

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 889**

51 Int. Cl.:
A61K 31/55 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03740247 .6**
96 Fecha de presentación: **13.06.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1519732**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2005**

54 Título: **Uso de inhibidores de vasopectidasa en el tratamiento de nefropatía**

30 Prioridad:
28.06.2002 DE 10229180

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.06.2012

73 Titular/es:
SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
BRÜNINGSTRASSE 50
65929 FRANKFURT AM MAIN, DE

72 Inventor/es:
SCHÄFER, Stefan;
LINZ, Wolfgang;
BLEICH, Markus y
HUBER, Jochen

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 889 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

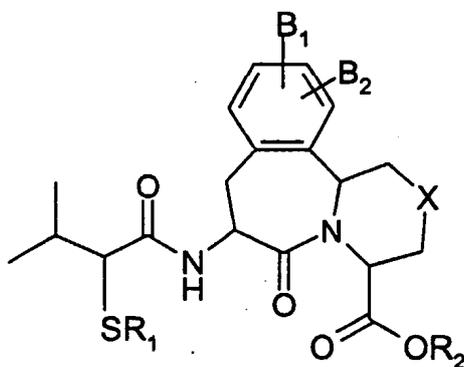
Uso de inhibidores de vasopectidasa en el tratamiento de nefropatía

5 La enzima convertidora de angiotensina (ACE) es una peptidil dipeptidasa que cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II. Angiotensina II es un vasoconstrictor que estimula también la secreción de aldosterona por parte de la corteza adrenal. La inhibición de ACE previene tanto la conversión de angiotensina I en angiotensina II, como el metabolismo de bradiquinina, dando como resultado concentraciones de angiotensina II circulante y de aldosterona disminuida, y de bradiquinina circulante incrementada. Además de estos cambios neurohormonales, se observan
10 disminuciones en la resistencia periférica y en la presión sanguínea, particularmente en individuos con una elevada concentración de renina circulante. Otros efectos farmacológicos asociados con la inhibición de ACE incluyen la regresión de la hipertrofia ventricular izquierda, la mejora en los signos clínicos de fallo cardíaco y la reducción de mortalidad en pacientes con fallo cardíaco congestivo (CHF) o disfunción ventricular izquierda después de infarto de miocardio.

15 La endopeptidasa neutra (NEP) es una enzima responsable del metabolismo del péptido natriurético atrial (ANP). La inhibición de NEP da como resultado concentraciones incrementadas de ANP lo que, a su vez, conduce a natriuresis, diuresis y disminuye el volumen intravascular, el retorno venoso y presión sanguínea. El ANP es liberado por miocitos atriales en respuesta a un esfuerzo atrial o a un volumen intravascular incrementado. Concentraciones elevadas en plasma de ANP han demostrado ser un mecanismo compensatorio potencial en diversos estados patológicos, incluidos
20 fallo cardíaco congestivo, fallo renal, hipertensión esencial y cirrosis.

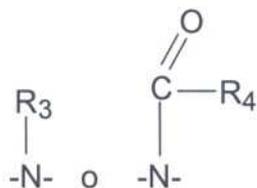
La secreción de ANP por parte de miocitos atriales provoca la vasodilatación, diuresis, natriuresis y la inhibición de la liberación de renina y secreción de aldosterona. En contraposición, la angiotensina II da como resultado una vasoconstricción, reabsorción de sodio y agua y producción de aldosterona. Estos dos sistemas hormonales interactúan
25 de una manera recíproca o equilibrada para mantener respuestas vasculares y hemodinámicas fisiológicas normales. La patente de EE.UU. 5.430.145, la patente europea EP 481522 y la solicitud de patente WO PCT/EP 02/03668 (publicada como WO 02/083671) describen derivados tricíclicos de mercaptoacetilamida de la fórmula (I) útiles como inhibidores de ACE y NEP, es decir para el tratamiento y/o prevención de fallo cardíaco e hipertensión.

30 Esta invención se dirige al uso de un compuesto de fórmula (II)



en donde

- 35 R₁ es hidrógeno, -CH₂OC(O)C(CH₃)₃, o un grupo acilo;
R₂ es hidrógeno, -CH₂O-C(O)C(CH₃)₃; un alquilo C₁-C₄; arilo, -(alquil C₁-C₄)-arilo; o difenilmetilo;
X es -(CH₂)_n, en donde n es un número entero 0 ó 1, -S-, -O-,



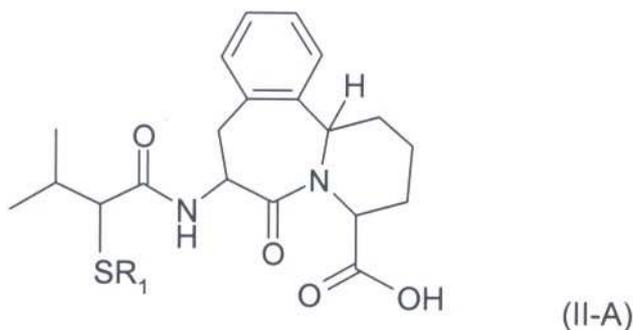
en donde R_3 es hidrógeno, un alquilo C_1-C_4 , arilo o aril-(alquilo C_1-C_4), y R_4 es $-CF_3$, alquilo C_1-C_{10} , arilo o aril-(alquilo C_1-C_4);

- 5 B_1 y B_2 , cada uno independientemente, son hidrógeno, hidroxilo, $-OR_5$, en donde R_5 es alquilo C_1-C_4 , arilo o -(alquilo C_1-C_4)-arilo, o en los casos en que B_1 y B_2 estén unidos a átomos de carbono adyacentes, B_1 y B_2 pueden ser tomados juntos con dichos átomos de carbono adyacentes para formar un anillo de benceno o metilendioxi, para el tratamiento y/o la profilaxis de nefropatía en pacientes diabéticos, incluida glomerulonefritis, esclerosis glomerular, síndrome nefrótico, nefrosclerosis hipertensiva, microalbuminuria o enfermedad renal de fase terminal.
- 10 En una realización, la presente invención proporciona los usos anteriores de un compuesto de fórmula (II)



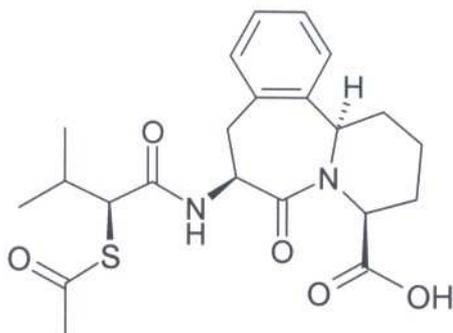
- 15 en donde R_1 es acetilo. En otra realización, la presente invención proporciona los usos anteriores de un compuesto de la fórmula (II), en donde R_1 es hidrógeno. En una realización adicional, la presente invención proporciona los usos anteriores de un compuesto de la fórmula (II), en donde R_2 es hidrógeno. En una realización adicional, la presente invención proporciona los usos anteriores de un compuesto de la fórmula (II), en donde B_1 y/o B_2 son hidrógeno. Todavía en una realización adicional, la presente invención proporciona los usos anteriores de un compuesto de la fórmula (II), en donde X es $-CH_2$.

