

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 119 614**

② Número de solicitud: 9500272

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 45/06
A61K 45/08

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **08.02.95**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.98**

Fecha de concesión: **26.05.99**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.99**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.07.99

⑦ Titular/es: **Universidad de Sevilla,
Vicerrectorado de Investigación
y Transferencia Tecnológica
Valparaiso, 5, 2º
41013 Sevilla, ES**

⑦ Inventor/es: **López Barneo, José;
Ureña López, Juan;
Franco Obregón, Alfredo;
Castellano Orozco, Antonio;
Montoro Laseca, Rafael;
Molina Pachón, Antonio y
Ortega Saenz, Patricia**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Utilización en composiciones farmacológicas de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia.**

⑤ Resumen:

Utilización en composiciones farmacológicas de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia.

Se propone como nueva la utilización en preparados farmacológicos de agentes reductores, y en general aquellos que produzcan hipoxia, que bien solos, o unidos por mezcla física o ligamiento químico a sustancias que los vehiculicen y dirijan hacia sus dianas, y especialmente a antagonistas del calcio (tales como nifedipina, diltiazem o verapamil), interaccionen con los canales de calcio de la membrana celular y produzcan una disminución de la entrada del catión Ca²⁺ al interior de las células. Es de destacar la acción de estos agentes sobre los canales de calcio de la fibra muscular lisa, donde producen disminución del flujo del catión al citosol y, por lo tanto, relajación.

Es de aplicación en la industria farmacéutica y en clínica, para la elaboración de composiciones farmacológicas para el tratamiento de situaciones patológicas debidas a un aumento de la contractilidad de la fibra muscular lisa, como por ejemplo hipotensores (por relajación del músculo liso arterial) o inhibidores de la motilidad intestinal o uterina.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Utilización en composiciones farmacológicas de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia.

Objeto de la invención

La invención se refiere a la posibilidad de generar una preparación farmacológica formada a base de agentes reductores que bien solos, o unidos por mezcla física o ligamiento químico a sustancias que los vehiculen y dirijan hacia sus dianas y especialmente a antagonistas del calcio (tales como nifedipina, diltiazem o verapamil), interaccionen con los canales de calcio de la membrana celular y produzcan disminución de la entrada del catión Ca^{2+} al interior de las células. Esta acción podría tener consecuencias biológicas muy diversas, destacándose su acción sobre los canales de calcio de la fibra muscular lisa donde producen disminución del flujo de este ión al citosol y, por lo tanto, relajación. Al conseguir relajación de la fibra muscular con esta nueva formulación (hipoxia gaseosa o química y agentes reductores solos o junto a antagonistas de canales de calcio) se podrán modificar situaciones patológicas que se deban a un aumento de la contractilidad de la fibra muscular lisa. Por ejemplo, estos preparados podrían actuar como hipotensores (al relajar el músculo liso arterial) o como inhibidores de la motilidad intestinal o uterina.

Estado de la técnica

Está bien demostrado que gran cantidad de funciones celulares, como la secreción o la motilidad, dependen de la entrada de calcio desde el exterior al citosol a través de canales selectivos de la membrana plasmática. Dentro de las diferentes funciones dependientes de la entrada de calcio destaca, por su participación en numerosas situaciones fisiopatológicas de gran prevalencia en la población, la contracción de la fibra muscular lisa, tanto visceral como vascular. Estas células necesitan para su contracción un aumento en la concentración citosólica de calcio iónico (Ca^{2+}). Los agentes que producen contracción de las fibras musculares lisas actúan por lo tanto aumentando el calcio citosólico, liberando el catión desde almacenes intracelulares o favoreciendo su entrada desde el exterior a través de canales iónicos.

Los fármacos que disminuyen la concentración de calcio citosólico producen inhibición de la contractilidad de la fibra muscular lisa. Este efecto tiene utilidad en diferentes situaciones fisiopatológicas que afectan al músculo liso visceral, pero es de importancia especial en el músculo liso vascular. En todos los lechos vasculares el aumento de calcio citosólico da lugar a contracción de la fibra muscular lisa, lo que produce hipertensión y disminución del riego en tejidos específicos. De hecho, las sustancias fisiológicas con mayor actividad hipertensora, como por ejemplo la angiotensina II, producen un aumento muy fuerte en el calcio iónico del citosol. Como agentes antihipertensivos y vasorelajantes se usan fármacos que inhiben la síntesis de angiotensina II (inhibidores del enzima conversor de angiotensina) o que disminuyen de forma directa la entrada de calcio a la célula muscular. A este segundo grupo pertenecen los llamados antagonistas del calcio como,

entre otros, diltiazem, verapamil y dihidropiridinas (nifedipina, nisoldipina, nimodipina, etc). Además de los agentes que actúan directamente sobre la fibra muscular lisa, existen factores producidos por las células endoteliales que se liberan en diferentes condiciones y que actuando sobre las fibras lisas regulan el tono vascular. De estos agentes destaca el óxido nítrico, potente vasodilatador que, a través de mecanismos todavía no del todo bien conocidos, inhibe la entrada de calcio a las células musculares de la pared vascular.

