

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 118**

51 Int. Cl.:

A61K 31/496	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61K 31/353	(2006.01) A61P 9/10	(2006.01)
A61K 31/4025	(2006.01) A61P 9/08	(2006.01)
A61K 31/5377	(2006.01) A61P 9/12	(2006.01)
C07D 311/66	(2006.01)	
C07D 311/72	(2006.01)	
C07D 311/74	(2006.01)	
C07D 405/06	(2006.01)	
A61P 39/06	(2006.01)	
A61P 3/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2018 PCT/EP2018/072735**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2019 WO19038361**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2018 E 18769288 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3672593**

54 Título: **Medicamentos para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la vasoconstricción**

30 Prioridad:

25.08.2017 NL 2019446
24.05.2018 NL 2020985

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2025

73 Titular/es:

SULFATEQ B.V. (100.00%)
Admiraal de Ruyterlaan 5-A
9726 GN Groningen, NL

72 Inventor/es:

HENNING, ROBERT HENK;
EUVERINK, GERRIT JAN WILLEM;
KRENNING, GUIDO y
VAN DER GRAAF, ADRIANUS CORNELIS

74 Agente/Representante:

MARTÍN DE LA CUESTA, Alicia María

ES 3 013 118 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

Medicamentos para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la vasoconstricción

5 La presente invención se refiere a medicamentos para su uso en la profilaxis o el tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción tal como se define en las reivindicaciones.

10 Los trastornos relacionados con la vasoconstricción comprenden un grupo de trastornos, como por ejemplo hipertensión pulmonar, hipertensión portal, enfermedades vasoespásticas, enfermedad de Raynaud, acrocianosis, livedo reticular, distrofia postraumática, enfermedades oclusivas asociadas con inflamación y enfermedad de Buerger.

15 La vasoconstricción es el proceso de constricción de los vasos sanguíneos, que puede dar como resultado una disminución del flujo sanguíneo. El flujo sanguíneo normal es necesario para transportar sangre oxigenada a todas las partes del cuerpo, y la interrupción del flujo normal puede provocar diversos problemas. La vasoconstricción puede producirse debido a una afección médica o debido a un trastorno psicológico. Esta afección se produce cuando los músculos pequeños de las paredes se contraen provocando el estrechamiento de los vasos sanguíneos. En realidad, este proceso es una afección exactamente opuesta a la vasodilatación en la que los vasos sanguíneos se agrandan o abren ampliamente. La contracción de los vasos sanguíneos puede aumentar el calor del cuerpo y puede provocar un conflicto vascular. Después de esta afección, la piel se vuelve más pálida que antes, ya que el suministro de sangre se reduce drásticamente. Se produce principalmente en arterias grandes obstruyendo así el flujo sanguíneo, pero a veces puede desarrollarse en pequeñas arteriolas provocando la constricción de los vasos sanguíneos.

25 Un antagonista de adrenorreceptores alfa (que es un vasodilatador) puede administrarse para reducir la constricción de los vasos sanguíneos y aumentar el flujo sanguíneo. El tratamiento del problema con bloqueadores de los canales de calcio facilitaría el ensanchamiento de los vasos sanguíneos.

30 El control de la hipertensión en el paciente vascular es claramente una prioridad. Sin embargo, estos pacientes a menudo tendrán comorbilidades significativas que pueden influir en la elección de la medicación. Las 5 categorías principales de fármacos usados en el tratamiento inicial de las enfermedades vasculares hipertensivas son (1) diuréticos, (2) bloqueadores beta-adrenérgicos, (3) bloqueadores de los canales de calcio, (4) inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y (5) bloqueadores de los receptores de angiotensina (ARB). Cada uno de los agentes antihipertensores es aproximadamente igual de eficaz, produciendo una buena respuesta antihipertensora en del 40 % al 60 % de los casos. Algunos antihipertensores, especialmente ACE y ARB, también pueden tener efectos beneficiosos sobre los sistemas vascular y metabólico independientemente de sus efectos de disminución de la presión sanguínea, lo que sugiere que pueden ser beneficiosos incluso si la presión sanguínea se mantiene bien con otros agentes.

40 Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de nuevos compuestos para el tratamiento de trastornos relacionados con la vasoconstricción, en particular aquellos que tengan menos efectos secundarios, o preferiblemente ningún efecto secundario en absoluto en el intervalo de dosificación de tal compuesto.

45 Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos para el tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción.

50 El objeto anterior se cumple por la presente invención mediante la forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol para su uso en el tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción tal como se define en las reivindicaciones.

55 Se han descrito determinados compuestos de cromanol, por ejemplo, en los documentos WO2014/098586, WO2015/193365 y WO2016/188766. Estos compuestos muestran una amplia variedad de efectos protectores sobre células y órganos. Los compuestos descritos en detalle están desarrollados por Sulfateq, y tienen abreviaturas, que se refieren a SUL-XXX (siendo XXX un número de 2 ó 3 dígitos). Muchos de estos compuestos son mezclas racémicas, aunque también se han sometido a prueba algunos enantiómeros. El documento WO2014/098586 A1 se refiere a compuestos de SUL para la protección de células, en particular para la protección de células durante el almacenamiento. El documento WO2016/188766 A1 se refiere a compuestos de SUL para su uso en la profilaxis o el tratamiento de daño orgánico restableciendo la función endotelial y/o inhibiendo la producción de especies reactivas de oxígeno, y especialmente a compuestos para la profilaxis o el tratamiento de daño renal diabético.

60 Inesperadamente, tras una investigación adicional, varios compuestos de SUL mostraron efectos inversos de la constricción vascular, efecto que es útil en el tratamiento de trastornos relacionados con la vasoconstricción.

65 Por tanto, la presente invención se refiere a la forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol, en la que el derivado de 6-cromanol es (R)(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(piperazin-1-il)metanona y sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

Según aún otra realización preferida, la presente invención se refiere a la forma enantiomérica (R) de un derivado de 6-cromanol tal como se describe, en la que el trastorno relacionado con la vasoconstricción se selecciona del grupo que consiste en hipertensión pulmonar, hipertensión portal, enfermedades vasoespásticas, enfermedad de Raynaud, acrocianosis, livedo reticular, distrofia postraumática, (pre)eclampsia, y enfermedad de Buerger. La hipertensión pulmonar se refiere, en particular, a hipertensión arterial pulmonar, para la que se prefiere la presente invención. Otro trastorno que puede tratarse con los compuestos descritos es la hipertrofia y fibrosis cardíacas.

El trastorno de vasoconstricción se refiere particularmente a trastornos mediados por adrenorreceptores α_1 , tales como hipertensión arterial pulmonar e hipertrofia y fibrosis cardíacas.

Otra indicación que se trata preferiblemente con el compuesto de la presente invención es insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión preservada (HFpEF), en la que la hipertensión generalmente está coindicada.