- 20 En una realización adicional, la presente invención proporciona los usos anteriores de un compuesto de la fórmula (II), caracterizado por un compuesto de la fórmula (II-A):

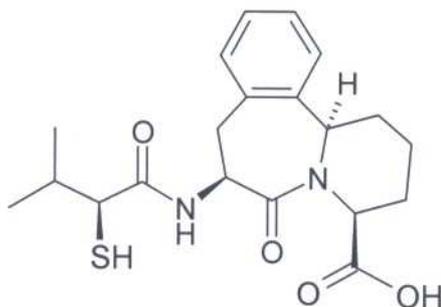


en donde R₁ es acetilo o hidrógeno.

5 La estructura de compuestos preferidos de la fórmula (II-A) son de la fórmula (II-B), a los que también se alude como compuesto (II-B) o comp. (II-B), y de la fórmula (II-C) que figuran a continuación:



(II-B)



(II-C)

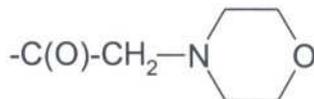
10 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "alquilo C₁-C₄" se refiere a una cadena hidrocarbonada monovalente saturada, lineal o ramificada, de uno, dos, tres o cuatro átomos de carbono, e incluye metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, butilo terciario y grupos similares. El término "alquilo C₁-C₁₀" se refiere a una cadena hidrocarbonada monovalente saturada, lineal o ramificada, de uno a diez átomos de carbono, e incluye metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, isopentilo, hexilo, 2,3-dimetil-2-butilo, heptilo, 2,2-dimetil-3-pentilo, 2-metil-2-hexilo, octilo, 4-metil-3-heptilo y grupos similares.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, "alcoxi C₁-C₄" se refiere a un sustituyente monovalente que consiste en una cadena de alquilo lineal o ramificada con 1 a 4 átomos de carbono enlazados a través de un átomo de oxígeno del éter y que tiene su enlace de valencia libre del oxígeno del éter, e incluye metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, sec.-butoxi, terc.-butoxi y grupos similares.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, "arilo" se refiere a un grupo fenilo o naftilo no sustituido o sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en metilendioxi, hidroxilo, alcoxi C₁-C₄, fluoro y cloro. Incluidos dentro del alcance del término "-(alquil C₁-C₄)-arilo" se encuentran fenilmetilo (bencilo), feniletilo, p-metoxibencilo, p-fluorobencilo y p-clorobencilo.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, "halógeno" o "Hal" se refiere a un miembro de la familia de flúor, cloro, bromo o yodo.

30 Tal como se utiliza en esta memoria, "grupo acilo" se refiere a grupos acilo alifáticos y aromáticos y a los derivados de compuestos heterocíclicos. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser un grupo alcanóilo inferior o (C₁-C₄) tal como formilo o acetilo, un grupo aroílo tal como benzoílo, o un grupo acilo heterocíclico que comprende uno o más de los heteroátomos O, N y S, tal como el grupo



5 Tal como se utiliza en esta memoria, "estereoisómero" es un término general utilizado para todos los isómeros y moléculas individuales que difieren únicamente en la orientación de sus átomos en el espacio. El término estereoisómero incluye isómeros de imagen especular (enantiómeros), isómeros geométricos (cis/trans o E/Z) e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares de una con la otra (diastereoisómeros).

10 Tal como se utiliza en esta memoria, "R" y "S" se utilizan como se usan habitualmente en la Química Orgánica para dar a entender una configuración específica de un centro quiral. El término "R" (recto) se refiere a la configuración de un centro quiral con una relación en el sentido de las agujas del reloj de prioridades de grupo (del más elevado al segundo más bajo) cuando se observa a lo largo del enlace hacia el grupo de prioridad más baja. El término "S" (sinistra) se refiere a la configuración de un centro quiral con una relación en sentido opuesto a las agujas del reloj de prioridades de grupo (del más elevado al segundo más bajo) cuando se observa a lo largo del enlace hacia el grupo de prioridad más baja. La prioridad de grupos se basa en normas de secuencia, en donde la prioridad se basa primeramente en el número atómico (en el orden de número atómico decreciente). Un listado y un comentario de prioridades están contenidos en Stereochemistry of Organic Compounds, Ernest L. Eliel, Samuel H. Wilen y Lewis N. Mander, compiladores, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994.

20 Además del sistema (R)-(S), el sistema D-L más antiguo puede utilizarse también en esta memoria para dar a entender una configuración absoluta, especialmente con referencia a aminoácidos. En este sistema, se orienta una fórmula proyección Fischer, de modo que el carbono número 1 de la cadena principal se encuentra en la parte superior. El prefijo "D" se utiliza para representar la configuración absoluta del isómero en el que el grupo funcional (determinante) se encuentra en el lado de la derecha del carbono en el centro quiral y "L" el del isómero que se encuentra a la izquierda.

25 Tal como se utiliza en esta memoria, "tratar" o "tratando" significa cualquier tratamiento que incluye, pero no se limita a aliviar síntomas, eliminar la causa de los síntomas sobre una base temporal o permanente o para prevenir o ralentizar la aparición de síntomas y el progreso de la enfermedad, trastorno o estado nombrado.

30 Tal como se describe en esta memoria, el término "paciente" se refiere a un animal homeotermo tal como un mamífero que está afectado por una enfermedad, trastorno o estado particular. Se entiende explícitamente que dentro del alcance del significado del término, cobayas, perros, gatos, ratas, ratones, caballos, reses, ovejas y seres humanos son ejemplos de animales.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" pretende aplicarse a cualquier sal, ya sea previamente conocida o que se descubra en un futuro, que se utilice por un experto en la técnica y que sea una sal por adición orgánica o inorgánica no tóxica que sea adecuada para uso como un producto farmacéutico. Bases ilustrativas que forman sales adecuadas incluyen hidróxidos de metales alcalinos y de metales alcalinotérreos tales como hidróxidos de sodio, potasio, calcio o magnesio; amoníaco y aminas alifáticas, cíclicas o aromáticas tales como metilamina, dimetilamina, trietilamina, dietilamina, isopropildietilamina, piridina y picolina. Ácidos ilustrativos que forman sales adecuadas incluyen ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico y similares, y ácidos carboxílicos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propiónico, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, maleico, hidroximaleico y dihidroximaleico, benzoico, fenilacético, 4-aminobenzoico, 4-hidroxibenzoico, antranílico, cinámico, salicílico, 4-aminosalicílico, 2-fenoxibenzoico, 2-acetoxibenzoico, mandélico y similares, y ácidos sulfónicos orgánicos tales como ácidos metanosulfónico y p-toluenosulfónico.

