una prueba y una muestra de células o tejidos en donde:

El aparato diseñado para la prueba comprende un recipiente, una cubierta para el cierre hermético y un sensor de oxígeno para la cuantificación de la concentración de oxígeno de cualquier solución en el mencionado recipiente; y

La muestra de células o tejidos que comprenden una porción de una arteria basilar humana o una muestra de células musculares lisas vasculares.

El mecanismo puede comprender un medio de agitación dentro del recipiente. El mecanismo puede comprender un medio líquido para la localización en el recipiente. Los medios adecuados se describen más adelante.

Los medios de incubación utilizados en los procedimientos y las asociaciones de mecanismos descritos más arriba han de estar libres de cualquier material que contenga células que puedan llevar a cabo procesos metabólicos. En consecuencia, no deben contener microorganismos viables como las bacterias. Dichos medios pueden convertirse en medios exentos de microorganismos viables mediante la utilización de técnicas de esterilización adecuadas, filtros (vasoespasma o vasoconstricción, filtros para la eliminación de bacterias) u otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

Al utilizar un procedimiento tal como se indicó más arriba para identificar un espasminógeno que induzca espasmos de las células musculares lisas, los presentes inventores han realizado el descubrimiento inesperado de que el ácido okadaico estimula un aumento del metabolismo oxidativo en la arteria carótida porcina. El efecto causado por el ácido okadaico es muy similar al causado por el sobrenadante de la hemorragia subaracnoidea. Al investigar este último con mayor detalle, los inventores obtuvieron resultados experimentales que indican que las propiedades físicas de la sustancia en el sobrenadante de la hemorragia subaracnoidea, que actúa como un espasminógeno, parece ser consistente con las propiedades del ácido okadaico. Específicamente, ambos son estables en solución ácida, tienen dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, y tienen un peso molecular inferior a 1000 daltons. El ácido okadaico tiene un peso molecular de 805 daltons, es lipofílico, proteínofílico (aunque no es propiamente una proteína por sí mismo).

El ácido okadaico es un compuesto lipofílico que inhibe específicamente la fosfatasa. Se sabe que causa constricción de las células musculares lisas y originalmente se halló en moluscos. La inhibición de la desfosforilación de la miosina ATPasa podría causar un aumento de la actividad ATPasa (véase más arriba en el texto). La presente invención sugiere en consecuencia que: (i) los mecanismos patofisiológicos del vasoespasma o vasoconstricción crónicos implican probablemente la inhibición de fosfatasa o la pérdida del control de cinasas y/o ATPasa; e (ii) el espasminógeno comprende probablemente una entidad molecular que provoca la inhibición de la fosfatasa. Alternativamente, el espasminógeno puede ser una molécula que provoca la activación de una proteína cinasa. El resultado de la inhibición de la actividad proteína-fosfatasa es un aumento de la población de proteínas desfosforiladas. Ello es también el resultado de la activación de las proteína-cinasas (vasoespasma o vasoconstricción, la cinasa C “PKC”). Es más, los ésteres de forbol como el forbolmeristato causarán una activación significativa de PKC en la célula muscular lisa vascular (y en otros tejidos). En los vasos, la activación de PKC da como resultado la fosforilación de Calponina y Caldesmón. Estas proteínas son inhibidores de la miosina ATPasa y cuando se fosforilan, desaparece la inhibición de la miosina ATPasa. En consecuencia, mediante la fosforilación activa de la Calponina y Caldesmón, ya no se inhibe la miosina ATPasa; efecto similar al descrito aquí.

En consecuencia, el espasminógeno puede ser una entidad molecular que sea propiamente un inhibidor de fosfatasa o un activador de una proteína cinasa. Alternativamente, puede ser una entidad molecular que active un inhibidor o que estimule la producción de un inhibidor de fosfatasa. También es posible que el efecto espasminogénico sea provocado por un grupo de compuestos que en conjunto actúan para inhibir una fosfatasa o activar una proteína cinasa. De este modo, la entidad molecular que ocasiona la inhibición de la fosfatasa puede ser estable en solución ácida, puede tener dominios hidrofóbicos e hidrofílicos y un peso molecular inferior a 1000 daltons. En consecuencia los inventores demuestran que el espasminógeno es una entidad molecular (o un grupo de compuestos) que provocan la inhibición de la fosfatasa o la activación de una proteína cinasa. La entidad molecular puede ser un inhibidor de la fosfatasa o una entidad molecular que active un inhibidor de la fosfatasa o que estimule la producción de un inhibidor de la fosfatasa. El espasminógeno puede comprender un grupo de compuestos que en su conjunto, actúan para inhibir una fosfatasa. La entidad molecular o uno o más de los grupos de compuestos mencionados pueden ser estables en solución ácida, pueden tener dominios hidrofóbicos o hidrofílicos y un peso molecular inferior a 1000 daltons. La entidad molecular o uno o más de un grupo de los compuestos mencionados puede ser un compuesto de tipo ácido okadaico.

En consecuencia, también se proporciona una nueva vía para el diagnóstico de pacientes que padecen una condición patológica, consecuencia del espasmo de las células musculares lisas (como el vasoespasmo cerebral crónico después de una hemorragia subaracnoidea) y que comprende la obtención de una muestra de tejido o fluido de un paciente y el análisis de la misma para determinar la presencia de un inhibidor de una fosfatasa o de un activador de una proteína cinasa. Los análisis pueden realizarse para determinar un inhibidor de fosfatasa que tenga una o más de las características siguientes:

(a) estabilidad ácida; (b) PM inferior a 1000 daltons; (c) dominios hidrofílicos e hidrofóbicos; (d) dominio lipofílico; (e) dominio proteínofílico. El análisis puede ser para un inhibidor de fosfatasa que inhiba la desfosforilación de la miosina ATPasa. El análisis puede ser para un compuesto relacionado con o similar al ácido okadaico. Es posible realizar el análisis para un inhibidor de una fosfatasa de acuerdo con técnicas conocidas y disponibles en la materia. El OxBox y los procedimientos, tal como se describen más arriba que cuantifican un marcador del metabolismo oxidativo son sensibles, fiables y cuantitativos. Por ello pueden utilizarse como un ensayo más general de ayuda en el diagnóstico y búsqueda de otros ensayos que impliquen la inhibición de fosfatasa.

Se proporciona además la utilización de un inhibidor de fosfatasa o un activador de proteína cinasa (vasoespasmo o vasoconstricción, tal como se indicó más arriba) para la búsqueda de compuestos de utilidad como fármacos para contrarrestar o bloquear sus efectos espasminogénicos sobre el músculo liso. Vasoespasmo o vasoconstricción, en el procedimiento de búsqueda descrito más arriba, el compuesto espasminogénico de la incubación puede comprender un inhibidor de fosfatasa como el ácido okadaico.

Se proporcionan además procedimientos de tratamiento y medicamentos para condiciones asociadas con el espasmo o constricción crónicos, por ejemplo el vasoespasmo o vasoconstricción, que se basan en la utilización de un compuesto que bloquea los efectos inhibidores del espasminógeno o un grupo de compuestos espasminogénicos. De este modo el compuesto del tratamiento puede bloquear los efectos inhibidores de un inhibidor de fosfatasa, o puede bloquear la activación de un inhibidor de fosfatasa, o la producción de un inhibidor de fosfatasa. Un tal compuesto puede comprender una pareja de unión específica para el inhibidor de fosfatasa. Dicha pareja de unión específica puede estar enmascarando al inhibidor, reduciendo o evitando de este modo su interacción normal con la fosfatasa. Respecto al apartado anterior, una pareja de unión específica comprende un miembro de una pareja de unión específica que tiene una especificidad particular uno con otro y que en condiciones normales se unen preferentemente entre sí respecto a otras moléculas. Ejemplos de parejas de unión específica son los antígenos y los anticuerpos (vasoespasmo o vasoconstricción, en el ejemplo citado anteriormente, el inhibidor de fosfatasa podría ser el antígeno en el contexto de una pareja de unión específica de tipo inmune); los ligandos y los receptores; los ligandos y las enzimas; las enzimas y los sustratos; y las secuencias nucleotídicas complementarias. El experto en la materia será capaz de pensar en muchos otros ejemplos, por lo que no es necesario representar una lista de todos ellos. Además, el término "pareja de unión específica" también es aplicable si uno o ambos elementos constitutivos comprenden parte de una molécula mayor.

Alternativamente, el compuesto puede comprender un ligando distinto no funcional (en el sentido de que no se inhibe la acción catalítica normal de la fosfatasa) para la fosfatasa, es decir un mimético del inhibidor. En dicho caso, se reducen los sitios de unión disponibles para la interacción con el inhibidor, con lo que se produce una disminución de los efectos inhibidores del ligando. El diseño de miméticos y análogos estructurales (como los análogos estructurales antagonistas) es una aproximación conocida para el desarrollo de compuestos farmacéuticos basados en un compuesto líder. Con el fin de que la presente invención sea claramente comprendida, se describen a continuación las realizaciones y ejemplos a modo ilustrativo únicamente con ayuda de las figuras referidas aquí más adelante.

La Figura 1 es una representación de un diagrama del dispositivo de cuantificación (denominado de aquí en adelante "OxBox").

La Figura 2 muestra el efecto de la sangre o del sobrenadante del CSF subaracnoideo de un paciente con vasoespasmo cerebral crónico según el consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de la arteria carótida porcina durante un periodo de 5 horas; A = muestra del sobrenadante de hemorragia subaracnoidea; B = muestra de sangre periférica; C = muestra control.

La Figura 3 muestra el efecto de la sangre o del sobrenadante de CSF subaracnoideo de un paciente con vasoespasmo cerebral crónico según el consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de aorta de rata durante un periodo de 4,5 horas; A = muestra de sobrenadante de hemorragia subaracnoidea; B = muestra de sangre periférica.

La Figura 4 compara el efecto de la sangre de un paciente con vasoespasmo (B) con la sangre de un paciente que no padece vasoespasmo cerebral crónico (C) según el consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina durante un periodo de 7 horas.

La Figura 5 muestra el efecto del sobrenadante hemorrágico subdural según el consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina durante un periodo de 5 horas; C = muestra control; D = sobrenadante del espacio subdural.

La Figura 6 muestra el efecto del sobrenadante de hemorragia intraventricular según el consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina durante un período de 5 horas; C = muestra control; E = sobrenadante de hemorragia intraventricular.

5 La Figura 7 muestra el efecto de la histamina y el sobrenadante de hemorragia subaracnoidea según el consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina durante un período de 3 horas; A = muestra de sobrenadante de hemorragia subaracnoidea; F = pretratamiento con histamina; C = muestra control.

10 La Figura 8 muestra el efecto del ácido okadaico según el consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina durante un período de aproximadamente 5 horas.