En tejidos hipóxicos se sabe que se produce una vasorelajación reactiva encaminada a que se favorezca la irrigación. Este proceso, que se observa utilizando arterias desnudas (a las que se ha extraído la pared endotelial), se supone está producido porque la falta de O_2 , altera la homeostasis de Ca^{2+} en la fibra muscular lisa. Sin embargo, no se conoce ningún proceso regulado por O_2 en miocitos arteriales que pudiese explicar este fenómeno. En otras células, como por ejemplo en las células glámicas, hemos demostrado que existen canales iónicos de K^+ regulados por O_2 (López-Barneo et al., 1988). La presente invención se basa en la existencia en la fibra muscular lisa de canales de calcio regulados por oxígeno que se inhiben por hipoxia o por agentes reductores. Estos canales explican el efecto dilatador de la hipoxia tisular y, de este modo, se abre la posibilidad a que la hipoxia y los agentes reductores (solos o junto a inhibidores de canales de calcio, bien separados o en la misma molécula) se utilicen como fármacos relajantes del músculo liso en general y como fármacos vasodilatadores y antihipertensivos, en particular.

Descripción general

1. *Descripción experimental de la inhibición de la corriente de calcio por la hipoxia.*

La observación experimental que condujo a la invención que aquí se describe está ilustrada en la figura 1. En miocitos dispersos enzimáticamente se registraron las corrientes de calcio utilizando la configuración en "célula completa" de la técnica de "patch-clamp" (Hamill et al., 1981). Los métodos de dispersión de células y de registro electrofisiológico, se explican con detalle en publicaciones previas (López-Barneo, 1991). En la Fig. 1A se muestran corrientes de calcio registradas durante pulsos de despolarización desde -80 mV hasta +10 mV en un miocito, de la arteria celiaca de rata bañado en una solución extracelular normóxica ($\text{PO}_2=150$ mm Hg), durante la exposición a una solución de igual composición iónica pero equilibrada con una concentración baja de O_2 ($\text{PO}_2 < 70$ mm Hg) y tras reintroducir la solución control en la cámara. Los registros demuestran que la amplitud de la corriente (medida al final del pulso) se inhibe aproximadamente un 40%. La relación entre la amplitud de la corriente y la PO_2 se ilustra en la Fig. 1B, donde los valores de la corriente máxima (círculos negros) muestran que las modificaciones en la amplitud de la corriente ocurren con un curso temporal parecido a los cambios en la PO_2 y que este efecto es particularmente aparente por debajo de los 70-80 mm Hg. Experimentos parecidos se han realizado en miocitos de la arteria femoral con idénticos resultados. En resumen, estos datos indican que

la corriente de calcio, tanto en arterias viscerales (como la celiaca) como en arterias musculares (como la femoral), se inhibe reversiblemente cuando la PO_2 baja a niveles parecidos a los que se pueden alcanzar en tejidos periféricos en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas.

2. Descripción experimental de la inhibición del calcio citosólico por hipoxia y agentes reductores.

Si la hipoxia produce una disminución en la amplitud de la corriente de calcio, es de esperar que esto se traduzca en una disminución del calcio citosólico y en la contracción. El efecto de la hipoxia sobre el calcio citosólico se estimó directamente por los cambios en la intensidad de fluorescencia emitida por Fura-2 que en su forma ester se introdujo previamente dentro de las células. Los detalles de esta metodología están descritos en multitud de publicaciones (ver por ejemplo Toledo-Aral et al., 1993). En la mayoría de los miocitos estudiados la concentración basal de Ca citosólico estimada con esta técnica es de aproximadamente 30-40 nM y la estimulación con un agonista purinérgico (1 mM trifosfato de adenosina), induce la génesis de oscilaciones de Ca^{2+} citosólico. Estas oscilaciones se han descrito en varios tipos celulares y en el músculo liso pueden mediar la contratilidad rítmica de las células (Blatter y Wier, 1992). En miocitos dispersos de la arteria pulmonar, que tienen mayor densidad de canales de calcio dependientes de potencial que en arterias sistémicas, las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico se observan espontáneamente. Un ejemplo típico de oscilaciones de Ca^{2+} generadas en un miocito de la arteria celiaca se ilustra en la Fig. 2A, donde se aprecia claramente que estas oscilaciones disminuyen en amplitud y frecuencia de forma reversible durante la exposición a una solución hipóxica.

