

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 842 970**

51 Int. Cl.:

A61K 31/167	(2006.01) A61P 9/10	(2006.01)
A61K 31/18	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
A61K 31/19	(2006.01) A61P 37/00	(2006.01)
A61K 31/343	(2006.01)	
A61K 31/4045	(2006.01)	
A61K 31/4184	(2006.01)	
A61K 31/501	(2006.01)	
A61P 3/10	(2006.01)	
A61P 3/00	(2006.01)	
A61P 7/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/GB2012/000229**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12120262**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12713772 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2020 EP 2683371**

54 Título: **Compuestos y métodos para mejorar la fibrinólisis endógena alterada usando inhibidores de la histona desacetilasa**

30 Prioridad:

09.03.2011 US 201161464776 P
09.03.2011 US 201161464809 P
28.10.2011 US 201161628339 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2021

73 Titular/es:

CERENO SCIENTIFIC AB (100.0%)
Erik Dahlbergsgatan 11 A
411 26 Gottenburg, SE

72 Inventor/es:

LARSSON, PIA;
BERGH, NIKLAS y
JERN, SVERKER

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 842 970 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos y métodos para mejorar la fibrinólisis endógena alterada usando inhibidores de la histona desacetilasa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a nuevos usos, métodos y composiciones médicas. Más específicamente, se refiere a mejorar o normalizar una fibrinólisis vascular endógena suprimida utilizando diferentes inhibidores de la histona desacetilasa.

10

Antecedentes

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental y, durante las últimas décadas, también se ha convertido en un problema que aumenta rápidamente en los países en desarrollo. Se estima que 80 millones de adultos estadounidenses (uno de cada tres) tienen una o más expresiones de enfermedad cardiovascular (ECV) tal como hipertensión, cardiopatía coronaria, insuficiencia cardíaca o ictus. Los datos de mortalidad muestran que la ECV fue la causa subyacente de fallecimiento en el 35 % de todas las muertes en 2005 en Estados Unidos, la mayoría relacionadas con el infarto de miocardio, el ictus o las complicaciones de los mismos. La gran mayoría de los pacientes que padecen episodios cardiovasculares agudos tienen una exposición previa a al menos un factor de riesgo importante, tal como tabaquismo, niveles anormales de lípidos en sangre, hipertensión, diabetes, obesidad abdominal e inflamación de bajo grado.

Fisiopatológicamente, los principales episodios de infarto de miocardio e ictus isquémico son causados por una interrupción repentina del suministro de sangre nutritiva debido a la formación de un coágulo sanguíneo dentro de la luz del vaso sanguíneo arterial. En la mayoría de los casos, la formación del trombo se precipita por la ruptura de una placa aterosclerótica vulnerable, que expone agentes químicos que activan las plaquetas y el sistema de coagulación del plasma. Las plaquetas activadas forman un tapón plaquetario que está armado por fibrina generada por la coagulación para formar un coágulo sanguíneo que se expande dentro de la luz del vaso hasta que obstruye o bloquea el flujo sanguíneo, lo que produce un daño tisular hipóxico (denominado infarto). Por lo tanto, los episodios cardiovasculares trombóticos se producen como resultado de dos procesos distintos; es decir, por un lado, una aterosclerosis vascular a largo plazo de la pared del vaso que progresa lentamente, y, por otro lado, una formación repentina de un coágulo agudo que rápidamente causa la detención del flujo. Esta invención se refiere únicamente al último proceso.

Recientemente, la inflamación ha sido reconocida como un factor de riesgo importante para los episodios trombóticos. La inflamación vascular es un rasgo característico de la pared del vaso aterosclerótico, y la actividad inflamatoria es un factor determinante de la susceptibilidad de la placa aterosclerótica a romperse e iniciar la coagulación intravascular. Además, las afecciones autoinmunitarias con inflamación sistémica, tales como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y las diferentes formas de vasculitis, aumentan notablemente el riesgo de infarto de miocardio e ictus.

Los enfoques tradicionales para prevenir y tratar los episodios cardiovasculares tienen como objetivo 1) ralentizar la progresión del proceso aterosclerótico subyacente, 2) prevenir la formación de coágulos en caso de rotura de una placa o 3) retirar directamente una obstrucción trombótica aguda del flujo. En resumen, el tratamiento antiaterosclerótico tiene como objetivo modular el impacto de los factores de riesgo generales, e incluye recomendaciones dietéticas, pérdida de peso, ejercicio físico, dejar de fumar, tratamiento del colesterol y de la presión arterial, etc. La prevención de la formación de coágulos se basa principalmente en el uso de fármacos antiplaquetarios que inhiben la activación y/o la agregación plaquetaria, pero también, en algunos casos, incluye la prevención tromboembólica con anticoagulantes orales tales como la warfarina. El tratamiento *a posteriori* de los episodios aterotrombóticos agudos requiere la lisis farmacológica directa del coágulo mediante agentes trombolíticos tales como el activador del plasminógeno de tipo tisular recombinante o la dilatación mecánica percutánea del vaso obstruido.

A pesar del hecho de que la terapia antiaterosclerótica de múltiples dianas y la prevención de los coágulos mediante agentes antiplaquetarios han reducido la incidencia del infarto de miocardio y del ictus isquémico, estos episodios siguen siendo un importante problema de salud para la población. Esto muestra que, en los pacientes con factores de riesgo cardiovascular, estas medidas profilácticas son insuficientes para prevenir por completo la aparición de episodios aterotrombóticos.

De la misma manera, las afecciones trombóticas en el lado venoso de la circulación, así como las complicaciones embólicas de las mismas, tales como la embolia pulmonar, siguen causando una morbilidad y una mortalidad sustanciales. La trombosis venosa tiene una presentación clínica diferente, y la importancia relativa de la activación plaquetaria frente a la coagulación plasmática es algo diferente con una preponderancia de esta última en la trombosis venosa. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, los principales mecanismos subyacentes que causan oclusiones trombóticas en los vasos son similares a los que actúan sobre la circulación arterial. Aunque

no está relacionado con la aterosclerosis como tal, el riesgo de trombosis venosa está relacionado con factores de riesgo cardiovasculares generales tales como la inflamación y las irregularidades metabólicas.

En conjunto, la terapia existente y el tratamiento de los factores de riesgo generales ofrecen una protección insuficiente contra los episodios trombóticos, tanto en la circulación arterial como en la circulación venosa, y no pueden borrar las graves consecuencias de tales episodios. Esto impulsa el desarrollo de nuevas dianas preventivas y terapéuticas, en especial, enfoques más eficaces que puedan prevenir la peligrosa isquemia tisular, incluso en una etapa tan temprana como aquella en la que los síntomas aún no se han presentado.

Curiosamente, en un individuo por lo demás sano, hay un sistema natural de “última línea de defensa”, que puede activarse si se produce un proceso de coagulación, a pesar de las medidas preventivas, en la vasculatura. En resumen, el inicio de un mecanismo trombótico tanto en el lado arterial como en el lado venoso de la circulación conduce a la activación de la capa celular más interna del vaso sanguíneo (el endotelio) y, como respuesta, las células liberan rápidamente grandes cantidades del activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA, *tissue-type Plasminogen Activator*), que es una sustancia que disuelve los coágulos. Esto eleva los niveles lumbinales de t-PA hasta niveles similares a los de la terapia trombolítica clínica (es decir, la administración de t-PA recombinante), pero la potencia de esta respuesta endógena es 100 veces mayor debido al inicio extremadamente rápido de la acción.

Los datos clínicos, epidemiológicos y experimentales acumulados apoyan la idea de que, si esta función tromboprotectora de la pared de los vasos sanguíneos está intacta, ofrece una potente defensa contra la formación de trombos que detienen el flujo. Sin embargo, desafortunadamente, la capacidad de liberación aguda de t-PA se ve afectada en varias condiciones, produciendo una mayor susceptibilidad a los episodios trombóticos. Estos incluyen aterosclerosis, hipertensión, obesidad abdominal, tabaquismo, estilo de vida sedentario e inflamación de bajo grado. Es muy probable que este deterioro se deba a una reducción de la síntesis y, por lo tanto, a una disponibilidad reducida del activador fibrinolítico en las células endoteliales.

Además, los presentes y otros inventores han demostrado que la eficacia de la respuesta fibrinolítica endógena se reduce en los pacientes con un mayor riesgo de padecer un episodio aterotrombótico, tal como en la aterosclerosis (Osterlund, B., *et al.*, *Acta Anaesthesiol Scand* **52**, 1375-1384 (2008), Newby, D.E., *et al.*, *Circulation* **103**, 1936-1941 (2001)). Los datos recientes sugieren que la inflamación es un mecanismo patogénico clave subyacente a la producción suprimida de t-PA en este estado. Los presentes inventores han demostrado que la exposición prolongada a las citoquinas inflamatorias factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa, *Tumor Necrosis Factor alpha*) e interleucina-1 beta (IL-1b) provoca una marcada supresión de la transcripción de t-PA (Ulfhammer, E., *et al.*, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **4**, 1781-1789 (2006), Larsson, P., *et al.*, *Thromb Res* **123**, 342-351 (2008)). Curiosamente, se sabe que la placa aterosclerótica está asociada con una activación inflamatoria local, potencialmente grave, en la pared del vaso, y es concebible que este medio inflamatorio obstaculice la respuesta fibrinolítica en las áreas específicas de la vasculatura donde es fundamental retener un alta capacidad fibrinolítica, aumentando, por lo tanto, el riesgo de episodios trombóticos. De manera similar, también es probable que la mayor incidencia de episodios trombóticos en pacientes con afecciones inflamatorias sistémicas (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias y síndrome metabólico), también podría estar relacionada con un efecto supresor de las citoquinas proinflamatorias circulantes sobre la síntesis de t-PA.

En este contexto, un cuarto enfoque alternativo para reducir la incidencia de los episodios trombóticos clínicos debería ser restablecer la capacidad del “sistema de última línea de defensa” fibrinolítico en pacientes con un deterioro de la función. Se han realizado grandes esfuerzos para encontrar un medio viable para potenciar la fibrinólisis endógena tanto basal como estimulada en sujetos con una reducción de la capacidad fibrinolítica asociada a factores de riesgo. Sin embargo, los intentos previos de mejorar la síntesis de t-PA con, por ejemplo, las estatinas y el ácido retinoico han sido decepcionantes. Otros medios para aumentar la fibrinólisis mediante el bloqueo de inhibidores naturales de la actividad del t-PA, tales como el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1, *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) y la carboxipeptidasa U (CPU), tampoco han tenido éxito, principalmente, debido a su limitada capacidad como fármacos, tal como a las deficientes propiedades farmacocinéticas de los candidatos a fármaco. Por lo tanto, hasta ahora no se han descrito medios que se puedan utilizar clínicamente para invertir un deterioro de la producción de t-PA.

Recientemente los presentes inventores informaron que el fármaco anticonvulsivo ácido valproico (VPA) utilizado clínicamente tiene un efecto estimulante sobre la producción de t-PA a dosis relativamente altas (Larsson, P., *et al.*, “The epigenetic modifier valproic acid stimulates tissue-type plasminogen activator expression in human endothelial cells”. *Poster presented at Epigenetics 2009 (The epigenetics annual scientific conference 2009), Melbourne Australia* (2009)). Se cree que el VPA inhibe las enzimas histonas desacetilasas, es decir, es lo que se denomina un inhibidor de HDAC (HDACi, *Histone DeAcetylase inhibitor*), que induce la hiperacetilación de las histonas. Se trata de un mecanismo de control epigenético que cambia la estructura de la cromatina, lo que hace que el ADN sea más accesible a la maquinaria de la transcripción, potenciando, generalmente, la velocidad de transcripción. Los presentes inventores han reunido ahora pruebas experimentales que indican que la producción de t-PA está controlada en gran medida por este mecanismo. Además, recientemente, se ha informado que el tratamiento con VPA de pacientes con epilepsia reduce el riesgo de episodios aterotrombóticos hasta en un 40 % (Olesen, J. B., *et al.*, *Pharmacoevidemiol Drug Saf* (2010)), un efecto que se cree que probablemente sea atribuible a una mayor capacidad fibrinolítica en estos pacientes tras el tratamiento con VPA.

Desafortunadamente, los niveles de VPA en plasma que se obtienen típicamente durante el tratamiento con VPA anticonvulsivo (0,35-0,85 mM) conllevan un riesgo de importantes efectos secundarios adversos tales como complicaciones hemorrágicas, pancreatitis, insuficiencia hepática, aumento de peso, etc. Por tanto, las concentraciones de VPA utilizadas en la práctica clínica neurológica o psiquiátrica actual excluyen su uso en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad cardiovascular debido a sus efectos secundarios. Según lo indicado por Olesen *et al.*: “Aunque la relación riesgo/beneficio para las indicaciones aceptadas de la epilepsia es favorable, el fármaco puede tener efectos adversos y, claramente, no es adecuado para la prevención cardiovascular en sí”.

Se ha demostrado previamente que la producción de t-PA en las células endoteliales aumentó cuando las células se trataron con los inhibidores de HDAC Tricostatina A (TSA) y butirato (Arts *et al.*, 1995, *Biochem J.*, 15 de agosto de 1995;310 (Pt 1):171-6). Sin embargo, estas sustancias no son adecuadas para uso clínico debido a su toxicidad y propiedades farmacocinéticas deficientes, por lo que nunca se ha analizado su posible uso *in vivo*. Recientemente, este trabajo se amplió para describir los mecanismos de señalización celular que hay tras la regulación positiva del t-PA después del tratamiento con TSA, butirato y MS-275 en células endoteliales cultivadas (Dunoyer-Geindre y Kruithof, *Cardiovascular Research* 90(3) 457-63 (2011)). En esta referencia, los autores hacen el siguiente comentario con respecto al posible efecto secundario en el t-PA cuando se utilizan modificadores epigenéticos en la terapia del cáncer: “es probable que el uso terapéutico de inhibidores de la metilación del ADN o de inhibidores de HDAC tenga un impacto en la expresión de t-PA *in vivo*”. Sin embargo, no se sugirió que tales sustancias pudieran utilizarse como terapia preventiva para dirigirse específicamente a una producción alterada de t-PA para reducir el riesgo de episodios cardiovasculares. Además, las sustancias investigadas en el último estudio están excluidas del uso clínico debido a la toxicidad (TSA) o solo se ha demostrado que son eficaces a dosis demasiado altas para ser utilizadas en la prevención cardiovascular (butirato y MS-275). En general, hasta donde se sabe, no se han presentado previamente datos que demuestren que los inhibidores de HDAC pueden aumentar significativamente la producción de t-PA a concentraciones lo suficientemente bajas como para permitir el uso clínico como agentes profilácticos contra los episodios cardiovasculares sin provocar efectos secundarios significativos o intolerables.

Recientemente, los presentes inventores investigaron el efecto de bajas concentraciones de VPA sobre la producción de t-PA cuando se suprime por estímulos proinflamatorios. Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que el VPA es un eficaz agente inductor de t-PA ya a concentraciones subclínicas y que, sorprendentemente, basta con concentraciones bajas para aumentar o normalizar notablemente la producción de t-PA suprimida por la inflamación. Por lo tanto, los presentes inventores creen que el VPA es realmente útil para la prevención de enfermedades cardiovasculares a estas bajas concentraciones en pacientes con producción de t-PA suprimida por la inflamación. Los efectos secundarios descubiertos utilizando concentraciones/dosis más altas de VPA previamente conocidas en la técnica en, por ejemplo, el tratamiento antiepiléptico hacen, como ya se ha mencionado previamente, que el VPA no sea adecuado para la prevención primaria y secundaria de la enfermedad cardiovascular. Los presentes inventores han resuelto este problema utilizando las concentraciones/dosis inesperadamente bajas de VPA descritas en la presente solicitud para aumentar o normalizar una producción de t-PA suprimida por la inflamación.

Dado que el TNF-alfa es un activador celular muy potente con efectos profundos en múltiples funciones celulares, incluyendo los mecanismos reguladores tanto de la transcripción como los posteriores a la transcripción, así como en las vías de señalización, fue imposible predecir si el VPA podría tener algún efecto sobre la expresión del t-PA en células con supresión de TNF (esta consideración también se aplica a la nueva generación de HDACi, como se describe en la presente memoria). Sin embargo, descubrieron que, sorprendentemente, concentraciones inesperadamente bajas de VPA podrían compensar completamente la inhibición de TNF-alfa sobre la expresión de t-PA. Curiosamente, las concentraciones necesarias para invertir el efecto del TNF-alfa estaban en un intervalo más adecuado para la prevención cardiovascular (inferior a 0,35 mM). Esta gran capacidad del VPA para restablecer la producción de t-PA en el endotelio tratado con TNF hace posible el uso de dosis bajas de VPA para un tratamiento profiláctico eficaz con relativamente pocos efectos secundarios para mejorar la fibrinólisis endógena en pacientes con inflamación local o sistémica. No se ha demostrado previamente que el VPA pueda contrarrestar esta supresión del t-PA por la inflamación. Además, cuando este efecto se observa a concentraciones sorprendentemente bajas, la presente invención hace posible utilizar este tratamiento para prevenir la enfermedad cardiovascular sin efectos secundarios intolerables.

Aún más sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que, a concentraciones superiores, el TNF-alfa potenció realmente el efecto estimulante del VPA sobre la producción de t-PA. Por consiguiente, la exposición de las células endoteliales al TNF-alfa provocó un cambio profundo en el patrón de la curva de respuesta a la dosis de VPA, con una respuesta de eficacia máxima notablemente aumentada al VPA. Este hallazgo inesperado indica que hay una interacción compleja entre los efectos celulares de los dos agentes, lo que también puede explicar el hecho de que concentraciones muy inferiores a las anticipadas fueron suficientes para aumentar o normalizar una función fibrinolítica suprimida por la inflamación. Nuevamente, esto apoya la idea de que es posible utilizar VPA para el tratamiento preventivo contra la enfermedad cardiovascular en estos pacientes sin provocar los efectos secundarios adversos observados en, por ejemplo, el tratamiento antiepiléptico.

La producción de t-PA celular amplificada en respuesta al VPA respalda aún más la idea de que, incluso en la aterosclerosis, donde hay un microambiente muy inflamado alrededor de la placa, bajas dosis de VPA son suficientes para restablecer una función fibrinolítica suprimida por la inflamación. Estas nuevas observaciones indican que las dosis bajas o subclínicas de VPA son suficientes para restablecer una producción de t-PA alterada que es suprimida por el estrés inflamatorio.