45 Tal como se utiliza en esta memoria, "soporte farmacéutico" se refiere a cualquier excipiente farmacéutico conocido útil en la formulación de compuestos farmacéuticamente activos para administración, y que sean esencialmente no tóxicos y no sensibilizantes en las condiciones de uso. La proporción exacta de estos excipientes se determina por la solubilidad y propiedades químicas del compuesto activo, la vía de administración elegida, así como la práctica farmacéutica convencional.

50 Las composiciones del compuesto de la fórmula (II) de esta invención se pueden administrar a un sujeto que necesita de

tratamiento mediante una diversidad de vías convencionales de administración, incluidas la vía oral, tópica, parenteral, por ejemplo intravenosa, subcutánea o intramedular. Además, las composiciones activas de esta invención se pueden administrar por vía intranasal, en forma de un supositorio rectal o utilizando una formulación "rápida", es decir permitiendo que la medicación se disuelva en la boca sin necesidad de utilizar agua.

5

Las composiciones activas de esta invención se pueden administrar solas o en combinación con soportes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en dosis sencilla o múltiple. Soportes, vehículos y diluyentes farmacéuticos adecuados incluyen diluyentes o materiales de carga sólidos inertes, soluciones acuosas estériles y diversos disolventes orgánicos. Las composiciones farmacéuticas formadas al combinar las composiciones activas de esta invención y los soportes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables se administran entonces fácilmente en una diversidad de formas de dosificación tales como comprimidos, polvos, pastillas, jarabes, soluciones inyectables y similares. Si se desea, estas composiciones farmacéuticas pueden contener ingredientes adicionales tales como saboreantes, aglutinantes, excipientes y similares. Así, para fines de la administración oral, se pueden emplear comprimidos con contenido en diversos excipientes tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de calcio, junto con diversos desintegrantes tales como almidón, ácido algínico y determinados silicatos complejos junto con agentes aglutinantes tales como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y acacia. Adicionalmente, a menudo se utilizan para fines de formación de comprimidos agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, lauril-sulfato de sodio y talco. También se pueden emplear como materiales de carga en cápsulas de gelatina blanda y dura composiciones sólidas de un tipo similar. Materiales preferidos para ello incluyen lactosa o azúcar de leche y polietilenglicoles de elevado peso molecular. Cuando para la administración oral se desean suspensiones o elixires acuosos, el ingrediente activo esencial en ellos puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o saboreantes, materia colorante o tintes y, si se desea, agentes emulsionantes o de suspensión, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerol y combinaciones de los mismos.

10

15

20

25

Para la administración por vía parenteral, se pueden emplear soluciones de las composiciones activas de esta invención en aceite de sésamo o de cacahuete, propilenglicol acuoso o en soluciones acuosas estériles. Soluciones acuosas de este tipo deberían estar adecuadamente tamponadas en caso necesario e isotonzarse primero el diluyente líquido con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles empleados están todos fácilmente disponibles mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

30

En general, una composición de esta invención se administra por vía oral, parenteral (por ejemplo intravenosa, intramuscular, subcutánea o intramedular) o tópica. Para la administración por vía intranasal o administración por inhalación, uno o más compuestos de la invención se suministran convenientemente en forma de una solución o suspensión a partir de un recipiente con spray de bomba que es exprimido o bombeado por el paciente, o en forma de una presentación en spray de aerosol a partir de un recipiente presurizado o un nebulizador, con el uso de un agente propulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar al proporcionar una válvula para suministrar una cantidad medida. El recipiente presurizado o nebulizador puede contener una solución o suspensión del compuesto activo. Cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla de polvos de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Para fines de administración transdermal (por ejemplo tópica) se preparan soluciones estériles diluidas, acuosas o parcialmente acuosas (habitualmente en una concentración de aproximadamente 0,1% a 5%), de otro modo similares a las soluciones parenterales anteriores. Son conocidos métodos para preparar diversas composiciones farmacéuticas con una determinada cantidad de ingrediente activo, o resultarán evidentes a la vista de esta descripción para los expertos de esta técnica. Para ejemplos de métodos para preparar composiciones farmacéuticas, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición (1995).

35

40

45

50 **NEFROPATÍA:**

La nefropatía es una enfermedad crónica que se define como una anomalía en la excreción de albúmina urinaria en pacientes diabéticos o no diabéticos. En seres humanos sanos, las tasas de excreción de albúmina urinaria son menores que o iguales a 40 mg/24 horas. Las fases clínicas de la nefropatía son microalbuminuria, nefropatía clínica (albuminuria) y enfermedad renal de fase terminal (ESRD).

55

Una forma común de nefropatía es la nefropatía diabética. La nefropatía diabética se desarrolla en el 35 a 40% de los

pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y en el 10 a 60% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, dependiendo del grupo étnico que esté siendo estudiado, y es la causa más común de enfermedad renal en fase terminal en los Estados Unidos. Se acepta que la nefropatía diabética es el resultado de la hiperglicemia, ya sea sola o en combinación con otros factores, tales como hipertensión y susceptibilidad genética a la enfermedad renal. Una terapia antihipertensiva apropiada ha demostrado reducir significativamente la mortalidad renal y, posiblemente cardiovascular, en pacientes de diabetes mellitus tipo 1 proteinúricos, así como retardar la tasa de declive de la tasa de filtración glomerular en algunos pacientes con una función renal perjudicada (Lewis et al., N. Engl. J. Med. 1993, 329, 1456-1462). Así, el cuidado convencional de pacientes con nefropatía diabética es un control intensivo glicémico y una normalización de la presión sanguínea utilizando principalmente inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) tal como ramipril.

Algunos inhibidores de vasopectidasa han demostrado exhibir un mayor efecto nefroprotector que los inhibidores de ACE solos (Molinario et al., Curr. Opin. Pharmacol. 2002, 2, 131-141), tal como omapatrilat en calidad de uno de los inhibidores de vasopectidasa más tempranamente desarrollados y el más ampliamente evaluado. Chen et al. (Hypertension 2001, 38, 187-191) definieron la acción renal del tratamiento agudo con omapatrilat y el inhibidor de ACE fosinoprilat, en donde omapatrilat tenía una mayor respuesta natriurética que el inhibidor de ACE. En otro estudio, el inhibidor de vasopectidasa CGS 30440 (Novartis, Suiza) tenía un mayor efecto protector renal que el inhibidor de ACE benazepril (Cohen et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 1998, 32, 87-95).

Se ha demostrado ahora que inhibidores de vasopectidasa de la fórmula (I) tienen un efecto nefroprotector superior en la tasa de excreción de albúmina y, por lo tanto, son útiles para el tratamiento y/o la prevención de nefropatía en pacientes diabéticos y no diabéticos, incluida la nefropatía diabética, glomerulonefritis, esclerosis glomerular, síndrome nefrótico, nefrosclerosis hipertensiva, microalbuminuria, y enfermedad renal de fase terminal. El efecto del compuesto (II-B) es 6-8 veces mayor que el observado con el inhibidor de ACE ramipril.