En la misma figura se muestra el registro de un electrodo de O_2 localizado en la cámara de registro. Se sabe que las oscilaciones de Ca^{2+} se deben fundamentalmente a la liberación de calcio de almacenes intracelulares pero que éstas requieren para su mantenimiento el flujo transmembranario intermitente de iones Ca^{2+} . De acuerdo con esta idea la despolarización de las células con una solución que contenía alto K^+ externo da lugar a un incremento en la frecuencia de las oscilaciones hasta que se alcanza un aumento mantenido de Ca^{2+} intracelular (Fig. 2B). El efecto contrario (disminución o supresión de las oscilaciones) se observa cuando se retira el calcio del medio intracelular (Fig. 2C) o se bloquea su entrada por canales dependientes de potencial con nifedipina (Fig. 2D).

Los datos mostrados en el párrafo anterior indican que la disminución en la PO_2 produce su acción relajante disminuyendo el calcio intracelular y que este efecto es el resultado de la inhibición de canales de Ca^{2+} dependientes de potencial que se describió anteriormente. Hemos comprobado experimentalmente que la hipoxia no afecta a la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares producida por cafeína (10 mM) o noradrenalina (3 mM) ni evita el llenado de almacenes intracelulares que se deplecionaron previamente con cafeína. De acuerdo con esta idea, la Fig. 3A

muestra que en miocitos donde la concentración de Ca^{2+} era relativamente alta (y como se mostró en la Fig. 2B las oscilaciones están ausentes o son de poca amplitud) el efecto de la hipoxia es una disminución de los niveles basales de Ca^{2+} lo que determina la aparición de oscilaciones de mayor amplitud. En términos mecánicos, el efecto de la hipoxia en estos casos es probablemente el paso de una contracción contenida a contracciones intermitentes.

Los mecanismos moleculares por los que la hipoxia produce inhibición de los canales de Ca^{2+} no se conocen con detalle, pero experimentos en nuestro laboratorio sugieren que este efecto se debe a la reducción de dominios específicos de la molécula. En experimentos recientes hemos observado que los agentes reductores externos inhiben también la amplitud de la corriente de calcio en miocitos. Este efecto se ilustra en la Fig. 3B donde en condiciones normióxicas y con un pH constante de 7.4, un agente reductor como el ácido ascórbico (1 mM) produce una disminución drástica de la concentración de Ca^{2+} intracelular en un miocito. Un efecto similar al de la hipoxia (Fig. 3A).

En resumen, existen canales de calcio regulados por oxígeno en los miocitos arteriales. En esta Memoria se describe por vez primera que estos canales se inhiben por la hipoxia o agentes reductores y que este efecto se traduce en disminución de la concentración promedio de calcio citosólico, lo que media la relajación arterial en respuesta a la hipoxia. Los agentes reductores tienen por lo tanto un efecto relajante del músculo liso y potencian considerablemente la acción sobre este tipo de células más que los bloqueantes clásicos de canales de calcio.

Descripción detallada y modo de realización

A continuación se describe una aplicación de la invención como relajante de músculo liso vascular, mediante dos ejemplos realizados sobre cilindros de arterias intactas, que deben entenderse no tienen carácter limitativo de la misma.

Ejemplo 1

Se utilizaron 5 conejos albinos de 1,5-2 kg de peso a los que bajo anestesia con pentobarbital (i.v. 40 mg/kg de peso) se extrajeron aproximadamente 10 mm de arteria celiaca o femoral. Tras la extracción los vasos se colocaron inmediatamente en suero fisiológico, se limpiaron de grasa y tejido adherente y se cortaron en secciones cilíndricas de aproximadamente 3 mm de longitud. Para la realización de los experimentos las secciones se montaron en baños de órganos individuales de 10 ml entre alambres de tungsteno de unos 80 Mm de diámetro los cuales se conectaron a transductores de fuerza. Se mantuvieron a una tensión de reposo de aproximadamente 1,5-2,0 g. Los cilindros de arterias estaban bañados en una solución externa con la siguiente composición (en milimoles/litro): 140 ClNa, 4 ClK, 1 Cl_2Mg , 2,5 Cl_2Ca , 5 glucosa, 5 Hepes, a un pH de 7.4. Esta solución se burbujeó bien con aire o con mezclas de aire y nitrógeno hasta alcanzar presiones de oxígeno variables. La presión parcial de oxígeno en la vecindad del trozo de músculo se