En la solicitud de patente estadounidense número US 2009/0270497, se describen métodos para tratar afecciones inflamatorias sistémicas no localizadas, principalmente, sepsis, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que es un inhibidor de pan-HDAC. En la presente solicitud, se describen muchas sustancias, incluido el VPA. Sin embargo, la solicitud se refiere al tratamiento específico de la afección inflamatoria como tal, y no se menciona una estimulación potencial de la respuesta tromboprotectora endógena. Además, en la solicitud, no se menciona la capacidad del VPA a concentraciones bajas para normalizar una producción de t-PA suprimida por la inflamación.

Recientemente, se han desarrollado varios inhibidores de HDAC más específicos que, en virtud de su mayor especificidad, son más potentes y eficaces a dosis inferiores. Por ejemplo, mientras que el VPA es eficaz en el intervalo mM, los inhibidores de HDAC de nueva generación suelen causar una inhibición de HDAC similar en el intervalo μM bajo. Además, las sustancias más recientes se desarrollan para optimizar la farmacocinética, así como para reducir la toxicidad. Sin embargo, los HDACi de nueva generación a dosis utilizadas para el tratamiento del cáncer se siguen asociando con efectos secundarios adversos que impiden su uso en el tratamiento preventivo cardiovascular.

No obstante, las nuevas observaciones de los presentes inventores muestran de forma inesperada, pero clara, que el uso de concentraciones del HDACi sustancialmente inferiores a las utilizadas en la terapia clínica del cáncer provocan un aumento significativo de la producción de t-PA. Dado que, sorprendentemente, las concentraciones bajas de estas sustancias de HDACi son suficientes para aumentar o normalizar una producción alterada de t-PA (debido, por ejemplo, a la inflamación o a factores genéticos), es probable que el tratamiento a estas concentraciones se asocie con muchos menos efectos secundarios adversos y menos graves que los que se encuentran en la terapia clínica del cáncer. Por lo tanto, se ha descubierto que estas sustancias de HDACi resultan adecuadas para el tratamiento profiláctico contra la enfermedad cardiovascular trombótica a estas bajas concentraciones. De esta forma, los presentes inventores han resuelto el problema de los efectos secundarios adversos, haciendo posible así el uso de estas sustancias para el tratamiento preventivo cardiovascular.

Sorprendentemente, los presentes inventores también descubrieron que las bajas concentraciones de HDACi podrían compensar completamente la inhibición de TNF-alfa sobre la expresión de t-PA. De hecho, las concentraciones necesarias se encontraban en un intervalo que se cree que es adecuado para la prevención cardiovascular (por ejemplo, para el Belinostat, de aproximadamente 0,05-0,2 μM). Cabe señalar que el efecto sobre la expresión de t-PA no se explicó por una acción antiinflamatoria en sí, sino que estuvo claramente mediado por efectos sobre vías no inflamatorias (véase el Ejemplo 78). La gran capacidad de los HDACi para restablecer la producción de t-PA en el endotelio tratado con TNF-alfa hace posible el uso de dosis bajas para un tratamiento profiláctico eficaz con relativamente pocos efectos secundarios para mejorar la fibrinólisis endógena en pacientes con inflamación local o sistémica.

Hasta donde se sabe, no se ha demostrado previamente que las sustancias de HDACi puedan contrarrestar esta supresión de la inflamación del t-PA. Además, cuando este efecto se observa a concentraciones muy bajas, la presente invención hace posible el uso de este tratamiento para prevenir la enfermedad cardiovascular sin efectos secundarios intolerables en pacientes con fibrinólisis endógena alterada debido a la inflamación local o sistémica. Estas nuevas observaciones indican que basta con dosis bajas de HDACi para restablecer una producción de t-PA alterada.

Los diferentes HDACi descritos en la presente solicitud pertenecen a diferentes clases estructurales (por ejemplo, hidroxamatos, benzamidas y péptidos cíclicos) y podrían tener selectividad para diferentes isoformas de HDAC. Los hidroxamatos (por ejemplo, Vorinostat, Belinostat, Givinostat, Panobinostat, PCI-24781, JNJ26481585 y SB939) son pan-HDACi, es decir, inhiben las HDAC de diferentes isoformas con una eficacia relativamente similar, aunque existen diferencias en la selectividad de la enzima HDAC dentro de las diferentes clases estructurales. Las benzamidas (que incluyen el Mocetinostat y CXD101) son probablemente más selectivas para la inhibición de las isoformas de clase I y II de HDAC (clase I: HDAC1, 2, 3 y 8, y clase II: HDAC4, 6, 7 y 9). Las diferencias entre los diferentes HDACi producen diferencias impredecibles en su regulación de la expresión génica de las células endoteliales. Por ejemplo, la regulación de la E-selectina es difícil de predecir, ya que el Mocetinostat induce enormemente la expresión, el Givinostat suprime enormemente la expresión, mientras que el VPA y el Belinostat casi no tienen efecto sobre la regulación del gen.

Sin embargo, para sorpresa de los presentes inventores, descubrieron que las sustancias de HDACi descritas en la presente solicitud tenían efectos inductores cualitativos similares sobre la producción de t-PA. Además, este efecto se observa a concentraciones inesperadamente bajas para todas las sustancias de HDACi, aunque pertenecen a diferentes clases químicas y tienen diferentes perfiles de selectividad. Por lo tanto, estos datos indican que el t-PA es sensible a la inhibición de HDAC como tal, no a las moléculas individuales. Curiosamente, sin embargo, los

presentes inventores descubrieron que las sustancias de la clase del hidroxamato de nueva generación resultaron ser inductoras del t-PA aún más potentes a concentraciones muy bajas, como se demuestra en el Ejemplo 77, lo que hace que esta clase sea aún más preferida como estimulantes de la producción endógena de t-PA.

Estos nuevos enfoques son las primeras estrategias clínicamente factibles para normalizar una fibrinólisis vascular defectuosa en pacientes propensos a padecer episodios aterotrombóticos debido a la producción reducida de t-PA. Por lo tanto, el tratamiento con dosis bajas de HDACi mejora la “última línea de defensa” contra episodios tromboticos tales como el infarto de miocardio, el ictus isquémico o la trombosis venosa cuando tales episodios se desencadenan a pesar del tratamiento tradicional óptimo de los factores de riesgo.

El documento WO 2007/084775 describe métodos para tratar trastornos autoinmunitarios, arteriopatía coronaria, síntomas de alergia, sepsis por rechazo de aloinjertos/choque tóxico.

El documento de Ojemann, L. M., *et al.*, *Epilepsia*, **22(2)**, 242-243, (1980), se titula “Fibrogen and Valpoic-Acid”.

El documento de Sutor, A. H., *et al.*, *Medizinische Welt*, **25(11)**, 447-449, (1974), se titula “Influence of dipropylacetic acid (Ergenyl) on blood clotting”.

Resumen de la invención

Se ha descubierto que determinadas sustancias de HDACi son sorprendentemente eficaces a bajas concentraciones para restablecer una función fibrinolítica suprimida, lo que hace que estas sustancias sean adecuadas para el tratamiento profiláctico o agudo destinado a reducir el riesgo de episodios tromboticos arteriales o venosos clínicos. Además, no se ha demostrado previamente que las sustancias de HDACi puedan contrarrestar la producción de t-PA suprimida por la inflamación. Cuando se observa el efecto sobre la producción de t-PA a concentraciones sorprendentemente bajas, la presente invención hace posible utilizar este tratamiento para prevenir la enfermedad cardiovascular sin los efectos secundarios adversos observados en otras enfermedades, por ejemplo, en el cáncer, a concentraciones superiores. Esto es muy importante, ya que resuelve el problema de que el tratamiento profiláctico de grandes grupos de pacientes debería cumplir criterios más exigentes, pues debería tener efectos secundarios escasos y tolerables, como es el caso de la prevención de enfermedades cardiovasculares en pacientes con, por ejemplo, la función fibrinolítica suprimida por la inflamación utilizando las sustancias de HDACi descritas en la solicitud.

En la presente memoria, se describe una forma de utilizar estas sustancias de HDACi a bajas concentraciones para mejorar una fibrinólisis endógena suprimida.

También se describe en la presente memoria una forma de utilizar estas sustancias de HDACi a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar una fibrinólisis endógena suprimida y, por lo tanto, reducir la trombosis en los seres humanos.

También se describe en la presente memoria una forma de utilizar estas sustancias de HDACi a bajas concentraciones para restablecer una función fibrinolítica suprimida por la inflamación.

También se describe en la presente memoria una forma de utilizar estas sustancias de HDACi a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar una fibrinólisis endógena alterada por la inflamación local o sistémica en seres humanos.

También se describe en la presente memoria una forma de utilizar estas sustancias de HDACi a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar la fibrinólisis endógena en pacientes diagnosticados con aterosclerosis.

También se describe en la presente memoria una forma de utilizar estas sustancias de HDACi a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar la fibrinólisis endógena en pacientes con una inflamación local o sistémica diagnosticada.

También se describe en la presente memoria una forma de utilizar estas sustancias de HDACi a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar la fibrinólisis endógena en pacientes con un perfil de biomarcadores (uno o varios biomarcadores) indicativo de inflamación local o sistémica.

También se describe en la presente memoria una forma de utilizar estas sustancias de HDACi a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar la fibrinólisis endógena en pacientes que muestran niveles elevados de TNF-alfa.

Se ha descubierto que el ácido valproico es sorprendentemente eficaz a bajas concentraciones para restablecer una función fibrinolítica suprimida por la inflamación, lo que permite utilizar concentraciones bajas de ácido valproico para

reducir el riesgo de episodios cardiovasculares trombóticos en pacientes con función fibrinolítica suprimida por la inflamación. No se ha demostrado previamente que el VPA pueda contrarrestar la producción de t-PA suprimida por la inflamación. Además, cuando este efecto se observa a concentraciones sorprendentemente bajas, la presente invención hace posible utilizar este tratamiento para prevenir la enfermedad cardiovascular sin los efectos secundarios adversos observados en otras enfermedades tratadas con VPA a concentraciones superiores. Esto es muy importante, ya que resuelve el problema de las mayores exigencias en cuanto a los efectos secundarios para los tratamientos profilácticos, donde los efectos secundarios deben ser pocos y tolerables. Por lo tanto, hace posible el tratamiento profiláctico de grandes grupos de pacientes, como es el caso de la prevención de enfermedades cardiovasculares en pacientes con función fibrinolítica suprimida por la inflamación que usan VPA. El hallazgo de que la máxima eficacia del VPA en la producción de t-PA aumentó notablemente al exponer las células endoteliales a TNF-alfa muestra además que hay una relación no lineal inesperada entre el VPA, el TNF-alfa y el t-PA. Los presentes inventores creen que esta relación significa que es posible utilizar dosis incluso inferiores de las esperadas en un principio, según sus resultados iniciales sobre la producción de t-PA suprimida por el TNF, para aumentar o normalizar una función fibrinolítica suprimida por la inflamación. Esto mejora aún más el perfil de efectos secundarios y hace que el VPA sea aún más adecuado para el tratamiento preventivo contra la enfermedad cardiovascular en pacientes con función fibrinolítica suprimida por la inflamación.

Un objetivo principal de la presente invención es utilizar ácido valproico a bajas concentraciones para mejorar o normalizar la fibrinólisis endógena alterada por la inflamación local o sistémica.

Otro objetivo de la presente invención es utilizar ácido valproico a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar o normalizar la fibrinólisis endógena alterada por la inflamación local o sistémica en seres humanos.

Otro objetivo de la presente invención es utilizar ácido valproico a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar o normalizar la fibrinólisis endógena en pacientes con una inflamación local o sistémica diagnosticada.

Otro objetivo de la presente invención es utilizar ácido valproico a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar o normalizar la fibrinólisis endógena en pacientes con un perfil de biomarcadores (uno o varios biomarcadores) indicativo de inflamación local o sistémica.

Otro objetivo de la presente invención es utilizar ácido valproico a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar o normalizar la fibrinólisis endógena en pacientes que muestran niveles elevados de TNF-alfa.

Otro objetivo de la presente invención es utilizar ácido valproico a bajas concentraciones como un tratamiento profiláctico y/o agudo seguro y eficaz con pocos efectos secundarios para mejorar o normalizar la fibrinólisis endógena en pacientes diagnosticados con aterosclerosis.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para el lector, y se pretende que estos objetivos y ventajas estén dentro del alcance de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A y 1B** muestran curvas de respuesta a la dosis para el Belinostat y Vorinostat, respectivamente, sobre la expresión de ARNm de t-PA en células endoteliales humanas. Se muestra un experimento representativo.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra la capacidad del Belinostat y del Vorinostat para contrarrestar una supresión de t-PA mediada por TNF-alfa a concentraciones bajas en células endoteliales humanas. Se muestra un experimento representativo.

La **Figura 3** muestra la capacidad de las concentraciones bajas de VPA para contrarrestar la supresión de t-PA mediada por TNF-alfa en células HUVEC. Se muestra un experimento representativo.

La **Figura 4** es un gráfico que muestra las curvas de respuesta a la dosis para el VPA (0,3-4 mM) en presencia o ausencia de TNF-alfa (10 ng/ml). Se muestra un experimento representativo.

La **Figura 5** muestra una curva de respuesta a la dosis para el Vorinostat sobre la expresión de ARNm de t-PA en HUVEC tras 24 h de incubación (n = 3)

La **Figura 6** muestra una curva de respuesta a la dosis para el Belinostat sobre la expresión de ARNm de t-PA en HUVEC tras 24 h de incubación (n = 3)

La **Figura 7** muestra una curva de respuesta a la dosis para el Givinostat sobre la expresión de ARNm de t-PA en HUVEC tras 24 h de incubación (n = 3)

La **Figura 8** muestra una curva de respuesta a la dosis para el JNJ-26481585 sobre la expresión de ARNm de t-PA en HUVEC tras 24 h de incubación (n = 3)

La **Figura 9** muestra una curva de respuesta a la dosis para el SB939 sobre la expresión de ARNm de t-PA en HUVEC tras 24 h de incubación (n = 3)

La **Figura 10** muestra una curva de respuesta a la dosis para el Panobinostat sobre la expresión de ARNm de t-PA en HUVEC tras 24 h de incubación (n = 3)

La **Figura 11** muestra una curva de respuesta a la dosis para el Mocetinostat sobre la expresión de ARNm de t-PA en HUVEC tras 24 h de incubación (n = 3)

La **Figura 12** muestra una curva de respuesta a la dosis para el PCI-24781 sobre la expresión de ARNm de t-PA en HUVEC tras 24 h de incubación (un experimento representativo)

La **Figura 13** muestra el efecto de TNF-alfa (TNF- α), givinostat y las sustancias antiinflamatorias prototípicas ácido acetilsalicílico (ASA) e ibuprofeno (IBU) sobre la expresión de t-PA (un experimento representativo).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la degradación o descomposición de la fibrina (también denominada fibrinólisis), y a composiciones y métodos para el tratamiento de afecciones patológicas asociadas con la deposición excesiva de fibrina y/o la formación de trombos. En particular, la presente invención se refiere a la degradación o descomposición de la fibrina, y a composiciones y métodos para el tratamiento de afecciones patológicas asociadas con la deposición excesiva de fibrina y/o la formación de trombos, particularmente, cuando se debe a una fibrinólisis alterada. Más particularmente, la presente invención se refiere a la degradación o descomposición de la fibrina, y a composiciones y métodos para el tratamiento de afecciones patológicas asociadas con la deposición excesiva de fibrina y/o la formación de trombos, cuando se debe a una fibrinólisis alterada causada por una producción endógena reducida de t-PA. También se describe en la presente memoria un nuevo método para potenciar la degradación de los depósitos de fibrina y prevenir tales depósitos asociados con afecciones patológicas o que pueden conducir a tales afecciones.

En la presente memoria, se describe la administración a un sujeto que necesita tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de HDAC, tal como cualquiera de los inhibidores de HDAC descritos en la solicitud, tal como Vorinostat (SAHA), Belinostat (PXD-101), Givinostat (ITF2357), Panobinostat (LBH 589), PCI-24781, JNJ-26481585, SB939, Mocetinostat (MGCD0103) o CXD 101, compuestos que pueden utilizarse solos o en combinación (por ejemplo, combinados entre sí) o junto con el inhibidor de HDAC ácido valproico (VPA) y, opcionalmente, en asociación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y/o uno o más fármacos dirigidos a la formación de coágulos.

La presente invención proporciona ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en:

- (I) mejorar o normalizar la fibrinólisis endógena alterada por la inflamación local o sistémica; o
- (II) tratar o prevenir una afección patológica asociada con la deposición excesiva de fibrina y/o la formación de trombos, en donde la afección patológica está causada totalmente o al menos en parte por un aumento de la deposición de fibrina y/o una reducción de la capacidad fibrinolítica debido a una inflamación local o sistémica,

en donde el ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una cantidad de entre 1 μ g y 30 mg por kilogramo de peso corporal al día.

En la presente solicitud, el término “fibrinólisis” y la expresión “sistema fibrinolítico” no solo se utilizan para referirse a componentes y acciones específicos del sistema fibrinolítico como tal, sino que pueden opcionalmente incluir otras funciones fisiológicas y agentes que interactúen con el sistema fibrinolítico, tales como plaquetas y productos liberados de las mismas, así como componentes del sistema de coagulación del plasma.

Las afecciones patológicas que se pueden tratar según la invención son aquellas que están causadas totalmente o al menos en parte por un aumento de la deposición de fibrina y/o una reducción de la capacidad fibrinolítica. Estas incluyen, aunque no de forma limitativa, aterosclerosis, infarto de miocardio, ictus isquémico, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, coagulación intravascular diseminada, enfermedad vascular renal y claudicación intermitente. Además, en otra descripción, las sustancias se utilizan en afecciones que, a través de su efecto supresor sobre el sistema fibrinolítico vascular, aumentan el riesgo de padecer las patologías mencionadas anteriormente. Tales afecciones incluyen, aunque no de forma limitativa, hipertensión, obesidad, diabetes, síndrome metabólico y tabaquismo. Además, la presente invención se puede utilizar en sujetos con una actividad fibrinolítica que se reduce por

otras razones, incluyendo, aunque no de forma limitativa, variaciones heredadas en los componentes del sistema fibrinolítico.

Según se ha analizado anteriormente, los episodios cardiovasculares trombóticos se producen como resultado de dos procesos distintos; es decir, por un lado, una aterosclerosis vascular a largo plazo de la pared del vaso que progresa lentamente, y, por otro lado, una formación repentina de un coágulo agudo que rápidamente causa la detención del flujo. Las afecciones patológicas particulares que se pueden tratar son las relacionadas con este último proceso.