15 La Figura 9 muestra los efectos estrechamente comparables de ácido okadaico y del sobrenadante de CSF subaracnoideo de un paciente con vasoespasmio cerebral crónico según el consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina durante un período de 5 horas.

La Figura 10 muestra la tasa de consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina en presencia de plasma sanguíneo de una mujer pre-eclámpsica, una embarazada normal y una no embarazada, y en ausencia de plasma.

20 La Figura 11 muestra las tasas de consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina a los 90 minutos en presencia de suero sanguíneo de mujeres preeclámpsicas como pacientes y sus controles, mujeres embarazadas.

25 La Figura 12 muestra la tasa de consumo de oxígeno (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina en presencia de CSF de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

La Figura 13 es una representación de la tasa de consumo de oxígeno en estado de equilibrio (micromoles/min/g de peso seco) de arteria carótida porcina en presencia CSF de pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes controles.

30 La Figura 14 muestra el consumo de oxígeno real (micromoles/min/g de peso seco) de la arteria carótida porcina en presencia de CSF de individuos con enfermedad de Alzheimer y de pacientes controles. El * señala el punto en el test de CSF de un paciente con Alzheimer, en donde se eliminó el CSF.

35 Los ejemplos y las realizaciones descritas aquí sirven para ilustrar la presente invención y no han de interpretarse como limitantes del ámbito de la invención.

El consumo de oxígeno de una muestra de tejido o de células puede cuantificarse utilizando un dispositivo sencillo tal como se representa en la Figura 1, y al que los inventores denominan "OxBox".

40 Una muestra de tejido que comprende células musculares como la arteria carótida porcina (14) se disecciona a 4°C a partir de una determinada fuente, vasoespasmio o vasoconstricción un cerdo recién sacrificado, y se eliminan los tejidos envolventes. La muestra de tejido se mantiene a 30°C en un recipiente hermético (10) en una solución previamente aireada (12) para soportar el metabolismo oxidativo. El recipiente (10) debe ser resistente al calor y la luz, y debería estar hecho de cualquier material que proporcione dichas cualidades, vasoespasmio o vasoconstricción el vidrio, el perspex, el plástico. El experto en la materia podrá reconocer otros materiales.

45 Para el tipo de vasoespasmio a estudiar, puede utilizarse cualquier tejido adecuado. Vasoespasmio o vasoconstricción, si se trata del diagnóstico de vasoespasmio cerebral, es posible utilizar tejido de carótida o arteria basilar porcinas. Si se trata de diagnosticar el vasoespasmio cardíaco, pueden seleccionarse las arterias coronarias adecuadas. Alternativamente, es posible utilizar un cultivo de células musculares adecuadas. También es posible utilizar especies y lechos vasculares distintos, tal como se ejemplifica aquí.

50 Una solución adecuada (12) para el mantenimiento de la muestra de tejido y el metabolismo oxidativo es el tampón de Krebs con glucosa 11 mM y/o piruvato 5 mM. Una solución alternativa es el Hepes. Otros tampones adecuados para el mantenimiento del tejido o de las células a utilizar serán del conocimiento de los expertos en la materia. El pH debería ser de aproximadamente 7,4.

60 Un sensor de oxígeno (16) se suspende en la solución para la cuantificación del consumo de oxígeno durante un período adecuado de tiempo (vasoespasmio o vasoconstricción de 1 a 5 horas) en condiciones experimentales diversas.

Ejemplo 1

65 Una muestra de aproximadamente 0,5 g de arteria carótida porcina se utilizó en un OxBox tal como se describió más arriba. La muestra se sumergió en 6 ml de solución tampón, se expuso al aire (20% de oxígeno aproximadamente) con una tasa de consumo de oxígeno de 0,2 μ Mol/mg de peso seco de tejido/min. La muestra de tejido se mantuvo en estas condiciones durante 30 min y la concentración de oxígeno en la cámara se cuantificó durante un período de tiempo para proporcionar la tasa de consumo de oxígeno basal del tejido en condiciones de reposo.

Una muestra de 200 μ l de sobrenadante de CSF de hemorragia subaracnoidea (A) o de suero de sangre periférica (B) (sangre recogida en un tubo colector que contiene un coagulante adecuado como el citrato sódico; se obtuvo el suero mediante centrifugación de la sangre o el sobrenadante a 1000 rpm durante 20 min; es preferible evitar la utilización de la heparina como anticoagulante ya que puede alterar los mecanismos de señalización intracelular) de un paciente con vasoespasmo cerebral crónico se añadió al recipiente y se cuantificó la concentración de oxígeno durante un período de tiempo de 300 minutos con el fin de determinar cualquier cambio en la tasa de consumo de oxígeno.

Se establecieron los controles adecuados (C). Estos controles pueden ser simplemente la ausencia de muestra. Alternativamente, pueden comprender muestras biológicas que no contengan un espasminógeno, vasoespasmo o vasoconstricción suero humano o CSF de un paciente con hidrocefalo, pero no con vasoespasmo. Por lo demás, se utilizan las mismas condiciones experimentales.

Como puede verse en la Figura 2, se observó un aumento de 5x en la tasa de consumo de oxígeno para el sobrenadante de hemorragia subaracnoidea (A). Esto comprende una primera demostración de un compuesto vasoactivo en CSF.

La sangre periférica (B) de dicho paciente, aunque causa un aumento definido y consistente en la tasa de consumo de oxígeno, no produce un efecto tan marcado como el sobrenadante de hemorragia subaracnoidea. Los controles (C), tal como se discutió más arriba, no presentaron ningún efecto sobre el consumo de oxígeno.

Ejemplo 2

El experimento se realizó igual que en el Ejemplo 1, salvo que se utilizó aorta de rata en lugar de arteria carótida porcina. Las muestras del test son (A) y (B) al igual que antes. Los resultados se muestran en la Fig. 3. Al igual que en el Ejemplo 1 anterior, se observó un aumento de 5x en la tasa de consumo de oxígeno para el sobrenadante de hemorragia subaracnoidea (A) y el incremento de consumo de oxígeno asociado con la sangre periférica (B) no fue tan marcado. El experimento muestra que los resultados de la Figura 2 no son específicos para la arteria carótida porcina.

Ejemplo 3

El experimento se realizó al igual que el Ejemplo 1, salvo que esta vez se comparó la sangre periférica de un paciente con hemorragia subaracnoidea con vasoespasmo cerebral crónico (B) con la sangre periférica de un paciente sin vasoespasmo cerebral crónico (C).

Tal como puede verse en la Figura 4, la sangre periférica de un paciente con vasoespasmo crónico causa aproximadamente un incremento de 2x en el consumo de oxígeno, mientras que la sangre periférica del paciente control mostró únicamente un aumento muy pequeño y no significativo. Con el fin de observar mejor los efectos sobre el consumo de oxígeno causado por la sangre periférica de un paciente con vasoespasmo cerebral crónico, es ventajoso aumentar el tiempo de incubación. Ello puede observarse a partir de la comparación entre la Figura 2 y la 4.

Ejemplo 4

El experimento se condujo al igual que en el Ejemplo 1, salvo que esta vez las muestras test comprenden el sobrenadante del espacio subdural (D) o de la hemorragia intraventricular (E) de un paciente con vasoespasmo cerebral crónico después de una hemorragia intraventricular. Tal como puede verse en la Figura 5, el sobrenadante del espacio subdural no aumenta el consumo de oxígeno. La Figura 6 muestra que aunque el sobrenadante de la hemorragia intraventricular causa un aumento del consumo de oxígeno, tiene un efecto atenuado ya que requiere 3,5 horas para que se inicie el aumento en el consumo de oxígeno. Como puede observarse en la Figura 2, el sobrenadante del espacio subaracnoideo de un paciente con vasoespasmo cerebral crónico, causa casi un aumento inmediato en la tasa de consumo de oxígeno. Este resultado sugiere que en el vasoespasmo de hemorragia subaracnoidea, el espasminógeno puede asociarse con la mezcla de sangre y CSF del espacio subaracnoideo.

Ejemplo 5

El experimento se condujo al igual que en el Ejemplo 1, salvo que se utilizó la arteria basilar humana en lugar de la arteria carótida porcina. El experimento investiga los efectos del pretratamiento con histamina. Si la arteria es pretratada con histamina (F) (concentración de histamina de 10^{-4} M en 6 ml de tampón OxBox durante 1 hora), se elimina el aumento mayor en el consumo de oxígeno en respuesta al sobrenadante del espacio subaracnoideo de un paciente con vasoespasmo crónico (a). El efecto se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 6

Las arterias carótidas porcinas se mantuvieron en solución salina fisiológica (PSS) enfriada en hielo con NaCl 116 mM, NaHCO_3 25 mM, KCl 5,4 mM, KH_2PO_4 5,4 mM, CaCl_2 1,2 mM, MgSO_4 1,25 mM y glucosa 11 mM. Se eliminaron los restos de grasa y tejido conectivo de las arterias a 4°C. Se colocaron 2-3 g de peso seco de arterias en un tubo RMN de 10 mm de diámetro y superfundidas a 37°C a una velocidad de flujo constante de 20 ml/min con el tampón de Krebs-Hensleit que contenía KH_2PO_4 0,5 mM junto con glucosa 11 mM o piruvato 5 mM como el sustrato

y se airearon con 95% de O₂/5% de CO₂. Las arterias se perfundieron durante 90 minutos en medio control y luego en presencia de tampón de Krebs-Henslei suplementado con 1 parte de 30 de sobrenadante de hemorragia subaracnoidea recogido de cuatro pacientes con vasoespasma angiográfico. Las carótidas se equilibraron durante 20 minutos en un tubo de RMN y se cuantificó el flujo de ATPasa en un espectrómetro de Bruker con interfaz de 400 MHz. El flujo iónico de la ATPasa (ATP a ADP) aumenta 6 veces (0,02-0,12 $\mu\text{mol/g/s}$) y se mantiene durante 18 h. La adenilato cinasa (Pi + ADP a ATP) no logra mantener el ritmo con el flujo de ATPasa y en consecuencia los niveles de ADP aumentan (de 41 a 114 $\mu\text{mol/l}$).

En consecuencia el CSF hemorrágico causa un aumento amplio e importante en la actividad ATPasa; muy por encima de cualquier espasminógeno o vasoconstrictor conocidos. El CSF hemorrágico parece estimular directamente la actinmiosina ATPasa en el músculo liso. La mitocondria responde, pero es incapaz de mantener la homeostasis metabólica y el ADP aumenta.