medió con un electrodo de O₂ fabricado en nuestro laboratorio (Ganformina y López-Bameo, 1992). Se realizaron medidas de tensión en la solución externa control, tras añadir a ésta noradrenalina (NA; 0,3-1 μ M) para contraer las fibras o después de añadir una solución con una alta concentración de K⁺ (40K; 40 mM ClNa se cambiaron por la misma cantidad de ClK). La NA es un agente que se sabe produce contracción por apertura de canales de calcio de la membrana y entrada de calcio además de por liberación de calcio de almacenes intracelulares. El alto K⁺ externo produce contracción por despolarización de la membrana, apertura de canales de calcio y por entrada del catión desde el medio extracelular. Estas soluciones de prueba se utilizaron bien normóxicas (con una PO₂ de aproximadamente 150 mm Hg) o hipóxicas (con PO₂ de aproximadamente 20-30 mm Hg). Los valores de tensión en las diferentes condiciones experimentales se dan como media \pm desviación estándar.

En condiciones normóxicas la NA produjo contracciones que llegaron de los 1,5-2 g iniciales a 6,8 \pm 0,4 g (n=20) y 7,2 \pm 0,8 g (n=16) en las arterias celiaca y femoral respectivamente. En presencia de una solución externa con baja PO₂, se observó una disminución reversible de las contracciones provocadas por la NA que fue muy aparente cuando la PO₂ era inferior a 40-50 mm Hg. En estas condiciones la reducción de las contracciones fue en ambas arterias de un 30% del valor registrado en normoxia. En ausencia de calcio extracelular, las contracciones producidas por la NA eran muy débiles (no superiores a 2,5 g) y la hipoxia no tuvo efecto sobre éstas. Una acción parecida a la hipoxia tenían los agentes reductores que se han estudiado (ácida ascórbico 0,5 mM y ditiotreitól 0,2 mM) los cuales en condiciones normóxicas redujeron las contracciones evocadas por la NA en ambos tipos de arterias en un 20-25%.

Un efecto parecido al de la NA tiene la administración de una solución externa con una alta concentración de K⁺ (40 mM). En condiciones normóxicas la solución 40K da lugar a contracciones de 9,2 \pm 1 g (n=20) y 12,4 \pm 1,3 g (n= 14) en las arterias celiaca y femoral, respectivamente. Estas contracciones desaparecen totalmente en ausencia de calcio extracelular. En ambos tipos de arterias el tratamiento con 40K en presencia de hipoxia (PO₂ por debajo de 40 mm Hg) produjo disminución hasta un 20-25% en las contracciones en ambos tipos de arterias. Un efecto cuantitativamente similar al de la hipoxia tuvieron los agentes reductores indicados anteriormente.

Estas experiencias en la arteria completa muestran que una composición farmacológica conteniendo agentes reductores, captadores de oxígeno o simplemente la hipoxia, son potentes relajantes de las arterias contraídas previamente bien con noradrenalina o con alto K⁺ externo. Este efecto es por interacción con los canales de calcio de la membrana celular como se mostró por los experimentos en células aisladas descritos en párrafos anteriores.

Ejemplo 2

En el segundo tipo de experiencias en cilindros de arterias completas lo que se ha estudiado

han sido los efectos de los antagonistas del calcio (verapamil, 5-10 μ M y nifedipina 2 μ M) sobre las contracturas evocadas por NA y por 40K en presencia o ausencia de hipoxia y agentes reductores. La metodología utilizada fue la indicada anteriormente y los agentes se añadieron a la solución externa.

En condiciones normóxicas tanto el verapamil como la nifedipina redujeron de forma marcada las contracciones producidas por alto K⁺ extracelular a menos del 30% del valor inicial en los dos tipos de arterias utilizadas (ver valores en la experiencia anterior). Este efecto fue marcadamente potenciado por la hipoxia y con PO₂ inferiores a 50 mmHg las contracciones se abolieron casi completamente. Un efecto similar a la hipoxia tuvieron los agentes reductores. Los antagonistas del calcio (verapamil y nifedipina) tuvieron sin embargo un efecto menos potente sobre las contracciones producidas por NA, con una disminución a valores entre el 70-80% de los medidos en situación control. En estas condiciones la hipoxia o los agentes reductores tuvieron un efecto aditivo al de los antagonistas del calcio disminuyendo las contracciones evocadas por NA hasta valores por debajo del 50% del valor inicial.

En conclusión, una composición farmacológica con agentes reductores y captadores de oxígeno o la hipoxia son potenciadores de la acción relajante de los bloqueantes de canales de calcio de la membrana celular. El efecto combinado de estos dos tipos de agentes (reductores y antagonistas del calcio) es muy eficaz en las contracturas producidas por alto K⁺, debidas a la despolarización de la membrana y a la apertura de canales de calcio. Aunque cualitativamente similar, el efecto combinado de estos agentes es menos potente en el caso de las contracciones producidas por NA donde además de la entrada de calcio del exterior, existe un componente (no influenciado por la hipoxia) de liberación de calcio de almacenes intracelulares.