En particular, la afección patológica tratada puede seleccionarse del grupo que consiste en infarto de miocardio, angina de pecho estable, angina de pecho inestable, claudicación intermitente, ictus isquémico, ataque isquémico transitorio, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Más particularmente, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Además, las afecciones patológicas que se pueden tratar según la invención son aquellas que están causadas totalmente o al menos en parte por un aumento de la deposición de fibrina y/o una reducción de la capacidad fibrinolítica debido a una inflamación local o sistémica. Estas incluyen, aunque no de forma limitativa, aterosclerosis, síndrome metabólico, diabetes, coagulación intravascular diseminada, artritis reumatoide, glomerulonefritis, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, neuropatías autoinmunitarias y enfermedad granulomatosa, así como inflamación asociada con otras afecciones (tales como síndrome metabólico, diabetes, coagulación intravascular diseminada, artritis reumatoide, glomerulonefritis, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, neuropatías autoinmunitarias y enfermedad granulomatosa, así como inflamación asociada con otras afecciones).

En una realización preferida adicional, las afecciones patológicas que se pueden tratar según la invención son aquellas que están causadas totalmente o al menos en parte por un aumento de la deposición de fibrina y/o una reducción de la capacidad fibrinolítica debido a una inflamación local o sistémica. Estas incluyen, aunque no de forma limitativa, infarto de miocardio, angina de pecho estable, angina de pecho inestable, claudicación intermitente, ictus isquémico, ataque isquémico transitorio, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

En un aspecto especialmente preferido de la invención, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Además del diagnóstico tradicional de una inflamación sistémica o local por un médico como se conoce en la técnica, la inflamación local o sistémica de los pacientes se puede determinar utilizando uno o más biomarcadores acoplados a la inflamación. Estos biomarcadores incluyen, aunque no de forma limitativa, proteína C reactiva, TNF-alfa, proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP, *high sensitive C-Reactive Protein*), fibrinógeno, IL-1 beta e IL-6. Los métodos particulares para determinar si un paciente tiene inflamación sistémica o local incluyen los que se describen de aquí en adelante.

Además, se sabe que las placas ateroscleróticas están asociadas con un proceso inflamatorio muy localizado. Por lo tanto, la inflamación local también se puede determinar indirectamente por la presencia de placas ateroscleróticas diagnosticadas por ultrasonido vascular u otras técnicas de formación de imágenes.

Se entenderá que el experto puede determinar fácilmente si un paciente padece alteración de la fibrinólisis y/o reducción de la producción de t-PA endógeno.

El experto comprenderá que, para identificar un nivel deficiente de fibrinólisis en un paciente (es decir, capacidad fibrinolítica reducida), se dispone de unas cuantas alternativas diferentes. Por ejemplo, los altos niveles circulantes de PAI-1 (el principal inhibidor de t-PA) generalmente se consideran indicativos de una fibrinólisis deficiente, y esto se puede medir mediante métodos disponibles en el mercado (PAI-1 Coaliza® (Chromgenix), PAI-1 TriniLIZE® (Trinity Biotech), PAI-1 plasmático Imubind® (American Diagnostica), PAI-1 Zymutest (Hyphen Biomed)). Además, los niveles sistémicos bajos de t-PA activo libre también son un indicador de una fibrinólisis general deficiente, y también se pueden medir mediante métodos comerciales (antígeno de t-PA TriniLIZE® y actividad (Trinity Biotech), al igual que la presencia de un genotipo bajo productor (T) del polimorfismo 7351 C/T de t-PA. También se han utilizado ensayos funcionales que miden el tiempo de lisis del coágulo para evaluar la fibrinólisis global (Thrombinoscope™ (Synapse, BV, Maastricht, Países Bajos), IL/ROTEM® (Term International GmbH, Munich, Alemania), TEG® (Haemoscope, Niles), ensayo CloFAL (Peikang Biotechnology Co. Ltd. Shanghai, China)).

Además, la producción local y la liberación de t-PA se pueden determinar mediante modelos regionales. Normalmente, esto se realiza en un lecho vascular modelo, por ejemplo, el antebrazo humano (*Hrafnkelsdottir T, et al (2004) "Regulation of local availability of active tissue-type plasminogen activator in vivo in man". J Thromb Haemost 2: 1960-1968*), donde se coloca un catéter en la arteria braquial y en una vena, y se mide la cantidad de t-PA liberado sobre el lecho vascular del antebrazo tras la liberación inducida por agonistas.

En descripciones particulares, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, infarto de miocardio, ictus isquémico, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, coagulación intravascular diseminada, enfermedad vascular renal y claudicación intermitente.

Más particularmente, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en infarto de miocardio, angina de pecho estable, angina de pecho inestable, claudicación intermitente, ictus isquémico, ataque isquémico transitorio, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Más particularmente, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

Más particularmente, la afección patológica se selecciona entre afecciones que, a través de su efecto supresor sobre el sistema fibrinolítico vascular, aumentan el riesgo de padecer las patologías mencionadas anteriormente. Tales afecciones incluyen, aunque no de forma limitativa, hipertensión, obesidad, diabetes, síndrome metabólico y tabaquismo.

En particular, el paciente tiene una actividad fibrinolítica que se reduce por razones distintas a las proporcionadas con respecto a la realización de la invención mencionada directamente arriba (por ejemplo, distintas de hipertensión, obesidad, diabetes, síndrome metabólico y tabaquismo), que incluyen, pero no de forma limitativa, variaciones heredadas en componentes del sistema fibrinolítico.

Según se ha analizado anteriormente, también se ha descubierto que las afecciones patológicas que pueden tratarse según la invención son aquellas que están causadas totalmente o al menos en parte por un aumento de la deposición de fibrina y/o una reducción de la capacidad fibrinolítica debido a una inflamación local o sistémica. En particular, los presentes inventores han demostrado que las sustancias antiinflamatorias prototípicas aspirina (ASA) e ibuprofeno (IBU) son incapaces de invertir la supresión de t-PA causada por el estrés inflamatorio (véase el Ejemplo 78). Por lo tanto, es poco probable que el efecto de HDACi sobre la supresión inflamatoria de t-PA sea el resultado de un efecto antiinflamatorio general de estas sustancias.

El experto entenderá que se puede determinar si, el aumento de la deposición de fibrina y/o la reducción de la capacidad fibrinolítica en el paciente se deben a una "inflamación local o sistémica", como se utiliza en el presente memoria, utilizando uno o más biomarcadores acoplados a la inflamación, que incluyen, aunque no de forma limitativa, la proteína C reactiva, el TNF-alfa, la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP), el fibrinógeno, la IL-1beta y la IL-6 (por ejemplo, por una mayor concentración de uno o más de estos biomarcadores en relación con los niveles de control como es conocido en la técnica). Las plataformas analíticas comerciales que se pueden utilizar para cuantificar estos biomarcadores incluyen, aunque no de forma limitativa, Afinion™ (Medinor AB, Suecia), CA-7000 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, NY, EE. UU.), Sistema de inmunoensayo Immulite® 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc).

Los biomarcadores particulares que pueden identificar la inflamación local o sistémica incluyen proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) (a o por encima de 2,0 mg/l de suero) y fibrinógeno (a o por encima de 3 g/l de suero) (Corrado E., *et al.*, "An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis", *Journal of atherosclerosis and Thrombosis* 2010;17:1-11, Koenig W., "Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update", *Thrombosis Haemostasis* 2003;89:601-9).

Se puede determinar si el paciente tiene una inflamación local o sistémica utilizando uno o más biomarcadores acoplados a la inflamación, que incluyen, aunque no de forma limitativa, la proteína C reactiva, el TNF-alfa, la proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP), el fibrinógeno, la IL-1beta y la IL-6 (por ejemplo, mediante el aumento de la concentración de uno o más de estos biomarcadores en relación con los niveles de control como es conocido en la técnica).

Se puede determinar si el paciente tiene una inflamación local o sistémica identificando la presencia de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) (a o por encima de 2,0 mg/l de suero) y/o fibrinógeno (a o por encima de 3 g/l de suero).

En particular, se puede determinar si el paciente tiene inflamación local indirectamente por la presencia de placas ateroscleróticas diagnosticadas por ultrasonido vascular u otras técnicas de formación de imágenes.

En determinada descripción de la presente memoria, el compuesto es ácido valproico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Como se describe en la presente memoria, se proporciona ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección patológica asociada con una deposición excesiva de fibrina y/o formación de trombos, en donde la afección patológica está causada totalmente o al menos en parte por un aumento de la deposición de fibrina y/o una reducción de la capacidad fibrinolítica debido a una inflamación local o sistémica.

En descripciones particulares, la dosis de ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es como se describe a continuación.

En una descripción adicional relacionada con la descripción mencionada directamente antes, la afección patológica es una enfermedad cardiovascular.

Como se utiliza en la presente memoria, “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad de un agente que confiere el efecto farmacológico o terapéutico requerido a un sujeto sin efectos secundarios adversos indebidos. Se entiende que la cantidad terapéuticamente eficaz variará de un sujeto a otro. Las cantidades y los regímenes de dosificación de HDACi cubiertos en esta solicitud, que se administran a un sujeto para normalizar o aumentar la fibrinólisis, dependerán de una serie de factores, tales como la sustancia de elección, el modo de administración, la naturaleza de la afección que se esté tratando, la edad, el peso corporal y el estado general del sujeto que se está tratando, y el criterio del médico que los prescribe. Las sustancias de HDACi cubiertas en esta solicitud se pueden administrar como una dosis específica en un intervalo específico basándose en estos factores. Alternativamente, como puede haber una variación significativa entre individuos en las concentraciones alcanzadas en plasma con una dosis específica de estas sustancias, se puede monitorizar de manera continua la concentración en plasma y valorar volumétricamente al paciente para alcanzar una dosis y un intervalo específicos que den lugar a una concentración en plasma deseada. Los ejemplos de intervalos de dosificación para las sustancias de HDACi en esta solicitud incluyen, aunque no de forma limitativa, la administración una vez al día o la administración dividida en múltiples dosis diarias. La administración puede ser continua, es decir, cada día, o intermitente. El término intermitente, como se utiliza en la presente memoria, significa detener y comenzar a intervalos regulares o irregulares. Por ejemplo, la administración intermitente de un HDACi puede ser la administración de uno a seis días a la semana, o puede significar la administración diaria durante dos semanas seguida de una semana sin administración, o puede significar la administración en días alternos. En términos generales, el HDACi puede administrarse en una cantidad en la que la fibrinólisis aumente o se normalice sin efectos secundarios adversos indebidos, lo que lo hace adecuado tanto para el tratamiento profiláctico como agudo.

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que la dosis requerida es significativamente inferior que la dosis convencional utilizada en, por ejemplo, aplicaciones oncológicas. Al lograr un aumento o una normalización de la producción de t-PA ya a estas dosis bajas, los presentes inventores resuelven el problema de los efectos secundarios que imposibilita el uso de estas sustancias a dosis superiores para el tratamiento de prevención cardiovascular.

Generalmente, la dosis descrita en la presente memoria (por ejemplo, para la prevención de la trombosis) es <50 % (por ejemplo, del 0,1 al 49,9 %, tal como del 1 al 40 %, del 2 al 30 %, del 5 al 25 % o incluso del 1 al 25 %) en peso (p/p) de la utilizada para indicaciones oncológicas. Más preferiblemente, la dosis utilizada es <20 % en peso de la utilizada para indicaciones oncológicas. Con la máxima preferencia, la dosis es ≤10 % en peso de la utilizada para indicaciones oncológicas. De manera similar, las limitaciones se aplican a la dosis como un porcentaje de la dosis máxima tolerada (DMT).

También se describe en la presente memoria que el compuesto se administra a una dosis que es <50 % (por ejemplo, del 0,1 al 49,9 %, tal como del 1 al 40 %, del 2 al 30 %, del 5 al 25 % o incluso del 1 al 25 %) en peso de:

- (i) la utilizada para indicaciones oncológicas; o
- (ii) la dosis máxima tolerada.

En particular, la dosis es <20 % en peso (por ejemplo, del 0,1 al 19,0 %, tal como del 5 al 15 % o incluso del 1 al 15 %) o, más preferiblemente, ≤ 10 % en peso (por ejemplo, del 0,1 al 10,0 %, tal como del 1 al 5 % o incluso del 1 al 10 %) de la utilizada para indicaciones oncológicas o de la dosis máxima tolerada.

Para evitar dudas, la referencia a la dosis que se “utiliza” con respecto a las aplicaciones oncológicas o a la dosis máxima tolerada incluye las dosis que se indican como tales en la bibliografía pertinente (es decir, la bibliografía asociada con la aplicación oncológica de ese compuesto y/o la bibliografía asociada con ensayos clínicos realizados con respecto a dichos compuestos). En este sentido, los compuestos de la invención especialmente preferidos son aquellos que han sido objeto de ensayos clínicos (por ejemplo, para uso en oncología).

En términos generales, las sustancias de HDACi descritas en esta solicitud se pueden administrar en una cantidad de 0,01-1000 mg/día, produciendo típicamente una concentración máxima en plasma (C_{máx}) de 0,1 nM a 10 μM. Preferiblemente, la cantidad administrada debería estar en el intervalo de 0,1-1000 mg/día, típicamente una C_{máx} de 1 nM a 10 μM. Más preferiblemente, la cantidad administrada debería estar entre 0,1-300 mg/día, produciendo típicamente una C_{máx} de 1 nM a 1 μM. Con la máxima preferencia, la cantidad administrada debería estar entre 0,1-100 mg/día, produciendo típicamente una C_{máx} de 1 nM a 0,5 μM.

Las concentraciones en plasma descritas en esta solicitud se pueden lograr mediante una valoración volumétrica de la dosis para cada sustancia como se conoce en la técnica. En los Ejemplos 66-69, se describen ejemplos de este tipo de valoración volumétrica.

- 5 También descrito en la presente memoria, se proporciona un método, compuesto para uso o uso como se define con respecto a uno o más de los aspectos precedentes de la invención, en donde el compuesto se administra en una cantidad de 0,01-1000 mg/día, preferentemente produciendo una $C_{máx}$ de 0,1 nM a 10 μ M.

10 En particular, la cantidad administrada debería estar en el intervalo de 0,1-1000 mg/día, produciendo preferiblemente una $C_{máx}$ de 1 nM a 10 μ M.

Más particularmente, la cantidad administrada debería estar en el intervalo de 0,1-300 mg/día, produciendo preferiblemente una $C_{máx}$ de 1 nM a 1 μ M.

- 15 Más particularmente, la cantidad administrada debería estar en el intervalo de 0,1-100 mg/día, produciendo preferiblemente una $C_{máx}$ de 1 nM a 0,5 μ M.

20 Los inhibidores de HDAC (HDACi) descritos en la presente memoria se pueden administrar a un sujeto de una manera conveniente tal como por vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, bucal, transdérmica, intradérmica o por supositorio como se conoce en la técnica. Las sustancias activas también pueden administrarse a un sujeto humano mediante infusión continua durante un período de tiempo predeterminado, por ejemplo, de un minuto a 24 horas. La administración puede realizarse mediante un catéter intravenoso conectado a una bomba apropiada o mediante alimentación por gravedad.

25 Las sustancias pueden recubrirse o administrarse con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el material activo puede administrarse en un adyuvante, administrarse junto con, por ejemplo, inhibidores de enzimas o en liposomas. Los adyuvantes contemplados en la presente memoria incluyen, aunque no de forma limitativa, resorcinolos, tensioactivos no iónicos tales como oleiléter de polioxietileno y polietilénéter de n-hexadecilo. Los inhibidores de enzimas incluyen; aunque no de forma limitativa, inhibidor de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFP) y trasilol. Las liposomas incluyen emulsiones P40 de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

35 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen, aunque no de forma limitativa, soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que sea fácil su administración a través de una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua estéril, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede realizarse mediante diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Se puede producir la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

50 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el material activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diferentes de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diferentes ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la técnica de liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución previamente filtrada estéril del mismo.

60 Cuando se inyecta, se pueden alcanzar temporalmente concentraciones en plasma de HDACi superiores a las descritas anteriormente. Sin embargo, la concentración en estado estable se encuentra dentro de las concentraciones mencionadas en la solicitud.

65 Cuando las sustancias descritas en la presente memoria se protegen adecuadamente como se ha descrito anteriormente, el compuesto activo se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible, o puede estar encerrado en una cápsula de gelatina de envoltura dura o blanda, o se puede comprimir en comprimidos, o se puede incorporar directamente con la comida de la dieta. Para la administración terapéutica oral, el material activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de

comprimidos que se pueden ingerir, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Además, el material activo se puede incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida. Por ejemplo, el material activo se puede incorporar en comprimidos con cubierta entérica/cápsulas y/o formulaciones de liberación bifásica, estas últimas descritas, por ejemplo, en el documento US2007/0232528A1.

Los comprimidos, los trociscos, las píldoras, las cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: Un aglutinante tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina, o un agente saborizante tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Pueden estar presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar de cualquier otra manera la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o las cápsulas se pueden recubrir con goma laca, azúcar o ambas. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metilparabenos y propilparabenos como conservantes, un colorante y saborizantes tales como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debería ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas.

En todas las formas y vías de administración mencionadas en la solicitud, se puede utilizar una sustancia de HDACi mencionada o una sal farmacéuticamente aceptable de esta sustancia de HDACi. La invención cubre el uso de estas sustancias de HDACi, así como de cualquier forma conocida de estas sustancias, incluyendo, aunque no de forma limitativa, una sal farmacéuticamente aceptable de las sustancias de HDACi, en cualquier forma o vía de administración adecuada conocida en la técnica.

Las sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos incluyen, aunque no de forma limitativa:

(a) sales formadas cuando un protón ácido se reemplaza por un ion metálico, tal como, por ejemplo, un ion de metal alcalino (por ejemplo, litio, sodio, potasio), un ion alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio o calcio) o un ion de aluminio, o se reemplaza por un catión amonio (NH_4^+);

(b) sales formadas haciendo reaccionar el compuesto con una base orgánica farmacéuticamente aceptable, que incluye alquilaminas, tales como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, dicitohexilamina, tris(hidroximetil)metilamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares;

(c) sales formadas haciendo reaccionar el compuesto con un ácido farmacéuticamente aceptable, lo que proporciona sales de adición de ácido. Los ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metafosfórico y similares; o con un ácido orgánico tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido trifluoroacético, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido toluensulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-metilbencil-2,2,2-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metilénbis-(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares.

Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen las descritas en Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1-19; y "Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, and Use", Stah y Wermuth, Ed.; Wiley-VCH y VHCA, Zürich, 2002.