En una realización preferida, el trastorno vasoconstrictor tiene una coindicación de inflamación. Como el compuesto de cromanol es eficaz como agente antiinflamatorio, el uso de dicho compuesto de cromanol es muy eficaz en la profilaxis o el tratamiento de trastornos vasoconstrictores y relacionados con la inflamación, tales como hipertensión pulmonar, hipertensión portal y (pre)eclampsia.

SUL-121 es una mezcla racémica 1:1 de dos enantiómeros (enantiómero S denominado SUL-151, enantiómero R denominado SUL-150). Se investigaron los efectos de SUL-150 y SUL-151 sobre las constricciones vasculares inducidas por fenilefrina (PE). Los resultados mostraron que mientras que SUL-150 ejercía un aumento dependiente de la dosis de CE50, mientras que no se observaron efectos significativos después del tratamiento con SUL-151. SUL-150 pudo inhibir o contrarrestar las constricciones vasculares inducidas.

Según una realización preferida, la presente invención se refiere a la forma enantiomérica (R) de un derivado de 6-cromanol, en la que dicha profilaxis o dicho tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción está mediado por la inhibición del adrenorreceptor α_1 . Los adrenorreceptores α_1 se acoplan con la proteína G (GPCR), específicamente los subtipos G_q y G_{11} . Su activación conduce a una activación posterior de las rutas de fosfolipasa, un aumento de (Ca^{2+}); y una constricción posterior del músculo liso vascular. Adicionalmente, los presentes inventores han demostrado la capacidad de los adrenorreceptores α_1 para transactivar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que contribuye a la fosforilación posterior de las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2. La inhibición de EGFR atenuó las respuestas de constricción a PE en aortas de rata aisladas. Por tanto, los presentes inventores investigan los efectos de SUL-150 sobre el mecanismo de transactivación de EGFR por adrenorreceptores α_1 .

Se halló que el mecanismo a través del cual SUL-150 inhibe la vasoconstricción es a través de la interacción directa con el adrenorreceptor α_1 como antagonista del receptor. SUL-151 no afectó a los transitorios de calcio en ninguno de los subtipos de adrenorreceptor α_1 investigados. Los resultados indican que SUL-150 puede contrarrestar la constricción vascular y las respuestas de calcio intracelular específicamente a través de su acción sobre los adrenorreceptores α_1 . El desplazamiento de prazosina radiomarcada sugiere que SUL-150 se une competitivamente al sitio de unión del antagonista. La prazosina es un bloqueador α_1 que actúa como agonista inverso en los receptores adrenérgicos alfa-1. En comparación con la prazosina, SUL-150 transmite una serie de efectos beneficiosos adicionales. Las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y vasodilatadoras combinadas de SUL-150 pueden ser aplicables en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la vasoconstricción, tales como la enfermedad de Raynaud.

Según la realización preferida, la presente invención se refiere al derivado de 2R-6-cromanol, en el que la profilaxis o el tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción está mediado por la inhibición del adrenorreceptor α_1 .

Los compuestos se usan preferiblemente en cantidades eficaces, para conseguir un efecto vasodilatador. Los efectos se observan con cantidades de 1 μ M, pero preferiblemente se usan mayores cantidades. Las cantidades preferidas son concentraciones *in vivo* o *in vitro* de aproximadamente 10 μ M o superior, más preferiblemente de aproximadamente 20 μ M o superior. Generalmente, una concentración en ser humano de aproximadamente 200 μ M o inferior debe ser suficiente y segura.

Para su uso en seres humanos, esto significaría, suponiendo un volumen de distribución de 30 l, una disponibilidad del 100 % y una concentración de aproximadamente 1 μ M, una dosificación de aproximadamente 10 mg o más. Las cantidades preferidas darían como resultado una concentración de aproximadamente 10 μ M, para las que una dosificación de aproximadamente 100 mg o más sería adecuada. Por tanto, preferiblemente, son adecuadas formas de dosificación de aproximadamente 20 mg o más, preferiblemente de 50 mg o más, preferiblemente de 100 mg o más. Generalmente, las formas de dosificación oral sólidas contienen, como máximo, aproximadamente 500 mg de compuesto, de manera preferible aproximadamente 450 mg o menos, para permitir excipientes. Con otras formas de administración i.v. líquidas, pueden administrarse cantidades más grandes.

Ejemplos de dosificaciones que pueden usarse son una cantidad eficaz del compuesto de la invención de una dosificación de 0,2 mg/kg o superior, tal como preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o dentro de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, o dentro de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, o dentro de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal. El compuesto de la presente invención puede administrarse en una dosis diaria única, o puede administrarse la dosificación diaria total en dosificación dividida de dos, tres o cuatro veces al día.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse como composiciones farmacéuticas mediante formulación con aditivos tales como excipientes, portadores y vehículos farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Los excipientes, portadores y vehículos farmacéutica o fisiológicamente aceptables adecuados incluyen agentes de procesamiento y modificadores y potenciadores de la administración de fármacos, tales como, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, monosacáridos, disacáridos, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, dextrosa, hidroxipropil-P-ciclodextrina, polivinilpirrolidona, ceras de bajo punto de fusión, y similares, así como combinaciones de dos o más cualesquiera de los mismos. Se describen otros excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Pub. Co., Nueva Jersey (1991), y "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 20ª edición (2003) y 21ª edición (2005).

Una composición farmacéutica puede comprender una formulación de dosis unitaria, en la que la dosis unitaria es una dosis suficiente para tener un efecto vasodilatador, preferiblemente un efecto terapéutico vasodilatador. La dosis unitaria puede ser una dosis administrada periódicamente en el transcurso del tratamiento o la supresión de un trastorno vasodilatador.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el método de administración previsto, incluyendo, por ejemplo, una disolución, una suspensión, o una emulsión. Normalmente se usan portadores líquidos en la preparación de disoluciones, suspensiones, y emulsiones. Los portadores líquidos contemplados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, disolvente(s) orgánico(s) farmacéuticamente aceptable(s), aceites o grasas farmacéuticamente aceptables, y similares, así como mezclas de dos o más de los mismos. El portador líquido puede contener otros aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados tales como solubilizadores, emulsionantes, nutrientes, tampones, conservantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, reguladores de la viscosidad, estabilizadores, y similares. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, alcoholes monohidroxilados, tales como etanol, y alcoholes polihidroxilados, tales como glicoles. Los aceites adecuados incluyen, por ejemplo, aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, y similares. Para administración parenteral, el portador también puede ser un éster oleoso tal como oleato de etilo, miristato de isopropilo, y similares. Las composiciones de la presente invención también pueden estar en forma de micropartículas, microcápsulas, encapsulados liposómicos, y similares, así como combinaciones de dos o más cualesquiera de los mismos.