Desarrollo inmediato y campo de aplicación de la invención

Tras la observación a nivel celular y de arteria completa descritas en la presente Memoria es necesaria una fase de investigación y desarrollo que determine la composición definitiva de la fórmula a utilizar como posible medicamento o fármaco. Además de por disolución de un gas inerte como el nitrógeno que desplace al oxígeno, un estado hipóxico puede obtenerse químicamente por el uso de los llamados captadores de oxígeno ("oxygen scavengers"), compuestos que, como el ditiotio-nito, se unen al O₂ y disminuyen su concentración efectiva en el líquido extracelular. Como agentes reductores químicos se pueden utilizar el ácido ascórbico ya citado, el glutatión reducido, ditiotreitól, acetil cisteína u otros. Proponemos el uso de estos agentes junto a antagonistas de canales de calcio (diltiazem, dihidropiridinas, verapamil) que ya se usan en la clínica. Con esta asociación se conseguirá reducir la dosis de antagonistas de calcio y, manteniendo el mismo poder terapéutico, evitar en gran medida los efectos secundarios. Los agentes reductores podrían mezclarse a los antagonistas del calcio en cápsulas o comprimidos, sin embargo una posibilidad en principio muy atrac-

tiva es unir químicamente ambos tipos de efectos. Se proponen como posibilidades, no únicas, bien el desarrollo de moléculas dihidropiridínicas que tengan un grupo químico reducido o el de moléculas compuestas por un grupo activo antagonista del calcio (por ejemplo dihidropiridinas) ligado químicamente a otro reductor. En cualquiera de estos dos casos el dominio "antagonista del calcio" u otra molécula que no tiene necesariamente que exhibir actividad antagonista del calcio se unirá con alta afinidad a los canales de calcio y transportaría hasta ellos la molécula reductora que entonces podría actuar localmente con mucha mayor eficacia. Es decir, el grupo "antagonista del calcio" o un ligando específico de canales de calcio sin acción terapéutica vehiculiza y dirige al grupo "reductor o captador de O₂"

Descripción de los dibujos

Figura 1:

- A) Inhibición de los canales de calcio dependientes de potencial por la disminución de la PO₂, A. Corrientes de calcio macroscópicas registradas en un miocito disperso de la arteria celíaca durante despolarizaciones de 15 ms desde -80 mV hasta +10 mV. El cambio de solución externa normóxica con una PO₂ de 150 mm Hg (trazado 1) a otra hipóxica equilibrada con una PO₂ de 20 mmHg (trazados 2 y 3) produce una disminución de la amplitud de la corriente. La reversibilidad al volver a la solución normóxica se ilustra por el trazado 4.
- B) Paralelismo en el curso temporal de los cambios de PO₂ en la cámara de registro y la disminución en la amplitud de la corriente. Los tiempos a los que se obtuvieron los trazados de la parte A de la figura se indican con el número correspondiente. La amplitud de la corriente se midió inmediatamente antes de la terminación del pulso de potencial. Las soluciones de registro contenían (en mM):
- ⇒ Externa: 140 ClNa, 2.7 ClK, 10 Cl₂Ba, 10 Hepes, pH 7.4.
- ⇒ Interna (solución en el interior de la pi-

meta de registro y en la célula): 100 ClCs, 25 FCs, 2 Cl₂Mg, 10 HEPES, 10 EGTA, 5 BAPTA, 4 MgATP, pH 7.3).

5 Figura 2:

- A) Medida simultánea de la concentración de O₂ en la cámara de registro (tensión de O₂ y de los cambios en la concentración de Ca²⁺ citosólico en un miocito de la arteria celíaca cargado con Fura-2. Nótese que las oscilaciones de calcio disminuyen en frecuencia y amplitud conforme se alcanzan tensiones de O₂ bajas.
- B) Aumento reversible en la frecuencia de las oscilaciones de Ca²⁺ en respuesta a la despolarización de la célula con una solución externa con 60 mM K⁺.
- C y D) Supresión de las oscilaciones al retirar el calcio extracelular o quelarlo con EGTA (C) y tras bloquear los canales de calcio dependientes de potencial con nifedipina (D). La aplicación de las diferentes soluciones se indica por las barras horizontales. La solución externa de registro contenía (en mM): 140 ClNa, 2.7 ClK, 2.5 Cl₂Ca, 1 Cl₂Mg, 10 HEPES, pH 7.35-7.40. La solución con 60 K⁺ contenía 82.7 mM ClNa y 60 mM ClK. La nifedipina (0.5 μM) se añadió a la solución externa. La solución con 0 Ca²⁺ y EGTA contenía 4 mM Cl₂Mg y 0.5 mM EGTA.