Ejemplo 7

El OxBox, tal como se describe aquí, puede utilizarse para controlar el tratamiento del vasoespasma cerebral crónico u otras condiciones como el vasoespasma cardíaco. El presente ejemplo concierne el control del tratamiento del vasoespasma cerebral crónico con dobutamina. Un día después de la aparición de la hemorragia subaracnoidea, una muestra de sangre o CSF de un paciente se diagnostica como capaz de estimular la arteria carótida porcina para incrementar el consumo de oxígeno y en consecuencia se considera que contiene un espasminógeno (véase el Ejemplo 1). Dicha muestra se describe como "caliente". El paciente se somete a un tratamiento con un agente vasoactivo adecuado como la dobutamina, vasoespasma o vasoconstricción 500 mg de dobutamina en 50 ml de solución salina fisiológica. La infusión comienza con 2,5 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corporal/min, alcanzándose los 10 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corporal/min. La infusión puede continuarse durante un máximo de 10 días. (La dobutamina se utiliza convenientemente en el tratamiento de la insuficiencia renal y presión arterial elevada). El paciente se controla gracias a la utilización del Ox-Box en vasoespasma o vasoconstricción los días 2, 4 y 8, hasta que la muestra procedente del paciente esté "fría", es decir no sea capaz de estimular la arteria carótida para aumentar el consumo de oxígeno.

Típicamente, la muestra se vuelve fría al cabo de unas horas de la infusión con dobutamina, lo que indica la eficacia del tratamiento con dobutamina.

Ejemplo 8

El OxBox tal como se describe aquí puede utilizarse para buscar nuevos fármacos para tratar condiciones como el vasoespasma cerebral crónico que resulta del espasmo de las células musculares lisas. Tal como se muestra en el Ejemplo 5, el pretratamiento del tejido de la arteria basilar humana con histamina reduce la tasa de consumo de oxígeno llegando casi al nivel del control después de la aplicación del sobrenadante de hemorragia subaracnoidea (Figura 7), cuando se cuantifica durante un período de 180 minutos. Se sabe que la histamina induce la contracción de los vasos y la presente invención cree que este estado de contracción puede proteger la estimulación de la ATPasa causada por el sobrenadante.

En consecuencia, el OxBox y el procedimiento aquí descrito pueden utilizarse para buscar fármacos que bloqueen los efectos espasminogénicos del CSF. Los resultados que se muestran en la Figura 7 indican la eficacia de la histamina como un tratamiento para prevenir el vasoespasma cerebral crónico.

Ejemplo 9

El OxBox tal como se describe aquí puede utilizarse para la determinación de espasminógenos. Es posible probar espasminógenos posibles por su aumento en el consumo de oxígeno de vasoespasma o vasoconstricción la arteria carótida porcina tal como se describe en el Ejemplo 1. En uno de dichos tests, la arteria carótida porcina se estimuló con ácido okadaico 1 nM y se cuantificó la tasa de consumo de oxígeno durante un período de aproximadamente 5 horas. Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9. Se puede ver que el ácido okadaico causa un aumento del consumo de oxígeno muy similar al causado por el sobrenadante del CSF subaracnoideo de un paciente con vasoespasma cerebral crónico.

Ejemplo 10

El experimento se realizó al igual que en el Ejemplo 1, salvo que esta vez los efectos del suero obtenido de pacientes preeclámpsicos se compararon con los del suero de mujeres con embarazo normal y no embarazadas como controles. Los resultados (Figuras 10 y 11) muestran que los cambios metabólicos en los vasos expuestos al suero de pacientes preeclámpsicos son comparables con los cambios metabólicos en los vasos expuestos vasoespasma o vasoconstricción al CSF de pacientes con vasoespasma de hemorragia subaracnoidea o al ácido okadaico, un inhibidor de la fosfatasa de tipo 2A.

En los pacientes preeclámpsicos, se observó una estimulación significativa de la respiración al cabo de 90 minutos cuando las arterias carótidas se expusieron al suero de pacientes preeclámpsicos (cuando se compararon con los controles apareados; Figura 10; n = 17 parejas concordantes). Frecuentemente, se observó un aumento de cinco veces

en el consumo de oxígeno en la arteria carótida porcina en reposo (sin contracción) en respuesta al suero de pacientes preeclámpsicos.

Además, en una comparación de sueros de preeclámpsicos y mujeres embarazadas como controles se observó una notable aceleración de la respiración, siendo significativamente superior al control (Figura 11). Todos los experimentos se realizaron a 30°C en vasos en reposo, sin contracción.

Es interesante remarcar que los espasminógenos causantes del vasoespasmo cerebral al estimular los vasos durante la preeclampsia pueden no ser los mismos. Dos diferencias apuntan a ello. En primer lugar, la estimulación de preeclampsia es completamente reversible mediante vasoespasmo o vasoconstricción lavado, mientras que no lo es la estimulación del vasoespasmo cerebral. En segundo lugar, la estimulación podría evitarse si el CSF del vasoespasmo cerebral se pretratara con esterasa. Por el contrario, el tratamiento con esterasa no tuvo efecto sobre la estimulación de los vasos con sueros preeclámpsicos.

Ejemplo 11

El experimento se realizó al igual que en el Ejemplo 1, salvo que esta vez los efectos del CSF obtenido de pacientes con enfermedad de Alzheimer se comparó con el CSF de individuos sin la enfermedad. Los resultados (véanse las Figuras 12, 13 y 14) muestran que los cambios metabólicos en los vasos expuestos a CSF de pacientes con enfermedad de Alzheimer son comparables a los cambios metabólicos en los vasos expuestos a vasoespasmo o vasoconstricción CSF de pacientes con vasoespasmo de hemorragia subaracnoidea o al ácido okadaico, un inhibidor de la fosfatasa de tipo 2A.

Se observó una estimulación significativa de la respiración al cabo de 60 minutos. La Figura 12 muestra la tasa del consumo de oxígeno para las arterias carótidas porcinas puestas en contacto con el CSF de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (G) y de pacientes sin la citada enfermedad (H). El CSF se obtuvo en ambos grupos en el momento del examen postmortem. El CSF se añadió a la solución de respiración estándar que baña una muestra de arteria carótida porcina (véase más arriba). Al igual que en el Ejemplo 1, se añadió 1 parte de CSF (vasoespasmo o vasoconstricción 200 µl) a 30 partes (6 ml) de solución de respiración y se cuantificó la tasa de respiración durante al menos 90 minutos. Tal como puede verse en la Figura 12, el CSF derivado de pacientes con enfermedad de Alzheimer se asocia con un aumento inmediato y significativo de la respiración. El CSF de pacientes controles no tuvo dicho efecto. Las barras de los errores representan la desviación estándar.

La Figura 13 es una representación gráfica del estado de equilibrio de la tasa de consumo de oxígeno (es decir, las tasas representadas son las obtenidas en el momento correspondiente a la meseta en la curva de representación de las tasas del consumo de oxígeno) en un sistema OxBBox para el CSF procedente de pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes controles. Tal como puede verse, el CSF de la mayoría de pacientes con enfermedad de Alzheimer causó una tasa de respiración en estado de equilibrio significativamente superior a la causada por el CSF de pacientes normales.

La Figura 14 muestra las tasas de respiración reales para las arterias carótidas porcinas expuestas al CSF de individuos con enfermedad de Alzheimer y pacientes controles. El * indica el punto en el que en un test con CSF de un paciente con enfermedad de Alzheimer, el CSF fue eliminado mediante lavado. La eliminación del CSF procedente de un paciente con enfermedad de Alzheimer causó que la tasa de respiración decayera rápidamente, alcanzando aproximadamente la tasa del CSF de pacientes controles en alrededor unos 30 min. Este efecto de eliminación del CSF de un paciente con enfermedad de Alzheimer sobre la tasa de respiración es similar al observado con la utilización de un suero de pacientes preeclámpsicos y es distinto al efecto observado con el CSF o el suero de pacientes con hemorragia subaracnoidea.

El apartado anterior proporciona la demostración de la existencia de un agente vasoactivo en el CSF de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Hasta la fecha no se conocía la existencia de un agente vasoactivo, vasoespasmo o vasoconstricción un agente vasoconstrictor, que estuviera implicado en la enfermedad de Alzheimer.

El hecho de que los efectos causados por el CSF de pacientes con enfermedad de Alzheimer sean reversibles, indica que el(los) espasminógeno(s) pueden disociarse de su receptor o de su sitio de unión. El sistema OxBBox también permite la identificación y la fabricación de entidades moleculares que estén relacionadas estructuralmente con el espasminógeno (vasoespasmo o vasoconstricción, análogos del mismo) que aunque sean capaces de unirse con el receptor/sitio de unión para el espasminógeno no estimulen los efectos patológicos. Dichas entidades moleculares son probablemente de un valor práctico importante como fármacos.

Un rastreo de dichas entidades moleculares, vasoespasmo o vasoconstricción los análogos, puede llevarse a cabo con o sin conocimiento específico de la naturaleza del espasminógeno para un efecto patológico. Pueden utilizarse diversas aproximaciones de rastreo. Vasoespasmo o vasoconstricción, el sistema OxBBox, tal como se describió aquí, puede instaurarse utilizando CSF de un paciente con enfermedad de Alzheimer para establecer una respuesta respiratoria positiva, es decir un aumento significativo en la tasa de consumo de oxígeno. A continuación es posible añadir una entidad molecular a la solución de respiración y observar la tasa de consumo de oxígeno. Ya que el espasminógeno(s) asociado(s) con la enfermedad de Alzheimer puede disociarse de su receptor/sitio de unión con la consiguiente bajada en el consumo de oxígeno, una bajada en la tasa del consumo de oxígeno, causada por la adición de la entidad mole-

cular en la solución de respiración, indica que la entidad molecular es capaz de competir con el espasminógeno por la unión con el receptor/sitio de unión.

5 Las entidades moleculares con tales efectos presentan probablemente un valor como agentes de tratamiento (profiláctico/terapéutico).

Una aproximación de rastreo adecuada se describió anteriormente. Otras serán evidentes a los expertos en la materia.

10 Un rastreo como el mencionado anteriormente puede utilizarse para buscar agentes de tratamiento en relación con otras patologías asociadas con los agentes espasminogénicos, vasoespasma o vasoconstricción la preeclampsia.

15 Una entidad molecular identificada como capaz de competir con un espasminógeno por la unión con el receptor del espasminógeno/sitio de unión puede ser un polipéptido, péptido o una molécula no peptídica en la naturaleza. Las “moléculas pequeñas” no peptídicas son a menudo preferibles para muchas utilizaciones farmacéuticas *in vivo*. Según ello, puede diseñarse un mimético de la sustancia (en particular si es un péptido) para su utilización farmacéutica.

20 El diseño de miméticos y análogos estructurales (como los análogos estructurales antagonísticos) de un compuesto farmacéuticamente activo y conocido es una aproximación conocida para el desarrollo de fármacos basados en un compuesto “líder” (vasoespasma o vasoconstricción una entidad molecular identificada como de interés por el sistema OxB). Esto puede ser deseable si el compuesto activo es difícil o caro de sintetizar, o si es inadecuado para un procedimiento en particular de administración, vasoespasma o vasoconstricción, los péptidos son agentes activos inadecuados para las composiciones orales ya que tienden a degradarse rápidamente por las proteasas en el canal alimentario. Para evitar el cribado aleatorio de un gran número de moléculas para una propiedad específica, se utiliza el
25 diseño, la síntesis y el análisis de miméticos.

