



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 568**

51 Int. Cl.:
A61K 31/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99900531 .7**

96 Fecha de presentación : **14.01.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1047413**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2000**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende un inhibidor específico de la aminopeptidasa A, en particular el EC33, para disminuir la presión arterial.**

30 Prioridad: **16.01.1998 FR 98 00453**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

73 Titular/es: **Institut National de la Sante et de la
Recherche Medicale (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR
Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS)**

72 Inventor/es: **Llorens-Cortes, Catherine;
Corvol, Pierre;
Fournie-Zaluski, Marie-Claude y
Roques, Bernard, Pierre**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 367 568 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

Composición farmacéutica que comprende un inhibidor específico de la aminopeptidasa A, en particular el EC33, para disminuir la presión arterial.

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento en particular de los trastornos relacionados con una hipertensión arterial.

10 La hipertensión arterial es una enfermedad cuyas causas son todavía desconocidas. Sin embargo, se sabe que el sistema nervioso central desempeña un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular controlando al mismo tiempo la actividad del sistema nervioso simpático autónomo y de baro-reflejo así como la liberación de hormonas hipofisarias.

15 Asimismo, unas investigaciones clínicas y experimentales sugieren que la actividad del sistema nervioso central y de los nervios simpáticos periféricos participa en la génesis de la hipertensión arterial.

20 Se ha demostrado asimismo que un sistema renina-angiotensina existía además en el sistema nervioso central. Parece que éste controla las funciones cardiovasculares y la homeostasia de los fluidos corporales. Todos los componentes del sistema renina-angiotensina sistémica, incluyendo los precursores y las enzimas necesarios para la formación y a la degradación de las angiotensinas, así como los receptores de angiotensina ya han sido identificados en el interior del cerebro.

25 En el sistema renina-angiotensina sistémico, se sabe en particular que la angiotensina II se genera bajo la acción de una enzima esencialmente membranaria que pertenece al grupo de las metaloproteasas de zinc. Esta ectopeptidasa se conoce con el nombre de enzima de conversión de la angiotensina (ECA) puesto que transforma el péptido inactivo angiotensina I en angiotensina II.

30 Se observa que esta angiotensina II se transforma *in vivo* en angiotensina III (AngIII) bajo la acción de otra ectopeptidasa de zinc, recientemente clonada, la aminopeptidasa A (APA), que elimina el residuo aspartilo N-terminal de la angiotensina II para conducir a la angiotensina III. Esta angiotensina III es destruida a su vez por diversas peptidasas incluyendo en particular la aminopeptidasa N (APN).

35 Estas dos ectopeptidasas de zinc, APA y APN pertenecen al grupo de enzimas de tipo termolisina y poseen una homología significativa entre sus secuencias de aminoácidos.

40 Se ha demostrado que la inhibición de la enzima de conversión de la angiotensina I en angiotensina II, ECA, presente en el sistema renina-angiotensina sistémico, conduce a través de un bloqueo de la formación de la angiotensina II, a una disminución de la presión arterial, particularmente sensible en las personas que padecen hipertensión. Se observa que estos inhibidores bloquean la ECA periférica al mismo tiempo en la circulación y sobre todo en numerosos tejidos; endotelio vascular, pulmón, riñón, etc.

En consecuencia, hasta ahora se había propuesto que la angiotensina II era el mediador principal del sistema renina-angiotensina cerebral por analogía con el sistema periférico.

45 El artículo Zini *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11968-11973, 1996) ha mostrado la implicación de la aminopeptidasa A, *in vivo*, en el metabolismo de la angiotensina II cerebral.

50 El artículo Song *et al.* (Brain Research, 744: 1-6, 1997) ha descrito el efecto de un antisuero anti-APA y anti-APN sobre el efecto prensador inducido por la administración intracerebroventricular de angiotensina II exógena.

55 De hecho, al contrario de lo que se admitía, parece ser que en el sistema renina-angiotensina cerebral, la etapa crítica no sería la formación de la angiotensina II por acción de la ECA sobre la angiotensina I sino la formación de la angiotensina III por acción de la APA sobre la angiotensina II. Este papel determinante de la angiotensina III en el sistema renina-angiotensina cerebral se reafirma en particular mediante los resultados que aparecen en el ejemplo 4 siguiente.

60 El conjunto de estos datos tiende por lo tanto a identificar la angiotensina III como el péptido efector del sistema renina-angiotensina cerebral, responsable del aumento de la presión arterial. Más precisamente, en el cerebro, se observa que Ang III ejerce un efecto estimulador tónico sobre el control central de la presión arterial.

65 La presente invención se basa precisamente en la demostración de que la angiotensina III desempeña un papel esencial en el control de la presión arterial a nivel central.

Más particularmente, la presente invención tiene como objetivo proponer una composición farmacéutica que permite disminuir la presión arterial y por lo tanto oponerse a un aumento de la presión inducido por la angiotensina III.

Más precisamente, describe una composición farmacéutica útil para disminuir la presión arterial, caracterizada porque comprende, a título de principio activo, por lo menos un inhibidor selectivo de la aminopeptidasa A.

5 La presente invención reivindica en particular una composición farmacéutica caracterizada porque comprende, a título de principio activo, por lo menos el ácido (S) 3-amino-4-mercaptobutilsulfónico o una de sus sales con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable, para su utilización como medicamento.

La presente invención reivindica asimismo un inhibidor selectivo de la aminopeptidasa A que:

10 - posee una afinidad multiplicada por lo menos por un factor 100 para la aminopeptidasa A en comparación con la aminopeptidasa N, o

- posee un poder inhibidor sobre la aminopeptidasa A *in vitro* inferior o igual a 10^{-7} M,

15 asociado, llegado el caso, a un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su utilización como medicamento para disminuir la presión arterial.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la aminopeptidasa A (APA) es una ectoenzima que pertenece a la familia de las metaloproteasas de zinc y de las cuales la termolisina constituye el modelo bacteriano.

20 La APA es una glicoproteína que se presenta en forma de un homodímero.

La clonación de su ADNc ha revelado que cada monómero está compuesto por un dominio de anclaje que separa un segmento corto citosólico N-terminal de un amplio dominio extracelular C-terminal que contiene el sitio activo incluyendo más particularmente el sitio que liga el zinc.

Ahora bien, se observa que la APA presenta 34% de identidad de secuencia en aminoácidos con la APN, implicada por su parte en la degradación de la angiotensina III. Esta homología es por otra parte la más elevada a nivel precisamente del sitio activo presente en el dominio extracelular glicosilado.

30 Está claro que esta homología de secuencia entre la APA y la APN constituye un hándicap para obtener unos inhibidores específicos y selectivos frente a la APA.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el inhibidor utilizado en la composición descrita es un inhibidor selectivo frente a la APA. Esta selectividad se traduce en particular por una afinidad multiplicada por aproximadamente por lo menos un factor 100 para la APA en comparación con la APN.

Más precisamente, se considera según la presente solicitud como un inhibidor selectivo frente a la APA, una molécula que responde por lo menos a uno de los criterios siguientes:

40 - su poder inhibidor sobre APA *in vitro* es inferior o igual a 10^{-7} M,

45 - presenta un factor de selectividad de aproximadamente 100 con respecto a las enzimas aminopeptidasa N, aminopeptidasa B (EC 3.4.11.6), endopeptidasa neutra (EC 3.4.24.11) y la enzima de conversión de la angiotensina (EC 3.4.15.1),

- inyectada *in vivo* por vía intracerebroventricular o sistémica (si atraviesa la barrera hematoencefálica), bloquea la formación de la angiotensina III.