Ejemplo 1: Disminución de la proteinuria mediante tratamiento con un compuesto de la fórmula (II-B)

Se determinó la excreción de proteína y creatinina en la orina de ratas ZDF machos (ZDF Gmi fa/fa) y animales testigo heterocigóticos (ZDF Gmi -/+) de 10, 17, 27 y 37 semanas de edad. En grupos adicionales, se administró crónicamente a ratas diabéticas ramipril (1 mg/kg/día, en el agua de beber) o un compuesto de la fórmula (II-B) (30 mg/kg/día, en la alimentación) a lo largo de un período de 10 a 37 semanas. Se sacrificó a los animales después de 37 semanas y se examinaron histológicamente sus riñones.

Tabla 1: Excreción urinaria de albúmina y creatinina en ratas obesas, flacas, tratadas con ramipril y tratadas con un compuesto de la fórmula (II-B)

Excreta orina	Albúmina				Albúmina/creatinina			
	mg/kg/h				mg/mmol			
Semanas	0	7	17	27	0	7	17	27
Grupo 1 Obeso								
Media	0,35	1,78	9,24	14,23	55,27	404,78	975,60	1543,25
s	0,24	1,09	6,70	7,69	41,58	349,65	714,38	819,04
EMT	0,06	0,28	2,02	2,32	10,74	90,28	215,40	246,95
N	15	15	11	11	15	15	11	11
Grupo 2 Flaco								
Media	0,121	0,090	0,070	0,079	12,828	9,573	5,754	7,313

s	0,041	0,069	0,033	0,051	4,206	6,010	2,772	4,541
EMT	0,009	0,015	0,008	0,014	0,940	1,344	0,693	1,260
N	20	20	16	13	20	20	16	13
Ensayo t	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Grupo 4 Ramipril								
Media	0,24	1,36	6,26	10,11	37,31	207,35	694,20	1077,88
s	0,12	1,28	4,71	7,20	17,20	198,42	510,20	742,86
EMT	0,03	0,33	1,42	2,17	4,44	51,23	153,83	223,98
N	15	15	11	11	15	15	11	11
Ensayo t	0,122	0,338	0,242	0,209	0,133	0,067	0,300	0,178
Grupo 7 comp. (II-B)								
Media	0,27	0,09	0,41	1,39	48,56	14,30	44,63	152,71
s	0,18	0,04	0,18	1,67	28,69	5,38	16,47	174,93
EMT	0,05	0,01	0,05	0,50	7,41	1,39	4,97	52,74
N	15	15	11	11	15	15	11	11
Ensayo t	0,293	0,000	0,000	0,000	0,611	0,000	0,000	0,000

Resultados histológicos:

- 5 En las tablas adjuntas se lista un resumen de los hallazgos en los riñones después de un período de tratamiento de 6 meses.

Los grupos examinados fueron:

- 10 C1: testigo ratas ZDF gruesas
 C2: testigo ratas ZDF gruesas
 D1: ramipril ratas ZDF gruesas 1,0 mg/kg
 D4: comp. (II-B) ratas ZDF gruesas 30 mg/kg
 Los hallazgos histopatológicos observados fueron:

- 15 - Células Armanni-Ebstein en túbulos renales que indican un estado metabólico diabético.
 - Glomeruloesclerosis que indican una lesión del riñón crónica debida a un estado metabólico diabético.
 - Atrofia: túbulo lesión degenerativa espontánea común en riñones.
 - Formaciones: túbulo lesión espontánea común en riñones.
 20 - Dilatación: pelvis lesión espontánea común en riñones, considerada una anomalía en el desarrollo heredada.

Células Armanni-Ebstein no estaban presentes en ratas testigo ZDF flacas, pero sí en cualquier grupo de rata ZDF gruesa tratada.

5 La glomeruloesclerosis no se encontró en ratas testigo ZDF flacas y tampoco estaba presente en animales tratados con compuesto (II-B). De manera correspondiente, en estos animales se encontraron bajas incidencias de lesiones degenerativas, atrofia de túbulo y formaciones tubulares.

10 En comparación con testigos ZDF gruesos en ratas tratadas con ramipril o MDL 100.240 no estaban presentes diferencias en la incidencia de la glomeruloesclerosis o lesiones degenerativas asociadas. Estos resultados indican que el tratamiento con el compuesto (II-B) puede prevenir el desarrollo de glomeruloesclerosis "diabética" y lesiones degenerativas asociadas. Las lesiones en las ratas testigo ZDF gruesas eran más bien poco graves.

Además, en animales tratados con el compuesto (II-B) se observó una elevada incidencia de la dilatación de la pelvis.

15 EXPLICACIÓN DE CÓDIGOS Y SÍMBOLOS

CÓDIGOS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS A NIVEL ANIMAL:

K0 = grupo de sacrificio terminal

Tabla 2: hallazgos histológicos				
NÚMERO DE ANIMALES CON HALLAZGOS MICROSCÓPICOS POR ÓRGANO/GRUPO/SEXO				
Estado de necropsia: GRUPO DE SACRIFICIO TERMINAL (KO)				
SEXO	Machos			
Grupo de dosis	C1	C2	D1	D4
Nº ANIMALES POR GRUPO DE DOSIS	12	6	9	9
Riñones Nº examinado	12	6	9	8
-células Armani-Ebstein	-	6	7	8
- glomeruloesclerosis	-	6	6	1
- atrofia: túbulo renal	-	6	9	2
- cilindros: túbulo renal	1	6	8	3
- dilatación: pelvis	3	2	5	7
INCIDENCIA SUMARIA DE CLASIFICACIONES POR ÓRGANO/GRUPO/SEXO				
Estado de necropsia: GRUPO DE SACRIFICIO TERMINAL (KO)				
SEXO	Machos			
Grupo de dosis	C1	C2	D1	D4
Nº ANIMALES POR GRUPO DE DOSIS	12	6	9	9
Riñones Nº examinado	12	6	9	8
- células Armani-Ebstein CALID. 1	-	2	1	-
CALID. 2	-	3	6	5
CALID. 3	-	1	-	3
TOTAL AFECTADO	-	6	7	8
GRAVEDAD MEDIA	-	1.8	1.9	2.4

- Glomeruloesclerosis	CALID. 1	-	1	-	1
	CALID. 2	-	3	4	-
	CALID. 3	-	2	2	1
	TOTAL AFECTADO	-	6	6	1
	GRAVEDAD MEDIA	-	2.2	2.3	1.0
- Atrofia: túbulo renal	CALID. 1	-	2	4	1
	CALID. 2	-	2	4	-
	CALID. 3	-	1	1	1
	CALID. 4	-	1	-	-
	TOTAL AFECTADO	-	6	9	2
GRAVEDAD MEDIA	-	2.2	1.7	2.0	
Formaciones: túbulo renal	CALID. 1	1	1	1	2
	CALID. 2	-	4	7	1
	CALID. 3	-	1	-	-
	TOTAL AFECTADO	1	6	8	3
	GRAVEDAD MEDIA	1.0	2.0	1.9	1.3
Dilatación: pelvis	CALID. 2	3	-	1	1
	CALID. 3	-	1	2	5
	CALID. 4	-	1	2	1
	TOTAL AFECTADO	3	2	5	7
	GRAVEDAD MEDIA	2.0	3.5	3.2	3.0

Tabla 3: Excreción urinaria de albúmina y creatinina en ratas obesas diabéticas Zucker (ZDF), ratas tratadas con ramipril y ratas tratadas con un compuesto de la fórmula (II-B) partiendo de un animal de 6 meses de edad. Las ratas ZDF son un modelo de diabetes tipo II.