Existen diversas etapas que se incluyen por lo general en el diseño de un mimético o de un análogo estructural (como un análogo estructural antagonístico) de un compuesto con una propiedad deseada. En primer lugar, se determinan las partes específicas del compuesto que son críticas y/o importantes en la determinación de la propiedad
30 deseada. En el caso de un péptido, este puede realizarse variando sistemáticamente los residuos de aminoácidos en el péptido, vasoespasma o vasoconstricción sustituyendo un residuo cada vez. El cribado de alaninas del péptido se utiliza comúnmente para afinar los motivos de dicho péptido. Estas partes o residuos que constituyen la región activa del compuesto son conocidos como su “farmacore”.

35 Una vez se han localizado los farmacóforos, se modela su estructura de acuerdo con sus propiedades físicas, como vasoespasma o vasoconstricción esteroquímica, sitio de unión, tamaño y/o carga, utilizando resultados de un abanico de fuentes, vasoespasma o vasoconstricción de técnicas espectroscópicas, resultados de difracción por rayos X y RMN. Los análisis informáticos, mapeo por similitud (que modelan la carga y/o el volumen de un farmacóforo, en lugar de la unión entre átomos) y otras técnicas pueden utilizarse en este proceso de modelado.
40

En una variante de esta aproximación, se modelan la estructura tridimensional del ligando y su pareja de unión. Esto puede ser especialmente útil si el ligando y/o la pareja de unión cambian la conformación según la unión, permitiendo que el modelo lo considere en el diseño del mimético o análogo estructural.

45 A continuación, se selecciona una molécula molde sobre la cual es posible injertar grupos químicos que mimeticen el farmacóforo. La molécula molde y los grupos químicos injertados en ella pueden seleccionarse de forma conveniente de modo que se facilite la síntesis del mimético, que dicho mimético sea farmacológicamente aceptable y que no se degrade *in vivo*, y a la vez se retenga la actividad biológica del compuesto líder. Alternativamente, si el mimético está basado en un péptido, puede alcanzarse una mayor estabilidad ciclizando el péptido y aumentando así su rigidez.
50 El mimético o los miméticos hallados por esta aproximación pueden rastrearse para ver si tienen la propiedad deseada, o cuál es la magnitud de su presencia. Puede llevarse a cabo una optimización o modificación adicional para lograr uno o más miméticos finales para el análisis *in vivo* o clínico.

Dado lo anterior, la presente invención también proporciona entidades moleculares y agentes de tratamiento como
55 los indicados más arriba, de obtención fácil y de rutina por las aproximaciones indicadas anteriormente, fármacos que comprenden dichas entidades moleculares/agentes de tratamiento, utilizaciones de dichas entidades moleculares/agentes de tratamiento, vasoespasma o vasoconstricción en los sistemas de cribado, el diseño de miméticos y análogos estructurales, la formulación y la utilización de los fármacos.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para investigar si un paciente tiene un agente o combinación de agentes capaces de causar un aumento del metabolismo oxidativo en las células musculares lisas, dicho procedimiento que se realiza en un medio adecuado para el soporte del metabolismo oxidativo comprende:

la incubación de una muestra de células o tejidos con un espécimen derivado de un paciente sospechoso de presentar una condición asociada con vasoespasma o vasoconstricción crónicas, y en donde la muestra comprende células musculares lisas;

la cuantificación de un marcador del metabolismo oxidativo de muestra de células o tejidos; en donde el marcador del metabolismo oxidativo se selecciona según la tasa de consumo de oxígeno; la actividad ATPasa, la actividad cinasa, el estado de fosforilación de una proteína contráctil, o la concentración de ADP; y

la detección de un aumento del metabolismo oxidativo; en donde las células musculares lisas cumplen unas de las características siguientes:

- (i) no presentar una demanda contráctil de ATP; o
- (ii) presentar una demanda de ATP, y entonces se comparan con una incubación control en el que las células tienen una demanda contráctil de ATP;

con el fin de detectar un aumento en el metabolismo oxidativo, el cual no es atribuible a una demanda contráctil de ATP, un tal incremento en el metabolismo oxidativo es indicativo de la existencia en el paciente de un mencionado agente o de la combinación de agentes.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 para el diagnóstico de un paciente que presenta, o para predecir que un paciente en un futuro presentará un estado metabólico anómalo **caracterizado** por un aumento del metabolismo oxidativo en las células musculares lisas no atribuible a una demanda contráctil de ATP.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en donde dicha muestra comprende células musculares lisas vasculares y el mencionado estado metabólico anómalo está asociado con un vasoespasma o una vasoconstricción.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la existencia de un mencionado agente o combinación de agentes es indicativa de que los pacientes tienen, o tendrán en un futuro, un vasoespasma o una vasoconstricción crónicas de un lecho vascular.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células musculares lisas son representativas de las implicadas en un vasoespasma o vasoconstricción existentes o predichos en un lecho vascular.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la utilización en relación con el diagnóstico, pronóstico, predicción y/o cuantificación de una condición médica seleccionada a partir de:

- preeclampsia
- enfermedad de Alzheimer o
- vasoespasma cerebral crónico

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en donde la condición médica es la preeclampsia y las células musculares lisas vasculares se derivan de los lechos vasculares uterinos o placentales o de la arteria umbilical.

8. Procedimiento según la reivindicación 6, en donde la condición médica es la enfermedad de Alzheimer o el vasoespasma cerebral crónico y las células musculares lisas se derivan de un lecho vascular cerebral.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde las células musculares lisas vasculares se derivan de una arteria carótida o de una arteria basilar.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en donde tanto la arteria carótida como la basilar son de origen porcino.

11. Procedimiento para utilizar en la identificación de un agente o combinación de agentes capaces de causar un aumento en el metabolismo oxidativo en las células musculares lisas no atribuible a una demanda contráctil de ATP; dicho procedimiento que se realiza en un medio adecuado para el soporte del metabolismo oxidativo comprende:

la incubación de una muestra de células o tejidos que comprende las células musculares lisas vasculares con un espécimen que supuestamente contiene uno de los agentes mencionados o una combinación de éstos;

ES 2 276 423 T3

la cuantificación de un marcador de metabolismo oxidativo de una muestra de células o tejidos; en donde el marcador del metabolismo oxidativo se selecciona según la tasa de consumo de oxígeno, la actividad ATPasa, la actividad cinasa, el estado de fosforilación de una proteína contráctil, o la concentración de ADP; y

5 la detección de un incremento en el metabolismo oxidativo, en donde las células musculares lisas cumplen unas de las características siguientes:

- (i) no presentar una demanda contráctil de ATP; o
- 10 (ii) presentar una demanda de ATP, y entonces se comparan con una incubación control en el que las células tienen una demanda contráctil de ATP;

con el fin de detectar un aumento en el metabolismo oxidativo, no atribuible a una demanda contráctil de ATP, y en donde un tal incremento en el metabolismo oxidativo es indicativo de la presencia de un mencionado agente o de la
15 combinación de agentes en el espécimen.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en donde el espécimen comprende una fracción de muestra derivada de un paciente.

20 13. Procedimiento según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en donde la mencionada muestra de células o tejidos comprende células musculares lisas vasculares.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 de identificación de un espécimen de fluido que contiene un agente o una combinación de los agentes mencionados, en donde dicho procedimiento comprende
25 la purificación y la separación del agente mencionado o combinación de los mismos para producir una preparación del citado agente, o combinación de agentes esencialmente libres de biomoléculas con las que el agente o los agentes estén normalmente asociados.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 de identificación de un espécimen de fluido
30 que contiene un agente o una combinación de los agentes mencionados, en donde dicho procedimiento comprende la caracterización del mencionado agente o combinación de los mismos.

16. Procedimiento para el rastreo de compuestos con una eficacia potencial como agentes terapéuticos para disminuir o eliminar un aumento del metabolismo oxidativo en las células musculares lisas, aumento que no es atribuible a
35 una demanda contráctil de ATP, y en donde dicho procedimiento comprende, en un medio adecuado para el soporte del metabolismo oxidativo, la incubación de una muestra de células o tejido que contiene células musculares lisas vasculares con (a) un espécimen, agente o combinación de agentes que se sabe aumentan el metabolismo oxidativo de la muestra de células o tejidos, el cual no es atribuible a una demanda contráctil de ATP; y (b) un compuesto a analizar; la cuantificación de un marcador de metabolismo oxidativo y en donde el marcador de metabolismo oxidativo se
40 selecciona según la tasa de consumo de oxígeno, la actividad ATPasa, la actividad cinasa, el estado de fosforilación de una proteína contráctil, o la concentración de ADP; y la detección de la ausencia o reducción del aumento del metabolismo oxidativo que normalmente está afectado por el espécimen, agente o combinación de agentes, en donde las células musculares lisas cumplen unas de las características siguientes:

- 45 (i) no presentar una demanda contráctil de ATP; o
- (ii) presentar una demanda de ATP y entonces se comparan con una incubación control, en donde las células tienen una demanda contráctil de ATP;

50 con el fin de detectar un aumento en el metabolismo oxidativo no atribuible a una demanda contráctil de ATP, con lo que cualquier ausencia o reducción es indicativa del compuesto a analizar que tenga una eficacia potencial como agente terapéutico.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en donde la muestra de células o tejido comprende células musculares lisas vasculares.
55

18. Procedimiento para la monitorización del efecto de un tratamiento administrado a un paciente que comprende: la realización de un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y la repetición de dicho
60 procedimiento en uno o más intervalos adecuados de tiempo, que se seleccionan para detectar una alteración del aumento en el metabolismo oxidativo que no sea atribuible a la demanda contráctil de ATP y en donde una reducción del incremento será indicativa de un tratamiento con una ventaja terapéutica.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el espécimen se selecciona a partir de fluido espinal cerebral (CSF), sangre, suero y plasma.
65

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde el mencionado medio comprende:

Tampón de Krebs con glucosa 11 mM y/o piruvato 5 mM o

ES 2 276 423 T3

Tampón de Krebs-Hensleit que contiene KH_2PO_4 0,5 mM con glucosa 11 mM y/o piruvato 5 mM.

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde el mencionado medio está libre de microorganismos viables.

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde la incubación se airea con 95% de O_2 y 5% de CO_2 .

23. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la incubación se realiza a un pH que soporta el metabolismo oxidativo de la muestra de células o tejidos.

24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la incubación se realiza esencialmente a pH 7,4.