35 Figura 3:

- A) Experimento similar al que se ilustra en la Fig. 2A en un miocito de la arteria pulmonar (tronco principal) que tenía una concentración basal de calcio relativamente alta. El período de administración de la hipoxia se indica por el área sombreada.
- B) Experimento similar realizado en otro miocito durante la aplicación de un agente reductor como el ácido ascórbico (1 mM).

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia para la elaboración de composiciones farmacológicas de acción relajante sobre la fibra muscular lisa, **caracterizada** porque dichos agentes tienen la capacidad de disminuir la concentración tisular de oxígeno, lo que se traduce en una inhibición de la actividad de los canales del calcio en músculo liso.

2. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicación 1, **caracterizada** porque la inhibición de los canales del calcio está mediada por agentes reductores.

3. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicación 1, **caracterizada** porque la inhibición de los canales del calcio está mediada por agentes químicos captadores de oxígeno.

4. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicación 1, **caracterizada** porque la inhibición de los canales del calcio se encuentra potenciada por la asociación de agentes reductores y/o captadores de oxígeno con otras sustancias que inhiben la entrada del calcio al interior de la célula, especialmente antagonistas del calcio.

5. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicación 4, **caracterizada** porque la asociación es por diseño de una molécula antagonista del calcio a la que

se modifica un grupo funcional en estado químico reducido.

6. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicación 4, **caracterizada** porque la asociación es por diseño de una molécula antagonista del calcio ligada por cualquier método químico a una molécula reductora y/o a un captador de oxígeno.

7. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicación 4, **caracterizada** porque la asociación se produce con un compuesto que es un ligando de canales del calcio con alta afinidad sin acción farmacológica pero que sirve para vehicular y dirigir hasta su diana al agente reductor y/o captador de oxígeno.

8. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicaciones 2 a 7, **caracterizada** porque el agente reductor es uno de los siguientes compuestos: ácido ascórbico, ditiotreitól, glutatión reducido, acetil cisteína.

9. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicaciones 3 a 7, **caracterizada** porque el agente captador de oxígeno es ditionito.

10. Utilización de agentes con efecto reductor o inductor de hipoxia, según reivindicaciones 4 a 7, **caracterizada** porque el antagonista del calcio está seleccionado del grupo compuesto por: diltiazem, verapamil, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, flunaridipina y/o derivados de los mismos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