Pueden usarse sistemas de administración de liberación controlada o liberación en el tiempo, tales como un sistema de matriz controlado por difusión o un sistema erosionable, tal como se describe, por ejemplo, en: Lee, "Diffusion-Controlled Matrix Systems", págs. 155-198 y Ron y Langer, "Erodible Systems", págs. 199-224, en "Treatise on Controlled Drug Delivery", A Kydonieus Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1992. La matriz puede ser, por ejemplo, un material biodegradable que puede degradarse espontáneamente *in situ* e *in vivo*, por ejemplo, mediante hidrólisis o escisión enzimática, por ejemplo, por proteasas. El sistema de administración puede ser, por ejemplo, un polímero o copolímero que se produce de manera natural o sintético, por ejemplo en forma de hidrogel. Los polímeros a modo de ejemplo con enlaces escindibles incluyen poliésteres, poliortoésteres, polianhídridos, polisacáridos, poli(fosfoésteres), poliamidas, poliuretanos, poli(imidocarbonatos) y poli(fosfacenos).

El compuesto de la invención puede administrarse por vía enteral, oral, parenteral, sublingual, por inhalación (por ejemplo, como neblinas o pulverizaciones), rectal, o tópica en formulaciones unitarias de dosificación que contienen portadores, adyuvantes, y vehículos farmacéutica o fisiológicamente aceptables no tóxicos convencionales según se desee. Por ejemplo, los modos adecuados de administración incluyen oral, subcutánea, transdérmica, transmucosa, iontoforética, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intranasal (por ejemplo, a través de la mucosa nasal), subdural, rectal, gastrointestinal, y similares, y directamente a un órgano o tejido específico o afectado. Para administración al sistema nervioso central, puede usarse administración espinal y epidural, o administración a ventrículos cerebrales. La administración tópica también puede implicar el uso de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intraesternales, o técnicas de infusión. Los compuestos se mezclan con portadores, adyuvantes, y vehículos farmacéuticamente aceptables apropiados para la vía de administración deseada.

La administración oral es una vía de administración preferida, y las formulaciones adecuadas para administración oral son formulaciones preferidas.

Los compuestos descritos para su uso en el presente documento pueden administrarse en forma sólida, en forma líquida, en forma de aerosol, o en forma de comprimidos, pastillas, mezclas de polvos, cápsulas, gránulos, inyectables, cremas, disoluciones, supositorios, enemas, irrigaciones colónicas, emulsiones, dispersiones, premezclas alimentarias, y en otras formas adecuadas. Los compuestos también pueden administrarse en formulaciones de liposomas.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse según la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en propilenglicol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer, y la disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Los supositorios para administración rectal del fármaco pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado tal como manteca de cacao y polietilenglicoles que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura rectal y, por tanto, se fundirán en el recto y liberarán el fármaco.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa, o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos, y pastillas, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Los comprimidos y las pastillas pueden prepararse adicionalmente con recubrimientos entéricos.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden incluir emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes habitualmente usados en la técnica, tales como agua. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, ciclodextrinas, y agentes edulcorantes, aromatizantes, y perfumantes.

También se dan a conocer artículos de fabricación y kits que contienen el compuesto reivindicado para su uso en el tratamiento, la prevención, o la supresión de síntomas asociados con afecciones o trastornos relacionados con vasodilatadores tal como se define en las reivindicaciones. El artículo de fabricación comprende un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que tiene un agente activo que es eficaz para tratar, prevenir, o suprimir síntomas asociados con un trastorno vasodilatador o con una afección asociada con la disfunción vasodilatadora tal como se define en las reivindicaciones. El agente activo en la composición es el compuesto de la invención. La etiqueta en el recipiente indica preferiblemente que la composición se usa para tratar, prevenir, o suprimir síntomas asociados con una afección o un trastorno relacionado con vasodilatadores tal como se define en las reivindicaciones. En un aspecto no reivindicado, la etiqueta también puede indicar indicaciones para uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente.

También se dan a conocer kits que comprenden el compuesto de la invención para su uso tal como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el kit de la invención comprende el recipiente descrito anteriormente. En otras realizaciones, el kit de la invención comprende el recipiente descrito anteriormente y un segundo recipiente que comprende un tampón. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones para realizar cualquier método descrito en el presente documento.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped al que se le administra el principio activo y del modo de administración particular. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el área corporal, el índice de masa corporal (IMC), la salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y el tipo, la progresión, y la gravedad de la enfermedad particular que se somete a terapia o la afección que va a tratarse. La dosificación unitaria elegida se fabrica y administra habitualmente para proporcionar una concentración final definida de fármaco en la sangre, los tejidos, los órganos, u otra región seleccionada como diana del cuerpo. La cantidad eficaz para una situación dada puede determinarse fácilmente mediante experimentación rutinaria y está dentro de la experiencia y el criterio del médico o experto habitual.

La presente invención se ilustrará adicionalmente usando los ejemplos a continuación. En los ejemplos, se hace referencia a las figuras, en las que

5 Figura 1: muestra las respuestas de constricción a fenilefrina (PE) en presencia de diferentes dosis de SUL-150 (B) y SUL-151 (C). Se midió la vasoconstricción inducida por metoxamina en anillos con endotelio intacto (D) y con denudación endotelial (E) en presencia de vehículo (DMSO al 0,1 %) y dos dosificaciones (30 μ M y 100 μ M) de SUL-150. Los datos se obtienen a partir de 2-3 experimentos (n=4-6 por grupo). La constricción en las figuras 1B y 1C se expresa como porcentaje de respuesta a la adición de PE final.

10 Figura 2: muestra las respuestas de constricción a histamina (A) y al agonista de tromboxano U46619 (B) después del pretratamiento con vehículo (DMSO al 0,1 %) y dos dosificaciones (30 μ M y 100 μ M) de SUL-150.

15 Figura 3: muestra las respuestas de constricción a fenilefrina en presencia de vehículo y tres concentraciones del inhibidor de EGFR AG1478 (A) y 20 μ M de AG1478 con 50 μ M de SUL-150 (B).

20 Figura 4: muestra las mediciones de calcio intracelular en células CHO transgénicas que sobreexpresan los subtipos de adrenorreceptor α_1 A (A), B (B) y D (C) después de la estimulación con fenilefrina en presencia de vehículo (DMSO al 10 %), 10 μ M, 30 μ M o 100 μ M de SUL-150. La figura D muestra la falta de efecto de SUL-151. Las figuras E y F muestran transitorios de calcio intracelular mediados por histamina y U46619, respectivamente, en células HeLa después del tratamiento con SUL-150.

Figura 5: muestra el desplazamiento de prazosina marcada con tritio por SUL-150 y SUL-151 en células CHO transgénicas con adrenorreceptores α_{1A} .

25 Figura 6: muestra la fórmula estructural del compuesto SUL-121 ((6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)-(piperaziniil)-metanona). SUL-121 es una mezcla racémica 1:1 del enantiómero (R) SUL-150 y el enantiómero (S) SUL-151. El * indica el centro quiral de SUL-121 en la fórmula estructural, que está en la posición 2 en el grupo cromanol. Por tanto, generalmente, el grupo de enantiómeros se denomina "enantiómero 2-R de".