	Albúmina/creatinina		
	mg/mmol		
	Basal	6 semanas tratamiento	12 semanas tratamiento
Placebo ratas ZDF			
media	1330,99	1068,25	1193,47
s	797,55	778,81	633,10
EMT	230,23	224,82	182,76
N	12	12	12
Comp. (II-B) ratas ZDF			
media	1330,99	135,08	100,86
S	797,55	40,28	59,27
EMT	230,23	11,63	17,11
N	12	12	12
Ramipril ratas ZDF			
media	1330,99	1249,59	841,69
S	797,55	1036,03	1124,24
EMT	230,23	299,07	324,54
N	12	12	12

5

Ejemplo 2:

10 Se determinó la excreción de albúmina y creatinina en ratas Goto-Kakizaki (GK). Las ratas GK son un modelo de diabetes tipo II. Se dejó un grupo sin tratar y uno se trató con el inhibidor de ACE/NEP de la fórmula (II-B) y un grupo se trató con el inhibidor de ACE ramipril.

Tabla 4: Excreción urinaria de albúmina y creatinina en ratas GK, ratas tratadas con ramipril y ratas tratadas con un compuesto de fórmula (II-B) partiendo de un animal de 6 meses de edad:

	Albúmina/creatinina		
	mg/mmol		
	Basal	6 semanas tratamiento	12 semanas tratamiento
Placebo ratas GK			
media	103,95	329,37	1183,19
s	71,42	230,17	637,71
EMT	20,62	66,44	184,09
N	12	12	12
Comp. (II-B) ratas GK			
media	103,95	17,70	24,28
s	71,42	6,01	14,41
EMT	20,62	1,74	4,16
N	12	12	12
Ramipril ratas GK			
media	103,95	161,71	244,89
S	71,42	112,42	146,00
EMT	20,62	32,5	44,0
N	12	12	11

5

Ejemplo 3:

10

Se determinó la excreción de albúmina y creatinina en ratas Wistar. Se dejó un grupo sin tratar, uno se trató con el inhibidor de ACE/NEP de fórmula (II-B) y un grupo se trató con el inhibidor de ACE ramipril. Las ratas Wistar son no diabéticas y desarrollan proteinuria y lesiones estructurales del riñón durante la vida de adulto. Las ratas Wistar son, por lo tanto, un modelo de nefropatía no diabética.

La figura 1 muestra la nefropatía no diabética relacionada con la edad en ratas Wistar tratadas con placebo (el riñón de una rata placebo exhibe lesiones túbulo-intersticiales moderadas (formaciones proteínicas en los túbulos, infiltración celular inflamatoria, túbulos basófilos)).

5 Tabla 5: Excreción urinaria de albúmina y creatinina en ratas Wistar, ratas tratadas con ramipril y ratas tratadas con un compuesto de la fórmula (II-B) partiendo de un animal de 6 meses de edad:

	Albúmina/creatinina		
	mg/mmol		
	Basal	6 semanas tratamiento	12 semanas tratamiento
Placebo ratas Wistar			
media	130,45	149,82	290,10
S	285,53	231,12	265,69
EMT	90,29	64,10	73,69
N	10	13	13
Comp. (II-B) ratas Wistar			
media	130,45	18,07	21,21
S	285,53	17,64	29,49
EMT	90,29	4,89	8,18
N	10	13	13
Ramipril ratas Wistar			
media	130,45	184,27	188,40
S	285,53	171,87	146,47
EMT	90,29	49,62	42,28
N	10	12	12

10 En el modelo no diabético, el compuesto de la fórmula (II-B) muestra un efecto nefroprotector significativamente mayor que ramipril según se determina por el grado de proteinuria.

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA EDAD

5 La incubación de proteínas o lípidos con azúcares aldosa resulta en una glicación no enzimática y en la oxidación de grupos amino en proteínas para formar aductos Amadori. Con el tiempo, los aductos sufren unas redistribuciones adicionales, deshidrataciones y reticulación con otras proteínas para formar complejos conocidos como productos finales de glicosilación avanzada (AGEs). La formación de AGEs también se puede describir como reacciones de Maillard. Factores que fomentan la formación de AGEs incluían un cambio retardado en las proteínas (por ejemplo como en amiloidosis), acumulación de macromoléculas con un alto contenido en lisina y altos niveles de glucosa en sangre (por ejemplo como en el caso de diabetes) (Hori et al., J. Biol. Chem. 270:25752-761, (1995)). Los AGEs han estado implicados en una diversidad de trastornos, incluidas complicaciones asociadas con diabetes y el envejecimiento normal.

10 Los AGEs exhiben una unión específica y saturable a receptores de la superficie celular en células endoteliales de la microvasculatura, monocitos y macrófagos, células de la musculatura lisa, células mesenquiales y neuronas. El receptor de los productos finales glicosilados avanzados (RAGE) es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas de moléculas de la superficie celular.

15 Niveles incrementados de RAGE se encuentran en tejidos en envejecimiento (Schleicher et al., J. Clin. Invest. 1997, 99, 457-468) y en la retina, vasculatura y riñón diabéticos (Schmidt et al., Nature Med. 1995, 1002-1004). La activación de RAGE en diferentes tejidos y órganos conduce a un cierto número de consecuencias patofisiológicas. RAGE ha estado implicado en una diversidad de estados que incluyen: inflamaciones aguda y crónica (Hofmann et al, Cell 1999, 97, 889-901), el desarrollo de complicaciones tardías diabéticas tales como una permeabilidad vascular incrementada, nefropatía, aterosclerosis y retinopatía por acumulación de AGEs en los riñones y otros tejidos (Singh et al., Diabetologia 2001, 44, 129-146), así como en la enfermedad de Alzheimer (Yan et al., Nature 1996, 382, 685-691), disfunción eréctil, invasión y metástasis de tumores (Taguchi et al., Nature 2000, 405, 354-357).

20 Es conocido que el inhibidor de ACE ramipril influye sobre los niveles en suero de productos finales de glicación avanzada en pacientes de alto riesgo con una enfermedad arterial coronaria: resultados procedentes de un estudio HOPE (B. Kihovd, E.M. Hjerkin, I. Seljeflot, T.J. Berg, A.A. Reikvam).