Los compuestos presentados en la presente memoria incluyen todas las formas diastereoisoméricas, enantioméricas y epiméricas. Para los compuestos descritos en la presente memoria que existen en forma de tautómeros, todos los tautómeros se incluyen dentro de las fórmulas descritas en la presente memoria. Además, los compuestos descritos en la presente memoria pueden formarse y/o usarse como sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden preparar utilizando técnicas y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos sintéticos ilustrativos útiles para sintetizar los compuestos de la solicitud incluyen, por ejemplo, los descritos en Nogrady (1985) "Medicinal Chemistry A Biochemical Approach", Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392; Silverman (1992); "Reagents for Organic Synthesis" de Fieser y Fieser, volúmenes 1-17 (John Wiley and Sons, 1991); "Chemistry of Carbon Compounds" de Rodd, volúmenes 1-5 y suplementos (Elsevier Science Publishers, 1989); "Organic Reactions", volúmenes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991), "Advanced Organic Chemistry" de March, (John Wiley and Sons, 4ª edición) y "Comprehensive Organic Transformations" de Larock (VCH Publishers Inc., 1989).

En particular, los compuestos descritos en la presente memoria pueden estar disponibles en el mercado y/o pueden sintetizarse según procedimientos publicados, como los conocidos por el experto y/o como los mencionados en la presente memoria. El VPA puede estar disponible en el mercado, en Sigma-Aldrich con el número de producto P4543.

Como se utilizan en la presente memoria, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” y el término “excipiente” incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, descritos anteriormente. El uso de tales vehículos y excipientes es bien conocido en la técnica, véase, por ejemplo, “Remington's Pharmaceutical Science” y la Farmacopea estadounidense (The United States Pharmacopeia-National Formulary (USP-NF)), “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, 19ª ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., “Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1975; Liberman, H. A. y Lachman, L., Eds., “Pharmaceutical Dosage Forms”, Marcel Decker, Nueva York, N.Y., 1980; y “Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems”, 7ª ed. (Lippincott Williams Wilkins 1999).

El experto comprenderá que la expresión “administrado junto con” incluye la administración concomitante y/o secuencial. En este sentido, la administración secuencial puede implicar la administración dentro de la misma intervención terapéutica (por ejemplo, en una hora del compuesto de la invención).

En particular, el compuesto puede administrarse en asociación con uno o más agentes anticoagulantes (es decir, un ejemplo de una clase de fármacos dirigidos a la formación de coágulos), tales como heparina, heparina de bajo peso molecular (HBPM), warfarina, anisindiona, fenindona, bishidroxycumarina, bivalirudina, eptifibatida; y/o uno o más vasodilatadores tales como nitrilos (por ejemplo, amilnitrilo, nitroglicerina, nitrilo de sodio, dinitrato de isosorbida), papaverina, ácido nicotínico y ciclandelato. Los agentes anticoagulantes y vasodilatadores pueden mejorar el acceso a la trombosis y a otros depósitos de fibrina, aumentando así la degradación de la fibrina.

Más particularmente, el material activo también se puede administrar en asociación con agentes que prevengan episodios cardiovasculares tales como, aunque no de forma limitativa, estatinas, betabloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas del receptor de angiotensina II o diuréticos.

En particular, el compuesto también se puede administrar en asociación con uno o más agentes antiinflamatorios que incluyen esteroides y AINE (que incluyen, aunque no de forma limitativa, aspirina, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco).

El material activo se puede administrar en asociación con uno o más agentes antiplaquetarios (es decir, un ejemplo de una clase de fármacos dirigidos a la formación de coágulos) que incluyen, aunque no de forma limitativa, aspirina, persantina y clopidogrel.

En descripciones particulares, el otro agente terapéutico es un fármaco dirigido a la formación de coágulos, tal como uno o más agentes antiplaquetarios (por ejemplo, aspirina, persantina y/o clopidogrel).

En más descripciones particulares, el compuesto también se puede administrar en asociación con otras sustancias de HDACi, que incluyen, aunque no de forma limitativa, VPA y sales farmacéuticamente aceptables de VPA.

Por ejemplo, un tratamiento combinado con VPA (utilizando, por ejemplo, aproximadamente 50-250 mg dos veces al día o una concentración en plasma en el intervalo de aproximadamente 1 μ M-0,4 mM, preferiblemente 1 μ M- <0,35 mM) puede hacer que el tratamiento sea más eficaz y/o reducir los efectos secundarios. El material activo también puede administrarse en asociación con uno o más agentes trombolíticos seleccionados entre, por ejemplo, t-PA recombinante, prouroquinasa, uroquinasa o estreptoquinasa. La potenciación de la actividad fibrinolítica puede tener lugar cuando el HDACi se administra con dichos agentes.

En descripciones particulares, el compuesto se administrará en asociación con VPA (por ejemplo, a una dosis de VPA de aproximadamente 50-250 mg dos veces al día y/o una dosis que alcance una concentración en plasma (por ejemplo, una $C_{m\acute{a}x}$) en el intervalo de aproximadamente 1 μ M-0,4 mM, preferiblemente 1 μ M- <0,35 mM). En otra realización, la dosis de VPA es como se describe con respecto al undécimo aspecto de la invención (a continuación)).

La descripción de la presente memoria también se refiere a composiciones trombolíticas que comprenden HDACi en asociación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables; y que incluyen opcionalmente uno o más agentes antitrombolíticos y/o uno o más agentes anticoagulantes y/o uno o más agentes antiplaquetarios y/o uno o más vasodilatadores, como se ha descrito anteriormente.

Se puede determinar si el paciente tiene una inflamación local o sistémica identificando la presencia de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) (a o por encima de 2,0 mg/l de suero) y/o fibrinógeno (a o por encima de 3 g/l de suero).

Según se ha analizado anteriormente, la invención hace posible utilizar este tratamiento para prevenir la enfermedad cardiovascular sin los efectos secundarios adversos observados en otras enfermedades tratadas con VPA (es decir, a concentraciones superiores).

Se puede determinar si el paciente tiene “fibrinólisis endógena alterada por la inflamación local o sistémica” y/o “función fibrinolítica suprimida por la inflamación”, como se utilizan en la presente memoria, utilizando uno o más

biomarcadores acoplados a la inflamación, que incluyen, aunque no de forma limitativa, proteína C reactiva, TNF-alfa, proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP), fibrinógeno, IL-1beta e IL-6 (por ejemplo, mediante el aumento de la concentración de uno o más de estos biomarcadores en relación con los niveles de control como es conocido en la técnica y como se analiza en la presente memoria (anteriormente)).

Como se utiliza en la presente memoria, el experto entenderá que “prevención” también puede denominarse “profilaxis”.

Las cantidades y los regímenes de dosificación de VPA que se administran a un sujeto para normalizar o aumentar la fibrinólisis dependerán de una serie de factores tales como el modo de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando, el peso corporal del sujeto que se está tratando y el criterio del médico que los prescribe. El tratamiento con VPA se puede administrar como una dosis específica en un intervalo específico en función de estos factores. Alternativamente, como hay una variación relativamente alta entre individuos en las concentraciones en plasma alcanzadas con una dosis específica de VPA, se puede monitorizar la concentración de VPA en plasma de manera continua y valorar volumétricamente al paciente para alcanzar una dosis y un intervalo específicos que den lugar a una concentración en plasma deseada. En términos generales, el VPA se puede administrar en una cantidad de entre 1 µg y 30 mg por kilogramo de peso corporal al día. La concentración de VPA en plasma podría estar entre 1 µM-2 mM. El VPA se puede administrar a un sujeto en un régimen de administración de una vez a la semana, dos veces al día, diariamente, dos o tres veces al día para alcanzar la concentración de estado estable requerida de la sustancia en plasma. Preferiblemente, la cantidad administrada debería estar en el intervalo de aproximadamente 50-1000 mg/día y las concentraciones en plasma alcanzan aproximadamente 0,01-0,7 mM. Más preferiblemente, la cantidad administrada debería ser de aproximadamente 50-250 mg dos veces al día y la concentración en plasma debería estar en el intervalo de aproximadamente 0,05-0,4 mM. Aún más preferiblemente, la cantidad administrada debería ser de aproximadamente 50-200 mg dos veces al día y la concentración en plasma debería estar en el intervalo de aproximadamente 0,05-0,35 mM. Con la máxima preferencia, la cantidad administrada produce una concentración en plasma en el intervalo de aproximadamente 0,05-0,3 mM. En una realización preferida de la invención, el VPA se administrará dos veces al día para producir una concentración en plasma inferior a 0,3 mM (tal como 0,05-0,29 mM).

En descripciones particulares, el ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una cantidad de entre 1 µg y 30 mg por kilogramo de peso corporal al día, produciendo preferiblemente una $C_{máx}$ en el intervalo de aproximadamente 1 µM-2 mM.

En descripciones particulares, la cantidad de ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrada debería estar en el intervalo de aproximadamente 50-1000 mg/día, produciendo preferiblemente una $C_{máx}$ en el intervalo de aproximadamente 0,01-0,7 mM. En una realización más particular, la cantidad administrada debería ser de aproximadamente 50-250 mg dos veces al día, produciendo preferiblemente una $C_{máx}$ en el intervalo de aproximadamente 0,05-0,4 mM. En otra realización, la cantidad administrada debería ser de aproximadamente 50-200 mg dos veces al día, produciendo preferiblemente una $C_{máx}$ en el intervalo de aproximadamente 0,05-0,35 mM.

En descripciones particulares, la cantidad de ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrada produce una concentración en plasma en el intervalo de aproximadamente 0,05-0,3 mM. En una realización preferida de la invención, se administrará ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dos veces al día para producir una concentración en plasma inferior a 0,3 mM (tal como de 0,01-0,29 mM).

Cuando se inyecta, se pueden alcanzar temporalmente concentraciones en plasma de VPA superiores a las descritas anteriormente. Sin embargo, la concentración en estado estable se encuentra dentro de las concentraciones descritas anteriormente.

El ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de esta solicitud se puede administrar a un sujeto de una manera conveniente, tal como las maneras descritas anteriormente con respecto a los inhibidores de HDAC (HDACi).

En todas las formas y vías de administración mencionadas en la solicitud, se puede utilizar VPA o una sal farmacéuticamente aceptable de VPA. La invención cubre el uso de VPA, así como cualquier forma de VPA conocida en la técnica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, sales farmacéuticamente aceptables de VPA en cualquier forma o vía de administración adecuada conocida en la técnica.

Las sales farmacéuticamente aceptables de VPA incluyen, aunque no de forma limitativa:

(a) sales formadas cuando un protón ácido se reemplaza por un ion metálico, tal como, por ejemplo, un ion de metal alcalino (por ejemplo, litio, sodio, potasio), un ion alcalinotérreo (por ejemplo, magnesio o calcio) o un ion de aluminio, o se reemplaza por un catión amonio (NH_4^+);

(b) sales formadas haciendo reaccionar VPA con una base orgánica farmacéuticamente aceptable, que incluye alquilaminas, tales como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, dicitohexilamina, tris(hidroximetil)metilamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y similares;

(c) sales formadas haciendo reaccionar VPA con un ácido farmacéuticamente aceptable, lo que proporciona sales de adición de ácido. Los ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico,

ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metafosfórico y similares; o con un ácido orgánico tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido trifluoroacético, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido toluensulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-metilbicyclo-[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metilenbis-(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares.

Otras sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen las descritas en Berge *et al.*, *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1-19; y "Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, and Use", Stah y Wermuth, Ed.; Wiley-VCH y VHCA, Zúrich, 2002.

El ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se puede administrar en asociación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y uno o más fármacos dirigidos a la formación del coágulo.

También descrito en la presente memoria, se proporciona un método, compuesto para uso o uso en donde el ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en asociación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y uno o más fármacos dirigidos a la formación del coágulo.

El ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se puede administrar en asociación con uno o más agentes antiplaquetarios que incluyen, aunque no de forma limitativa, aspirina, persantina y clopidogrel. También se puede administrar en asociación con uno o más agentes anticoagulantes, tales como heparina, heparina de bajo peso molecular (HBPM), warfarina, anisindiona, fenindona, bishidroxicumarina, bivalirudina, eptifibatida; y/o uno o más vasodilatadores tales como nitrilos (por ejemplo, amilnitrilo, nitroglicerina, nitrilo de sodio, dinitrato de isosorbida), papaverina, ácido nicotínico y ciclandelato. Los agentes anticoagulantes y vasodilatadores pueden mejorar el acceso a la trombosis y a otros depósitos de fibrina, aumentando así la degradación de la fibrina. Además, el ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) también se puede administrar en asociación con agentes que previenen episodios cardiovasculares tales como, aunque no de forma limitativa, estatinas, betabloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas del receptor de angiotensina II o diuréticos. El ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) también se puede administrar en asociación con uno o más agentes antiinflamatorios que incluyen esteroides y AINE (que incluyen, aunque no de forma limitativa, aspirina, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco). El ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) también se puede administrar en asociación con uno o más agentes trombolíticos seleccionados entre, por ejemplo, tPA recombinante, prouroquinasa, uroquinasa o estreptoquinasa. Sin pretender imponer ninguna teoría, la potenciación de la actividad fibrinolítica puede tener lugar cuando VPA se administre con tales agentes.

En una descripción particular, el ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se administra en asociación con uno o más agentes antiplaquetarios que incluyen, aunque no de forma limitativa, aspirina, persantina y clopidogrel.

En otra descripción, el ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se administra con uno o más agentes anticoagulantes, tales como heparina, heparina de bajo peso molecular (HBPM), warfarina, anisindiona, fenindona, bishidroxicumarina, bivalirudina, eptifibatida; y/o uno o más vasodilatadores tales como nitrilos (por ejemplo, amilnitrilo, nitroglicerina, nitrilo de sodio, dinitrato de isosorbida), papaverina, ácido nicotínico y ciclandelato.

En otra descripción, el ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se administra en asociación con agentes que previenen episodios cardiovasculares tales como, aunque no de forma limitativa, estatinas, betabloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas del receptor de angiotensina II o diuréticos.

En otra descripción, el ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se administra en asociación con uno o más agentes antiinflamatorios que incluyen esteroides y AINE (que incluyen, aunque no de forma limitativa, aspirina, ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco).

En otra descripción, el ácido valproico (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) se administra en asociación con uno o más agentes trombolíticos seleccionados entre, por ejemplo, tPA recombinante, prouroquinasa, uroquinasa o estreptoquinasa.

También se describen en la presente memoria composiciones trombolíticas que comprenden VPA en asociación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables; y que incluyen opcionalmente uno o más agentes antitrombolíticos y/o uno o más agentes anticoagulantes y/o uno o más agentes antiplaquetarios y/o uno o más vasodilatadores, como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, también descrito en la presente memoria, se proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- (a) ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 - (b) uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables; y
 - (c) uno o más agentes antitrombóticos y/o uno o más agentes anticoagulantes y/o uno o más agentes antiplaquetarios y/o uno o más vasodilatadores,
- en donde los agentes antitrombóticos, agentes anticoagulantes, agentes antiplaquetarios y vasodilatadores son como se describen con respecto al undécimo aspecto de la invención.

En una descripción particular, el ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está presente a una dosis según se define en la presente memoria.

También descrito en la presente memoria, se proporciona un kit de piezas que comprende:

- (A) ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (B) uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables; y
- (C) uno o más agentes antitrombóticos y/o uno o más agentes anticoagulantes y/o uno o más agentes antiplaquetarios y/o uno o más vasodilatadores,

en donde los agentes antitrombóticos, agentes anticoagulantes, agentes antiplaquetarios y vasodilatadores son como se describen con respecto al decimotercer aspecto de la invención.

Para evitar dudas, se pretende específicamente que las referencias a otros aspectos (por ejemplo, precedentes) incluyan una referencia a cada realización (por ejemplo, realizaciones particulares o preferidas) de ese aspecto y combinaciones de los mismos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos y ejemplos de referencia ilustran adicionalmente la invención y otras descripciones proporcionadas en la presente memoria. Como es evidente, se entenderá que la invención no se limita de ninguna manera a los aspectos específicos descritos en estos ejemplos.

Ejemplo de referencia 1

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el Vorinostat

Se prepararon células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) mediante tratamiento con collagenasa de cordones umbilicales recién extraídos (Jaffe, E. A., *et al.*, *J Clin Invest* **52**, 2745-2756 (1973)) obtenidos en la sala de maternidad del hospital de la Universidad de Sahlgrenska, Gotheburg, Suecia. Las células se cultivaron en medio EGM-2 (Lonza, Basilea, Suiza) y todos los experimentos se realizaron en el pase 1 de subcultivo. Las HUVEC confluentes se expusieron a 10 nM-10 μ M de Vorinostat (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) en medio completo durante 24 h. Tras 24 h, se recogieron las células y el medio acondicionado.

Se preparó ARN total utilizando el kit RNeasy Mini RNA (Qiagen, Hilden, Alemania) y se retiró el ADN genómico utilizando un conjunto de ADNasa I libre de ARNasa (Qiagen). Los niveles de ARNm de t-PA se analizaron con RT-PCR en tiempo real, realizada en un sistema de PCR en tiempo real rápido 7500 de Applied Biosystems utilizando reactivos de ADNc y Taqman obtenidos de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.). Se usó hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT, número de ensayo Hs99999909_m1, Applied Biosystems) como patrón interno endógeno.

Se sabe que las células endoteliales en cultivo secretan constitutivamente la mayoría del t-PA sintetizado, lo que hace que los medios acondicionados sean una fuente adecuada para la cuantificación de la proteína t-PA. Se recogió medio acondicionado de cultivos celulares, se centrifugó (10.000 x g, 10 min, 4 °C) para retirar los restos celulares, se transfirió a tubos nuevos y se almacenó a -70 °C. Las concentraciones de antígeno t-PA en medios acondicionados se determinaron utilizando el ELISA de antígeno t-PA TriniLize disponible en el mercado (Trinity Biotech, Bray, Irlanda) según el protocolo del fabricante.

Ya se pudo observar un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA y proteína t-PA a 50 nM de Vorinostat. El efecto sobre la expresión de t-PA aumentó de una manera dependiente de la dosis y fue máximo a alrededor de 3 μ M, donde la expresión de t-PA aumentó aproximadamente 7 veces (Figura 1 B).

Ejemplo de referencia 2

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el Belinostat

El Belinostat se estudió según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se trataron con 10 nM-10 µM de Belinostat (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h. Ya se pudo observar un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 10 nM de Belinostat. El efecto sobre la expresión de t-PA aumentó de una manera dependiente de la dosis y fue máximo a alrededor de 3 µM, donde la expresión de t-PA aumentó aproximadamente 10 veces (Figura 1).

Ejemplo de referencia 3

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el Givinostat

El Givinostat se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se tratan con 1 nM-10 µM de Givinostat durante 24 h.

Ya se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 10 nM de Givinostat (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.). El efecto sobre la expresión de t-PA aumenta de una manera dependiente de la dosis y es máximo a alrededor de 0,3 µM, donde la expresión de t-PA aumenta aproximadamente 10 veces.

Ejemplo de referencia 4

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el Panobinostat

El Panobinostat se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se tratan con 0,1 nM-10 µM de Panobinostat (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

Ya se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 1 nM de Panobinostat. El efecto sobre la expresión de t-PA aumenta de una manera dependiente de la dosis y es máximo a alrededor de 30 nM, donde la expresión de t-PA aumenta aproximadamente 10 veces.