30 Ejemplos

Ejemplo 1:

35 *Preparación de tejido y miografía en arterias renales porcinas aisladas*

Se obtuvieron riñones porcinos de un matadero local (Kroon Vlees, Gotenburgweg 30, 9723 TM Groningen, Países Bajos) y se transportaron sobre hielo en tampón de Krebs fisiológico normal que contenía NaCl 120 mM, KCl 6 mM, CaCl₂ × 2H₂O 2,5 mM, MgCl₂ × 6H₂O 1,2 mM, NaH₂PO₄ × H₂O 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM y D-(+)-glucosa monohidratada 11,4 mM (todos los componentes se adquirieron de Merck) en agua ultrapura.

40 Se diseccionó el árbol arterial renal del riñón, se limpió de tejido conjuntivo circundante y se cortó en segmentos anulares del mismo tamaño (2 mm de longitud). En algunos anillos, se realizó denudación endotelial frotando suavemente la superficie de la íntima con una pinza sujetapapeles. Se montaron los anillos en baños de órganos tal como se ha descrito previamente (Buikema *et al.*, 2000). Se lavaron a fondo los anillos arteriales reemplazando el tampón de Krebs y se dejaron equilibrar durante un periodo de 60 min bajo 1,4 g de tensión de reposo antes de evaluar su viabilidad induciendo 2 constricciones posteriores con KCl (60 mM). Se excluyeron los anillos que no produjeron un aumento umbral en el diámetro de 100 μ m. Después del lavado y la estabilización, se trataron los anillos durante 30 minutos mediante incubación con vehículo (DMSO al 0,1 %), SUL-121, SUL-150 o SUL-151, seguido de incubación posterior con dosis acumuladas de fenilefrina.

50 Se registraron respuestas de constricción dependientes de la dosis a fenilefrina (10⁻⁸M - 10⁻⁴M) en dichas arterias intrarrenales porcinas aisladas. Se calentó el tampón hasta 37°C y se aireó con el 95 % de O₂ y el 5 % de CO₂ antes de su uso.

55 Ejemplo 2:

Cultivo celular

60 Se transfectaron establemente células CHO-K1 con un plásmido que contenía los subtipos de α_1 -AR humano A, B y D en líneas celulares independientes en medio DMEM-F12 con FBS al 10 %, penicilina-estreptomocina al 1 % y geneticina 200 μ g/ml (G418, Invitrogen, Carlsbad, CA).

65 Se hicieron crecer células HeLa que expresaban endógenamente receptores de TP e histamina en medio DMEM-F12 enriquecido con FBS al 10 % y penicilina-estreptomocina al 1 %. Se mantuvieron las células en una incubadora de histocultivo a 37 °C en una atmósfera del 5 % de O₂/95 % de CO₂ y se hicieron crecer en matraces de cultivo

celular no tratados de 75 cm². Se realizó siembra en placa 24 horas antes de la medición en placas de 96 pocillos de fondo transparente negro a una densidad de 20.000 células por pocillo.

Ejemplo 3:

Ensayos de calcio intracelular

Al día siguiente, se trataron las células CHO con vehículo (DMSO al 0,1 %) o enantiómeros de SUL-121 durante 30 min a 37 °C y se estimularon con una serie de dilución de 3 veces de PE (20 μM-100 μM). Se midió [Ca²⁺]_i usando el kit de ensayo fluorescente FLIPR Calcium 6 (Molecular Devices) en células CHO inmortalizadas que expresaban establemente el adrenerreceptor α₁.

Inicialmente, se investigaron las respuestas de calcio inducidas por series de concentraciones no acumuladas de fenilefrina usando mediciones de fluorescencia en células CHO que sobreexpresaban adrenerreceptores α_{1A} tratadas con SUL-150 y SUL-151 (figura 4). Se procesaron y analizaron los datos de medición de fluorescencia en *SoftMax Pro 7* y se expresaron como % de AUC de nivel inicial con un multiplicador de 3 veces usando un promedio de los primeros 10 puntos de medición como nivel inicial.

El "vehículo" usado en todos los experimentos es una disolución de DMSO al 0,1 %.

Datos y análisis estadístico

Las respuestas de constricción vascular se expresan como porcentaje de la respuesta final a KCl. Los datos se expresan como media ± EEM. *p < 0,05.

Ejemplo 4

Simulación de acoplamiento molecular de ajuste inducido

Se realizó la unión de SUL-150 al sitio de unión del antagonista en α_{1A}-AR, simulación de acoplamiento molecular de ajuste inducido, usando prazosina como referencia, de la siguiente manera.

Se obtuvo la secuencia primaria del adrenerreceptor α_{1A} de la base de datos de UniProt (The UniProt Consortium, 2017) usando el código de referencia P35348 y se cargó en SWISS-MODEL con el fin de construir un modelo de homología, dando como resultado 373 moldes. Posteriormente, se usaron códigos de ligando molde para consultar la base de datos de PDB para obtener datos estructurales en formato SMILES, que se procesaron mediante Chemmine para detectar similitudes con SUL-150. Se usó el molde de SWISS-MODEL que contenía un ligando con la puntuación de similitud más alta (un receptor de dopamina D3 formando un complejo con eticloprida, ETQ) para alinear la secuencia de α_{1A}-AR en una estructura principal modelada. Se validó el modelo de homología resultante mediante el gráfico de Ramachandran y se preparó con Protein Preparation Wizard mediante la adición de hidrógenos, asignación de orden de enlace, generación de cargas parciales en heteroátomos y enlaces disulfuro. Se realizó refinamiento final mediante asignación de enlaces de hidrógeno a pH 7,4 y minimización restringida a 0,3 RMSD.

Se convirtieron los archivos estructurales de prazosina, SUL-150 y SUL-151 de SMILES a estructuras 3D usando LigPrep. Se generaron estados de protonación con Epik a pH 7,4 y se calcularon parámetros de energía de molécula pequeña usando el campo de fuerza OPLS3.

Se realizó simulación de acoplamiento molecular flexible usando ajuste inducido, parte del paquete Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery. Se definió un centroide de unión entre residuos implicados en la unión del antagonista confirmado mediante mutagénesis (PHE312, PHE308 y ASP106) y se acoplaron ligandos dentro de 15 Å, usando un protocolo de muestreo ampliado sin restricciones. Se refinaron los residuos dentro de 5 Å de las posiciones de ligando resultantes usando Prime para mejorar el muestreo conformacional de ligandos. Finalmente, se usó el servidor Scorpion para la evaluación y la clasificación de las interacciones proteína-molécula pequeña y se representaron los resultados finales usando PyMOL 2.0.

Resultados

Efectos de SUL-150 y SUL-151 sobre la vasoconstricción mediada por adrenerreceptores α₁

Para explorar los efectos de los enantiómeros de (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(piperazin-1-il)metanona (SUL-150 y SUL-151) sobre la constricción de arterias intrarrenales porcinas aisladas, se construyeron curvas de dosis acumulada-respuesta al agonista de adrenerreceptores α₁ fenilefrina (PE) en presencia y ausencia de SUL-150 y SUL-151. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Valores de logCE₅₀ de respuestas de constricción inducida por fenilefrina en presencia de SUL-150 y SUL-

151.