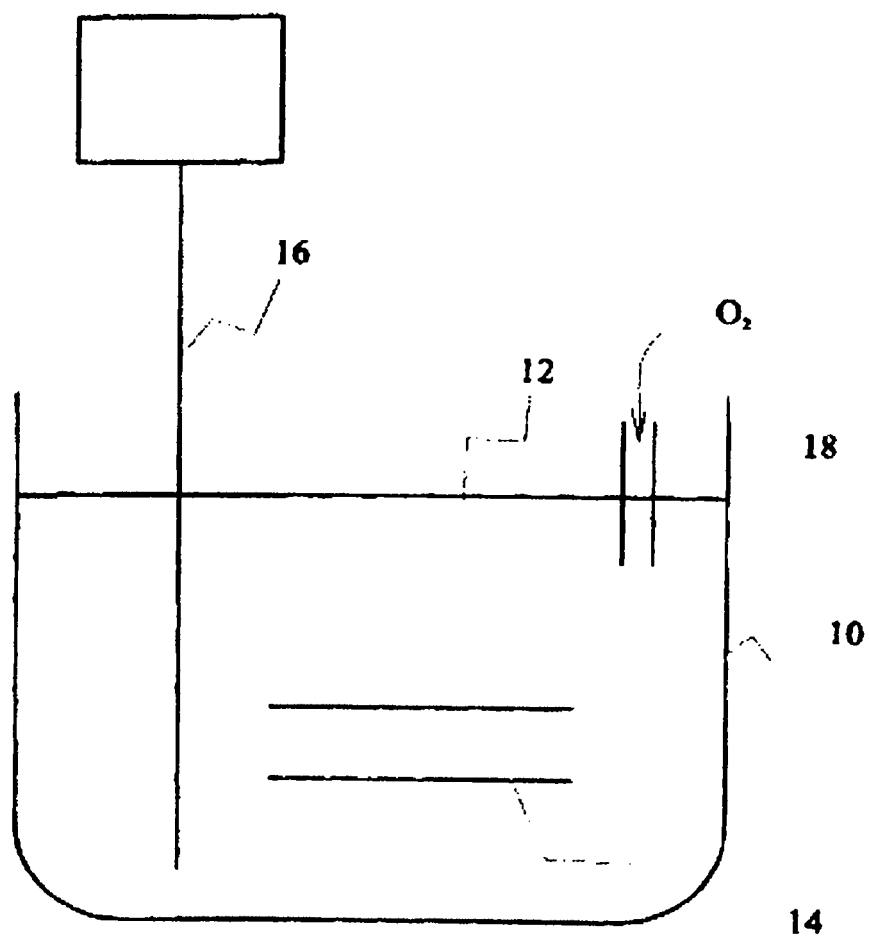


Fig. 1

Fig. 2

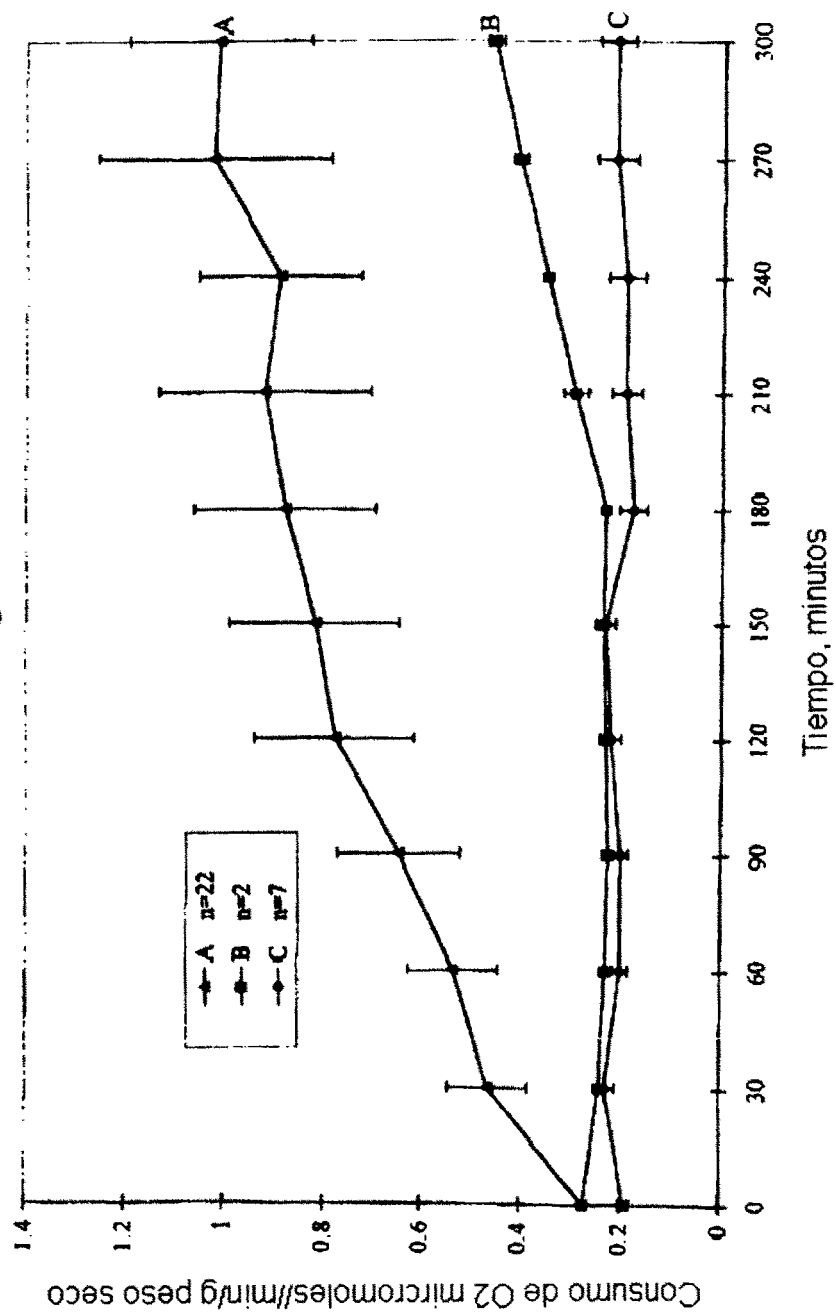
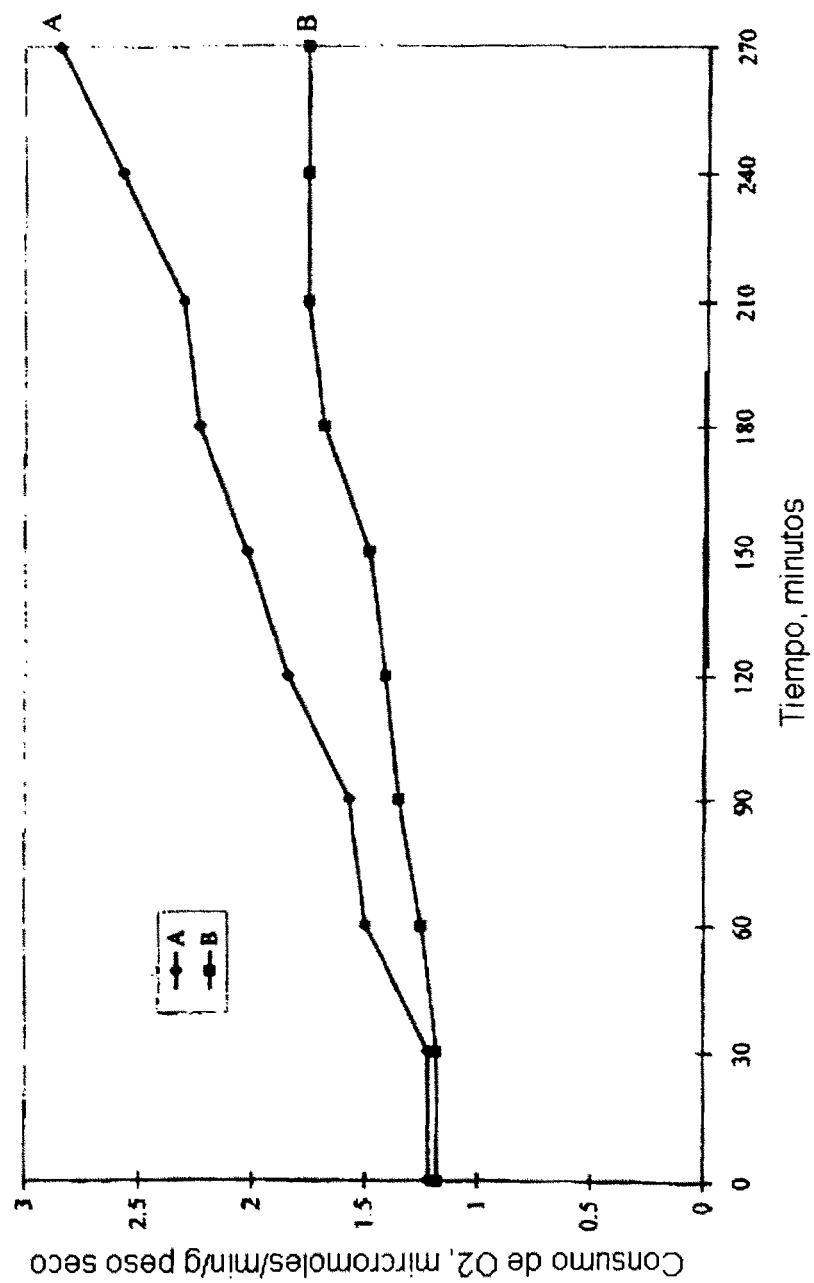