Ejemplo de referencia 5

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el PCI-24781

El PCI-24781 se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se tratan con 1 nM-10 µM de PCI-24781 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

Ya se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 1 nM de PCI-24781. El efecto sobre la expresión de t-PA aumenta de una manera dependiente de la dosis y es máximo a alrededor de 0,3 µM, donde la expresión de t-PA aumenta aproximadamente 10 veces.

Ejemplo de referencia 6

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el JNJ-26481585

El JNJ-26481585 se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se tratan con 0,1 nM-1 µM de JNJ-26481585 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

Ya se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 1 nM de JNJ-26481585. El efecto sobre la expresión de t-PA aumenta de una manera dependiente de la dosis y es máximo a alrededor de 30 nM, donde la expresión de t-PA aumenta aproximadamente 10 veces.

Ejemplo de referencia 7

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el Mocetinostat

El Mocetinostat se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se tratan con 10 nM-10 µM de Mocetinostat (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

Ya se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 10 nM de Mocetinostat. El efecto sobre la expresión de t-PA aumenta de una manera dependiente de la dosis y es máximo a alrededor de 3 µM, donde la expresión de t-PA aumenta aproximadamente 10 veces.

Ejemplo de referencia 8

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el SB939

El SB939 se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se tratan con 10 nM-10 μ M de SB939 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

- 5 Ya se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 10 nM de SB939. El efecto sobre la expresión de t-PA aumenta de una manera dependiente de la dosis y es máximo a alrededor de 1 μ M, donde la expresión de t-PA aumenta aproximadamente 10 veces.

Ejemplo de referencia 9

- 10 Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el CXD101

El CXD101 se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se tratan con 1 nM-10 μ M de CXD101 (Celleron Therapeutics, Oxon, RU) durante 24 h.

- 15 Ya se observa un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 10 nM de CXD101. El efecto sobre la expresión de t-PA aumenta de una manera dependiente de la dosis y es máximo a alrededor de 3 μ M, donde la expresión de t-PA aumenta aproximadamente 10 veces.

Ejemplo de referencia 10

- 20 Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el Belinostat

- 25 Los presentes inventores han demostrado previamente que las citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, TNF-alfa e IL-1 b, suprimen la producción de t-PA en las células endoteliales. Desean determinar la capacidad del Belinostat para invertir tal respuesta del t-PA suprimida por TNF-alfa en las células HUVEC.

- 30 Se prepararon y cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) como se describe en el Ejemplo 1. Las HUVEC confluentes se expusieron a bajas concentraciones de TNF-alfa (0,1 ng/ml) (Sigma-Aldrich) durante 24 h. A continuación, se reemplazó el medio por EGM-2 nuevo que contenía TNF-alfa y bajas concentraciones de Belinostat (de 10 nM a 300 nM) y se incubó durante 24 h. Tras 24 h, se recogieron las células y los medios acondicionados. Se preparó ARN total, y se cuantificó el ARN y la proteína secretada como en el Ejemplo 1. La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto podría invertirse parcialmente con tan solo 50 nM y normalizarse completamente con 200 nM de Belinostat (Figura 2).

- 35 Ejemplo de referencia 11

Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el Vorinostat

- 40 El Vorinostat se estudió según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Tras una estimulación inicial con TNF de 24 h, las células se trataron con Vorinostat de 10 nM a 300 nM durante 24 h.

- 45 La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto podría invertirse parcialmente con tan solo 50 nM y normalizarse completamente con 300 nM de Vorinostat (Figura 2).

Ejemplo de referencia 12

Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el Givinostat

- 50 El Givinostat se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Tras una estimulación inicial con TNF de 24 h, las células se tratan con Givinostat de 10 nM a 300 nM durante 24 h. La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto se invierte parcialmente con tan solo 30 nM y se normaliza completamente con 100 nM de Givinostat.

- 55 Ejemplo de referencia 13

Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el Panobinostat

- 60 El Panobinostat se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Tras una estimulación inicial con TNF de 24 h, las células se tratan con Panobinostat de 1 nM a 300 nM durante 24 h. La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto se invierte parcialmente con tan solo 1 nM y se normaliza completamente con 5 nM de Panobinostat.

Ejemplo de referencia 14

- 65 Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el PCI-24781

El PCI-24781 se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Tras una estimulación inicial con TNF de 24 h, las células se tratan con PCI-24781 de 10 nM a 300 nM durante 24 h.

- 5 La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto se invierte parcialmente con tan solo 10 nM y se normaliza completamente con 200 nM de PCI-24781.

Ejemplo de referencia 15

- 10 Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el JNJ-26481585

El JNJ-26481585 se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Tras una estimulación inicial con TNF de 24 h, las células se tratan con JNJ-26481585 de 1 nM a 300 nM durante 24 h.

- 15 La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto se invierte parcialmente con tan solo 1 nM y se normaliza completamente con 5 nM de JNJ-26481585.

- 20 Ejemplo de referencia 16

Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el Mocetinostat

- 25 El Mocetinostat se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Tras una estimulación inicial con TNF de 24 h, las células se tratan con Mocetinostat de 10 nM a 300 nM durante 24 h. La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto se invierte parcialmente con tan solo 10 nM y se normaliza completamente con 300 nM de Mocetinostat.

Ejemplo de referencia 17

- 30 Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el SB939

El SB939 se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Tras una estimulación inicial con TNF de 24 h, las células se tratan con SB939 de 10 nM a 300 nM durante 24 h.

- 35 La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto se invierte parcialmente con tan solo 10 nM y se normaliza completamente con 300 nM de SB939.

- 40 Ejemplo de referencia 18

Supresión inflamatoria contrarrestada de t-PA con el CXD101

- 45 El CXD101 se estudia según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Tras una estimulación inicial con TNF de 24 h, las células se tratan con CXD101 de 10 nM a 300 nM durante 24 h.

La estimulación prolongada (48 h) con 0,1 ng/ml de TNF-alfa provocó una supresión significativa del doble de la producción de t-PA. Esto se invierte parcialmente con tan solo 10 nM y se normaliza completamente con 300 nM de CXD101.

- 50 Ejemplo de referencia 19

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del Vorinostat sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

- 55 Se realiza un estudio de prueba de concepto del criterio de valoración intermedio en pacientes con enfermedad aterosclerótica investigados antes y después del tratamiento con Vorinostat.

El estudio comprende 16 pacientes con angina de pecho estable. Se investiga a los pacientes antes y después del tratamiento oral con 10 mg de Vorinostat (Zolinza®, Merck & Co., Inc, NJ, EE. UU.) al día durante 2 semanas. El estudio tiene un diseño cruzado aleatorizado, y la capacidad de liberación de t-PA se investiga antes y después del tratamiento, actuando cada individuo como su propio control.

- 60 La capacidad de liberación de t-PA se investiga en el modelo de perfusión en el antebrazo desarrollado por los presentes inventores, que es el único método que permite una medición directa de la liberación local de t-PA del endotelio (Hrafnkelsdottir, T., *et al.*, *Lancet* **352**, 1597-1598(1998), Wall, U., *et al.*, *Blood* **91**, 529-537 (1998)). Dado que el t-PA tiene un aclaramiento hepático rápido, es imposible inferir las velocidades de liberación

endotelial a partir de los niveles en plasma obtenidos de muestras venosas convencionales. Sin embargo, con el modelo invasivo, se calculan las velocidades netas de liberación de t-PA en el antebrazo a partir de gradientes de concentración arteriovenosa de t-PA tras la corrección del flujo plasmático del antebrazo. Se inducen respuestas de liberación aguda de t-PA mediante infusiones intraarteriales de Sustancia P (Bachem, Bubendorf, Suiza), y se usa el perfil de cantidad y de secreción de proteína como una medida de la capacidad de liberación de t-PA.

La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con Vorinostat muestra que la cantidad total de área bajo la curva (AUC, *Area Under the Curve*) de t-PA liberado aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio demuestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación tras el tratamiento a corto plazo con Vorinostat.

Ejemplo de referencia 20

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del Belinostat sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

El Belinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 19. Se tratan los pacientes con 65 mg de Belinostat (TopoTarget, Copenhagen, Dinamarca) al día durante 2 semanas.

La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con Belinostat muestra que la cantidad total de t-PA liberado (AUC) aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio muestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación tras el tratamiento a corto plazo con Belinostat.

Ejemplo de referencia 21

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del Givinostat sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

El Givinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 19. Se tratan los pacientes con 2 mg de Givinostat (Italfarmaco, Milán, Italia) al día durante 2 semanas.

La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con Givinostat muestra que la cantidad total de t-PA liberado (AUC) aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio muestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación tras el tratamiento a corto plazo con Givinostat.

Ejemplo de referencia 22

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del Panobinostat sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

El Panobinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 19. Se tratan los pacientes con 0,5 mg de Panobinostat (Novartis, Cambridge, MA, EE. UU.) al día durante 2 semanas.

La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con Panobinostat muestra que la cantidad total de t-PA liberado (AUC) aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio demuestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación después del tratamiento con corto plazo con Panobinostat.

Ejemplo de referencia 23

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del PCI-24781 sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

El PCI-24781 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 19. Se tratan los pacientes con 2 mg de PCI-24781 (Pharmacyclics, Sunnyvale, CA, EE. UU.) al día durante 2 semanas. La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con PCI-24781 muestra que la cantidad total de t-PA liberado (AUC) aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio demuestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación después del tratamiento con corto plazo con PCI-24781.

Ejemplo de referencia 24

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del JNJ-26481585 sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

El JNJ-26481585 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 19. Se tratan los pacientes con 0,2 mg de JNJ-26481585 (Johnson&Johnson Pharmaceutical Research and Development, La Jolla, CA, EE. UU.) al día durante 2 semanas.

- 5 La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con JNJ-26481585 muestra que la cantidad total de t-PA liberado (AUC) aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio demuestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación después del tratamiento con corto plazo con JNJ-26481585.

10 Ejemplo de referencia 25

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del Mocetinostat sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

- 15 El Mocetinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 19. Se tratan los pacientes con 2 mg de Mocetinostat (Methylgene, Montreal, Canadá) al día durante 2 semanas. La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con Mocetinostat muestra que la cantidad total de t-PA liberado (AUC) aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio demuestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación después del tratamiento con corto plazo con Mocetinostat.

20 Ejemplo de referencia 26

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del SB939 sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

- 25 El SB939 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 19. Se tratan los pacientes con 0,4 mg de SB939 (S*Bio, Singapur) al día durante 2 semanas.

- 30 La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con SB939 muestra que la cantidad total de t-PA liberado (AUC) aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio demuestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación después del tratamiento con corto plazo con SB939.

Ejemplo de referencia 27

- 35 Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del CXD101 sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

El CXD101 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 19. Se tratan los pacientes con 10 mg de CXD101 (Celleron Therapeutics, Oxon, RU) al día durante 2 semanas.

- 40 La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con CXD101 muestra que la cantidad total de t-PA liberado (AUC) aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio demuestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación después del tratamiento con corto plazo con CXD101.

45 Ejemplo 28

Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando Vorinostat

- 50 El primer estudio de resultados clínicos se realiza en pacientes de alto riesgo que han experimentado un episodio cardiovascular aterotrombótico importante reciente (infarto de miocardio o ictus isquémico) para investigar el efecto preventivo del tratamiento con Vorinostat sobre el riesgo de padecer episodios recurrentes. El riesgo anual de padecer un episodio aterotrombótico recurrente en la población investigada se estima en aproximadamente un 7 %. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 10 mg al día de Vorinostat o de placebo, además del tratamiento convencional óptimo. La tasa de episodios se controla mediante el análisis estadístico de Kaplan-Meier. El criterio de valoración principal de la eficacia es la medida combinada de mortalidad, infarto de miocardio no mortal o ictus isquémico. El estudio se basa en episodios hasta un total de 180 episodios en el grupo de placebo.

- 60 El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con Vorinostat reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Vorinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 29

- 65 Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando Belinostat

El Belinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 28. Los pacientes se asignan al azar para recibir 65 mg al día de Belinostat o de placebo.

- 5 El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con Belinostat reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Belinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

10 Ejemplo de referencia 30

Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando Givinostat

- 15 El Givinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 28. Los pacientes se asignan al azar para recibir 2 mg al día de Givinostat o de placebo.

El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con Givinostat reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Givinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

20 Ejemplo de referencia 31

- 25 Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando Panobinostat

El Panobinostat se estudió según el mismo protocolo que en el Ejemplo 28. Los pacientes se asignan al azar para recibir 0,5 mg al día de Panobinostat o de placebo.

- 30 El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con Panobinostat reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Panobinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

35 Ejemplo de referencia 32

Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando PCI-24781

- 40 El PCI-24781 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 28. Los pacientes se asignan al azar para recibir 2 mg al día de PCI-24781 o de placebo.

45 El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con PCI-24781 reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de PCI-24781 para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 33

- 50 Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando JNJ-26481585

El JNJ-26481585 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 28. Los pacientes se asignan al azar para recibir 0,2 mg al día de JNJ-26481585 o de placebo.

- 55 El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con JNJ-26481585 reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de JNJ-26481585 para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

60 Ejemplo de referencia 34

Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando Mocetinostat

65

El Mocetinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 28. Los pacientes se asignan al azar para recibir 2 mg al día de Mocetinostat o de placebo.

El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con Mocetinostat reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Mocetinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 35

Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando SB939

El SB939 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 28. Los pacientes se asignan al azar para recibir 0,4 mg al día de SB939 o de placebo.

El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con SB939 reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de SB939 para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 36

Estudio de resultados clínicos en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes utilizando CXD101

El CXD101 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 28. Los pacientes se asignan al azar para recibir 10 mg al día de CXD101 o de placebo.

El estudio muestra que el tratamiento a largo plazo con CXD101 reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de CXD101 para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 37

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando Vorinostat

El segundo estudio de resultados clínicos se realiza en pacientes con síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST. Este estudio es un ensayo aleatorizado, con doble ocultación, en el que participan aproximadamente 7.000 pacientes dentro de las 72 horas posteriores a la presentación bien con angina inestable o infarto de miocardio sin elevación del segmento ST que no están destinados a someterse a procedimientos de revascularización para su episodio índice. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con Vorinostat o placebo durante una mediana de duración de 18 meses, además de la terapia médica convencional. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de Vorinostat seguida de un tratamiento oral con 10 mg al día de Vorinostat. El criterio de valoración principal combinado de la eficacia será el tiempo transcurrido hasta la primera aparición de muerte cardiovascular, de un nuevo infarto de miocardio no mortal, de ictus no mortal o de isquemia miocárdica grave que requiera una revascularización urgente. El estudio muestra que el Vorinostat puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Vorinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 38

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando Belinostat

El Belinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 37. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con Belinostat o con placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de Belinostat seguida de un tratamiento oral con 65 mg al día de Belinostat.

El tratamiento muestra que el Belinostat puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Belinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 39

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando Givinostat

El Givinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 37. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con Givinostat o con placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de Givinostat seguida de un tratamiento oral con 2 mg al día de Givinostat.

El tratamiento muestra que el Givinostat puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Givinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 40

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando Panobinostat

El Panobinostat se estudió según el mismo protocolo que en el Ejemplo 37. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con Panobinostat o con placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de Panobinostat seguida de un tratamiento oral con 0,5 mg al día de Panobinostat.

El tratamiento muestra que el Panobinostat puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Panobinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 41

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando PCI-24741

El PCI-24781 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 37. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con PCI-24781 o con placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de PCI-24781 seguida de un tratamiento oral con 2 mg al día de PCI-24781.

El tratamiento muestra que el PCI-24781 puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de PCI-24781 para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo 42

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando JNJ-26481585

El JNJ-26481585 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 37. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con JNJ-26481585 o con placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de JNJ-26481585 seguida de un tratamiento oral con 0,2 mg al día de JNJ-26481585.

El tratamiento muestra que el JNJ-26481585 puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de JNJ-26481585 para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 43

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando Mocetinostat

El Mocetinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 37. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con Mocetinostat o con placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de Mocetinostat seguida de un tratamiento oral con 2 mg al día de Mocetinostat.

El tratamiento muestra que el Mocetinostat puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de Mocetinostat para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 44

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando SB939

El SB939 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 37. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con SB939 o con placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de SB939 seguida de un tratamiento oral con 0,4 mg al día de SB939.

El tratamiento muestra que el SB939 puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de SB939 para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 45

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando CXD101

El CXD101 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 37. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con 10 mg al día de CXD101 o de placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de CXD101 seguida de un tratamiento oral con 10 mg al día de CXD101.

El tratamiento muestra que el CXD101 puede reducir eficazmente el riesgo de futuros episodios cardiovasculares importantes. El riesgo se reduce en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de CXD101 para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 46

Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando Vorinostat

El tercer estudio de resultados investiga el efecto preventivo primario del Vorinostat en sujetos sanos con un mayor riesgo de padecer episodios cardiovasculares aterotrombóticos, es decir, tabaquismo, niveles anormales de lípidos en sangre, hipertensión, diabetes, obesidad abdominal, inflamación de bajo grado y/o aterosclerosis. Los sujetos se asignan al azar a un tratamiento oral, con doble ocultación, con 10 mg al día de Vorinostat o de placebo. Se controla anualmente el riesgo de padecer un episodio aterotrombótico primario. El criterio de valoración principal combinado de la eficacia es la mortalidad o el infarto de miocardio no mortal o el ictus isquémico. El estudio se basa en episodios hasta un total de 180 episodios en el grupo de placebo.

En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el Vorinostat puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el Vorinostat es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 47

Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando Belinostat

El Belinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 46. Los pacientes se asignan al azar para recibir 65 mg al día de Belinostat o de placebo.

En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el Belinostat puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el Belinostat es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 48

Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando Givinostat

5 El Givinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 46. Los pacientes se asignan al azar para recibir 2 mg al día de Givinostat o de placebo.

10 En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el Givinostat puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el Givinostat es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 49

Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando Panobinostat

15 El Panobinostat se estudió según el mismo protocolo que en el Ejemplo 46.

Los pacientes se asignan al azar para recibir 0,5 mg al día de Panobinostat o de placebo.

20 En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el Panobinostat puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el Panobinostat es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 50

25 Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando PCI-24781

El PCI-24781 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 46. Los pacientes se asignan al azar para recibir 2 mg al día de PCI-24781 o de placebo.

30 En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el PCI-24781 puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el PCI-24781 es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 51

35 Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando JNJ-26481585

El JNJ-26481585 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 46. Los pacientes se asignan al azar para recibir 0,2 mg al día de JNJ-26481585 o de placebo.