<i>logCE₅₀</i>	<i>Fenilefrina</i>	
	<i>SUL-150</i>	<i>SUL-151</i>
Vehículo	-5,77±0,04	
10 μM	-5,11±0,09*	-5,82±0,05
30 μM	-5,06±0,06*	-5,89±0,04#
100 μM	-4,44±0,09*	-5,77±0,04

p < 0,05 frente a vehículo, * p < 0,0001 frente a vehículo

5 Mientras que SUL-150 ejerció un aumento dependiente de la dosis de CE₅₀ (figura 1A, Table 1), no se observaron efectos significativos después del tratamiento con SUL-151 (figura 1B, tabla 1).

10 Adicionalmente, se investigaron los efectos de SUL-150 sobre la estimulación con metoxamina, que es un agonista de adrenorreceptores α₁ alternativo. De manera similar a PE, las curvas de dosis-respuesta a metoxamina se desplazaron hacia la derecha mediante el pretratamiento con SUL-150 (figura 1C). La retirada del endotelio no anuló los efectos de SUL-150 sobre la constricción inducida por metoxamina (figura 1D).

Efectos de SUL-150 sobre la vasoconstricción inducida por histamina y U46619

15 Para obtener información sobre la especificidad de SUL-150 por el receptor, se investigaron los efectos de SUL-150 sobre las constricciones inducidas por histamina y U46619 (un agonista de tromboxano sintético) (figura 2). SUL-150 no afectó a las respuestas de constricción a histamina (tabla 2), y aunque el desplazamiento en CE₅₀ de las constricciones inducidas por U46619 en presencia de SUL-150 100 μM fue estadísticamente significativo (tabla 2), el pequeño tamaño del efecto llevó a excluir una acción de SUL-150 sobre los receptores de tromboxano.

20 Tabla 2: Valores de logCE₅₀ de respuestas de constricción inducida por histamina y U46619 en presencia de SUL-150.

<i>logCE₅₀</i>	<i>Histamina</i>		<i>U46619</i>	
	<i>Arterias renales porcinas</i>	<i>Células HeLa</i>	<i>Arterias renales porcinas</i>	<i>Células HeLa</i>
Vehículo	-4,94±0,03	-6,47±0,05	-7,65±0,05	-6,62±0,18
10 μM		-6,45±0,05		-6,83±0,10
30 μM	-4,86±0,08	-6,39±0,05	-7,58±0,06	-6,78±0,18
100 μM	-4,85±0,10	-6,29±0,06*	-7,50±0,04*	-6,75±0,10

* p < 0,05 frente a vehículo

25 *Efectos de SUL-150 mediados a través de la transactivación de EGFR*

30 Se sabe que la inhibición de la transactivación del receptor de EGF (EGFR) inhibe las constricciones mediadas por adrenorreceptores α₁ (REF). Por tanto, se investigó el papel de la transactivación de EGFR en la inhibición de la vasoconstricción mediada por SUL-150. Para ello, se pretrataron arterias intrarrenales porcinas con el bloqueador de EGFR AG1478 (figura 3). En primer lugar, se realizó una medición inicial para determinar la dosis de AG1478 que provocaría la máxima inhibición de la constricción vascular inducida por PE (figura 3A). Posteriormente, se trataron arterias aisladas con AG1478 (20 μM) y SUL-150 (50 μM) y se estudió la vasoconstricción inducida por PE. A pesar de la máxima inhibición de la transactivación de EGFR por AG1478, SUL-150 todavía demostraba un efecto inhibitorio adicional sobre la constricción mediada por PE (figura 3B).

35 *Efectos de SUL-150 sobre la señalización de calcio intracelular inducida por PE*

40 Para investigar adicionalmente los mecanismos a través de los cuales SUL-150 inhibe las contracciones mediadas por adrenorreceptores α₁, se estudiaron transitorios de calcio inducidos por PE en células CHO que sobreexpresaban establemente los subtipos de adrenorreceptor α₁ humanos A, B y D. SUL-150 desplazó hacia la derecha las curvas de dosis-respuesta para los tres subtipos de adrenorreceptor α₁ (figuras 4A, B y C, tabla 3). SUL-151 no afectó a los transitorios de calcio en ninguno de los subtipos de adrenorreceptor α₁ investigados (mostrado sólo para el subtipo de adrenorreceptor α₁ A en la figura 4D).

45 Tabla 3: Valores de logCE₅₀ de la entrada de calcio inducida por fenilefrina después del tratamiento con SUL-150.

	SUL-150	SUL-151
--	---------	---------

<i>logCE₅₀</i>	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}	α_{1A}
Vehículo	-8,07±0,03	-7,99±0,08	-7,68±0,13	-8,10±0,11
10 μ M	-7,62±0,03*	-7,51±0,08*	-7,37±0,10	-8,09±0,10
30 μ M	-7,28±0,03*	-7,24±0,07*	-7,04±0,06*	-8,09±0,11
100 μ M	-6,88±0,03*	-6,72±0,08*	-6,80±0,10*	-7,98±0,10

* $p < 0,0001$ frente a vehículo

Efectos de SUL-150 sobre la señalización de calcio intracelular inducida por histamina y U46619

5 Adicionalmente, para confirmar la especificidad de SUL-150 por el adrenoceptor α_1 , se estudiaron transitorios de calcio inducidos por histamina y U46619 en células HeLa que expresaban endógenamente el receptor de histamina H_1 humano. SUL-150 no afectó significativamente a los transitorios de calcio inducidos por histamina y U46619 (figuras 4E, 4F y tabla 2).

10 *Ensayo de unión de radioligando en células CHO que sobreexpresan adrenoceptores α_{1A}*

SUL-150 afectó a los transitorios de calcio inducidos por PE, lo que indica que los efectos de SUL-150 se producen antes del calcio. Por tanto, se exploró si SUL-150 podía interaccionar directamente con el adrenoceptor α_1 como antagonista del receptor. Para ello, se realizó un ensayo de unión por desplazamiento en células CHO transgénicas con adrenoceptores α_{1A} usando prazosina radiomarcada, un antagonista de adrenoceptores α_{1A} establecido. 15 SUL-150 fue más potente en el desplazamiento del radioligando en comparación con SUL-151, que desplazó [7-metoxi-3H]-prazosina sólo a concentraciones superiores a 10 μ M (figura 5).

Modelado molecular de ajuste inducido

20 La prazosina coexiste en dos formas de protonación a pH 7,4. En la forma protonada, N1 asume una carga positiva, formando posteriormente un puente salino con la cadena lateral cargada negativamente de ASP106, haciendo finalmente que esta forma asuma una orientación invertida en relación a su forma no protonada. El armazón de quinazolina de la prazosina no protonada se acopló cerca de TM5 para formar un enlace de hidrógeno confocal entre los grupos 6,7-metoxilo y SER188, un enlace de hidrógeno entre el oxígeno de furano y SER83, y entre la 25 carboxamida de la prazosina y la cadena lateral de GLN177; interacciones de van der Waals con las cadenas laterales de PHE86, VAL107, ILE178, PHE289, MET292, y PHE312; interacciones π - π con PHE288 y PHE312; y una interacción de π -enlace de hidrógeno con el grupo carboxilo de cadena lateral y la carboxamida del péptido de estructura principal de ASP106. El modo de unión propuesto de la prazosina no protonada indicó interacciones que concordaban con las descritas en la bibliografía.