Fig. 3



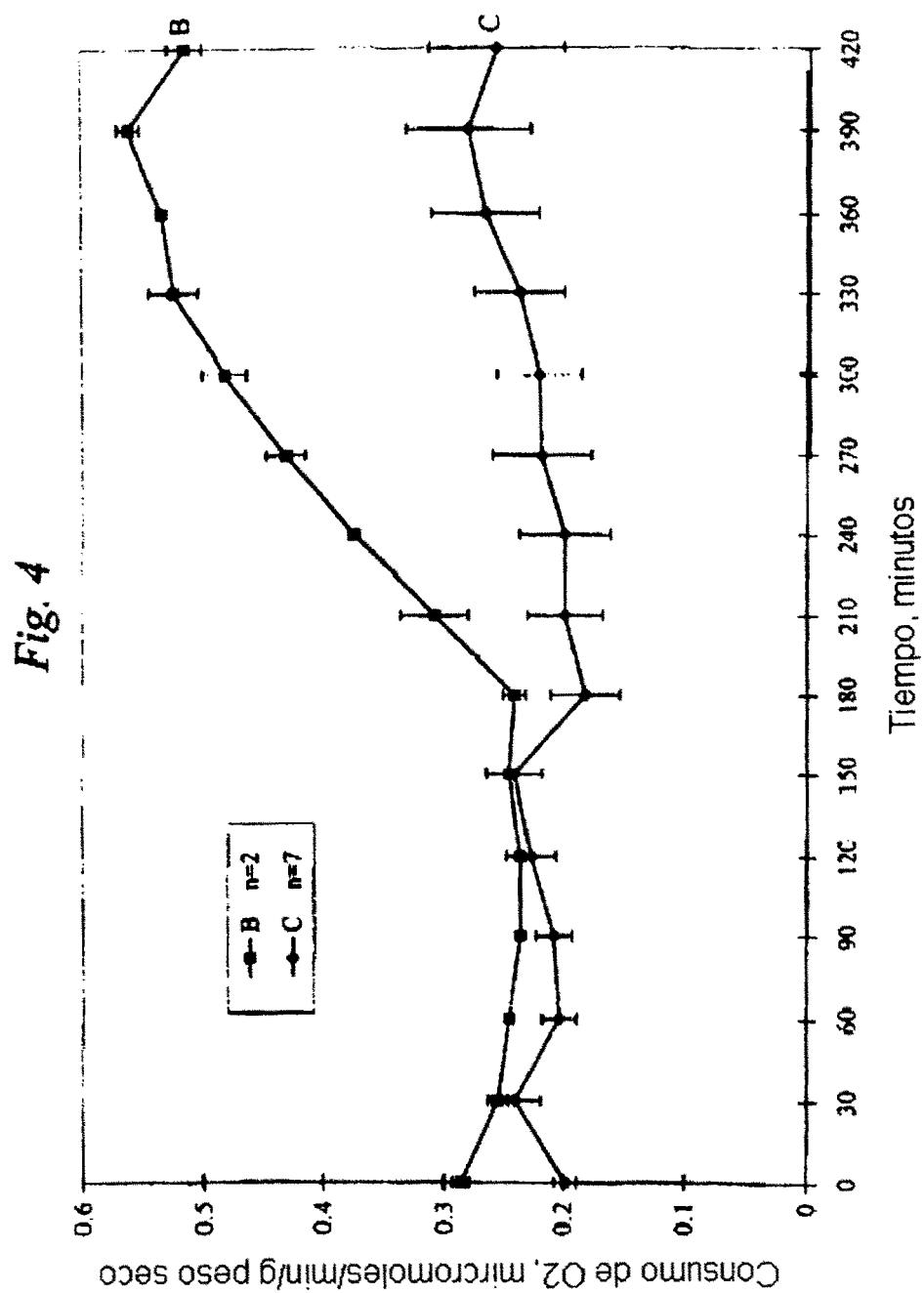


Fig. 5

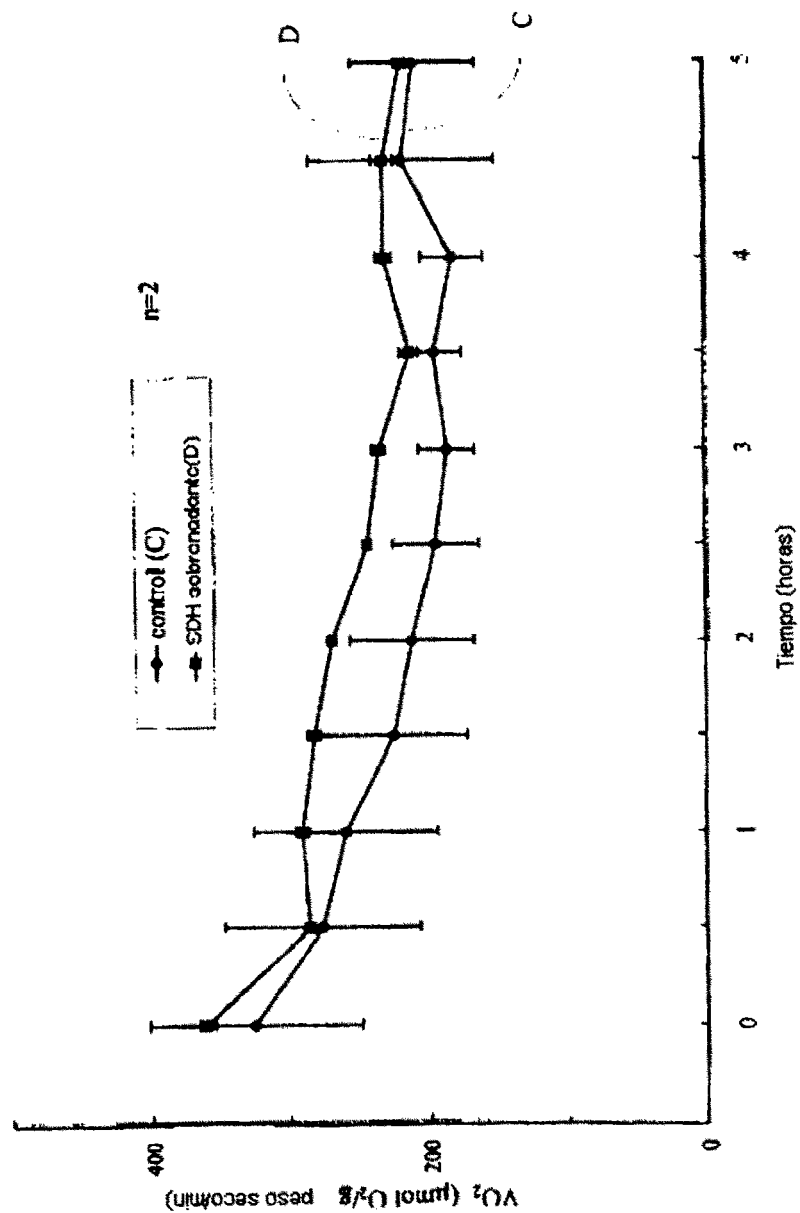


Fig. 6

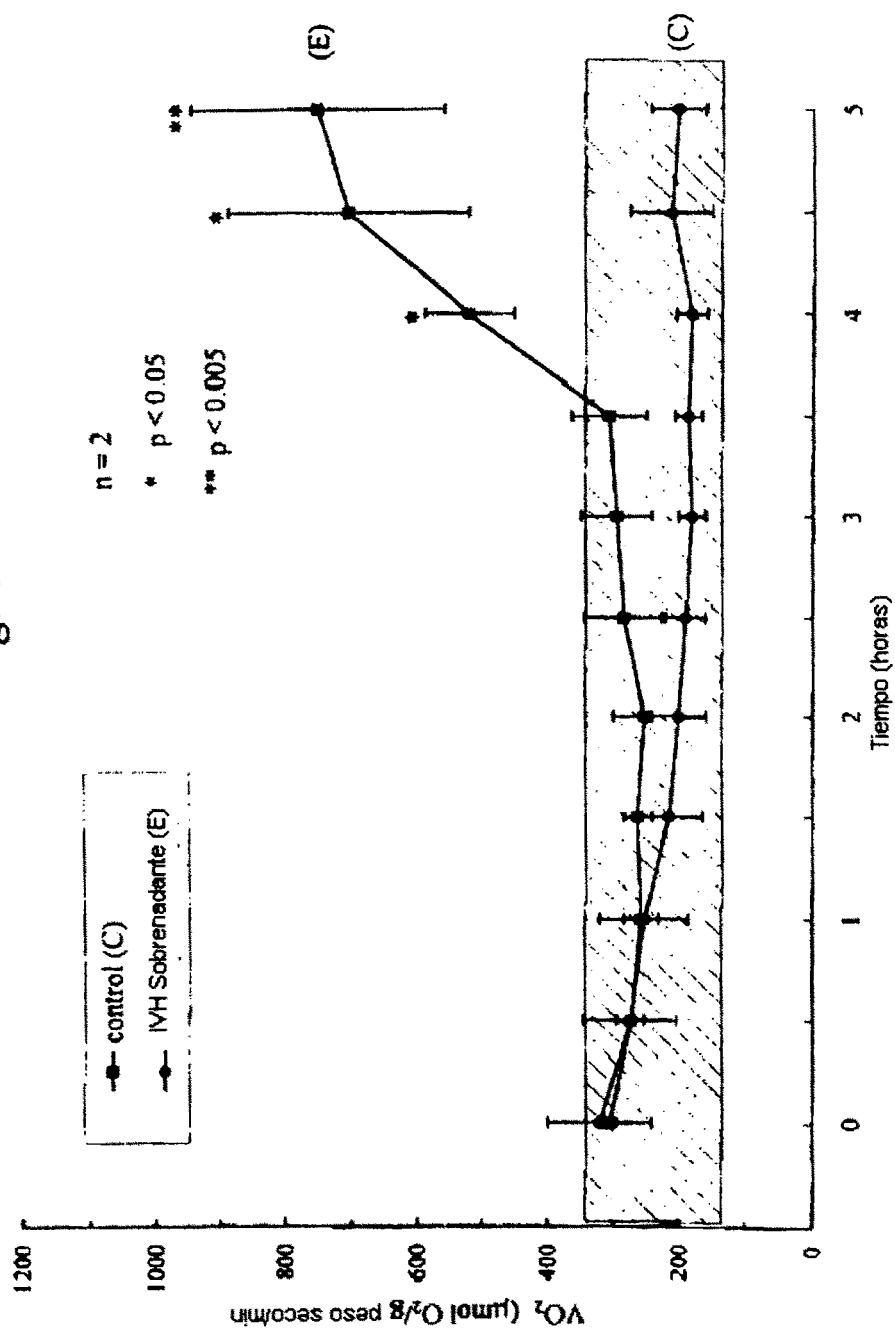


Fig. 7