50 Como inhibidor de la APA que conviene muy particularmente a la invención, se puede citar en particular el ácido (S) 3-amino-4-mercaptobutilsulfónico o una de sus sales con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable.

Tal como se desprende de los ejemplos presentados a continuación, el (S) 3-amino-4-mercaptobutilsulfonato de sodio, designado a continuación con el símbolo EC33, presenta una actividad inhibidora significativa frente a la APA.

55 Este inhibidor presenta ventajosamente un factor de selectividad de 100 con respecto a la aminopeptidasa N.

Inyectado en el ratón por vía intracerebroventricular, a razón de 30 μ g, se observa un aumento significativo de la semi-vida de la angiotensina II (30 μ g), en un factor del orden de 2,6 en comparación con la observada en un animal control. Paralelamente, bloquea totalmente la formación de la angiotensina III a nivel del hipotálamo.

65 Asimismo, unos experimentos realizados en unas ratas normotensas (WKY) o hipertensas (SHR) muestran que la inyección del EC33 permite disminuir significativamente la presión arterial. El efecto hipotensor de este inhibidor de la APA, el EC33, es máximo para una dosis de 100 μ g. Es de -22 mmHg en la rata normotensa y de -28 mmHg en la rata hipertensa. La duración de acción a esta dosis es como media de 40 a 60 minutos.

Estos resultados muestran por lo tanto que la APA, la enzima responsable de la producción de angiotensina III en el sistema nervioso central constituye una nueva diana terapéutica del sistema renina-angiotensina cerebral y que la utilización de un inhibidor de la APA permite reducir significativamente la presión arterial.

5 Las composiciones farmacéuticas reivindicadas pueden eventualmente contener uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos vehículos se seleccionan de manera que constituyan una forma farmacéutica administrable de manera clásica por vía oral, transmucosa, parenteral o rectal.

10 Sus modos de administración, posologías y formas galénicas óptimas pueden ser determinados según los criterios generalmente tenidos en cuenta en el establecimiento de un tratamiento terapéutico adaptado a un paciente, tal como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios observados, etc.

15 En consecuencia, las composiciones según la invención son particularmente interesantes para tratar la hipertensión arterial esencial durante la cual la hiperactividad simpática observada frecuentemente durante la fase precoz está aparentemente mediada por una actividad incrementada del sistema renina-angiotensina cerebral.

20 A título ilustrativo pero no limitativo de los trastornos susceptibles de ser tratados con las composiciones reivindicadas, se pueden citar en particular las insuficiencias cardíaca y renal, los trastornos de la homeostasia hidrodinámica y la reducción de la proteinuria en los diabéticos.

Además, las composiciones según la invención pueden ser ventajosamente utilizadas como complemento de los bloqueantes del sistema renina-angiotensina sistémico.

25 A título representativo de estos bloqueantes, se pueden citar en particular los inhibidores de la enzima de conversión tal como el Enaprilato y los antagonistas de los receptores de la angiotensina II tal como el Losartán.

30 Según una variante de la invención, la composición reivindicada comprende además un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina I o un antagonista de los receptores AT1.

35 Este tipo de bloqueantes del sistema renina-angiotensina sistémico resulta eficaz en unas patologías tales como la hipertensión, la insuficiencia cardíaca congestiva, la disfunción ventricular izquierda después de un infarto de miocardio, pero también en la regresión de la proteinuria en los diabéticos y en la reducción de la progresión de la insuficiencia renal crónica.

Actuando asimismo a nivel del control central de la presión arterial y bloqueando la actividad del sistema renina-angiotensina central a través de su inhibidor de APA, las composiciones reivindicadas serán asimismo eficaces para tratar las infecciones mencionadas anteriormente.

40 La solicitud describe asimismo la utilización de un inhibidor de APA tal como el definido anteriormente, asociado, llegado el caso, a un vehículo farmacéuticamente aceptable, para la preparación de un medicamento útil para disminuir la presión arterial.

45 Puede tratarse, en particular, del ácido (S) 3-amino-4-mercaptobutilsulfónico o una de sus sales farmacéuticamente aceptables con un ácido o una base.

Figuras

50 Figura 1: Evolución a lo largo del tiempo del contenido en AngII tritiada en el hipotálamo murino en presencia o no del EC33.

Figura 2: Representación semilogarítmica de los contenidos en AngII tritiada en el hipotálamo murino en ausencia (control) o en presencia de EC33 (30 µg).

55 Figura 3: Efecto de diferentes dosis de EC33 inyectadas por vía intracerebroventricular sobre la presión arterial en unas ratas SHR y WKY.

Figura 4: Efecto de diferentes dosis de EC33 en términos de duración del efecto sobre la presión arterial en unas ratas SHR y WKY.

60 Figura 5: Efecto prensador de un inhibidor de la APN, el PC18, en las ratas SHR.

Figura 6: Efecto en términos de duración de un inhibidor de la APN, el PC18, sobre la presión arterial, en la rata SHR.

65 Figura 7: Efecto prensador de un inhibidor de la APN, el PC18, en la rata normotensa en presencia de un

antagonista de los receptores angiotensinérgicos de tipo 1, AT1.

Figura 8: Efecto sobre la presión arterial del inhibidor EC33 inyectado por vía intracerebroventricular (i.c.v.) o por vía intravenosa (i.v.) en unas ratas conscientes normotensas (WKY) o espontáneamente hipertensas (SHR).

5

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Compuestos:

10 El EC33, (S)-3-amino-4-mercapto-butanosulfonato de sodio se prepara según los protocolos descritos en Chauvel *et al.* J. Med. Chem. 37, 1339-1346 y 2950-2957.

15 El PC18, metioninatiol es un inhibidor selectivo y de alta afinidad para la APN ($K_i = 9 \text{ nm}$). Se prepara según el protocolo descrito en Fournié-Zaluski *et al.*, J. Med. Chem. 35, 1259-1266.

Las diferentes formas de angiotensina II o III consideradas a continuación están disponibles en las compañías Amersham o Sigma.

B. Animales:

20 Unos ratones machos suizos (disponibles en el Instituto Iffa Credo) de 18 a 20 gramos de peso son mantenidos bajo luz artificial (12 horas en fase iluminada - 12 horas en la penumbra) y disponen de alimentos y de agua *ad libitum*. Los experimentos se realizan entre 9 h y 11 h de la mañana. Las drogas son administradas en el ventrículo lateral por vía intracerebroventricular (i.c.v.) a un porcentaje de 5 μl por ratón según el método de Haley y McCormick (Br. J. Pharmacol. 12, 12-15).

25 Las ratas utilizadas son unas ratas macho Sprague-Dawley, de 200 a 250 gramos de peso, algunas de ellas son unas ratas (SHR) de 11 semanas de edad. Unas ratas normotensas Wistar Kyoto se utilizan asimismo a título de control. Los animales son conservados durante una semana con unos periodos de luminosidad y de penumbra de 12 horas alternadas, y disponen de agua y de alimentos *ad libitum*. Para cada experimento, se pesan las ratas SHR y WKY y se registra su presión arterial y su ritmo cardiaco en continuo por vía invasiva después de la colocación de un catéter (PE 50) en la arteria femoral. El catéter está unido a un sensor de presión (COBE) y conectado a un condicionamiento de señales unido a un amplificador. El sistema informático comprende un sistema de interfaz MacLab y un programa (Chart y Scope) de aplicación que permite la adquisición y el cálculo de los datos por medio de un ordenador Macintosh.