30 Un ajuste inducido de SUL-150 y SUL-151 demostró la alineación del armazón de cromano con la quinazolina de la prazosina, los grupos 6-hidroxilo (SUL) y 6-metoxilo (prazosina), así como a lo largo de su resto de piperazina común. Los residuos que estaban implicados en la formación de contactos con los tres compuestos eran VAL107, 35 ILE178, SER188, PHE288, PHE289.

Las puntuaciones de deslizamiento calculadas usando el paquete Schrödinger Small Molecule-Drug Discovery fueron de -10,8 kcal \times mol⁻¹, -10,2 kcal \times mol⁻¹ y -9,4 kcal \times mol⁻¹ para prazosina, SUL-150 y SUL-151, respectivamente. La prazosina y SUL-150 formaron contactos con PHE312 y ASP106 confirmados en la unión de prazosina por mutagénesis, mientras que SUL-151 no mostró interacciones con estos residuos. Adicionalmente, la quiralidad de 40 SUL-150 permite la orientación de su carboxamida hacia ASN179, formando eficazmente un enlace de hidrógeno. Se formó un enlace de hidrógeno adicional entre su extremo N-terminal protonado y TYR316.

45 La comparación de las interacciones del sitio de unión de los diversos compuestos de SUL con la unión de SUL-150, y la no unión de SUL-151 y SUL-132 y SUL-138, permitió la predicción de que los compuestos de SUL ahora reivindicados tienen, de hecho, las propiedades de unión reivindicadas.

REIVINDICACIONES

1. Forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol, en la que el derivado es (2R)(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-il)(piperazin-1-il)metanona y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción, en la que dichas afecciones o dichos trastornos relacionados con la vasoconstricción se seleccionan del grupo que consiste en hipertensión pulmonar, hipertensión portal, enfermedades vasoespásticas, enfermedad de Raynaud, acrocianosis, livedo reticular, distrofia postraumática, (pre)eclampsia, enfermedad de Buerger, hipertensión arterial pulmonar, insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión preservada, e hipertrofia y fibrosis cardíacas.
2. Forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha profilaxis o dicho tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción se seleccionan de hipertensión arterial pulmonar, insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión preservada, e hipertrofia y fibrosis cardíacas.
3. Forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha profilaxis o dicho tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción es insuficiencia cardíaca con fracción de expulsión preservada.
4. Forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha profilaxis o dicho tratamiento de afecciones o trastornos relacionados con la vasoconstricción está mediado por la inhibición del adrenorreceptor α_1 .
5. Forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el compuesto se usa en una cantidad suficiente para conseguir una concentración de 1 μM o superior.
6. Forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol para su uso según la reivindicación 5, en la que el compuesto se usa en una cantidad suficiente para conseguir una concentración de aproximadamente 10 μM o superior.
7. Forma de dosificación farmacéutica que comprende la forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el compuesto está presente en una cantidad de 10 mg - 500 mg, preferiblemente de 100 - 500 mg.
8. Forma de dosificación farmacéutica que comprende la forma enantiomérica (2R) de un derivado de 6-cromanol para su uso según la reivindicación 7, en la que la forma de dosificación es un sólido, preferiblemente una forma de dosificación oral sólida.