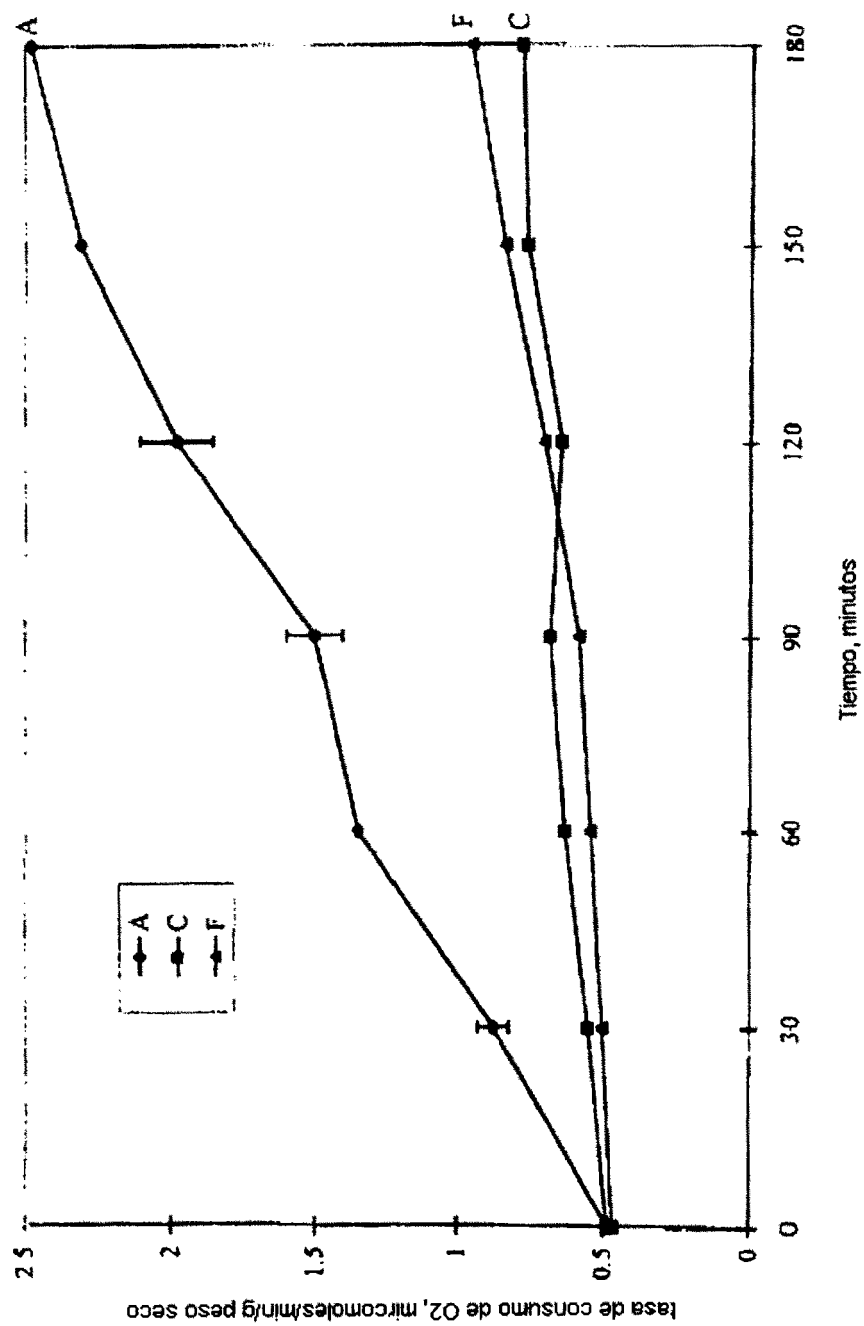


Fig. 8

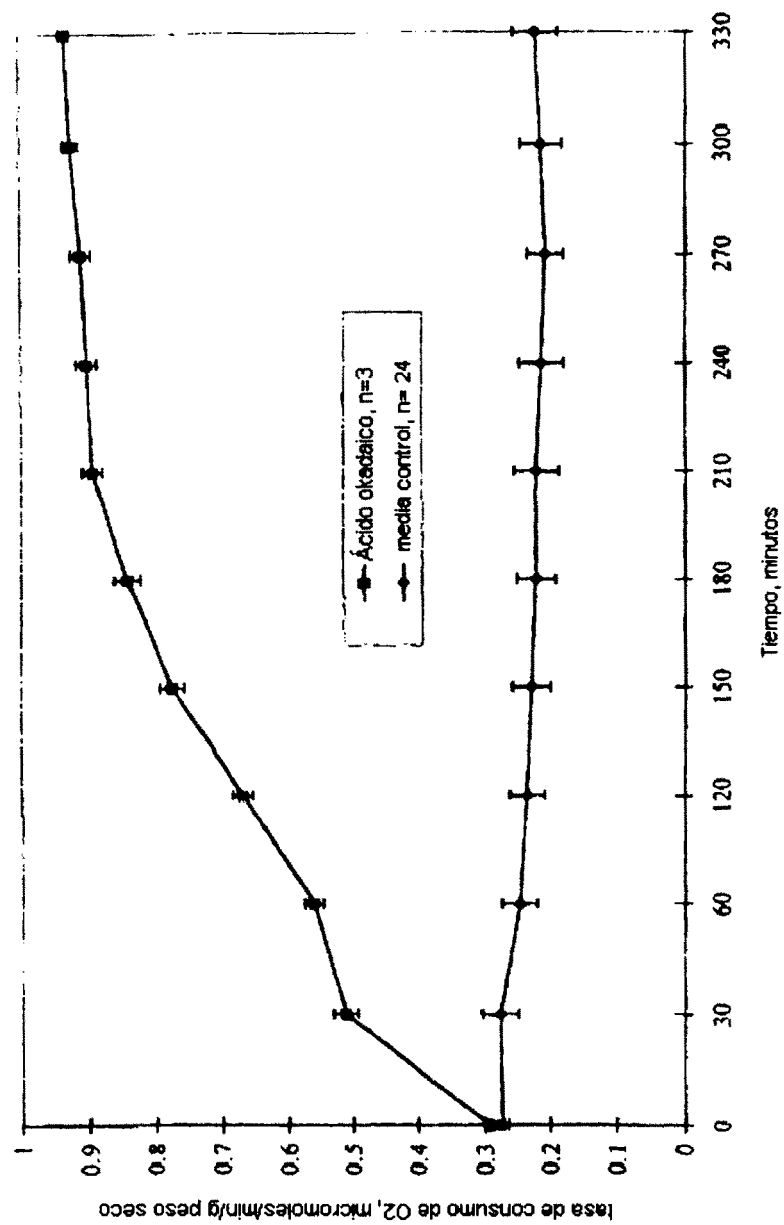


Fig. 9

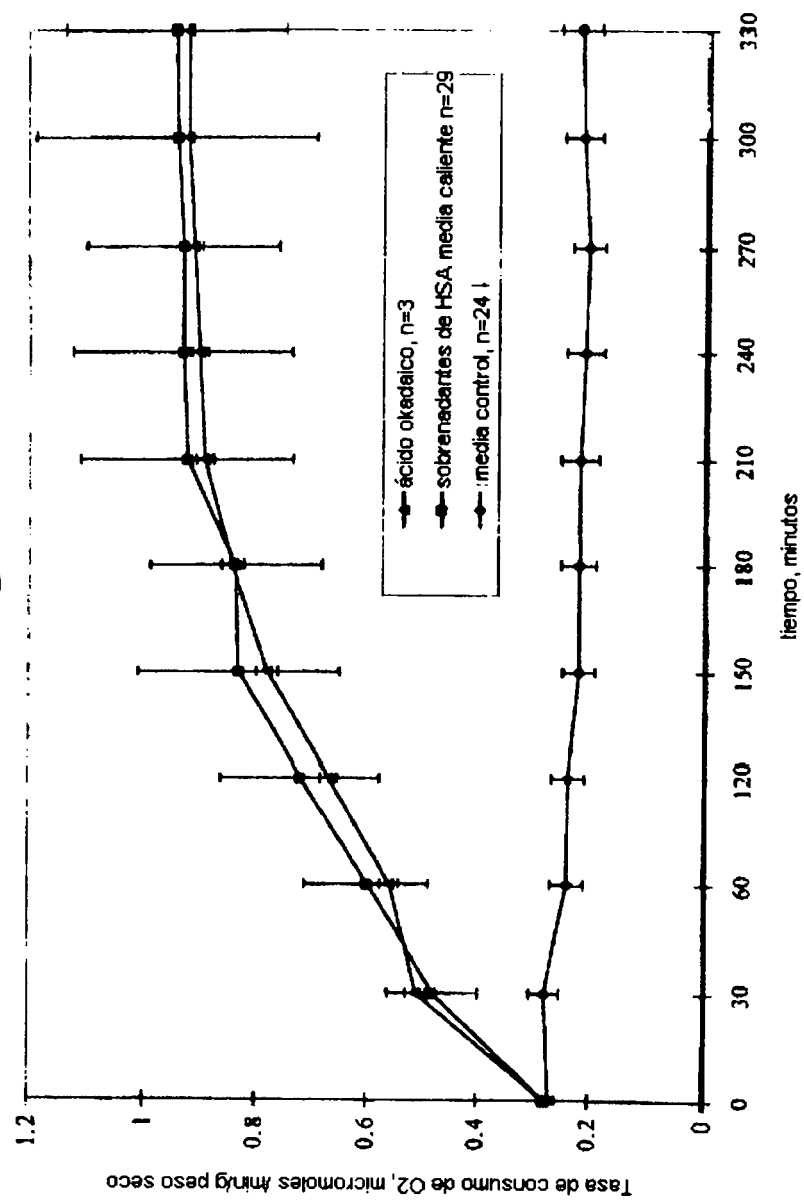


Fig. 10

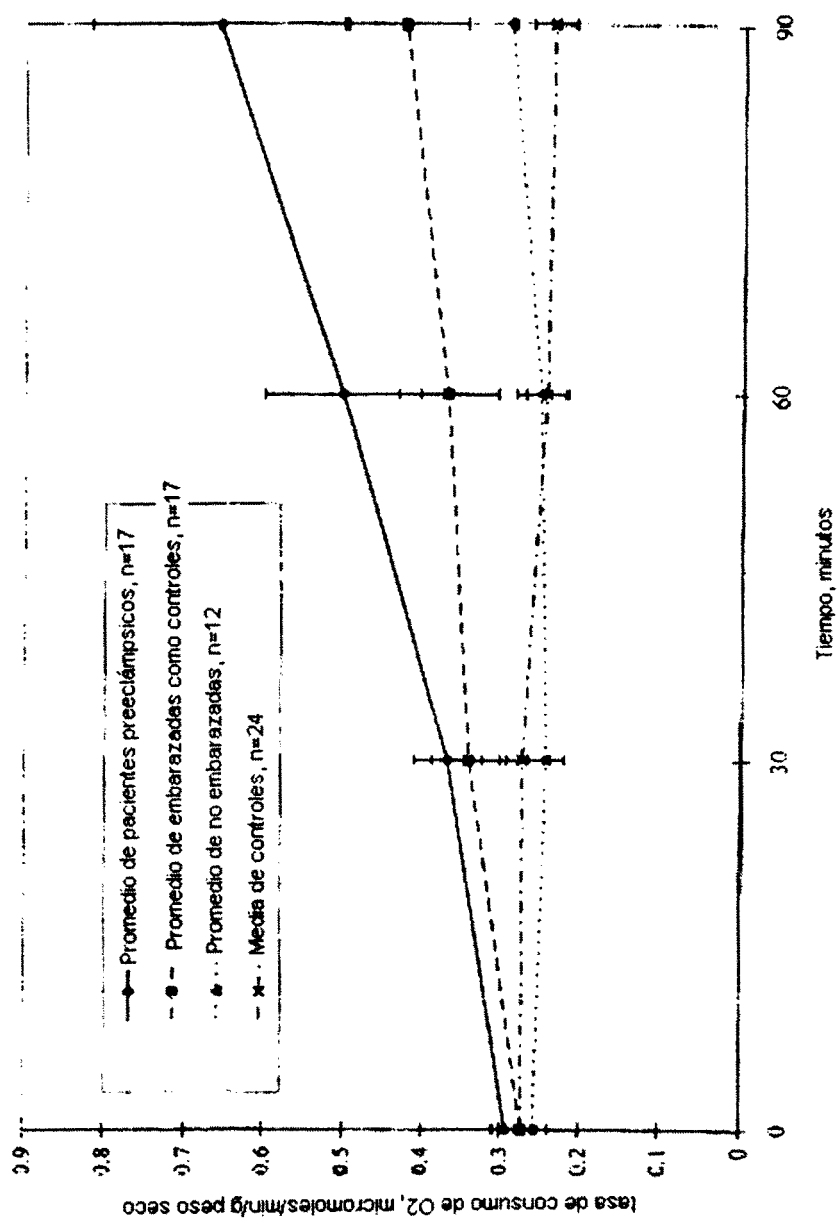