35

C. Modos de administración y métodos de análisis

- Inyección intracerebroventricular

40

Para cada experimento, se utilizan seis a ocho ratones para cada una de las condiciones. Una mezcla de $2 \cdot 10^6$ cpm [^3H]Ang II y 30 μg de Ang II no marcadas se administra en un volumen de 5 μl , conjuntamente o no con el EC33 (30 μg). Los inhibidores se disuelven en una disolución salina isotónica ajustada a un pH de 7,4 con una disolución de NaOH a 0,01 M. En diferentes tiempos después de la inyección, los ratones son decapitados, sus cerebros extraídos y sus hipotálamos disecados sobre hielo y homogeneizados mediante sonicación (ultrasonidos, Anemasse, Francia) en 10 volúmenes de una disolución a 0,1 M de HCl enfriada en hielo. El homogeneizado se centrifuga a razón de 12.000 x g x 20 min. a 4°C y se conserva el sobrenadante a -80°C hasta el análisis.

45

- Separación de las angiotensinas II y III mediante cromatografía intercambiadora de iones

50

Las cantidades respectivas en angiotensinas II y III marcadas presentes en el hipotálamo se determinan según el protocolo de Ledwith *et al.* (Anal. Biochem. 213, 349-355). Para ello, se carga un gel de sefarosa a flujo rápido (1/2 de volumen muerto, Pharmacia) en unas columnas jeringas de 3 ml y equilibrado a temperatura ambiente con 15 ml de un tampón (10 mM de acetato de sodio - 50 mM de NaCl, pH 5,0). Después de haber sido congelados, los extractos de hipotálamos que contienen aproximadamente 30.000 cpm son diluidos en 2 ml de tampón de equilibración, cargados sobre las columnas y lavados con 1 ml de tampón. Una primera fracción (F1) que contiene angiotensina II tritiada y otros metabolitos de la angiotensina II tritiada se eluye con 7 ml de una disolución de 10 mM de acetato de sodio/80 mM de NaCl/5% de acetoniitrilo a pH 5. Una segunda fracción (F2) que contiene angiotensina III tritiada sola se eluye con 3 ml de una disolución HCl 3 M. Las fracciones F1 y F2 son analizadas después mediante HPLC para determinar su contenido respectivo en angiotensina II tritiada y en angiotensina III tritiada.

55

60

- Concentración por paso sobre columna C₁₈Sep-pak[®]

65 En la perspectiva de un análisis HPLC, las fracciones F1 y F2 se concentran inicialmente por extracción sobre un dispositivo C₁₈Sep-pak[®] Cartridges (Waters). Para ello, se añade ácido trifluoroacético (1% a concentración final) a la fracción F1 que se carga a continuación sobre Sep-pak[®], equilibrada previamente con una disolución acuosa en

ácido trifluoroacético al 1%. La fracción radioactiva se eluye con 1,5 ml de acetonitrilo al 100%. En estas condiciones se recuperan 75% de angiotensina II. La fracción F2 se carga sobre Sep-pak[®] equilibrada previamente con 2 ml de una disolución de metanol al 100% seguido por 5 ml de agua. La fracción radioactiva se eluye con 1,5 ml de metanol al 100%. Se recuperan así 92% de angiotensina III. Después de la elución sobre Sep-pak[®], las fracciones F1 y F2 respectivas son liofilizadas, disueltas en 0,2 ml de una disolución de ácido acético a 0,01 M con 20 ng de angiotensina II y de angiotensina III a título de patrón interno y analizadas mediante HPLC.

- Análisis HPLC

El análisis HPLC se lleva a cabo utilizando una columna de fase inversa H Hypersil ODS[®]-3 μm (Shandon, Pittsburgh) calentada a 45°C y después con una elución isocrática a un flujo de 0,6 ml por minuto. La fase móvil consiste en H₃PO₄ 86 mmolar, ajustada a pH 3 con trietilamina, y en 17,5% de acetonitrilo. Después de la inyección de la muestra (0,15 ml), se recogen unas fracciones de 0,10 ml durante 12 minutos. Su contenido en radioactividad se estima mediante un contador beta. En dichas condiciones, los tiempos de retención de las angiotensinas controles son de 9,5 minutos para la angiotensina II y 7,8 minutos para la angiotensina III.

D. Medición de la actividad APA *in vitro*:

La dosificación de la actividad APA se basa en el protocolo de Goldberg adaptado a la escala de dosificación sobre microplacas (Pro BindTM 3915) (Chauvel *et al.*, 1994).

- Principio

En presencia de iones de calcio, *in vitro*, la APA hidroliza la α -L-gultamil- β -naftilamida (Glu β Na) en glutamato y β -naftilamina (β Na). Una reacción de diazotación en medio ácido permite revelar la β -naftilamina mediante la formación de un complejo de color violeta: una medición de espectrofotometría permite conocer entonces la cantidad de complejo formado y, por referencia a una gama patrón realizada con unas concentraciones crecientes de β -naftilamina, deducir de ello la actividad enzimática de la muestra.

- Agentes reactivos

El sustrato Glu β Na y la β -naftilamina (Bachem) son solubilizados en el DMSO (dimetilsulfóxido) y el HCl 0,1 N respectivamente, y conservados a -20°C a la concentración de 10⁻² M. La reacción de diazotación se realiza en presencia de nitrito de sodio (87 mM), de sulfamato de amonio (130 mM) y del dihidrocloruro de N-1-naftil)etilendiamina (23 mM).

- Reacción enzimática

La reacción tiene lugar a pH 4 en tampón Tris-HCl 50 mM, en presencia de calcio (CaCl₂, 4 mM): la muestra a dosificar se incuba a 37°C en presencia de sustrato (Glu β Na, 200 μM) y en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor a ensayar en un volumen final de 100 μl . La reacción se detiene mediante la adición de 10 μl de HCl 3N. Una gama patrón de β -naftilamina en medio ácido (añadir 10 μl de HCl 0,1N) se efectúa en paralelo.

- Revelación del producto formado

Se añaden en cada pocillo:

* 25 μl de nitrito de sodio (mezclar, esperar 5 minutos a temperatura ambiente),

* 50 μl de sulfamato de amonio (agitar, esperar 5 minutos a temperatura ambiente), y después

* 25 μl de dihidrocloruro de N-(1-naftil)etilendiamina 23 mM (mezclar, esperar la estabilización del color violeta aproximadamente 30 minutos a 37°C).

La adsorbancia se mide a continuación a 540 nm.

E. Medición de la actividad APN

El principio de la dosificación se basa en la hidrólisis de la [3H] leu-enkefalina (10 nM) por APN en dos metabolitos, la [3H] Tyr y el tetrapéptido Gly-Gly-Phe-Leu. Cuando se detiene la reacción, el metabolito [3H] se aísla sobre una columna de Porapak y su radioactividad se estima mediante centelleo líquido. La actividad de la APN se estima en fmoles de sustrato hidrolizado/min./mg de proteína.

F. Estimación del poder inhibidor del EC33 y del PC18

El poder inhibidor del EC33 y del PC18 sobre la APA o la APN se estima midiendo la actividad enzimática de la APA o la APN purificadas en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor. A partir de estos datos, la concentración eficaz 50 se calcula según un programa de regresión no lineal de los mínimos cuadrados Graph Pad PRISM™, versión 2), lo cual permite deducir el K_i de estas moléculas según la fórmula siguiente:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

El K_m de la APA para GluβNa es de 100 μM (Vazeux *et al.*, J. Biochem., 1996, vol. 271:9069-9074).