25 Se ha encontrado ahora que compuestos de la fórmula (I) reducen significativamente la acumulación de AGEs en los riñones y en el corazón. Por lo tanto, compuestos de la fórmula (I) son útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades metabólicas asociadas con productos finales de glicación avanzada, especialmente complicaciones diabéticas tales como neuropatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética, infarto de miocardio, cataratas y cardiopatía diabética.

30 Los valores AGE del riñón se determinaron mediante análisis de la mancha puntual (Stracke et al., Exp. Clin. Endocrinol, Diabets 2002, 109, 330-336) y cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa o RP-HPLC (Drusch et al., Food Chem. 1999, 65, 547-553).

35 El tratamiento de ratas diabéticas con un compuesto de la fórmula (II-B) normaliza los valores de AGE en el riñón (CML), el tratamiento con M 100.240 disminuye significativamente el valor CML.

40 Ejemplo 4: Análisis de la mancha puntual

45 Muestras de riñón para análisis de la mancha puntual se obtuvieron de ratas ZDF machos de 17 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas durante siete semanas con 30 mg/kg/d de compuesto (II-B) y 35 mg/kg/d de MDL 100.240. Se sacrificó a tres animales de cada grupo, los riñones se retiraron e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. La molienda del riñón se efectuó en nitrógeno líquido utilizando un molino congelador (Freezer 6750, C3 Analysetechnik GmbH). 10 mg de muestra de riñón se disolvieron en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS que contenía 0,5 g/l de Tween 20, PMSF 0,5 mM, 1 µg/ml). La solución se trató dos veces durante cinco segundos con un disruptor de células ultrasónico (45% de potencia, Bandolin Sonoplus HD 2070), se centrifugó durante 20 minutos a 4000 rpm y el material sobrenadante se utilizó para el análisis de la mancha puntual. La membrana de nitrocelulosa se colocó en el aparato de la mancha puntual y se lavó dos veces con 100 µl de TBS/pocillo. Para cada muestra, 10 µg de proteína (la concentración de proteína de las muestras se determinó con el análisis de proteínas DC, Bio Rad) se diluyeron en 100 µl de TBS y se cargaron sobre la membrana de nitrocelulosa (Amersham). La membrana se incubó durante una noche en TBST (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 al 0,05% v/v) con leche en polvo no grasa al 5% a 4°C y se incubó durante 1

5 hora a la temperatura ambiente utilizando la siguiente concentración de anticuerpos: anti-CML 011 (Biologo) 0,25 µg/ml, anti-CEL (Biologo) 0,25 µg/ml y anti-pentosidina 012 (Biologo) 0,25 µg/ml. Después de un lavado extenso en TBST con leche en polvo no grasa al 5%, las membranas se expusieron a anticuerpos IgG anti-ratón marcados con peroxidasa alcalina (Dianova) durante una hora a la temperatura ambiente. Las membranas se lavaron de nuevo y se expusieron al sistema de detección de quimifluorescencia reforzado (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia relativa se determinó con el Fluor-Imager 595 (Molecular Dynamics) y se cuantificó utilizando el software Image-Quant. Los resultados se expresaron en fluorescencia relativa (rf) veces 10⁵.

10 Tabla 6: Valores del subtipo de AGE CML en el riñón de ratas ZDF de 17 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas con compuesto (II-B) o MDL 100.240.

riñones de ratas de 17 semanas de edad anti-CML 011	n	media rf * 10 ⁵	EMT rf * 10 ⁵	ensayo t	sign.
control flaco	3	32.20	1.22		
ratas ZDF	3	45.14	3.23	0.0199	*
ZDF comp. (II-B)	3	32.62	0.34	0.0182	*
ZDF MDL 100.240	3	38.67	1.38	0.1389	

15 Tabla 7: Valores del subtipo de AGE CEL en el riñón de ratas ZDF de 17 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas con compuesto (II-B) o MDL 100.240.

riñones de ratas de 17 semanas de edad anti-CEL	n	media rf * 10 ⁵	EMT rf * 10 ⁵
control flaco	3	54.49	2.55
ratas ZDF	3	61.30	1.12
ZDF comp. (II-B)	3	50.24	0.46
ZDF MDL 100.240	3	52.60	1.16

20 Tabla 8: Valores del subtipo de AGE pentosidina en el riñón de ratas ZDF de 17 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas con compuesto (II-B) o MDL 100.240.

riñones de ratas de 17 semanas de edad anti-pentosidina 012	n	media rf * 10 ⁵	EMT rf * 10 ⁵
control flaco	3	52.78	1.65
ratas ZDF	3	56.01	1.24
ZDF comp. (II-B)	3	44.99	1.61
ZDF MDL 100.240	3	40.70	2.75

Los valores del subtipo de AGE CML son significativamente mayores en riñones de ratas ZDF en comparación con ratas testigo ($p < 0,05$). Para los subtipos de AGE CEL y pentosidina no pudo demostrarse ninguna diferencia significativa en las ratas ZDF y testigo. Ratas ZDF tratadas con un compuesto de la fórmula (II-B) muestran valores AGE significativamente menores para el subtipo AGE CML, CEL y pentosidina ($p < 0,05$) en comparación con ratas ZDF no tratadas. Valores AGE menores para los subtipos CEL y pentosidina también se pueden determinar en ratas ZDF tratadas con MDL 100.240 ($p < 0,01$).

Ejemplo 5: Cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)

Muestras de riñón y corazón para el análisis de RP-HPLC se obtuvieron de ratas ZDF machos de 17 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas durante siete semanas con 30 mg/kg/d de compuesto de la fórmula (II-B) y 35 mg/kg/d de MDL 100.240. Se analizaron dos animales de cada grupo. Las moliendas del riñón y del corazón se efectuaron en nitrógeno líquido utilizando un molino congelador (Freezer 6750, C3 Analysetechnik GmbH). La hidrólisis de las muestras de órganos se efectuó con ácido clorhídrico (HCl) 6 M a 110°C durante 12 horas. La derivatización de muestras con o-ftaldialdehído (OPA) y RP-HPLC se efectuó según se describe en Drusch et al., Food Chem. 1999, 65, 547-553.

Tabla 9: Valores del subtipo de AGE CML en el riñón de ratas ZDF de 17 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas con compuesto (II-B) o MDL 100.240.