Fig. 11

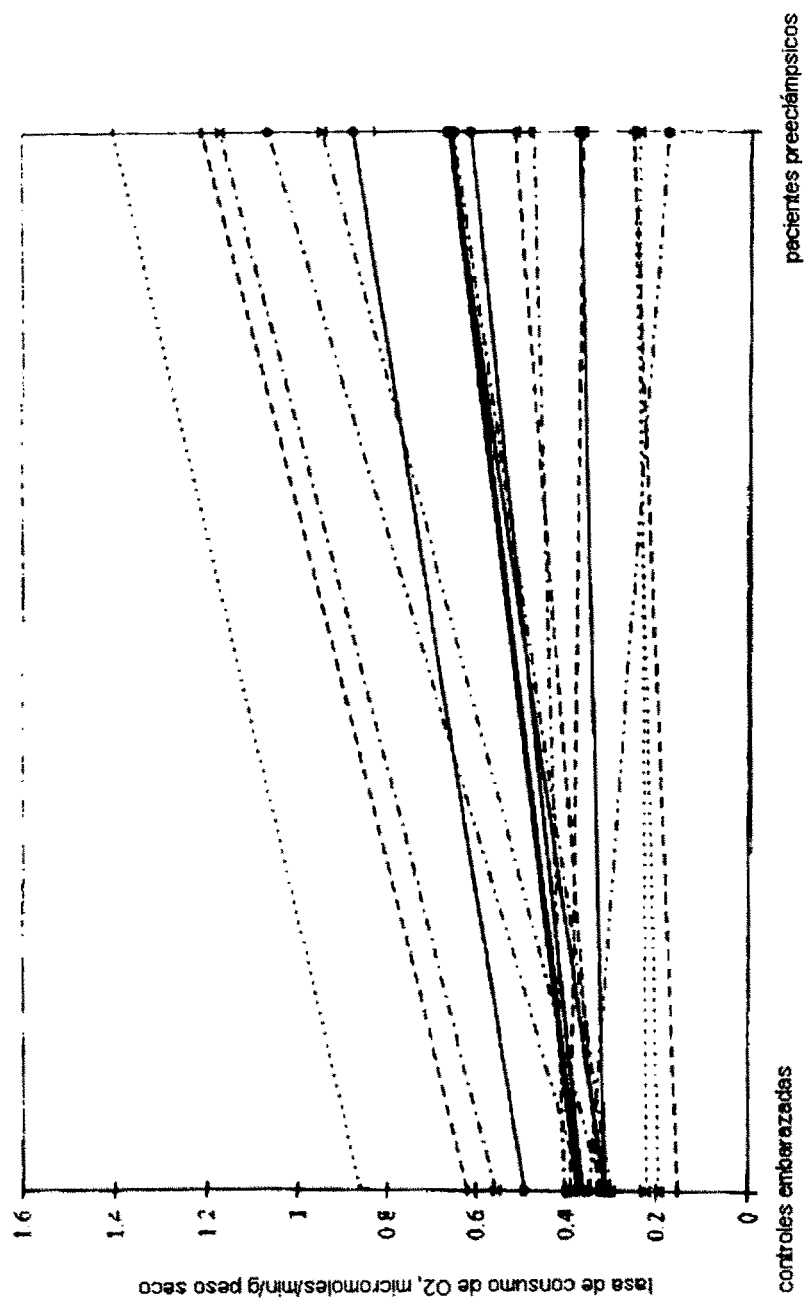
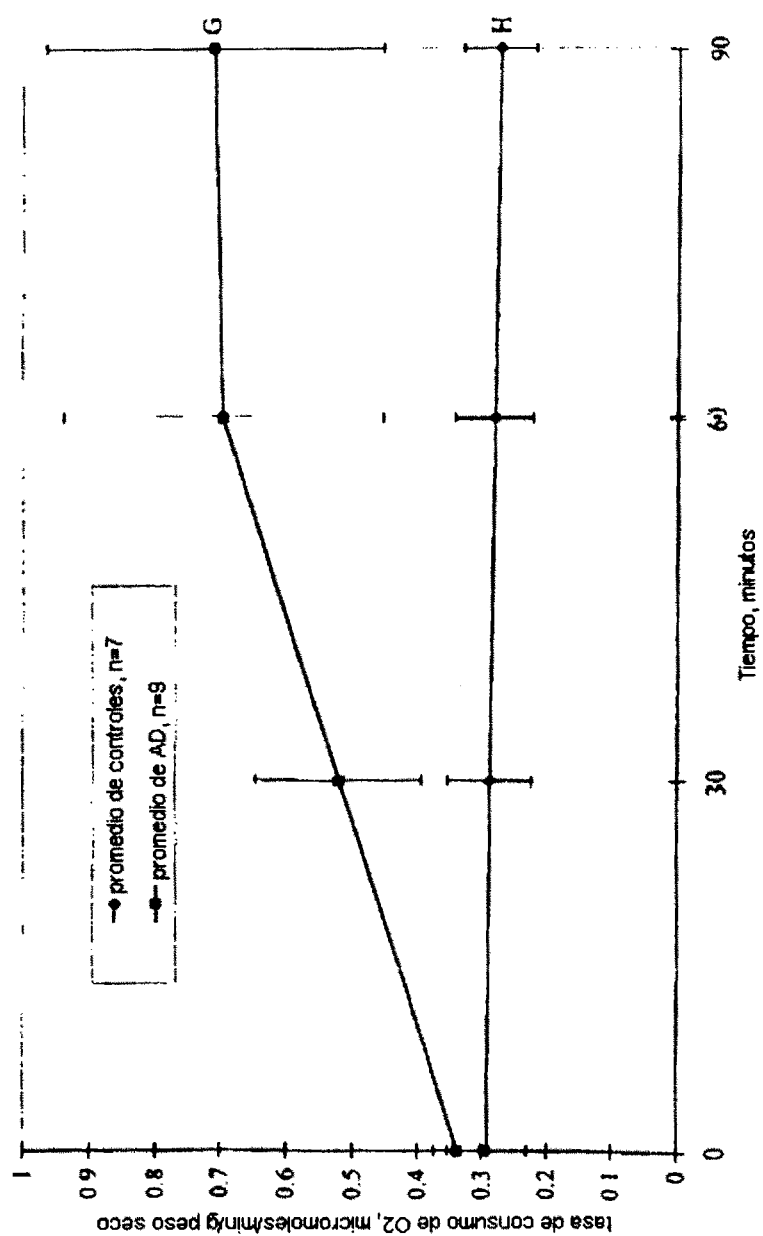


Fig. 12



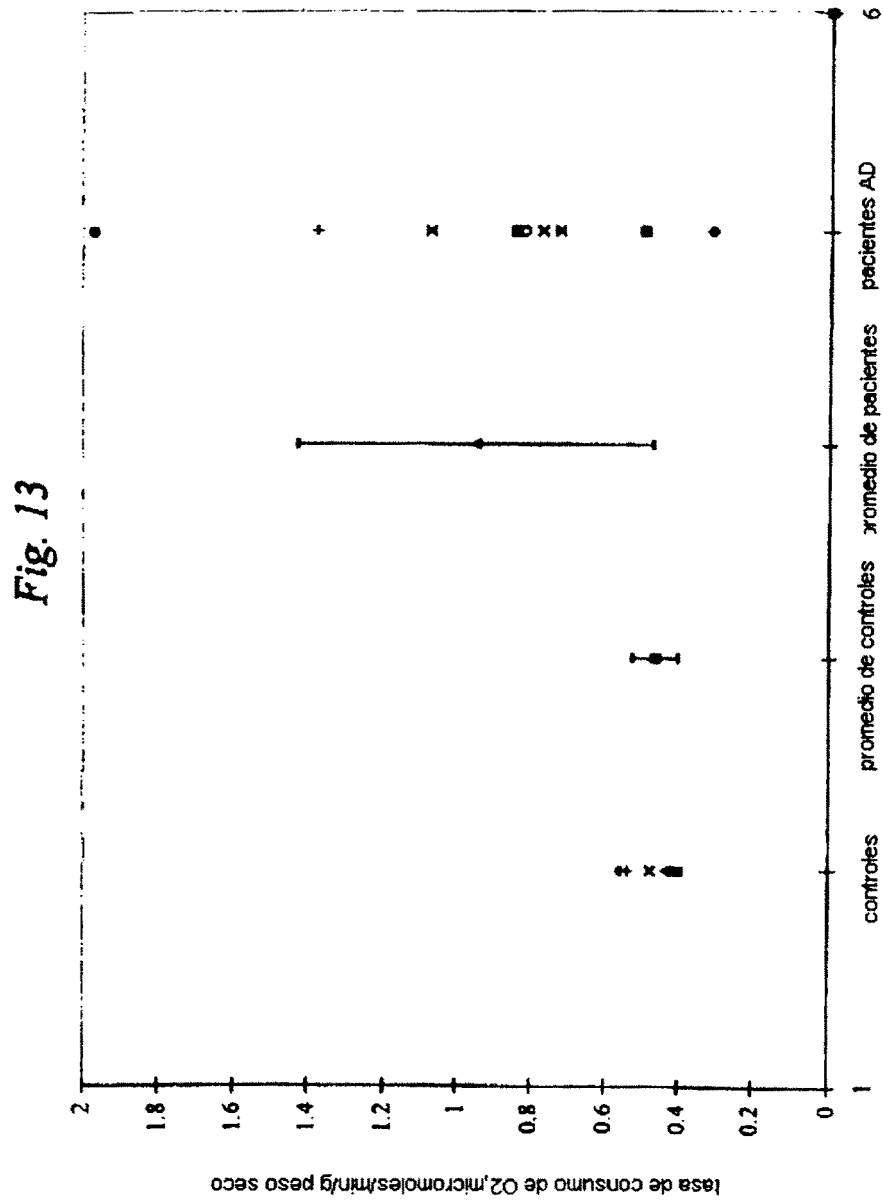


Fig. 14