Figura 1

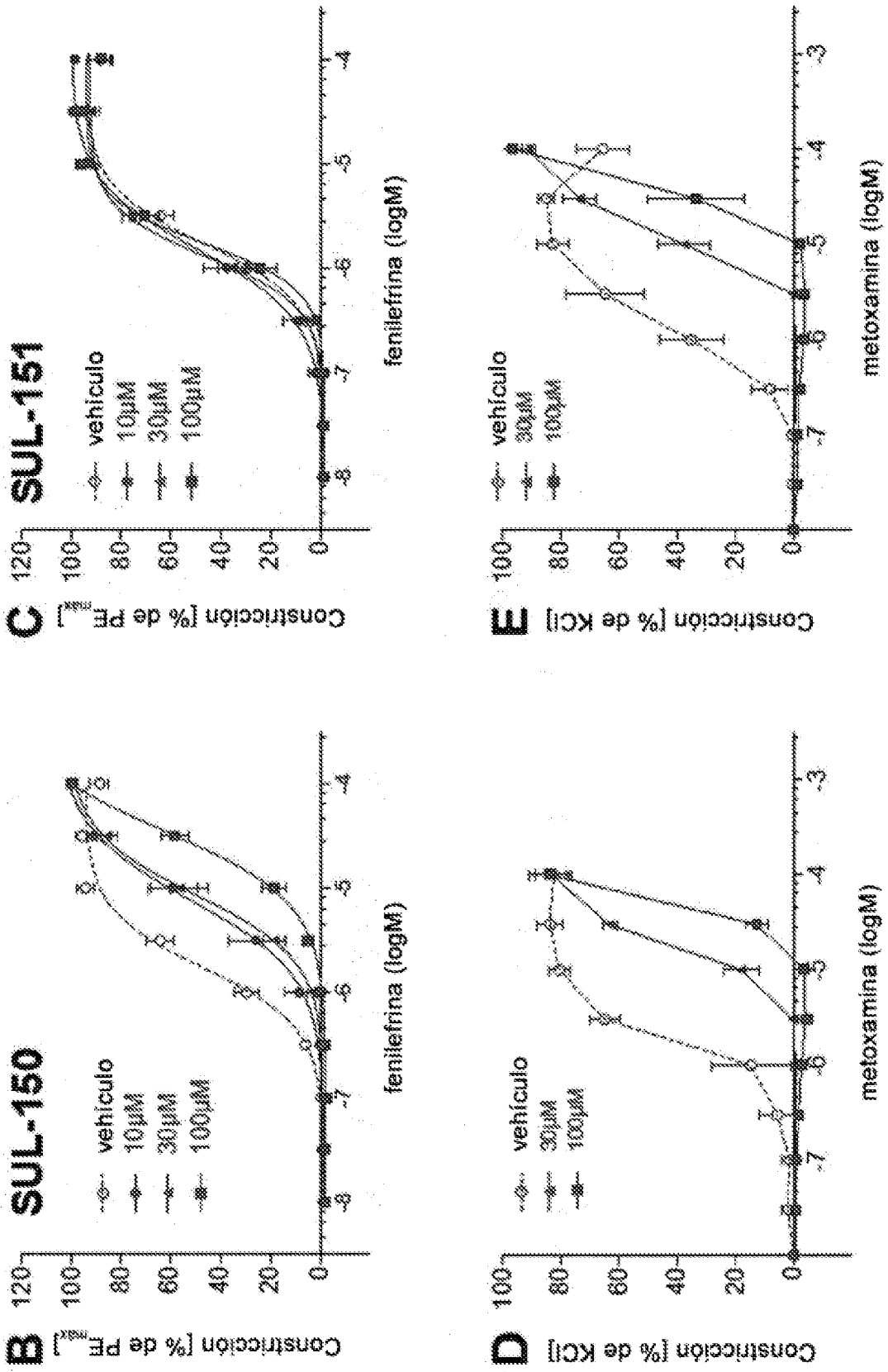


Figura 2

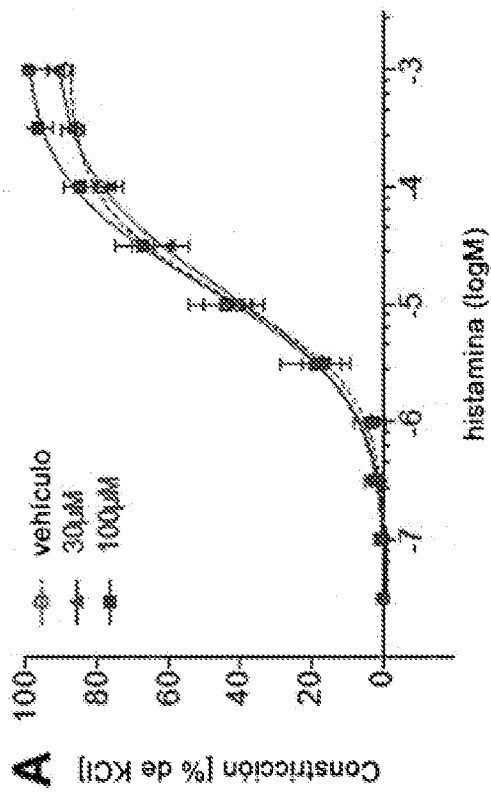
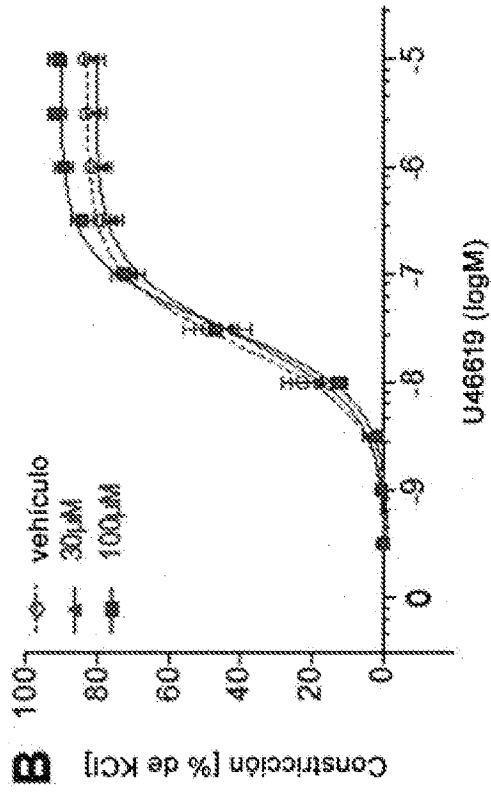


Figura 3

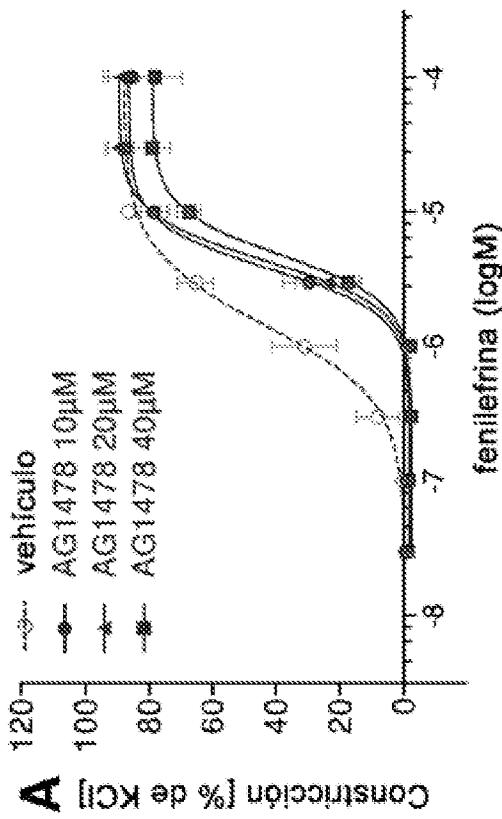
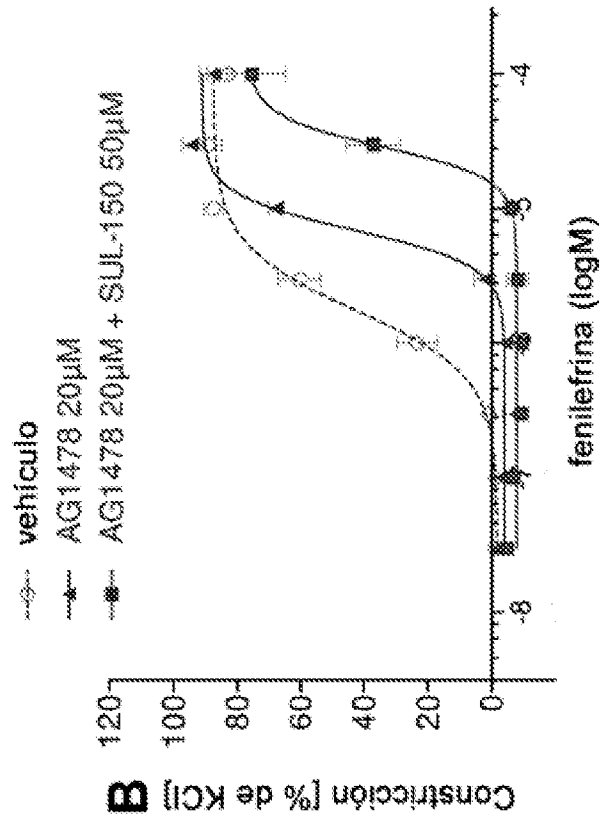