El K_m de la APN para la Leu-enkefalina es de 50 μM (Chauvel *et al.*, J. Med. Chem., 1994, vol. 37:2950-2956).

Ejemplo 1

Ensayo *in vitro* del poder inhibidor del EC33 y del PC18 sobre la APA y la APN

Estos poderes inhibidores son estimados de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo "materiales y métodos".

El EC 33 presenta un K_i de $2,5 \pm 0,6 \cdot 10^{-7}$ M para la APA y un factor de selectividad de aproximadamente 100 con relación a la APN ($25 \pm 11 \cdot 10^{-6}$ M).

El poder inhibidor del PC18 sobre la APN es de $1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-8}$ M, es 1.000 veces menos activo sobre la APA ($11 \pm 1,7 \cdot 10^{-6}$ M).

Ejemplo 2

Efecto *in vitro* del inhibidor EC33 sobre el metabolismo de las angiotensinas cerebrales AngII y AngIII presentes en el hipotálamo murino

Las cinéticas de aparición y de desaparición en el hipotálamo de las angiotensinas II y III radiomarcadas se determinan después de haber inyectado en el ratón por vía intracerebroventricular una cantidad conocida de AngII tritiada ($2 \cdot 10^6$ cpm) con 30 μg de AngII no radioactiva, en presencia o en ausencia del inhibidor (EC33, 30 μg). Los porcentajes de péptidos tritiados en los tejidos son cuantificados según el protocolo descrito en el capítulo "Materiales y métodos" mediante HPLC.

La evolución del contenido en AngII [3 H] en el hipotálamo después de la inyección i.c.v. de AngII [3 H], en ausencia o en presencia del EC33, se indica en la figura 1.

En el ratón control, el contenido en AngII [3 H] disminuye rápidamente después de 1,5 minutos y ya no es detectable más allá de 7 minutos. En presencia del EC33, este contenido en AngII [3 H] está significativamente incrementado entre 0,5 y 7 minutos para alcanzar aproximadamente 11 veces el contenido del ensayo control.

Una representación semilogarítmica del porcentaje de desaparición en contenido de AngII [3 H] en presencia del EC33 con relación al control se presenta en la figura 2.

Se observa que en el animal tratado con EC33, la semi-vida de AngII [3 H] ($5,38 \pm 0,21$ min.) está incrementada en un factor de 2,6 en comparación con la de un animal control.

En el ratón control, la formación de AngII tritiada es máxima a 1 minuto y los porcentajes disminuyen progresivamente hasta 10 minutos. En presencia de EC33, la formación de AngII tritiada está inmediatamente bloqueada y se miden unos porcentajes muy bajos a lo largo de todo el experimento.

Ejemplo 3

Efecto *in vitro* del inhibidor EC33 sobre un aumento de la presión arterial inducido por AngII

Estos experimentos se llevan a cabo en la rata normotensa Wistar Kyoto (WKY) o espontáneamente hipertensa (SHR de 12 semanas de edad).

Los animales son anestesiados con inactina (5-etil-2-(1-metil-propil)-2-tiobarbital), anestésico utilizado regularmente en los experimentos de fisiología renal o cardiovascular. Sus características son la de provocar una disminución muy leve de la presión arterial, visible únicamente en la rata SHR, y sobre todo permitir el

mantenimiento de una presión arterial de base estable a lo largo de todo el experimento.

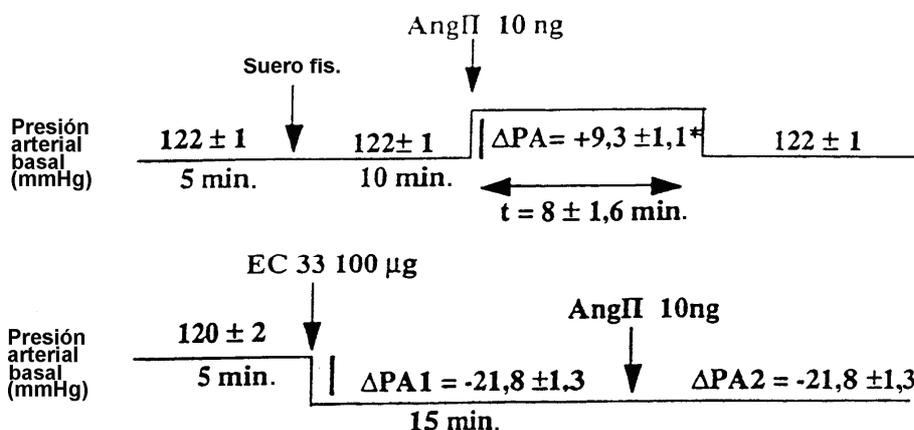
La presión arterial media (sistólica + diastólica) se mide en continuo, por vía invasiva, después del cateterismo de la arteria femoral. Los péptidos o los inhibidores son inyectados por vía intracerebroventricular (i.c.v.) con la ayuda de una cánula dispuesta en el ventrículo lateral, bajo estereotaxia (Atlas Stéréotacique; G. Paxinos y C. Watson, Academic Press, 1986).

Los experimentos se llevan a cabo sobre unos grupos de 4 a 20 animales analizados individualmente. Los resultados sobre unos lotes de animales control y tratados han sido comparados con la ayuda de un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un ensayo de Student no apareado.

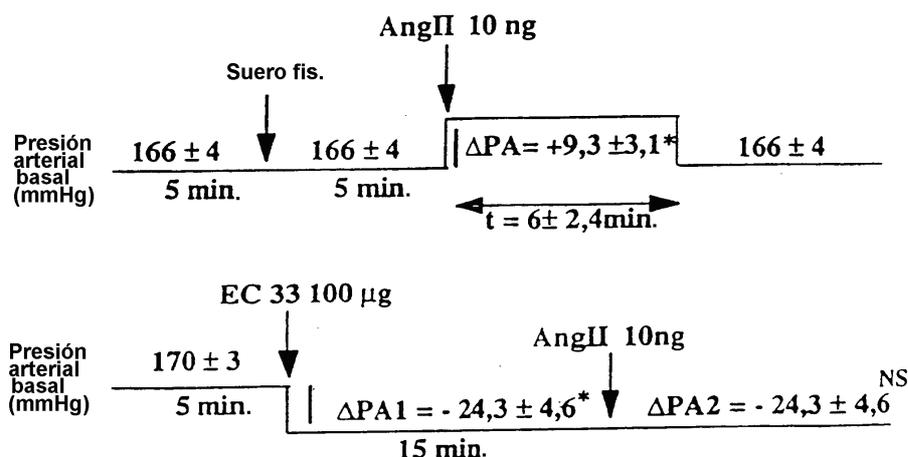
Se procede a una inyección de angiotensina II asociada, llegado al caso, a una inyección consecutiva de EC33.

Los ensayos se llevan a cabo según los esquemas siguientes que rinden cuenta asimismo de los resultados obtenidos.