40 En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el JNJ-26481585 puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el JNJ-26481585 es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

45 Ejemplo de referencia 52

Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando Mocetinostat

50 El Mocetinostat se estudia según el protocolo del Ejemplo 46. Los pacientes se asignan al azar para recibir 2 mg al día de Mocetinostat o de placebo.

55 En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el Mocetinostat puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el Mocetinostat es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 53

Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando SB939

60 El SB939 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 46. Los pacientes se asignan al azar para recibir 0,4 mg al día de SB939 o de placebo.

65 En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el SB939 puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el SB939 es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 54

Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando CXD101

- 5 El CXD101 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 46. Los pacientes se asignan al azar para recibir 10 mg al día de CXD101 o de placebo.

10 En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el CXD101 puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el CXD101 es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo de referencia 55

- 15 Estudio de resultados clínicos del Vorinostat en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

Este estudio se realiza en pacientes de alto riesgo que han experimentado una trombosis venosa profunda reciente o una embolia pulmonar estable circulatoria reciente para investigar el efecto preventivo del tratamiento con Vorinostat sobre el riesgo de padecer episodios tromboticos venosos recurrentes. Se incluirá a los pacientes con diagnóstico de cáncer que presenten un primer episodio de trombosis venosa profunda proximal sin embolia pulmonar inestable. Los pacientes recibirán tratamiento convencional (es decir, warfarina durante 3-6 meses) y, posteriormente, se incluirán en el estudio. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 10 mg al día de Vorinostat o de placebo, además del tratamiento convencional óptimo. La tasa de episodios se controla mediante el análisis estadístico de Kaplan-Meier. El criterio de valoración principal de la eficacia es la medida combinada de la mortalidad o la trombosis venosa profunda recurrente o la embolia pulmonar. El estudio se basa en episodios hasta un total de 180 episodios en el grupo de placebo. El estudio muestra que el tratamiento con Vorinostat a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del Vorinostat para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

Ejemplo de referencia 56

- 35 Estudio de resultados clínicos del Belinostat en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

El Belinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 55. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 10 mg al día de Vorinostat o de placebo.

- 40 El estudio muestra que el tratamiento con Belinostat a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del Belinostat para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

Ejemplo de referencia 57

- 45 Estudio de resultados clínicos del Givinostat en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

50 El Givinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 55. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 2 mg al día de Givinostat o de placebo.

El estudio muestra que el tratamiento con Givinostat a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del Givinostat para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

Ejemplo de referencia 58

- 60 Estudio de resultados clínicos del Panobinostat en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

El Panobinostat se estudió según el mismo protocolo que en el Ejemplo 55. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 0,5 mg al día de Panobinostat o de placebo.

65 El estudio muestra que el tratamiento con Panobinostat a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del Panobinostat para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

Ejemplo de referencia 59

5 Estudio de resultados clínicos del PCI-24781 en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

El PCI-24781 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 55. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 2 mg al día de PCI-24781 o de placebo.

10 El estudio muestra que el tratamiento con PCI-24781 a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del PCI-24781 para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

15 Ejemplo de referencia 60

Estudio de resultados clínicos del JNJ-26481585 en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

20 El JNJ-26481585 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 55. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 0,2 mg al día de JNJ-26481585 o de placebo.

25 El estudio muestra que el tratamiento con JNJ-26481585 a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del JNJ-26481585 para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

Ejemplo de referencia 61

30 Estudio de resultados clínicos del Mocetinostat en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

35 El Mocetinostat se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 55. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 2 mg al día de Mocetinostat o de placebo.

El estudio muestra que el tratamiento con Mocetinostat a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del Mocetinostat para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

40 Ejemplo de referencia 62

Estudio de resultados clínicos del SB939 en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

45 El SB939 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 55. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 0,4 mg al día de SB939 o de placebo.

50 El estudio muestra que el tratamiento con SB939 a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del SB939 para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

Ejemplo de referencia 63

55 Estudio de resultados clínicos del CXD101 en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

60 El CXD101 se estudia según el mismo protocolo del Ejemplo 55. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 10 mg al día de CXD101 o de placebo.

El estudio muestra que el tratamiento con CXD101 a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del CXD101 para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

65 Ejemplo 64

Para determinar si la sustancia X es un HDACi interesante, se realiza un cribado para determinar la actividad hacia un panel de enzimas HDAC humanas recombinantes (HDAC1-11) en colaboración con Reaction Biology Corporation. En estos estudios se genera una serie de diluciones del compuesto X con diez etapas de diluciones triples comenzando a 10 μ M (por ejemplo, 10 μ M, 3 μ M, 1 μ M, 300 nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM) y esto se representa en una curva de respuesta a la dosis para producir el valor de CI_{50} .

Ejemplo 65

En la siguiente etapa (siguiendo el procedimiento del Ejemplo 64), se pueden probar sustancias interesantes para determinar la actividad inhibidora de HDAC en células endoteliales de vena umbilical humana cultivadas (HUVEC) a tres dosis: 10 x CI_{50} , 1 x CI_{50} y 0,1 x CI_{50} . Si no se ha obtenido un valor de CI_{50} , se puede utilizar la serie de diluciones del ejemplo anterior en lugar de 10 x, 1 x y 0,1 x CI_{50} para el análisis. Las lecturas son citotoxicidad (ensayo de LDH Promega), actividad de HDAC (kit de ensayo de actividad de HDAC de Active Motif), aumento de la acetilación de las histonas (medida mediante transferencia Western con anticuerpos de histona H3/H4 panacetilada) y efecto sobre los niveles de ARNm de t-PA (PCR en tiempo real).

Ejemplo de referencia 66

Estudio de aumento progresivo de la dosis de Vorinostat. Se realiza un estudio de aumento progresivo de la dosis de Vorinostat comenzando el tratamiento oral a 10 mg/día en la primera cohorte (5 sujetos por cohorte) y a continuación aumentando en incrementos del 100 % (10, 20, 40,... mg/día) hasta que se observa la concentración deseada en plasma de 100 nM. Las muestras de sangre venosa se recogen en los puntos de tiempo de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 y 48 h después de la dosificación. La concentración de Vorinostat en las muestras de sangre se determina utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) (Kelly W. K. *et al.*, (2005) "Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer". *J Clin Oncol* 23: 3923-3931).

Ejemplo de referencia 67

Estudio de aumento progresivo de la dosis de Belinostat. Se realiza un estudio de aumento progresivo de la dosis de Belinostat comenzando el tratamiento oral a 50 mg/día en la primera cohorte (5 sujetos por cohorte) y a continuación aumentando en incrementos del 100 % (50, 100, 200, 400,... mg/día) hasta que se observa la concentración deseada en plasma de 200 nM. Las muestras de sangre venosa se recogen en los puntos de tiempo de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 y 48 h después de la dosificación. La concentración de Belinostat en las muestras de sangre se determina utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS, *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*) (Steele N. L., Plumb J. A., Vidal L., Tjornelund J., Knoblauch P., *et al.*, (2008) "A phase 1 pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced solid tumors". *Clin Cancer Res* 14: 804-810).

Ejemplo de referencia 68

Estudio de aumento progresivo de la dosis de Givinostat. Se realiza un estudio de aumento progresivo de la dosis de Givinostat comenzando el tratamiento oral a 5 mg/día en la primera cohorte (5 sujetos por cohorte) y a continuación aumentando en incrementos del 100 % (5, 10, 20, 40,... mg/día) hasta que se observa la concentración deseada en plasma de 50 nM. Las muestras de sangre venosa se recogen en los puntos de tiempo de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 y 48 h después de la dosificación. La concentración de Givinostat en las muestras de sangre se determina utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Furlan A., *et al.*, (2011) "Pharmacokinetics, Safety and Inducible Cytokine Responses during a Phase 1 Trial of the Oral Histone Deacetylase Inhibitor ITF2357 (Givinostat)". *Mol Med* 17: 353-362).

Se realiza un estudio de aumento progresivo de la dosis de Givinostat comenzando a 1 mg/día en la primera cohorte (5 sujetos por cohorte) y a continuación aumentando en incrementos del 100 % (1, 2, 4, 8, 16,... mg/día) hasta que se observa la concentración deseada en plasma de 25 nM. Las muestras de sangre venosa se recogen en los puntos de tiempo de 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 y 48 h después de la dosificación. La concentración de Givinostat en las muestras de sangre se determina utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Ejemplo de referencia 69

Estudio de aumento progresivo de la dosis de Panobinostat. Se realiza un estudio de aumento progresivo de la dosis de Panobinostat comenzando el tratamiento oral a 0,5 mg/día en la primera cohorte (5 sujetos por cohorte) y a continuación aumentando en incrementos del 100 % (0,5, 1, 2, 4, 8,... mg/día) hasta que se observa la concentración deseada en plasma de 5 nM. Las muestras de sangre venosa se recogen en los puntos de tiempo de 0, 0,25, 0,5, 1,

2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 y 48 h después de la dosificación. La concentración de Panobinostat en las muestras de sangre se determina utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Ejemplo 70

Efecto del VPA sobre la supresión de t-PA inducida por la inflamación *in vitro*

Los presentes inventores han demostrado previamente que las citoquinas proinflamatorias, por ejemplo, TNF-alfa e IL-1b, suprimen la producción de t-PA en las células endoteliales. Después, investigaron si el VPA podría invertir una respuesta de t-PA suprimida por TNF-alfa. Se prepararon células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) mediante tratamiento con collagenasa de cordones umbilicales recién extraídos (Jaffe, E. A., *et al.*, *J Clin Invest* **52**, 2745-2756 (1973)) obtenidos en la sala de maternidad del hospital de la Universidad de Sahlgrenska, Gothenburg, Suecia. Las células se cultivaron en medio EGM-2 (Lonza, Basilea, Suiza) y todos los experimentos se realizaron en el pase 1 de subcultivo. Las HUVEC confluentes se trataron previamente con 0,1 ng/ml de TNF-alfa recombinante humano (Sigma-Aldrich) durante 24 horas y a continuación se expusieron a concentraciones óptimas de VPA en medio completo. Tras la incubación con VPA y TNF-alfa durante 24 horas más, se recogieron las células y el medio acondicionado.

Se preparó ARN total utilizando el kit RNeasy Mini RNA (Qiagen, Hilden, Alemania) y se retiró el ADN genómico utilizando un conjunto de ADNasa I libre de ARNasa (Qiagen). Los niveles de ARNm de t-PA se analizaron con RT-PCR en tiempo real, realizada en un sistema de PCR en tiempo real rápido 7500 de Applied Biosystems utilizando reactivos de ADNC y Taqman obtenidos de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU.). Se usó hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT, número de ensayo Hs99999909_m1, Applied Biosystems) como patrón interno endógeno.

Se sabe que las células endoteliales en cultivo secretan constitutivamente la mayoría del t-PA sintetizado, lo que hace que los medios acondicionados sean una fuente adecuada para la cuantificación de la proteína t-PA. Se recogió medio acondicionado de cultivos celulares, se centrifugó (10.000 x g, 10 min, 4 °C) para retirar los restos celulares, se transfirió a tubos nuevos y se almacenó a -70 °C. Las concentraciones de antígeno t-PA en medios acondicionados se determinaron utilizando el ELISA de antígeno t-PA TriniLize disponible en el mercado (Trinity Biotech, Bray, Irlanda) según el protocolo del fabricante.

0,1 ng/ml de TNF-alfa suprimió 2 veces la producción de ARNm de t-PA. Las bajas concentraciones de VPA invirtieron esta supresión y se logró la normalización completa con 0,35 mM de la sustancia (Figura 1). Los resultados correspondientes también se observan a nivel de proteína t-PA secretada.

Ejemplo 71

Desplazamiento de la curva de respuesta a la dosis de VPA en presencia de TNF-alfa

En un intento de imitar las condiciones potencialmente altamente inflamadas en el microambiente local que rodea una placa aterosclerótica, se expusieron células endoteliales a una alta concentración (10 ng/ml) de TNF-alfa durante 24 horas y a continuación se añadió VPA durante 24 horas más. Se trataron las células y se preparó ARNm como se describe en el Ejemplo 1.

Al comparar las curvas de respuesta a la dosis de VPA para las células de control y las células tratadas con TNF-alfa, se observó sorprendentemente una diferencia en el patrón de respuesta al VPA en ausencia y presencia de TNF. En las células de control, la eficacia máxima del VPA para inducir t-PA fue aproximadamente 10 veces mayor. En las células tratadas con TNF-alfa, por otro lado, la eficacia máxima se aumentó enormemente hasta aproximadamente 50 veces más (Figura 2), demostrando que dosis inferiores a lo esperado de VPA pueden mejorar o normalizar una función fibrinolítica suprimida por la inflamación.

Ejemplo 72

Estudio del criterio de valoración intermedio: Efectos del VPA sobre la liberación de t-PA *in vivo* en el ser humano

Se realiza un estudio de prueba de concepto de criterio de valoración intermedio en pacientes con enfermedad aterosclerótica y signos de una afección inflamatoria de bajo grado investigados antes y después del tratamiento con ácido valproico.

El estudio comprende 16 pacientes con angina de pecho estable y niveles en suero elevados de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) > 3 mg/l. Se investiga a los pacientes antes y después del tratamiento oral con 100 mg de ácido valproico dos veces al día durante 2 semanas. El estudio tiene un diseño cruzado aleatorizado, y la capacidad de liberación de t-PA se investiga antes y después del tratamiento, actuando cada individuo como su propio control.

La capacidad de liberación de t-PA se investiga en el modelo de perfusión en el antebrazo desarrollado por los presentes inventores, que es el único método que permite una medición directa de la liberación local de t-PA del endotelio (Hrafnkelsdottir, T., *et al.*, *Lancet* **352**, 1597-1598 (1998), Wall, U., *et al.*, *Blood* **91**, 529-537 (1998). Dado que el t-PA tiene un aclaramiento hepático rápido, es imposible inferir las velocidades de liberación endotelial a partir de los niveles en plasma obtenidos de muestras venosas convencionales. Sin embargo, con el modelo invasivo, se calculan las velocidades netas de liberación de t-PA en el antebrazo a partir de gradientes de concentración arteriovenosa de t-PA tras la corrección del flujo plasmático del antebrazo. Se inducen respuestas de liberación aguda de t-PA mediante infusiones intraarteriales de Sustancia P (Bachem, Bubendorf, Suiza), y se usa el perfil de cantidad y de secreción de proteína como una medida de la capacidad de liberación de t-PA.

La comparación de los perfiles de secreción de t-PA antes y después del tratamiento con VPA muestra que la cantidad total de t-PA liberado aumenta en aproximadamente un 50 %. Este estudio demuestra que hay una mejora significativa de la cantidad acumulada de t-PA liberada a través de la vasculatura del antebrazo en respuesta a la estimulación después del tratamiento a corto plazo con una dosis baja de VPA en pacientes con inflamación sistémica de bajo grado.

Ejemplo 73

Estudio de resultados clínicos utilizando VPA en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios recurrentes El primer estudio de resultados clínicos se realiza en pacientes de alto riesgo que han experimentado un episodio cardiovascular aterotrombótico importante reciente (infarto de miocardio o ictus isquémico) para investigar el efecto preventivo del tratamiento con VPA sobre el riesgo de padecer episodios recurrentes. Los signos de una afección inflamatoria de bajo grado son un criterio de inclusión, definido como un nivel en suero elevado de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) > 3 mg/l. El riesgo anual de padecer un episodio aterotrombótico recurrente en la población investigada se estima en aproximadamente un 7 %. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 100 mg de ácido valproico o placebo dos veces al día, además del tratamiento convencional óptimo. La tasa de episodios se controla mediante el análisis estadístico de Kaplan-Meier. El criterio de valoración principal de la eficacia es la medida combinada de mortalidad, infarto de miocardio no mortal o ictus isquémico. El estudio se basa en episodios hasta un total de 180 episodios en el grupo de placebo. El estudio muestra que el tratamiento con VPA a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional, es decir, reduce la tasa absoluta anual de episodios hasta aproximadamente un 5 %. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de VPA para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo 74

Estudio de resultados clínicos en la angina inestable/el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST utilizando VPA

El segundo estudio de resultados clínicos se realiza en pacientes con síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST. Este estudio es un ensayo aleatorizado, con doble ocultación, en el que participan 7000 pacientes dentro de las 72 horas posteriores a la presentación bien con angina inestable o infarto de miocardio sin elevación del segmento ST que no están destinados a someterse a procedimientos de revascularización para su episodio índice. Los pacientes se asignan al azar al tratamiento con ácido valproico o con placebo durante una mediana de duración de 18 meses. El tratamiento hospitalario se inicia como una infusión intravenosa de ácido valproico seguida del tratamiento oral con 100 mg de ácido valproico dos veces al día. El criterio de valoración principal combinado de la eficacia es el tiempo transcurrido hasta la primera aparición de muerte cardiovascular, infarto de miocardio o ictus. El estudio muestra que el tratamiento con VPA reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso de VPA para la prevención secundaria de episodios cardiovasculares en pacientes con arteriopatía coronaria inestable.

Ejemplo 75

Estudio de resultados clínicos preventivo primario utilizando VPA

El tercer estudio de resultados investiga el efecto preventivo primario del VPA en sujetos sanos con un mayor riesgo de padecer episodios cardiovasculares aterotrombóticos debido a una inflamación de bajo grado. La activación inflamatoria se define clínicamente como un nivel en suero elevado de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) > 3 mg/l. Los sujetos se asignan al azar a un tratamiento oral con doble ocultación con 100 mg de ácido valproico o placebo dos veces al día. Se controla anualmente el riesgo de padecer un episodio aterotrombótico primario. El criterio de valoración principal combinado de la eficacia es la mortalidad o el infarto de miocardio no mortal o el ictus isquémico. El estudio se basa en episodios hasta un total de 180 episodios en el grupo de placebo. En esta población, la tasa anual de episodios se reduce en un 30 %, del 1,5 al 1 %. El efecto del tratamiento muestra que el VPA puede reducir el riesgo de futuros episodios cardiovasculares en sujetos sanos de alto riesgo, y que el VPA es adecuado para la prevención primaria de episodios cardiovasculares.