RP-HPLC riñones de ratas de 17 semanas de edad	n [animales]	conc. media de CML [%]	EMT [%]
ZDF placebo	2	100	0.27
control flaco	2	84	1.19
comp. (II-B)	2	55	3.83
MDL 100.240	2	60	10.15

Tabla 10: Valores de los subtipos de AGE CML en el riñón de ratas ZDF de 37 semanas de edad, ratas testigo y ratas

ZDF tratadas con un compuesto de fórmula (II-B) o MDL 100.240. Los valores con $p < 0,05$ se consideraron significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

RP-HPLC riñones de ratas de 37 semanas de edad	n [animales]	conc. media de CML [%]	EMT [%]	ensayo t	sign.
ZDF placebo	2	100	2.00	0.010	*
control flaco	2	79	0.17		
ZDF comp. (II-B)	2	58	4.46	0.014	*
ZDF MDL 100.240	2	93	4.77	0.298	

5 Tabla 11: Valores de los subtipos de AGE CML en el corazón de ratas ZDF de 37 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas con un compuesto de fórmula (II-B) o MDL 100.240. Los valores con $p < 0,05$ se consideraron significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

RP-HPLC corazones de ratas de 37 semanas de edad	n [animales]	conc. media de CML [%]	EMT [%]	ensayo t	sign.
ZDF placebo	2	100	3.74	0.015	*
control flaco	2	32	7.28		
ZDF comp. (II-B)	2	26	10.95	0.025	*
ZDF MDL 100.240	2	66	3.29	0.022	*

10 Ratas ZDF muestran una concentración de CML significativamente mayor en el riñón de ratas de 17 y 37 semanas de edad y en el corazón de ratas de 17 semanas de edad en comparación con ratas testigo ($p < 0,05$). El tratamiento con un compuesto de la fórmula (II-B) reduce la concentración de CML en el riñón de ratas ZDF de 17 y 37 semanas de edad, así como la concentración de CML en el corazón de ratas ZDF de 17 semanas de edad. MDL 100.240 reduce también la concentración de CML en el riñón y corazón en ratas ZDF de 17 semanas de edad, pero no en el riñón de ratas ZDF de 37 semanas de edad.

RESISTENCIA A INSULINA

20 Los compuestos de la fórmula (I) muestran también una actividad sensibilizante a insulina. La acción profiláctica de los compuestos de la fórmula (I) tras nefropatía es también indicativa de que se puede esperar que un agente sensibilizante a insulina prevenga, invierta, establezca o retarde la progresión de microalbuminuria en albuminuria. Esto se debe a que se considera que la microalbuminuria es un adivino de la futura nefropatía, especialmente en pacientes con una evidencia clínica de un síndrome de resistencia a insulina pre-diabético, al que alternativamente se alude como síndrome X.

25 Hasta la fecha no se ha examinado el uso de inhibidores de ACE o de vasopeptidasa para el tratamiento de la resistencia a insulina.

30 Se ha encontrado ahora que compuestos de la fórmula (I) reducen significativamente las concentraciones de glucosa en sangre y los valores HbA_{1c} y, con ello, reducen la resistencia a insulina. HbA_{1c} es una medida de valores de glucosa a largo plazo. HbA_{1c} glicado es un AGE temprano, un denominado producto Amadori.

El efecto de un compuesto de la fórmula (II-B) sobre HbA_{1c} y el valor de glucosa en sangre es similar a M 100.240, y ambos compuestos muestran valores menores que el inhibidor de ACE ramipril.

Ejemplo 6: Análisis de glucosa en sangre y HbA_{1c} en ratas ZDF

La glucosa en sangre y HbA_{1c} se midieron en ratas gruesas diabéticas Zucker machos de diecisiete semanas de edad (Genetic Model Inc.), ratas testigo (Genetic Model Inc.) y ratas ZDF machos tratadas durante siete semanas con 30 mg/kg/d de compuesto de la fórmula (II-B), 35 mg/kg/d de MDL 100.240 y 1 mg/kg/d de ramipril. En cada grupo se analizaron quince animales.

Las muestras de sangre para la determinación de glucosa se obtuvieron de ratas ZDF utilizando tubos de muestreo convencionales. En el espacio de 30 minutos de la recogida, las muestras se separaron de las células por centrifugación. La determinación cuantitativa de la glucosa en sangre en suero se efectuó con un ensayo enzimático in vitro de Roche Diagnostics GmbH (Gluco-quant, Roche Diagnostics GmbH) utilizando el analizador de química clínica automatizado Boehringer Mannheim/Hitachi 912.

Para obtener muestras de sangre para la determinación de HbA_{1c}, se utilizaron tubos capilares desechables. Los valores HbA_{1c} se obtuvieron de muestras de sangre entera hemolizada con un inmunoensayo de la inhibición turbidimétrica (Tina-quant, Roche Diagnostics GmbH) y las concentraciones de hemoglobina se determinaron en un segundo canal en un analizador de química clínica automatizado (Boehringer Mannheim/Hitachi 912). La concentración de HbA_{1c} en porcentaje se calculó a partir de la relación HbA_{1c} a hemoglobina total.

Tabla 12: Concentración de glucosa en sangre en ratas ZDF de 10 y 17 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas con compuesto (II-B), MDL 100.240 y ramipril.

glucosa en sangre	ratas ZDF		control		ZDF Comp. (II-B)		ZDF Ramipril		ZDF MDL100.240	
	10	17	10	17	10	17	10	17	10	17
edad [semanas]	10	17	10	17	10	17	10	17	10	17
media [mM]	11.92	29.68	7.32	8.04	10.67	21.09	11.74	27.33	10.37	19.74
EMT [mM]	1.74	1.32	0.15	0.34	1.49	2.78	1.48	1.75	1.40	2.10
n [animales]	15	15	20	20	15	15	15	15	15	15

Tabla 13: Valores HbA_{1c} en ratas ZDF de 10 y 17 semanas de edad, ratas testigo y ratas ZDF tratadas con compuesto (II-B), MDL 100.240 y ramipril.

HbA _{1c}	ratas ZDF		control		ZDF Comp. (II-B)		ZDF Ramipril		ZDF MDL100.240	
	10	17	10	17	10	17	10	17	10	17
edad [semanas]	10	17	10	17	10	17	10	17	10	17
media [%]	6.14	9.96	4.49	4.62	5.69	8.24	5.66	9.48	5.60	7.19
DT [%]	0.22	0.42	0.02	0.02	0.16	0.71	0.14	0.52	0.15	0.46
n [animales]	15	15	20	20	14	15	15	15	15	15

La concentración de glucosa en sangre y los valores HbA_{1c} son significativamente menores en los animales testigo en comparación con las ratas ZDF (p<0,01). Las ratas ZDF machos de 17 semanas de edad tratadas con MDL 100.240 o compuesto (II-B) muestran también una concentración de glucosa en sangre y valores HbA_{1c} significativamente menores

en comparación con las ratas ZDF tratadas. No puede demostrarse ninguna diferencia significativa en cuanto a la glucosa en sangre o HbA_{1c} en ratas ZDF de 17 semanas de edad tratadas con ramipril en comparación con las ratas ZDF no tratadas.