WKY



SHR

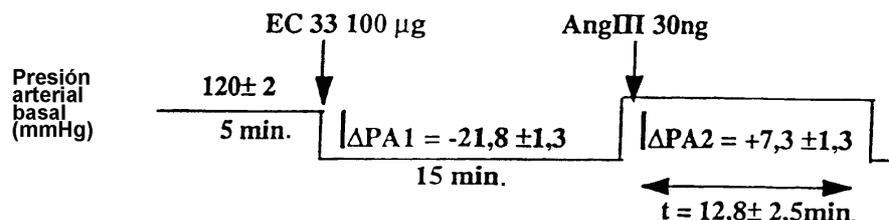
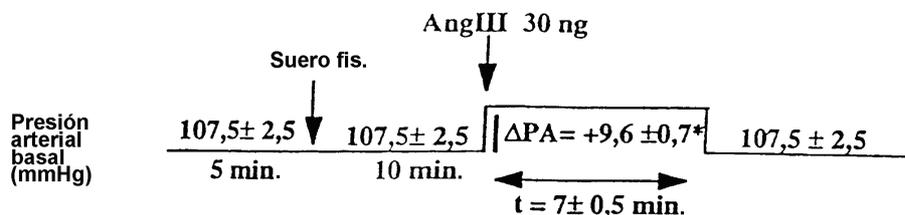


Se observa que la AngII a una dosis de 10 ng aumenta significativamente la presión arterial (PA). El efecto es ligeramente más importante en la rata SHR que en la rata WKY. La amplitud máxima del efecto es de aproximadamente 10 mm Hg para 10 ng de AngII y la duración de la acción se sitúa entre 7 y 9 minutos.

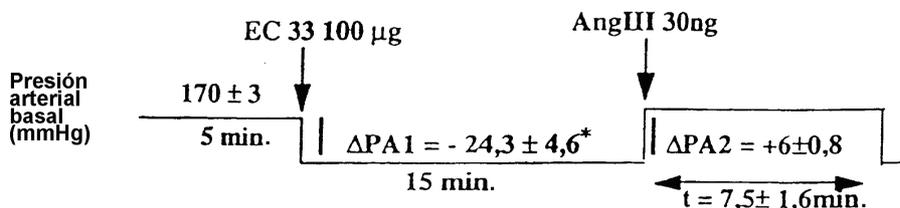
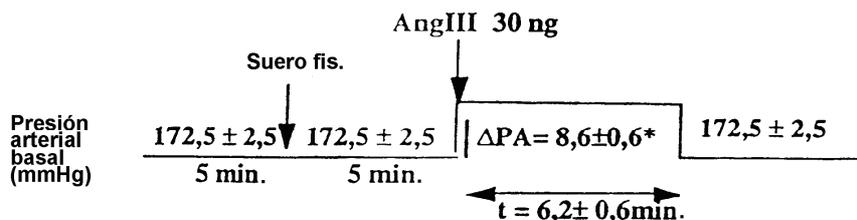
Cuando la AngII (10 ng) se inyecta en presencia de $100 \mu\text{g}$ del inhibidor de aminopeptidasa A, el EC33, el efecto prensador de AngII está completamente abolido.

La especificidad de la acción del EC33 ha sido asimismo demostrada por su ineficacia para modificar el efecto prensador de AngIII (30 ng). Los esquemas siguientes rinden cuenta de los resultados obtenidos.

WKY



SHR



5 El efecto dosis-dependiente del EC33 inyectado solo, ha sido apreciado asimismo en los planos de duraciones de la acción y del efecto hipotensor. Los resultados obtenidos están representados en las figuras 3 y 4.

10 De manera general, cuando se bloquea la APA mediante el EC33, se observa una disminución de PA dosis-dependiente, más marcada en la rata hipertensa que en la rata normotensa. El efecto hipotensor del inhibidor de la APA es máximo para una dosis de 100 µg. Es de -22 mm Hg en la rata normotensa y de -28 mm Hg en la rata hipertensa.

15 La duración de la acción a esta dosis es como media de 40 a 60 minutos.

En consecuencia, estos datos indican que en las condiciones basales, la angiotensina III endógena ejerce un efecto tónico positivo en el control central de la presión arterial.

Ejemplo 4

Demostración del papel determinante de AngIII en el sistema renina-angiotensina cerebral

Este ensayo se lleva a cabo con la ayuda de un inhibidor de aminopeptidasa N (APN), el PC18 (3-amino-3-mercaptometionina). Esta APN es responsable de la degradación de la angiotensina III en angiotensina IV.

25 Según el protocolo descrito en el ejemplo 3, se inyecta la AngIII (10 ng) en presencia de 60 µg de PC18 en la rata SHR. A título de ensayo control, se procede a una inyección de PC18 solo.

El efecto de esta co-inyección se aprecia en términos de presión arterial y de duración, y los resultados obtenidos se presentan en las figuras 5 y 6.

5 Se observa una potencialización del efecto prensador de AngIII (10 ng) considerando el inhibidor PC18 (60 µg). A 60 µg, el PC18, solo, aumenta en la rata SHR la presión arterial 15 mm y el efecto dura aproximadamente 12 minutos.

10 Por otra parte, se ha demostrado asimismo en la rata normotensa o hipertensa que el aumento de la presión arterial (+10 o +13 mm Hg respectivamente) inducida por 60 µg de PC18 está antagonizada por un pretratamiento con un antagonista de receptores angiotensinérgicos de tipo 1 (AT1), el losartán (10 µg). Esto se ilustra en particular en la figura 7 para la rata normotensa.

15 Este efecto antagonista es del orden de 85% en la rata normotensa y de 52% en la rata hipertensa.

De estos datos se desprende que el efecto prensador del PC18 se debe a una acumulación de la AngIII endógena a través de los receptores AT1.

20 Ejemplo 5

Efecto sobre la presión arterial del inhibidor EC33 inyectado por vía intracerebroventricular (i.c.v.) o por vía intravenosa (i.v.) en ratas conscientes

25 Estos experimentos se efectúan en la rata SHR de 12 semanas de edad (300-350 g). Durante la operación, los animales son anestesiados puntualmente (3 horas) con pentobarbital sódico (50 mg/kg intraperitoneal, Laboratoire Sentravet, Plancoët, Francia). Los experimentos se llevan a cabo como mínimo 24 horas después de la operación.

- Inyección por vía i.c.v.

30 Las inyecciones se llevan a cabo con la ayuda de una cánula colocada en el ventrículo lateral, bajo estereotaxia y la presión arterial se mide en continuo por vía invasiva después del cateterismo de la arteria femoral. El catéter se exterioriza a nivel de la nuca del animal y se conecta a un sistema de fijación que permite que la rata se mueva libremente en su jaula.

35 - Inyección por vía i.v.

Un primer catéter se coloca en la vena femoral con el fin de realizar las inyecciones, y se introduce en la arteria femoral un segundo catéter con el fin de poder medir la presión arterial en continuo. Los dos catéteres son exteriorizados a continuación tal como se ha indicado anteriormente.

40 Los resultados obtenidos se representan en la figura 8.

45 Se observa que en las ratas SHR conscientes, la inyección i.c.v. del EC33 a una dosis de 100 µg disminuye significativamente la presión arterial (-26 mmHg) en el mismo orden que en los animales anestesiados (-28 mmHg) (figura b). Este efecto hipotensor dura sin embargo menos tiempo (40 minutos).

Por el contrario, inyectado por vía i.v., el EC33 a una dosis de 45 mg/kg no induce ningún efecto hipotensor significativo en las ratas SHR conscientes (Fig. c).

50 Estos resultados muestran por lo tanto que la AngIII cerebral endógena ejerce una acción tónica en la regulación de la presión arterial tanto en la rata anestesiada como en la rata consciente. Los resultados obtenidos en la periferia muestran que el bloqueo de la conversión de la AngII circulante en AngIII no induce ninguna modificación significativa de la presión arterial.