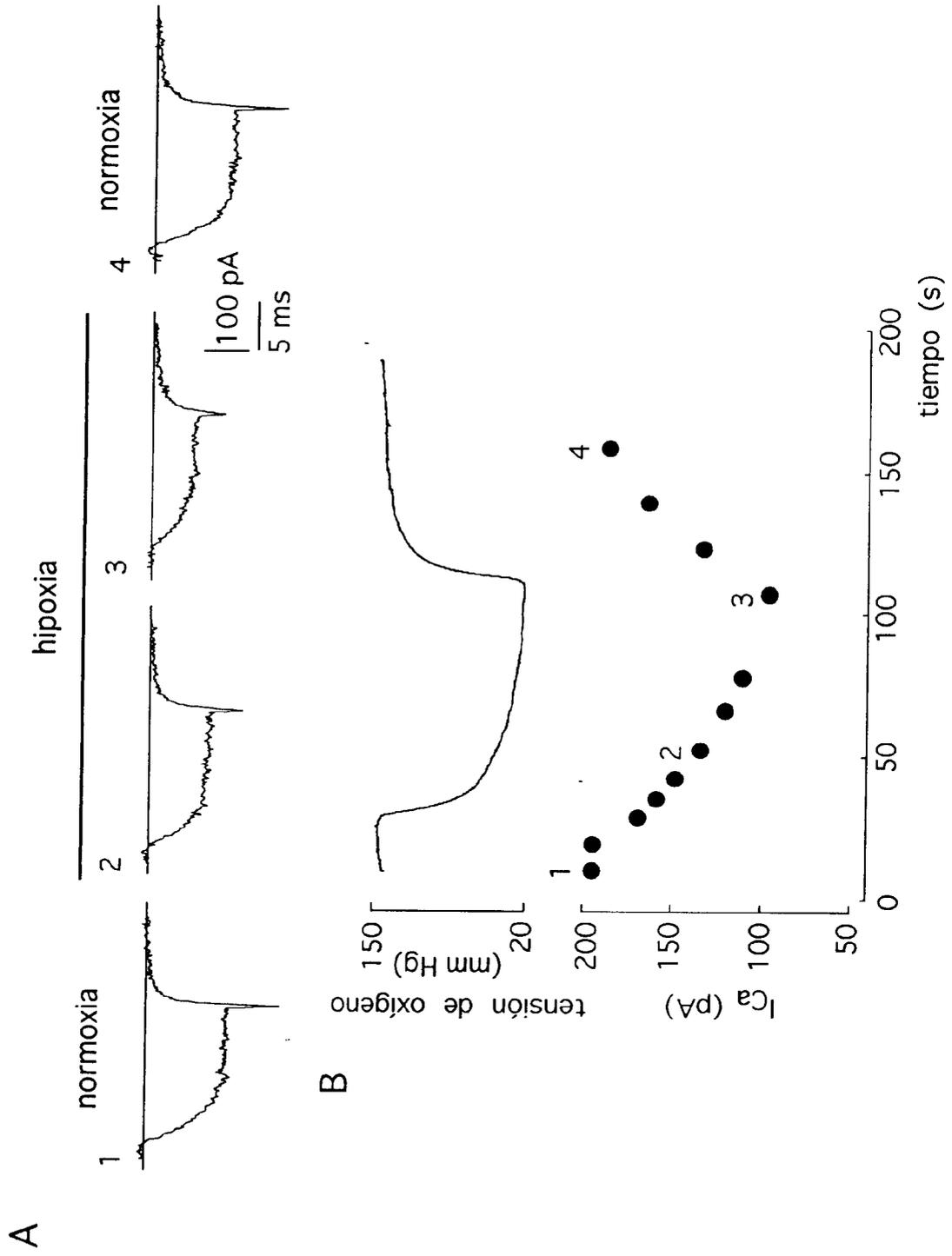


Figura 2

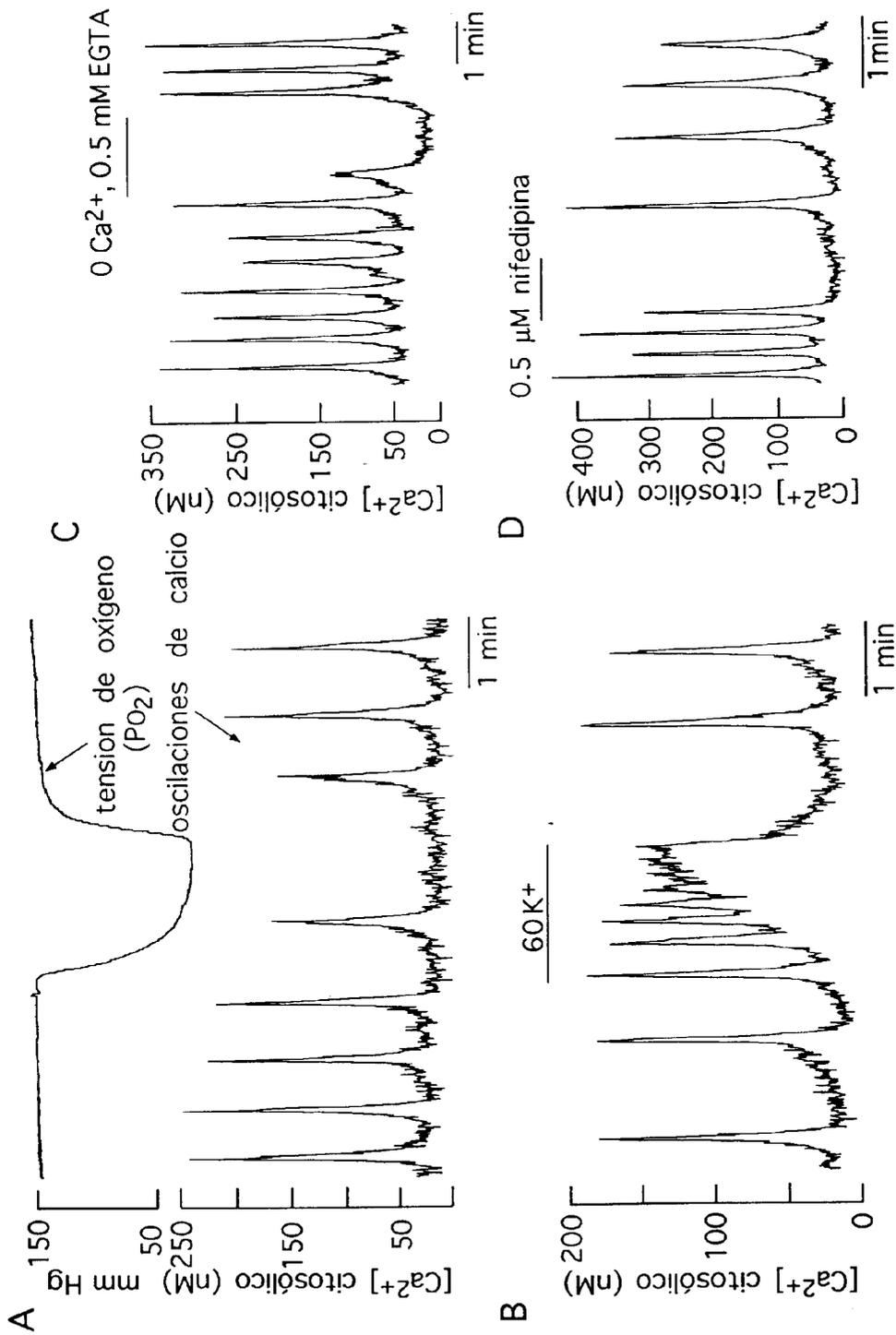
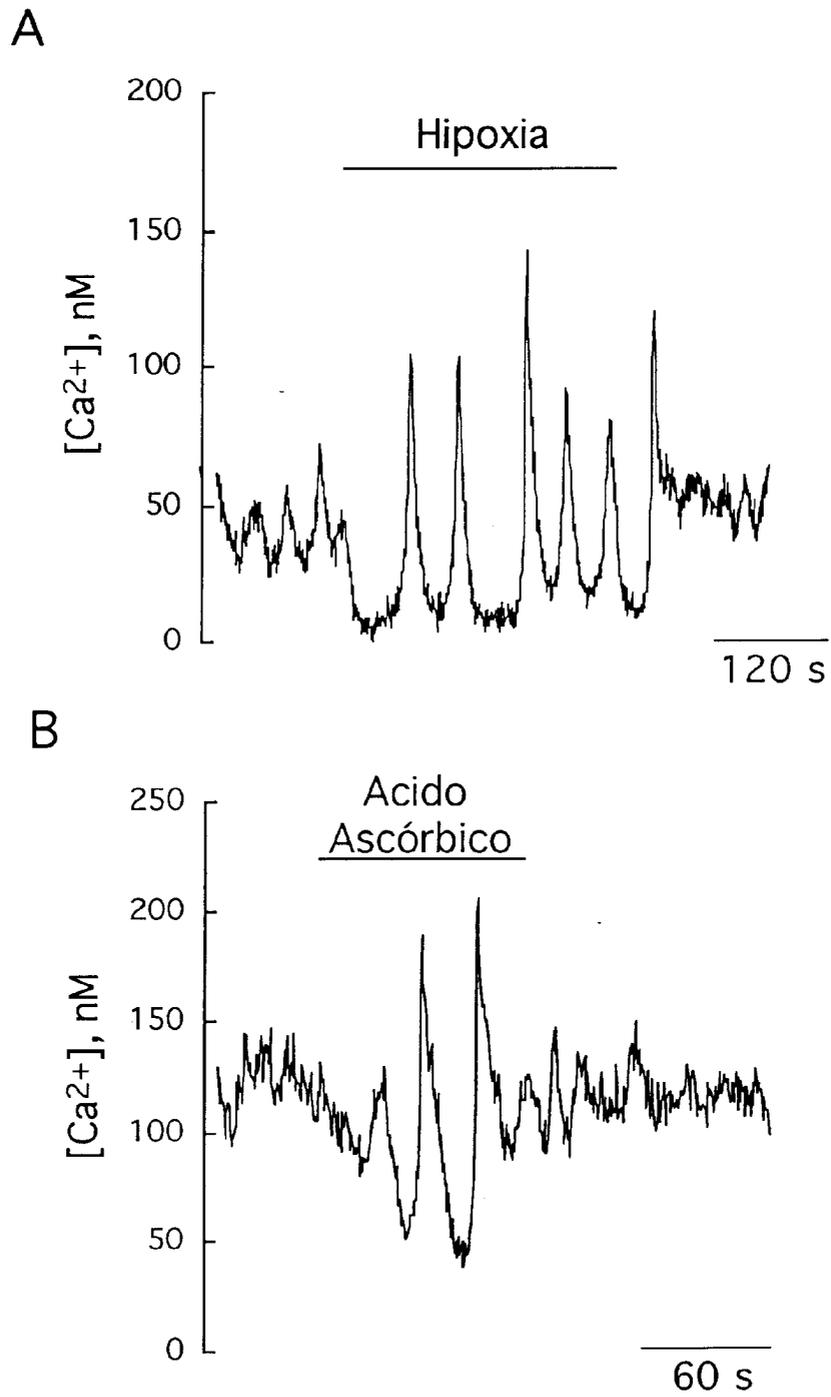


Figura 3





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A61K 45/06, 45/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-4080448-A (MIRSKY) 21.03.1978 * Reivindicación 1; resumen *	1-10
A	EP-39130-A (BETZ EUROPE INC) 04.11.1981 * Resumen *	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

17.08.98

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/1