Figura 4

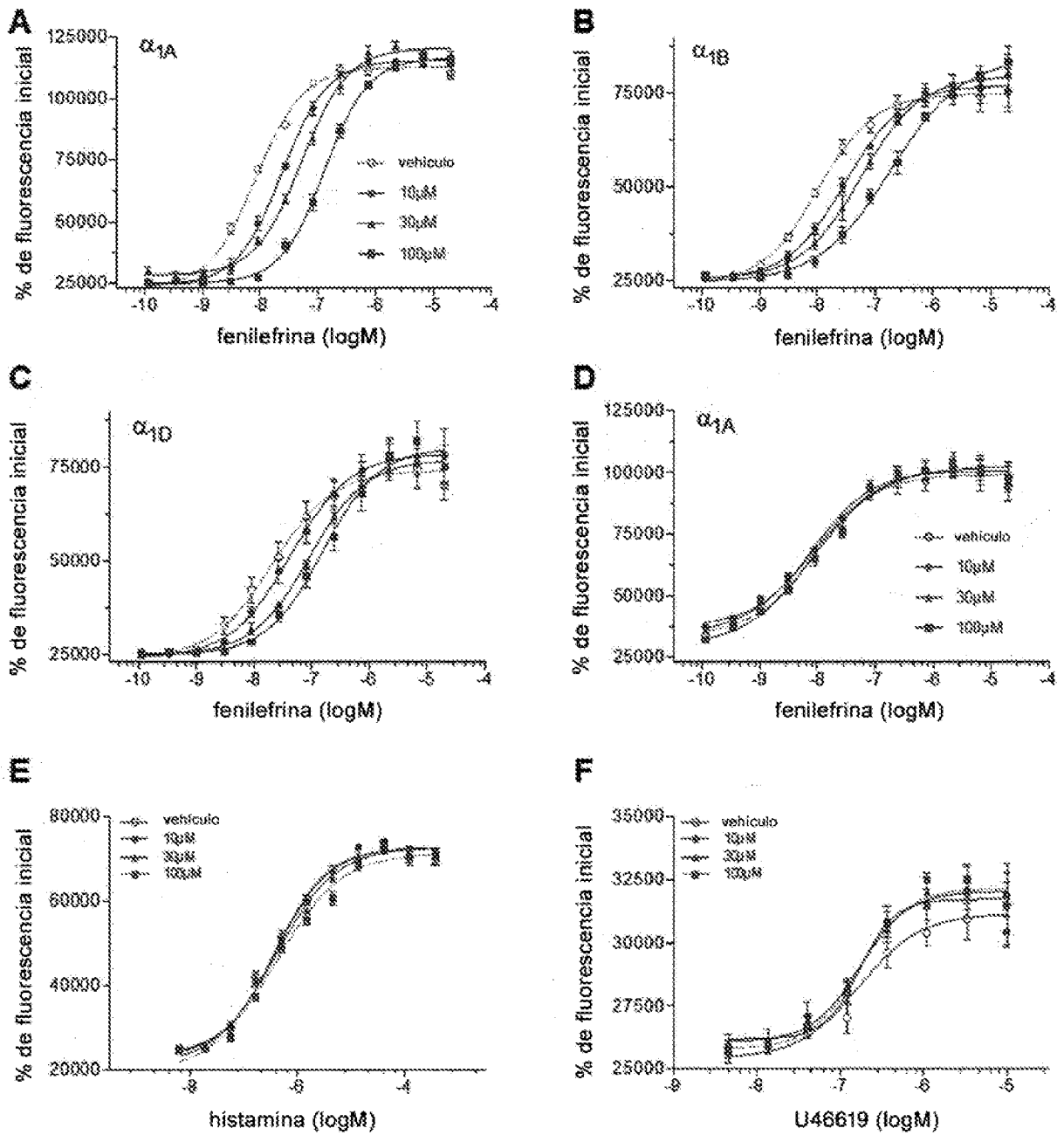


Figura 5

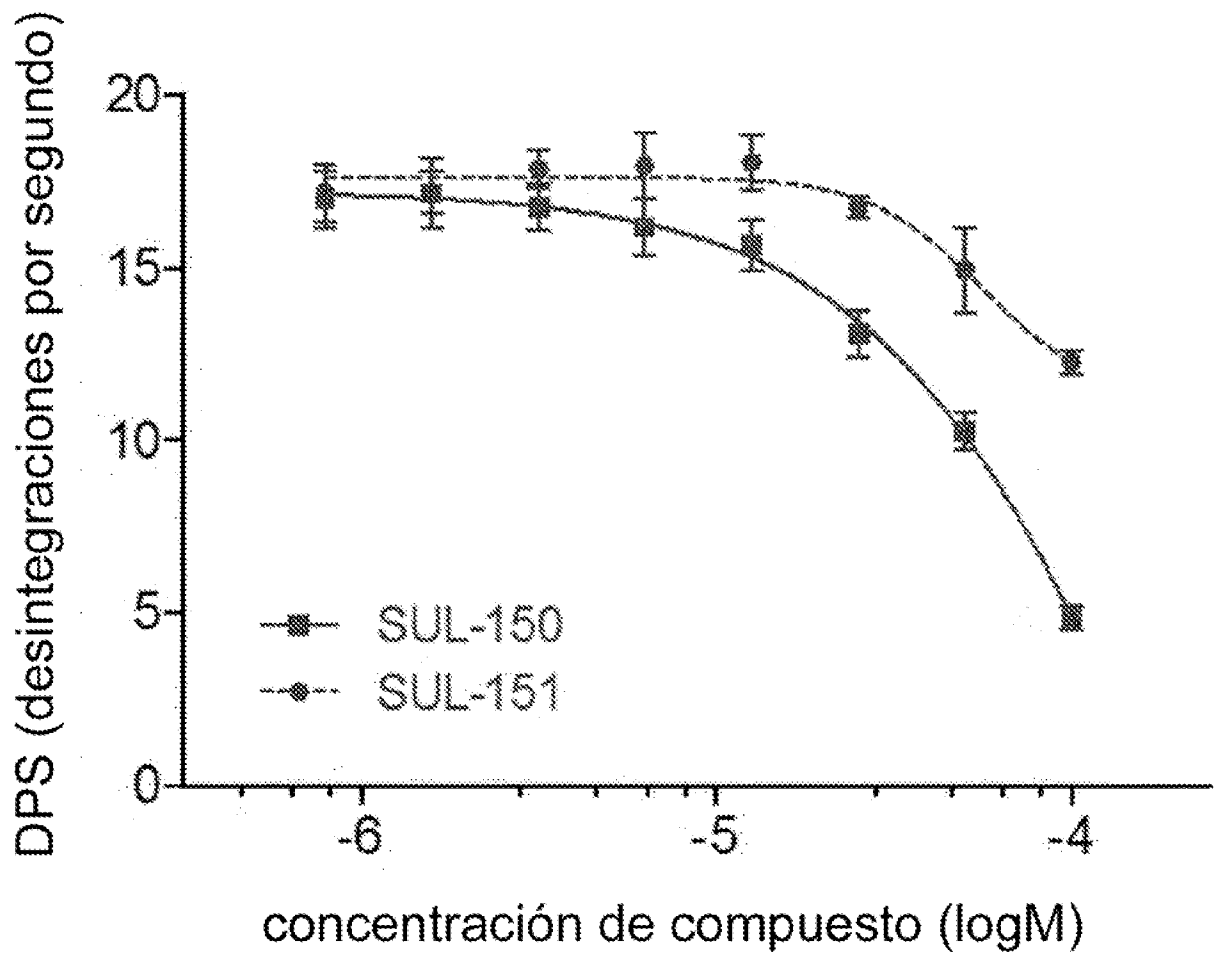


Figura 6