Ejemplo 76

Estudio de resultados clínicos utilizando VPA en pacientes de alto riesgo para la prevención de episodios tromboembólicos venosos recurrentes

Este estudio se realiza en pacientes de alto riesgo que han experimentado una trombosis venosa profunda reciente o una embolia pulmonar estable circulatoria reciente para investigar el efecto preventivo del tratamiento con VPA sobre el riesgo de padecer episodios trombóticos venosos recurrentes. Se incluyen los pacientes con diagnóstico de cáncer e inflamación de bajo grado que presenten un primer episodio de trombosis venosa profunda proximal sin embolia pulmonar inestable. Los pacientes reciben tratamiento convencional (es decir, warfarina durante 3-6 meses) y, posteriormente, se incluyen en el estudio. Los pacientes se asignan al azar en un diseño de estudio paralelo para recibir tratamiento oral con doble ocultación con 100 mg de ácido valproico o placebo dos veces al día, además del tratamiento convencional óptimo. La tasa de episodios se controla mediante el análisis estadístico de Kaplan-Meier. El criterio de valoración principal de la eficacia es la medida combinada de la mortalidad o la trombosis venosa profunda recurrente o la embolia pulmonar. El estudio se basa en episodios hasta un total de 180 episodios en el grupo de placebo. El estudio muestra que el tratamiento con VPA a largo plazo según la invención de la presente memoria reduce este riesgo en aproximadamente un 30 % además del de la terapia convencional. Por lo tanto, este estudio confirma la eficacia clínica y la viabilidad del uso del VPA para la prevención secundaria de la tromboembolia venosa.

Ejemplo de referencia 77

Se tratan HUVEC con diferentes concentraciones de hidroxamatos de primera generación (TSA), hidroxamatos de segunda generación (Givinostat, Vorinostat, Belinostat, Panobinostat, SB939, PCI24781), benzamidas (Mocetinostat, Entinostat) o ácidos grasos de cadena corta (SCFA, Butirato, Fenilbutirato) durante 24 h y se midió el ARNm de t-PA. Se determinaron las dosis que producían un aumento del 100 % del ARNm de t-PA (C100) y se compararon con la concentración máxima (C_{máx}) en plasma alcanzada cuando se administra la dosis máxima tolerada (DMT) de cada sustancia a los seres humanos, dividiendo el C100 con la C_{máx}. Para el hidroxamato TSA de primera generación, esta comparación es imposible, porque no es adecuado para su uso en seres humanos, por lo que no se realiza dicha comparación. Para los hidroxamatos de segunda generación, los presentes inventores encontraron que esta relación es significativamente inferior a la de la clase de benzamida y ácidos grasos de cadena corta, lo que sorprendentemente indica que los hidroxamatos de segunda generación estimulan la expresión de t-PA a concentraciones relativamente inferiores en comparación con las otras clases probadas (véase la Tabla A que se presenta a continuación). En la siguiente tabla, los valores de DMT y C_{máx} son de las siguientes referencias (mencionadas en el mismo orden que en la tabla): Steele, N. L. *et al.*, *Cancer Chemother Pharmacol* 67(6):1273-9 (2011), Kelly, K. K. *et al.*, *J Clin Oncol* 23:3923-3931 (2005), Furlan, A. *et al.*, *Mol Med* 17(5-6) 353-362 (2011), Fukutomi, A. *et al.*, *Invest New Drugs*, 12 de abril de 2011, Yong, W. P. *et al.*, *Ann Oncol* 22(11) 2516-22 (2011), García-Manero, G. *et al.*, *Blood* 112: 981-989 (2008), Ryan, Q. C. *et al.*, *J Clin Oncol* 23(17): 3912-3922 (2005), Edelman, M. J. *et al.*, *Cancer Chemother Pharmacol* 51: 439-444, <http://www.drugs.com/pro/buphenyl.html> *El butirato se administró en forma de profármaco tributirina.

HDACi	Clase	DMT	C _{máx} (ng/ml)	C _{máx} (μM)	C100 de tPA (μM)	C100/C _{máx}
Belinostat	Hidrox. de 2 ^a	1000 mg/m ²	~1400	4 μM	0,2	0,05
Vorinostat	Hidrox. de 2 ^a	200 mg dos veces al día	300	1,1 μM	0,1	0,09
Givinostat	Hidrox. de 2 ^a	200 mg	300	0,65 μM	0,05	0,08
Panobinostat	Hidrox. de 2 ^a	20 mg	20	0,06 μM	0,004	0,07
SB-939	Hidrox. de 2 ^a	80 mg	~400	1,1 μM	0,05	0,05
Mocetinostat	Benzamida	60 mg/m ²	200	0,5 μM	0,1	0,2
Entinostat	Benzamida	10 mg/m ²	45	0,12 μM	0,3	2,5
Butirato*	SCFA	200 mg/kg tres veces al día	0,1 mM	0,1 mM	1,0	
Fenilbutirato	SCFA	5 g	218.000	1,1 mM	1,3 mM	1,2

Tabla A

Ejemplo de referencia 78

Se trataron HUVEC con TNF-alfa (TNF-α) durante 1 hora y a continuación se añadieron concentraciones óptimas de las sustancias antiinflamatorias ácido acetilsalicílico (ASA, 1 mM) e ibuprofeno (IBU, 1 mM). También se añadió Givinostat a las células para comparar. Se recogieron las células y se analizaron los niveles de ARNm de t-PA según el Ejemplo 1. El TNF-α suprimió cinco veces la expresión de t-PA, y esto no fue contrarrestado ni por ASA ni por IBU. Por otro lado, el Givinostat no solo fue capaz de invertir completamente la supresión mediada por TNF, sino que, de hecho, provocó un

aumento de 9 veces de t-PA (Figura 13). Esto demuestra que el efecto sobre el t-PA del HDACi descrito en la presente solicitud no es el resultado de un efecto antiinflamatorio general, sino que sugiere un efecto mediado por una vía no inflamatoria.

5 Ejemplo de referencia 79

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el Givinostat

10 El Givinostat se estudió según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se trataron con 10 nM-10 µM de Givinostat durante 24 h.

Ya se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 30 nM de Givinostat (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.). El efecto sobre la expresión de t-PA aumentó de una manera dependiente de la dosis y alcanzó un máximo a 0,3 µM, donde la expresión de t-PA se aumentó 10 veces (Figura 7).

15 Ejemplo de referencia 80

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el Panobinostat

20 El Panobinostat se estudió según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se trataron con 1 nM-10 µM de Panobinostat (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

Ya se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 3 nM de Panobinostat. El efecto sobre la expresión de t-PA aumentó de una manera dependiente de la dosis y alcanzó un máximo a alrededor de 30 nM, donde la expresión de t-PA aumentó aproximadamente 10 veces (Figura 10).

Ejemplo de referencia 81

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el PCI-24781

30 El PCI-24781 se estudió según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se trataron con 3 nM-3 µM de PCI-24781 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h. Ya se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 100 nM de PCI-24781. El efecto sobre la expresión de t-PA aumentó de una manera dependiente de la dosis y alcanzó un máximo a alrededor de 1 µM, donde la expresión de t-PA aumentó aproximadamente 6 veces (Figura 12).

35 Ejemplo de referencia 82

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el JNJ-26481585

40 El JNJ-26481585 se estudió según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se trataron con 1 nM-1 µM de JNJ-26481585 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

Ya se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 3 nM de JNJ-26481585. El efecto sobre la expresión de t-PA aumentó de una manera dependiente de la dosis y alcanzó un máximo a alrededor de 30 nM, donde la expresión de t-PA aumentó aproximadamente 6 veces (Figura 8).

Ejemplo de referencia 83

Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el Mocetinostat

50 El Mocetinostat se estudió según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se trataron con 10 nM-10 µM de Mocetinostat (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

Ya se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 0,1 nM de Mocetinostat. El efecto sobre la expresión de t-PA aumenta de una manera dependiente de la dosis y alcanzó un máximo a alrededor de 3 µM, donde la expresión de t-PA aumentó aproximadamente 15 veces.

Ejemplo de referencia 84

60 Experimento de respuesta a la dosis *in vitro* para el SB939

El SB939 se estudió según el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Las células se trataron con 10 nM-10 µM de SB939 (Selleck Chemicals, Houston, TX, EE. UU.) durante 24 h.

Ya se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm de t-PA a 30 nM de SB939. El efecto sobre la expresión de t-PA aumentó de una manera dependiente de la dosis y alcanzó un máximo a alrededor de 1 μ M, donde la expresión de t-PA aumentó aproximadamente 10 veces (Figura 9).

REIVINDICACIONES

1. Ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en:
 - 5 (I) mejorar o normalizar la fibrinólisis endógena alterada por la inflamación local o sistémica; o
 - (II) tratar o prevenir una afección patológica asociada con la deposición excesiva de fibrina y/o la formación de trombos, en donde la afección patológica está causada totalmente o al menos en parte por un aumento de la deposición de fibrina y/o una reducción de la capacidad fibrinolítica debido a una inflamación local o sistémica,
- 10 en donde el ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una cantidad de entre 1 µg y 30 mg por kilogramo de peso corporal al día y en el intervalo de aproximadamente 50-1000 mg al día.
- 15 2. El compuesto para el uso según la reivindicación 1, en donde el ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en una cantidad que produce una concentración en plasma en el intervalo de aproximadamente 0,05-0,3 mM.
- 20 3. El compuesto para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:
 - (i) la mejora o normalización de la fibrinólisis endógena alterada por la inflamación local o sistémica es parte del tratamiento o la prevención de una enfermedad cardiovascular;
 - (ii) la afección patológica es una enfermedad cardiovascular.
- 25 4. El compuesto para el uso según la reivindicación 3, en donde la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en infarto de miocardio, angina de pecho estable, angina de pecho inestable, claudicación intermitente, ictus isquémico, ataque isquémico transitorio, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.
- 30 5. El compuesto para el uso según la reivindicación 4, en donde la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.
6. El compuesto para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cantidad de ácido valproico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrada produce una C_{máx} en el intervalo de aproximadamente 0,01-0,7 mM.