55 Esto sugiere que la APA cerebral desempeña un papel preponderante en la regulación de la presión arterial comparada con la APA periférica que parece tener una contribución menos importante.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica, caracterizada porque comprende a título de principio activo, por lo menos el ácido (S) 3-amino-4-mercaptobutilsulfónico o una de sus sales con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable para su utilización como medicamento.
2. Composición para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque comprende además por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Composición para su utilización según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque comprende además un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina I o un antagonista de los receptores AT1.
4. Inhibidor selectivo de la aminopeptidasa A que:
- 15 - posee una afinidad multiplicada por lo menos por un factor 100 para la aminopeptidasa A en comparación con la aminopeptidasa N, o
- posee un poder inhibidor sobre la aminopeptidasa A *in vitro* inferior o igual a 10^{-7} M,
- 20 asociado, llegado el caso, a un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su utilización como medicamento para disminuir la presión arterial.
5. Inhibidor para su utilización según la reivindicación 4, en el que el inhibidor es el ácido (S) 3-amino-4-mercaptobutilsulfónico o una de sus sales con un ácido o una base farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Inhibidor para su utilización según la reivindicación 4 ó 5, en el que dicho medicamento comprende además un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina I o un antagonista de los receptores AT1.

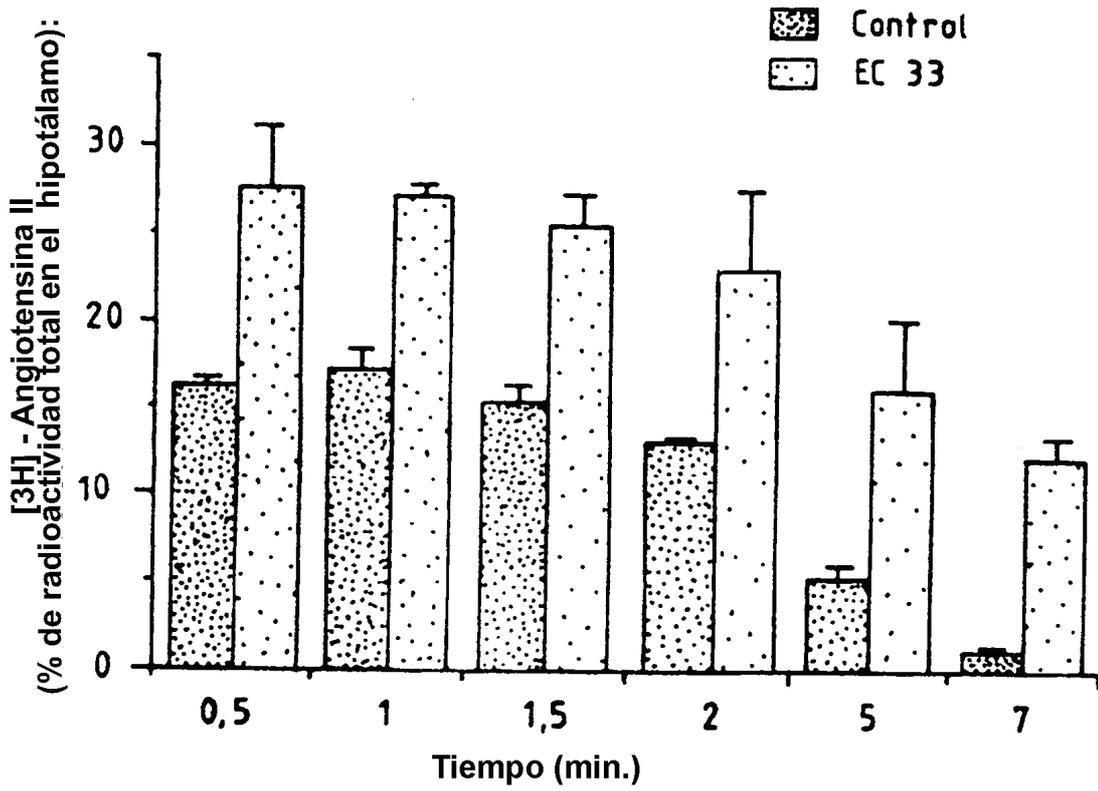


FIG.1

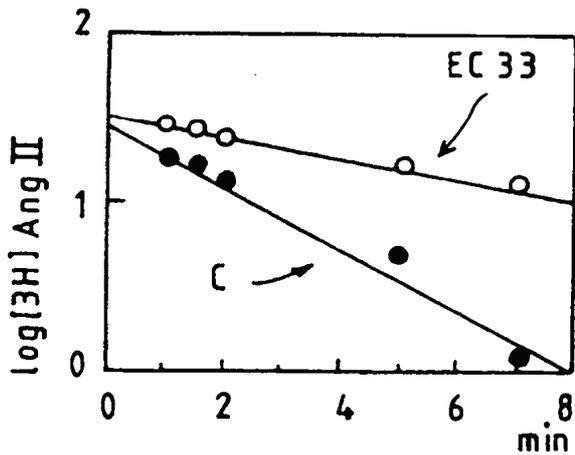


FIG.2

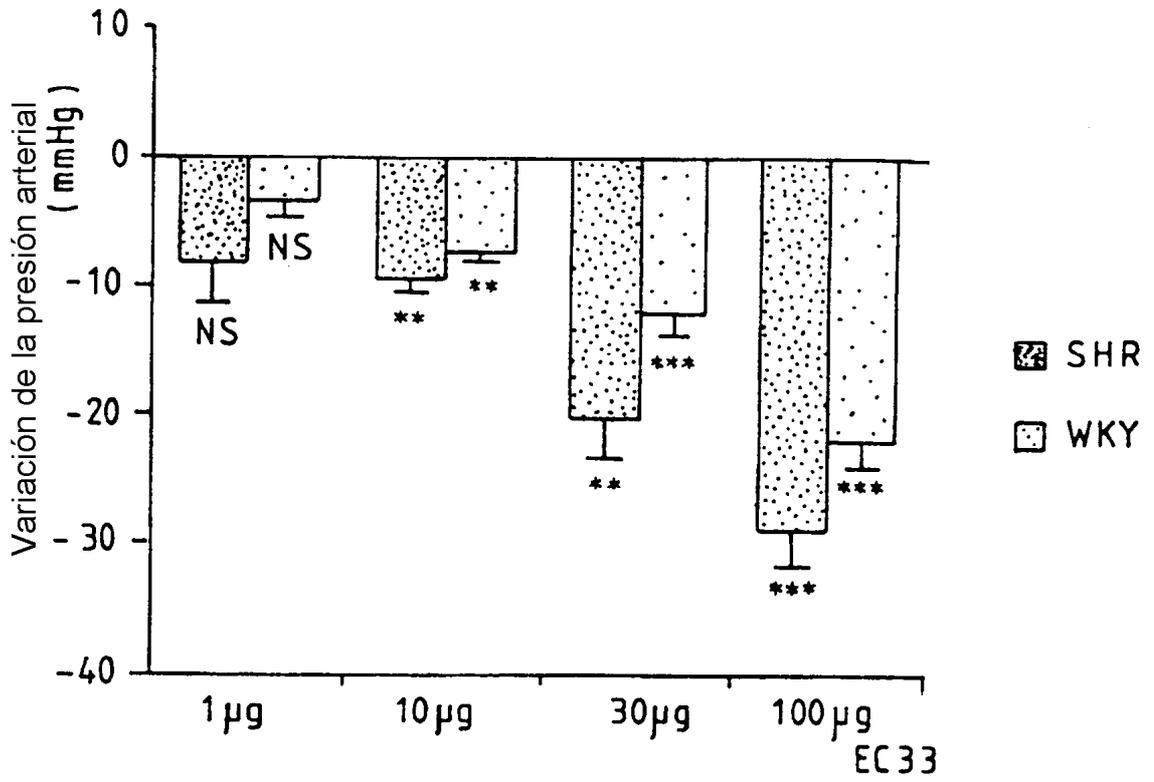


FIG.3

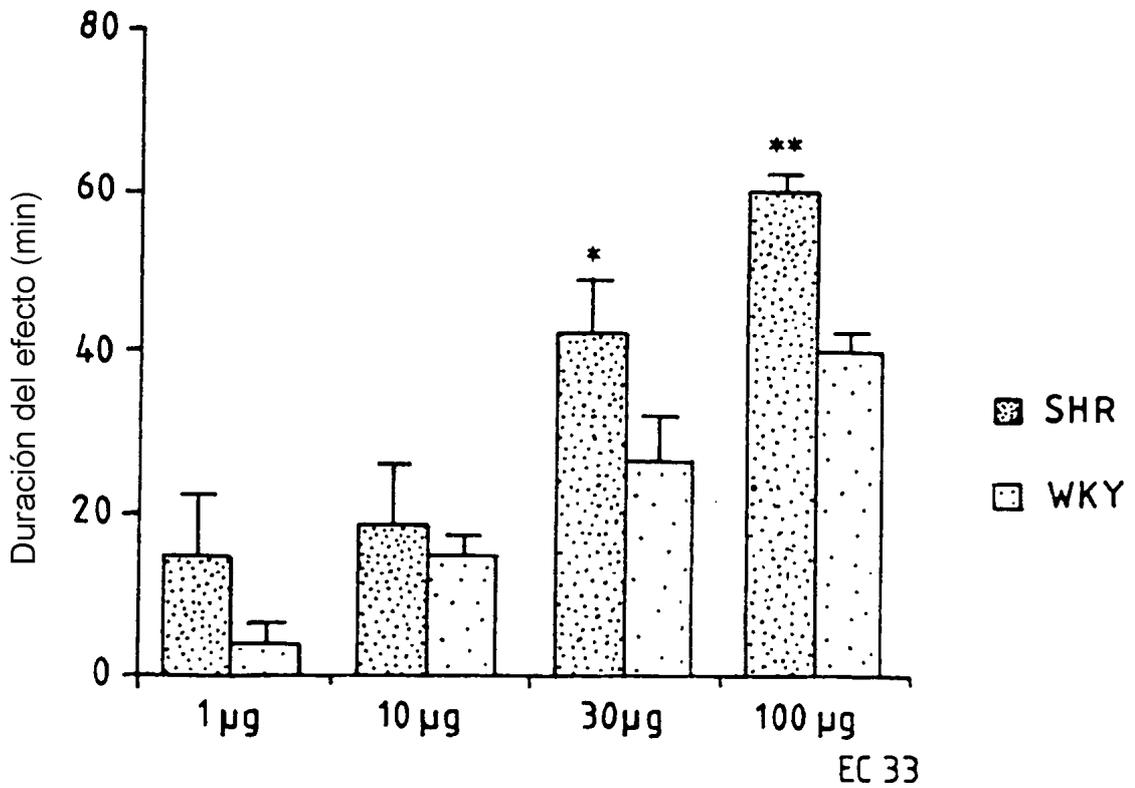


FIG.4

SHR

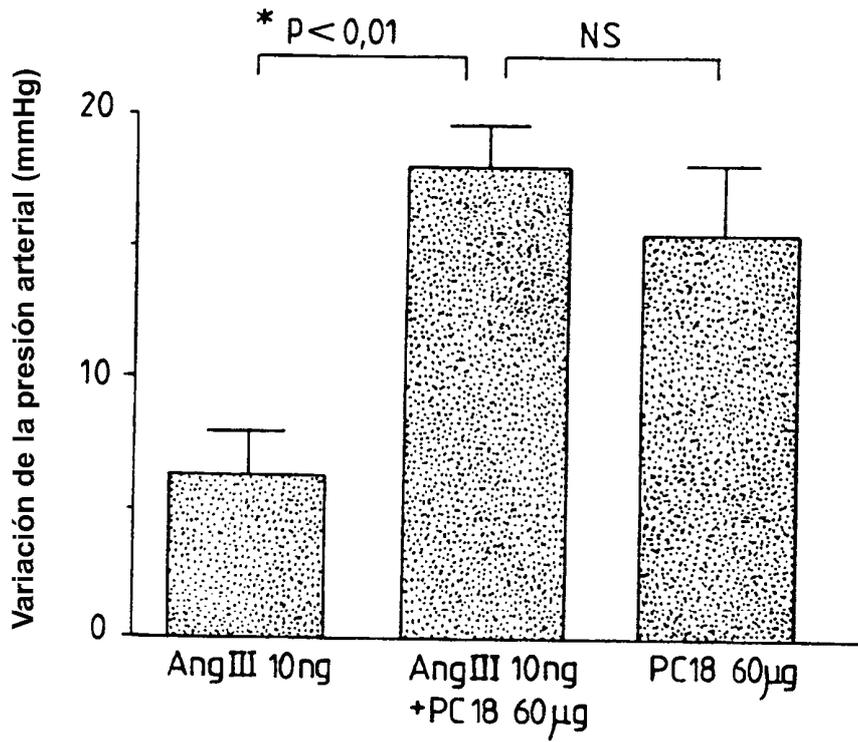


FIG.5

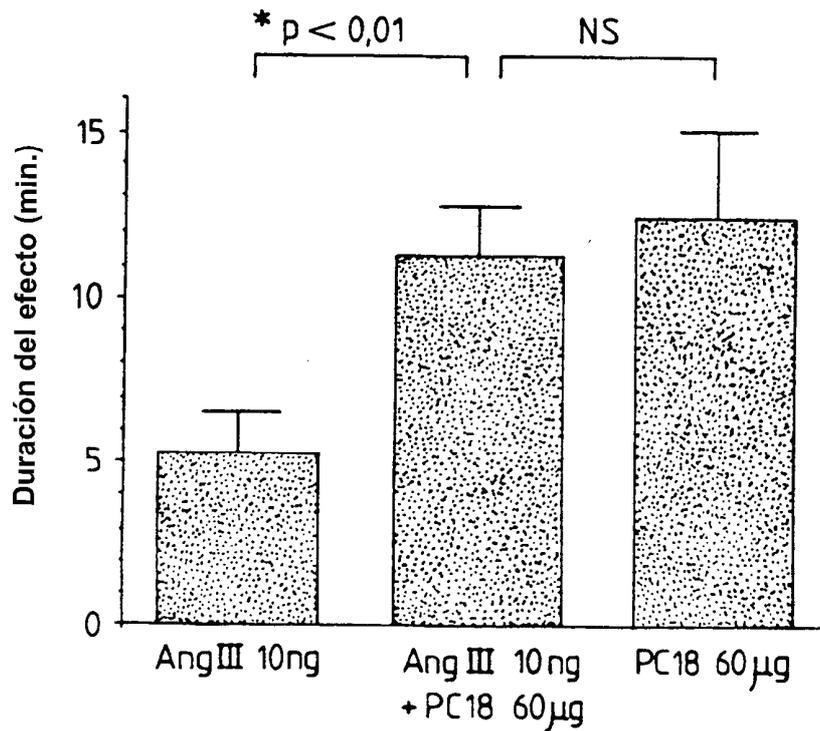


FIG.6

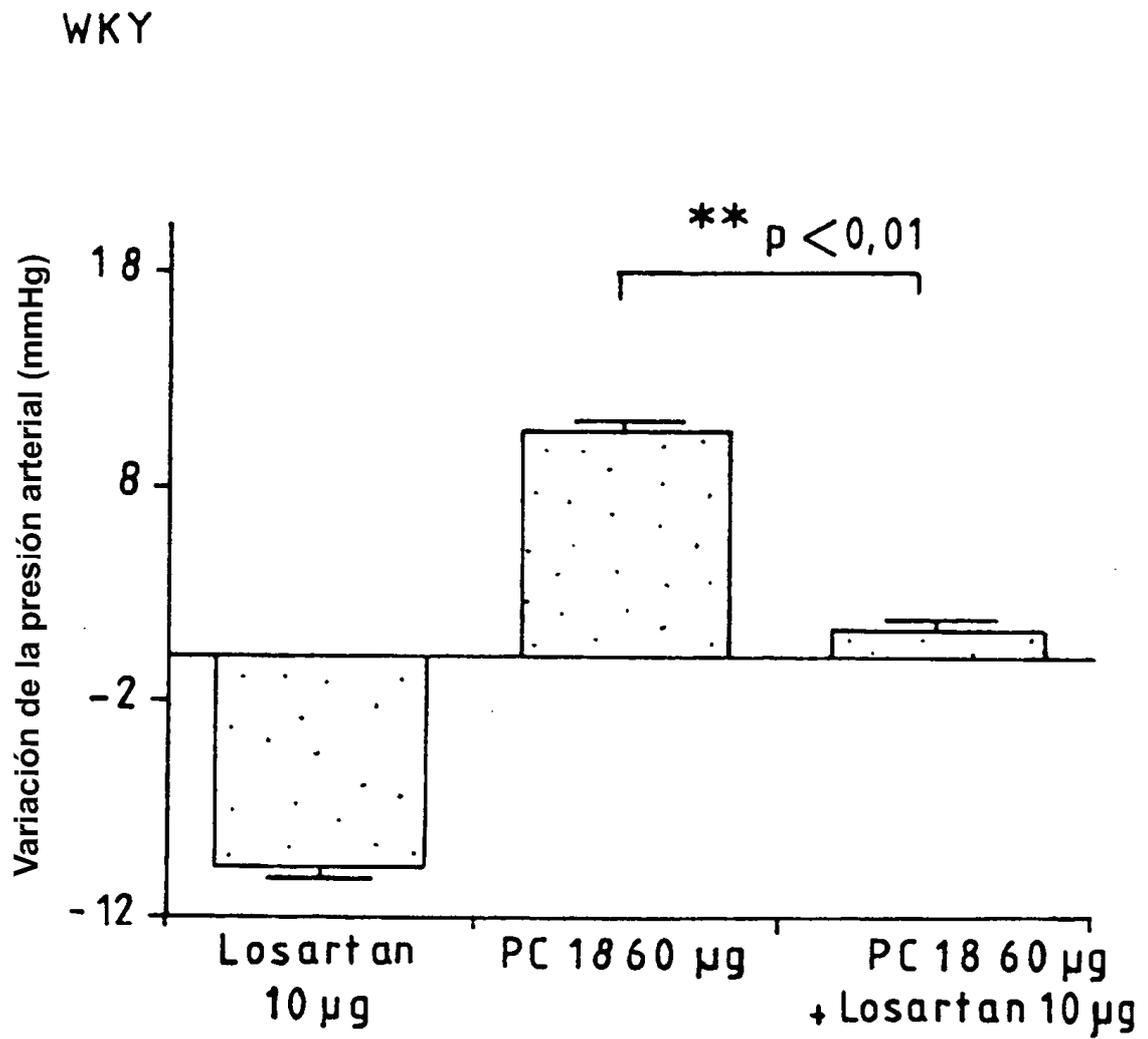


FIG.7

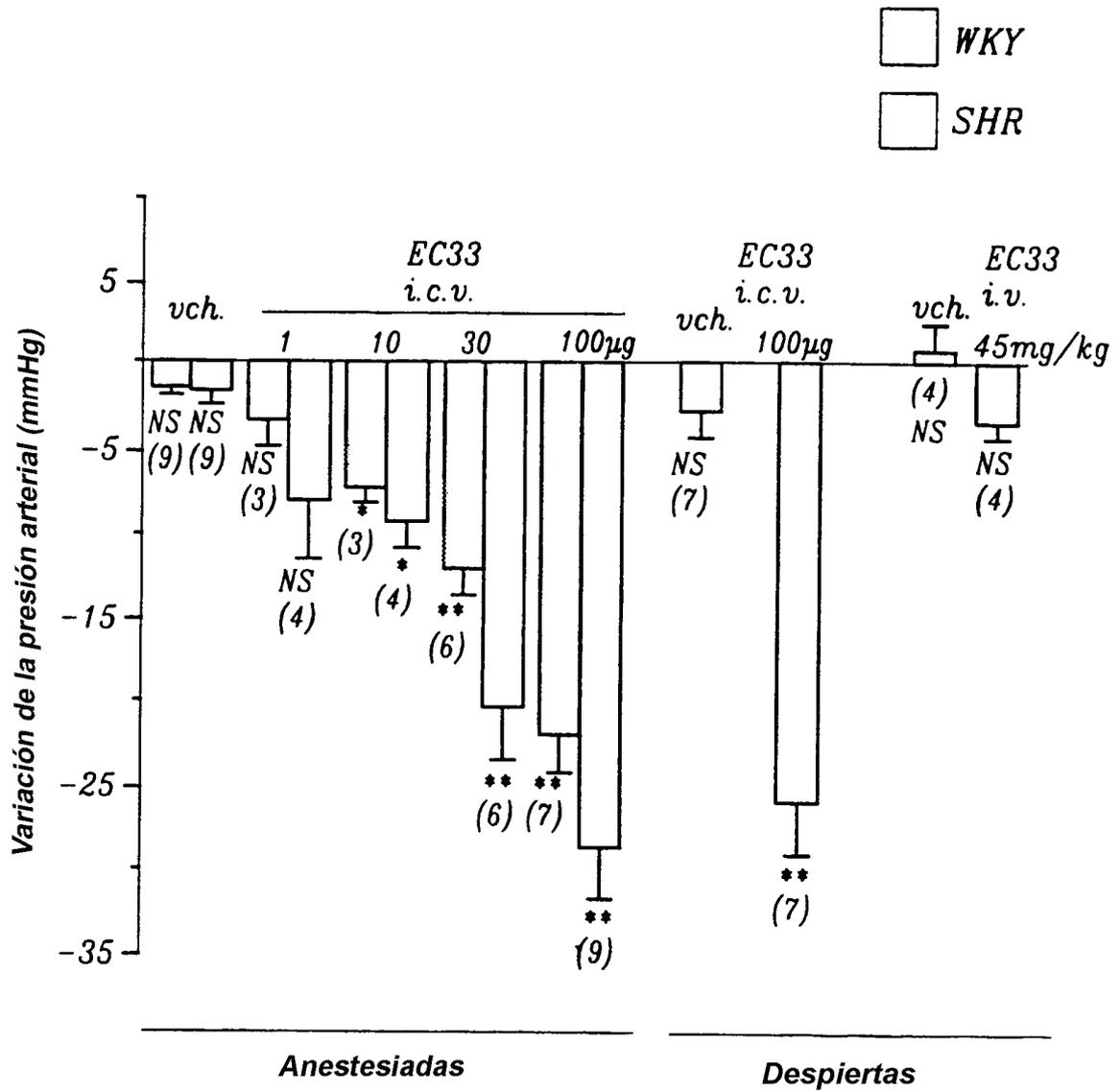


FIG.8