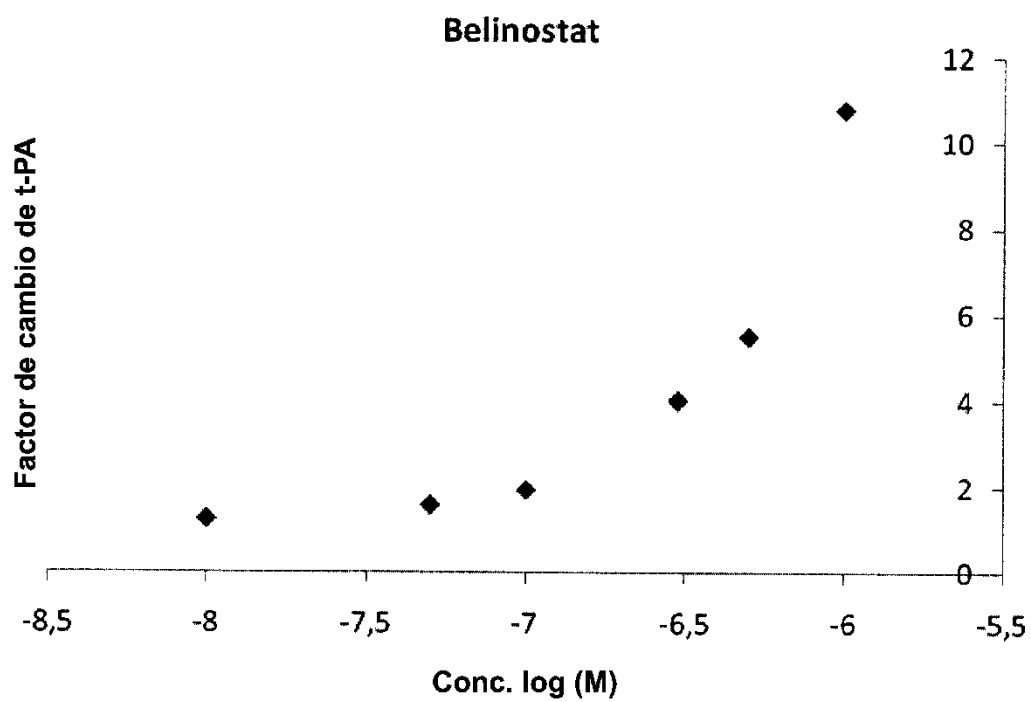


Figura 1A

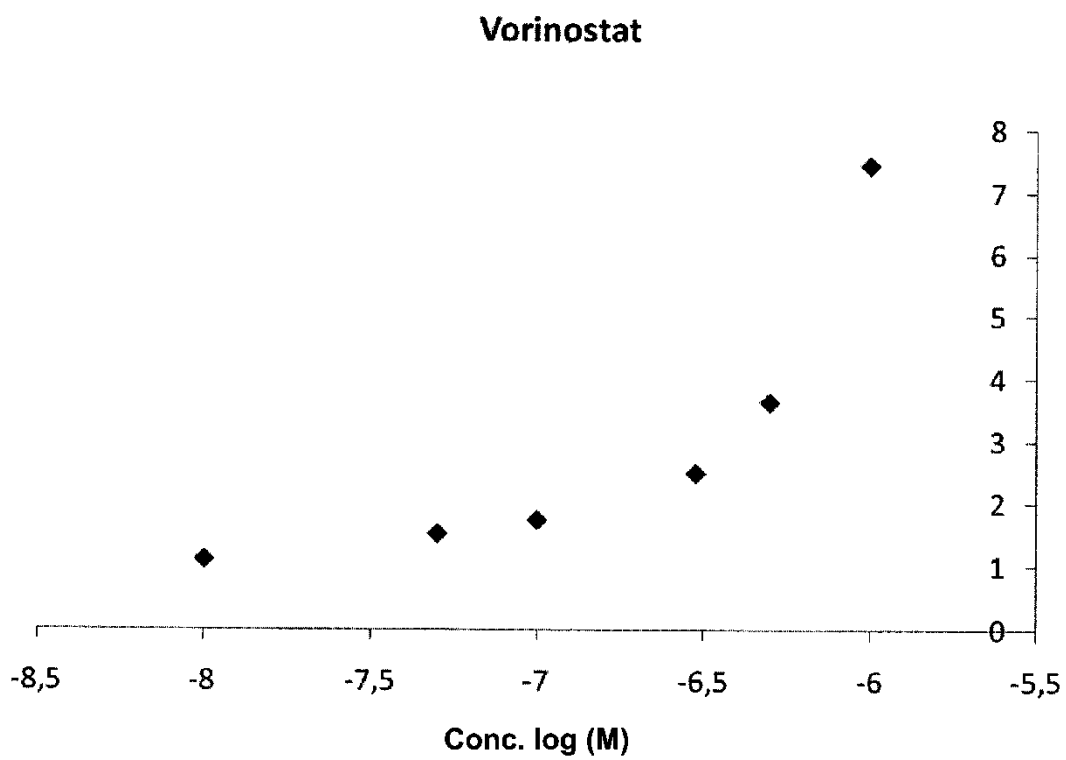


Figura 1B

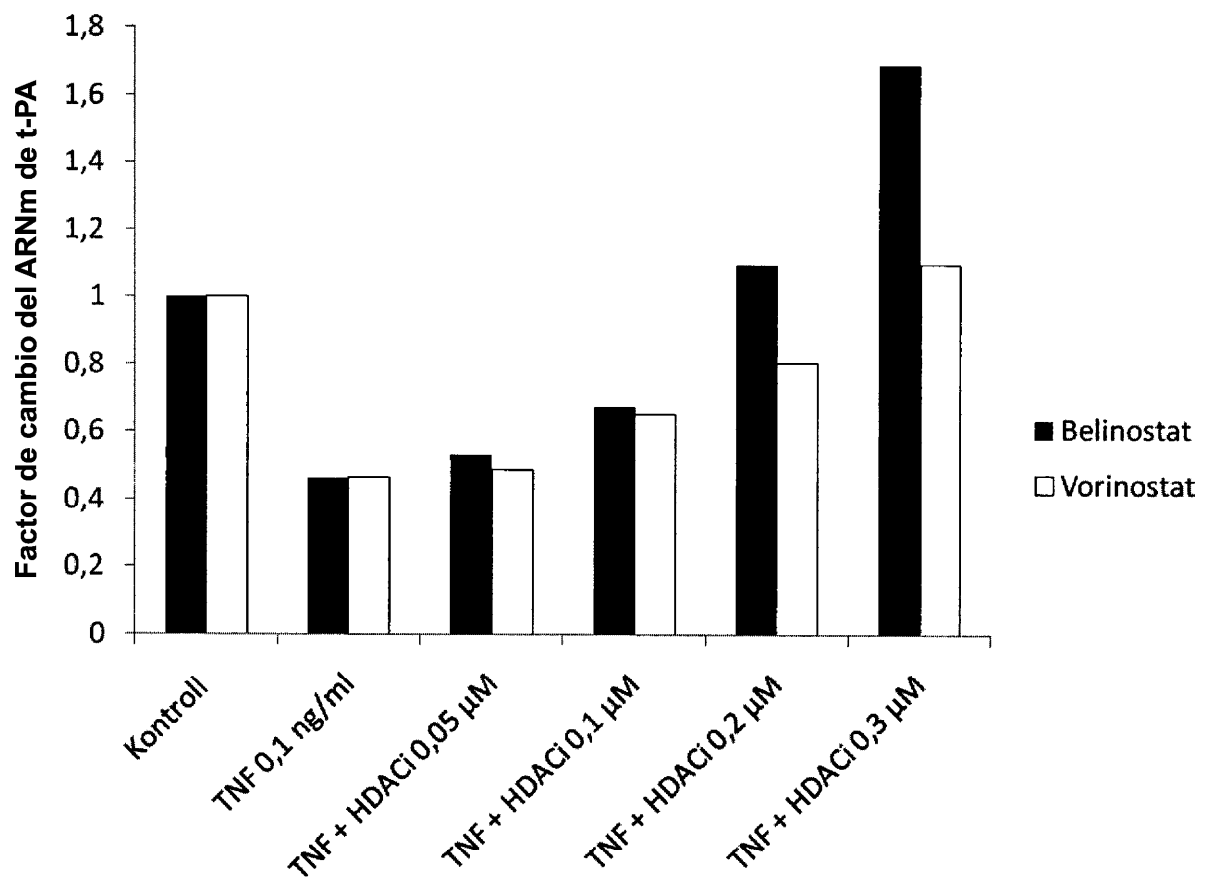


Figura 2

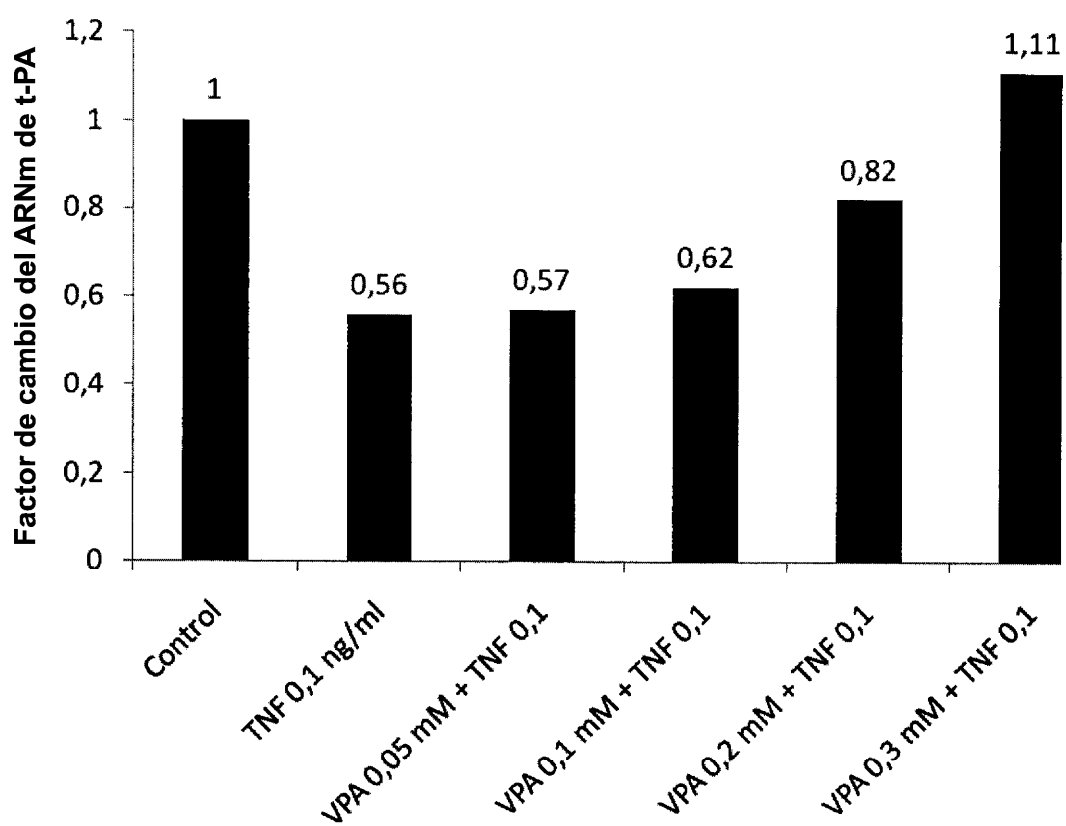


Figura 3

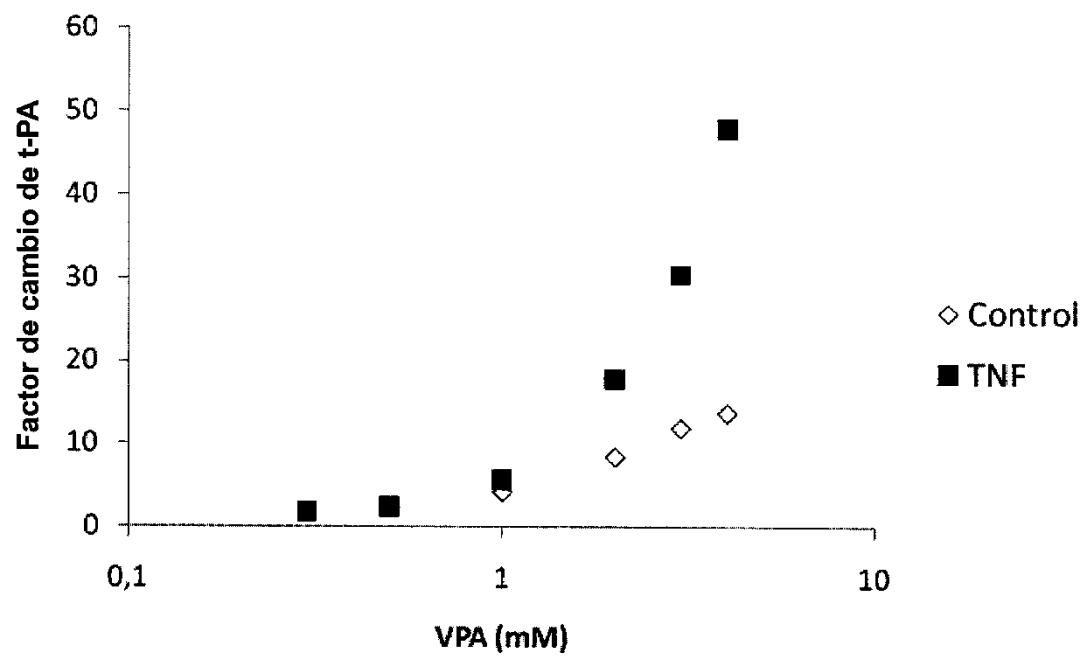


Figura 4

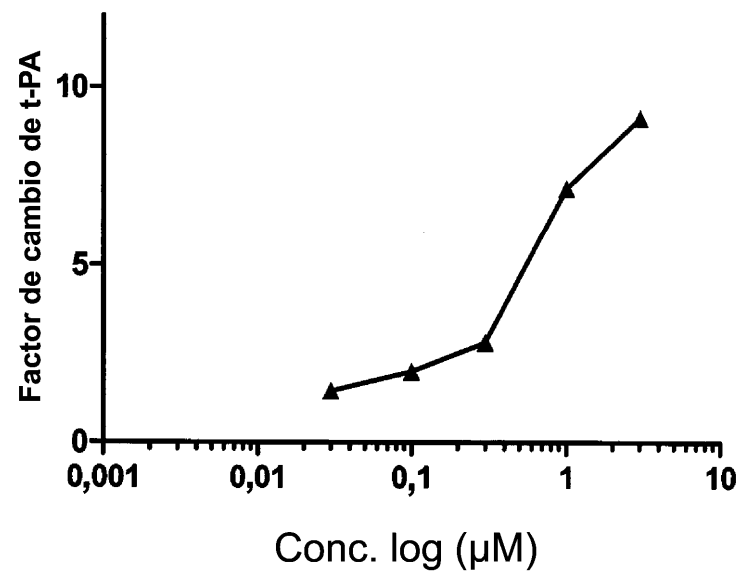


Figura 5

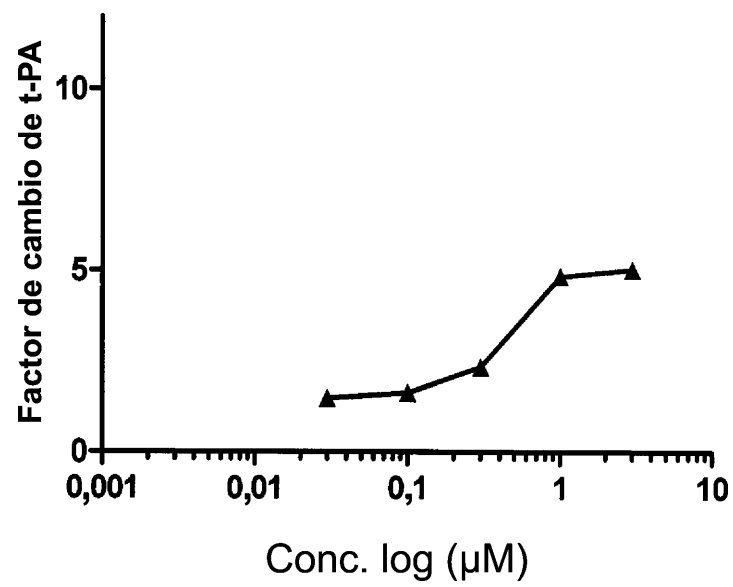


Figura 6

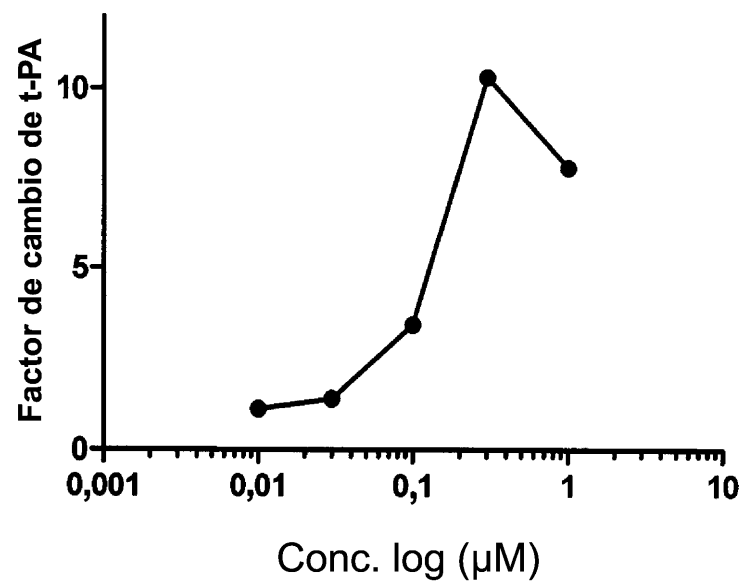


Figura 7

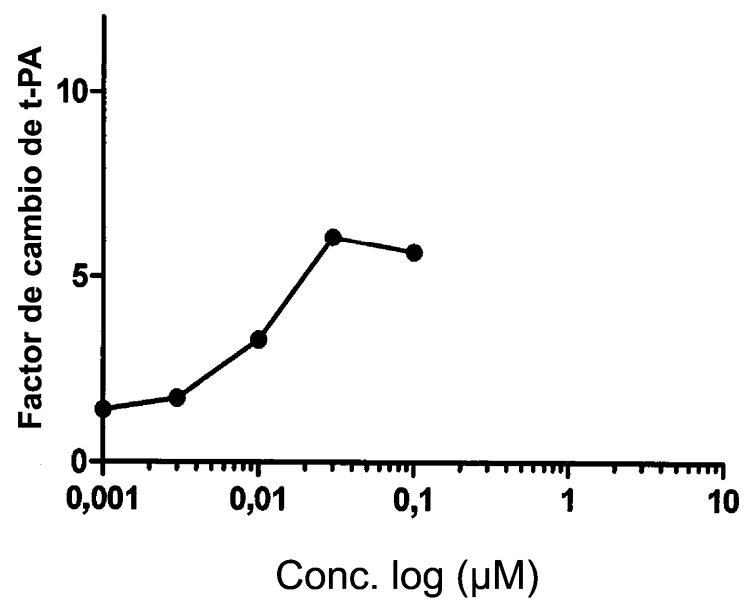


Figura 8

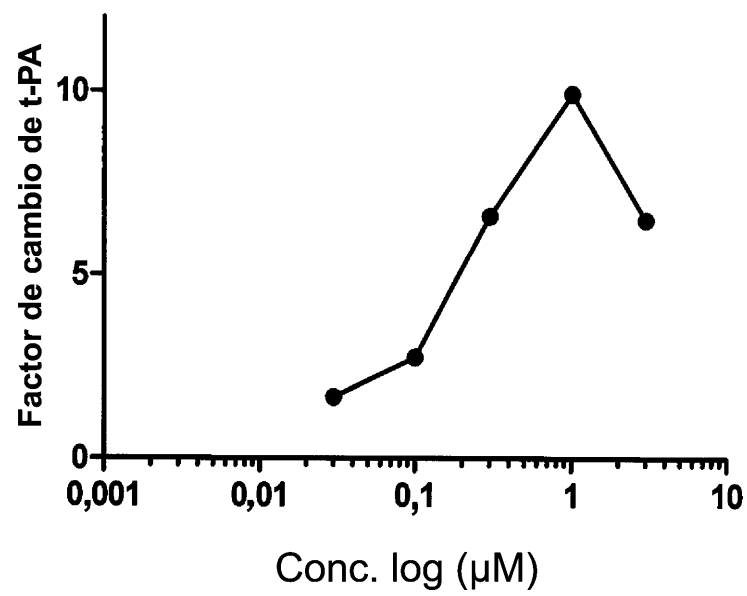


Figura 9

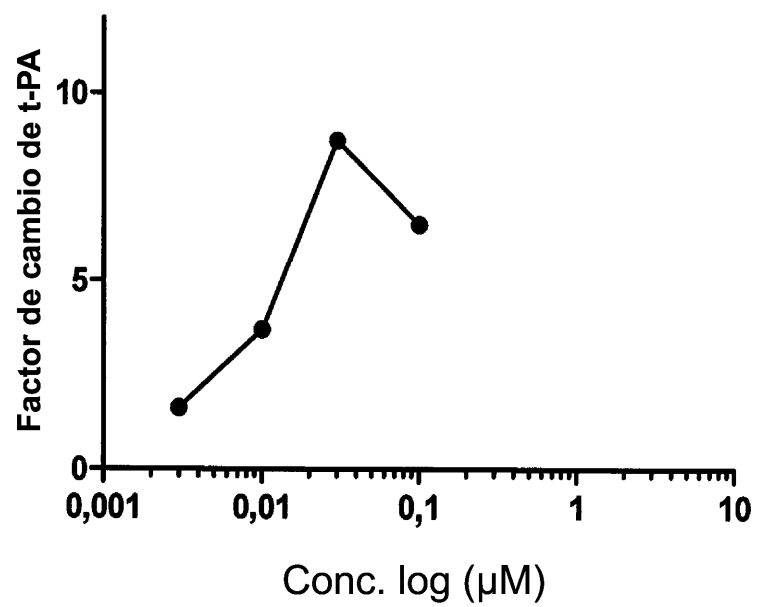


Figura 10

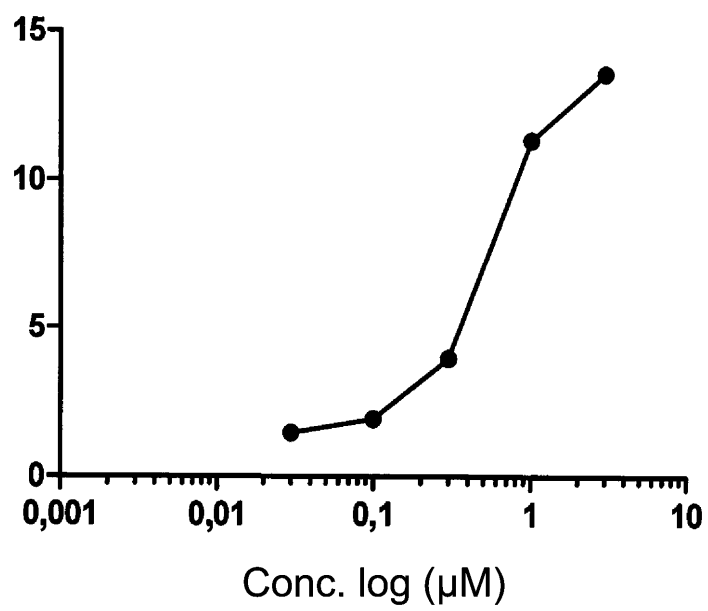


Figura 11

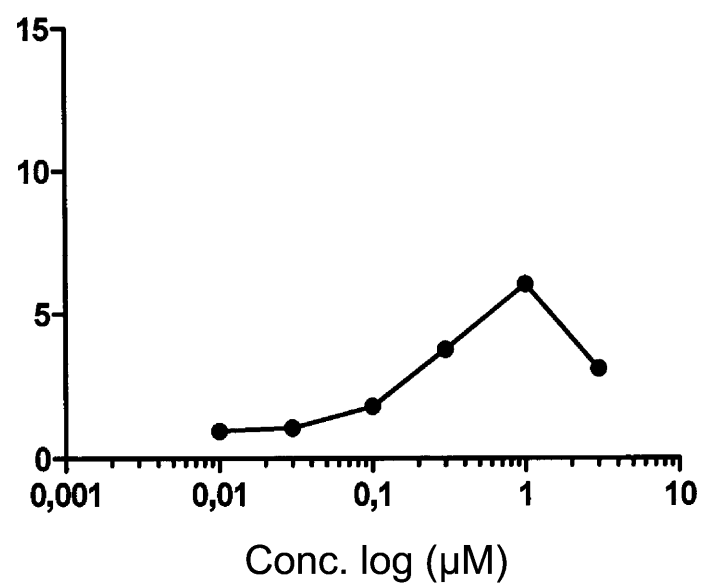


Figura 12

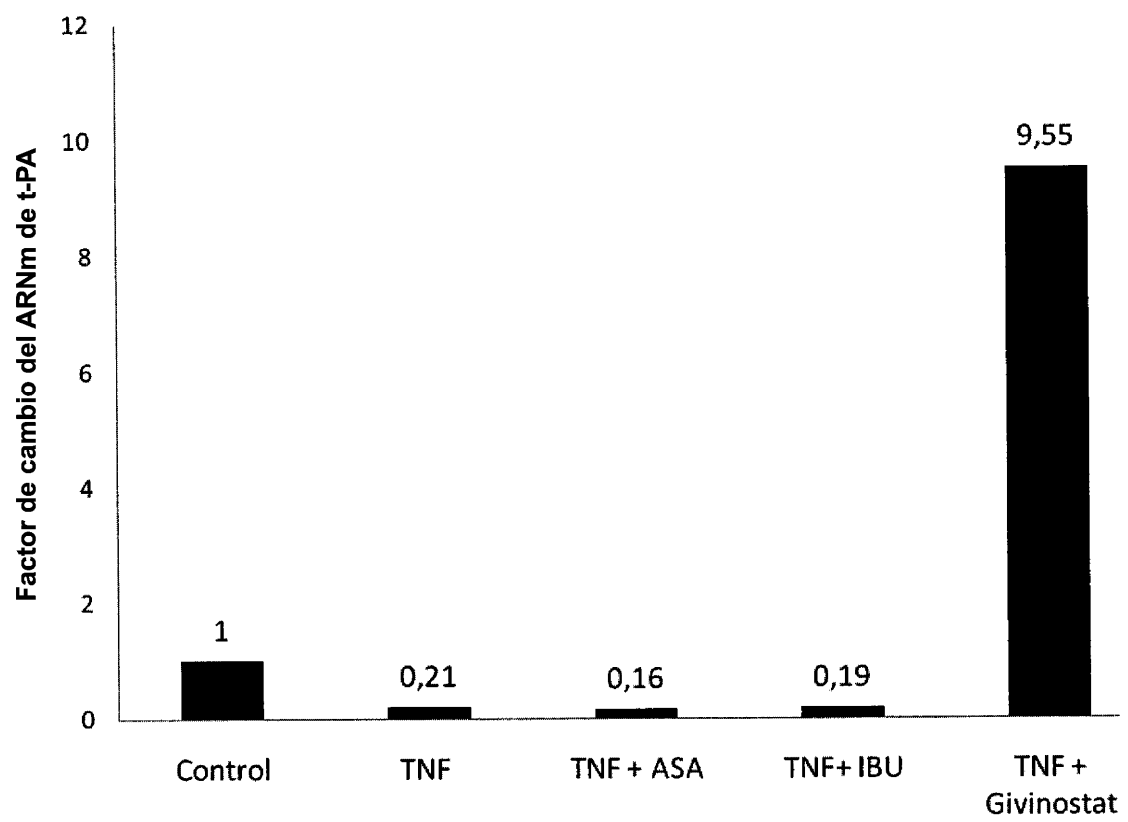


Figura 13