5 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y PLACAS ATEROSCLERÓTICAS

En el modelo de conejo aterogénico (conejos White New Zealand fueron alimentados con colesterol al 0,25% más aceite de coco al 3%) se demostró que incluso un corto período con una dieta aterogénica de 6 semanas ya conduce a una disfunción endotelial sostenida, a pesar de que después de ello los animales recibieron durante 3 meses una dieta normal.
 10 En todos los experimentos conocidos los animales fueron alimentados constantemente durante todo el tiempo con una dieta aterogénica y tenían niveles de colesterol extremadamente altos no fisiológicos, no equiparables con la situación en seres humanos.

La disfunción endotelial así como los cambios aterogénicos en los vasos sanguíneos fueron ambos prevenidos e invertidos mediante tratamiento con el inhibidor de ACE/NEP del compuesto de la fórmula (II-B), investigados por vez primera y mostrados en comparación directa con el inhibidor de ACE, ramipril. Como medida de la disfunción endotelial servía la relajación dependiente del endotelio sobre anillos aórticos aislados de los conejos, así como la liberación de óxido y superóxido nítrico a partir de las células endoteliales.

20 Ejemplo 7: Efectos del tratamiento a largo plazo con el inhibidor de ACE/NEP del compuesto de la fórmula (II-B) sobre la disfunción endotelial y placas ateroscleróticas en conejos alimentados con una dieta aterogénica

Grupos:

Convencionales: dieta normal durante 18 semanas

25 Aterogénicos: dieta aterogénica durante 18 semanas (aceite de coco al 3% + colesterol al 0,25%)

Dieta variada (Var.): dieta aterogénica durante 6 semanas + dieta normal durante 12 semanas

Dieta variada + ramipril: dieta aterogénica durante 6 semanas + dieta normal durante 12 semanas + ramipril

Dieta variada + compuesto (II-B): dieta aterogénica durante 6 semanas + dieta normal durante 12 semanas + comp. (II-B)

30 Tabla 14: Relajación de los anillos aórticos por acetilcolina (ACh) en 4 concentraciones incrementadas (10^{-8} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l y 10^{-5} mol/l) después de estimulación precedente por parte de fenilefrina (10^{-7} mol/l) (datos en %, $x \pm$ EMT)

ACh	10^{-8} mol/L	10^{-7} mol/L	10^{-6} mol/L	10^{-5} mol/L
Grupos				
Dieta normal	11,65 ± 1,55	52,68 ± 3,06	75,64 ± 2,83	83,81 ± 3,3
Dieta aterogénica	2,18 ± 1,23	7,07 ± 2,76 * # ° †	11,82 ± 3,88 * # ° †	12,49 ± 4,1 * # ° †
Dieta var.	10,76 ± 2,29	43,33 ± 3,57 †	63,48 ± 2,89 † # °	69,41 ± 2,82 † # °
Var. + Ramipril	13,08 ± 2,22	51,86 ± 4,43	77,34 ± 3,7	83,73 ± 4,03
Var. +comp (II-B)	19,9 ± 3,48	59,62 ± 6,43	76,4 ± 6,38	80,89 ± 6,82

35 *:p<0,05 frente a dieta variada;

#: p<0,05 frente a dieta normal;

!: p<0,05 frente a Var. + Ram.

†: p<0,05 frente a Var. + comp. (II-B)

Tabla 15: Datos de NO y superóxido (O₂) (en nmol/l; $x \pm$ EMT)

Grupos	NO (nM)	O ₂ ⁻ (nM)
Dieta normal	306,71 ± 36,16 *	29,41 ± 5,89
D. aterogénica	167,77 ± 30,65	52,12 ± 7,06 #
Dieta var.	174,39 ± 25,44	35,86 ± 7,49
Var. +Ramipril	368,31 ± 42,25 *	48,09 ± 7,91 #
Var. + comp (II-B)	329,19 ± 30,10 *	30,18 ± 6,00

+: p<0,05 frente a dieta variada, frente a dieta aterogénica;

#: p<0,05 frente a dieta variada, frente a dieta normal, frente a dieta variada + comp. (II-B).

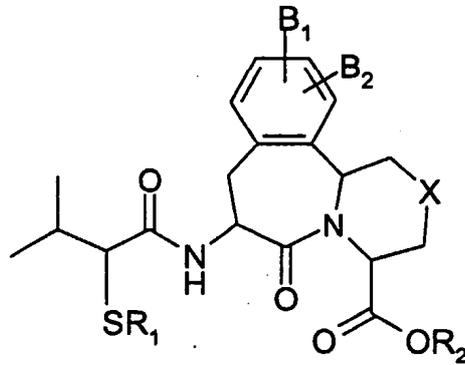
5

NO y O₂⁻ son marcadores de la función endotelial: son beneficiosos una relajación incrementada y niveles de NO, mientras que la formación de O₂⁻ incrementada inhibe los efectos beneficiosos de NO.

10

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula (II)



5

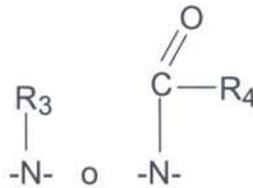
en donde

R₁ es hidrógeno, -CH₂OC(O)C(CH₃)₃, o un grupo acilo;

R₂ es hidrógeno, -CH₂O-C(O)C(CH₃)₃; un alquilo C₁-C₄; arilo, -(alquil C₁-C₄)-arilo; o difenilmetilo;

X es -(CH₂)_n, en donde n es un número entero 0 ó 1, -S-, -O-,

10



en donde R₃ es hidrógeno, un alquilo C₁-C₄, arilo o aril-(alquilo C₁-C₄), y R₄ es -CF₃, alquilo C₁-C₁₀, arilo o aril-(alquilo C₁-C₄);

B₁ y B₂, cada uno independientemente, son hidrógeno, hidroxilo, -OR₅, en donde R₅ es alquilo C₁-C₄, arilo o -(alquil C₁-C₄)-arilo, o en los casos en que B₁ y B₂ estén unidos a átomos de carbono adyacentes, B₁ y B₂ pueden ser tomados juntos con dichos átomos de carbono adyacentes para formar un anillo de benceno o metilendioxi, para la fabricación de un medicamento el tratamiento y/o la profilaxis de nefropatía en pacientes diabéticos.

20

2.- Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₁ es acetilo.

3.- Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R₁ es hidrógeno.

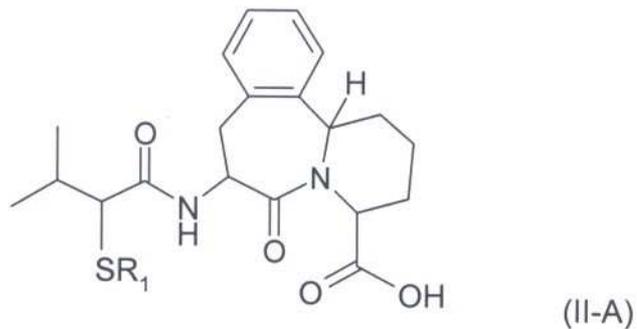
4.- Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde B₁ y/o B₂ son hidrógeno.

25

5.- Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X es -CH₂.

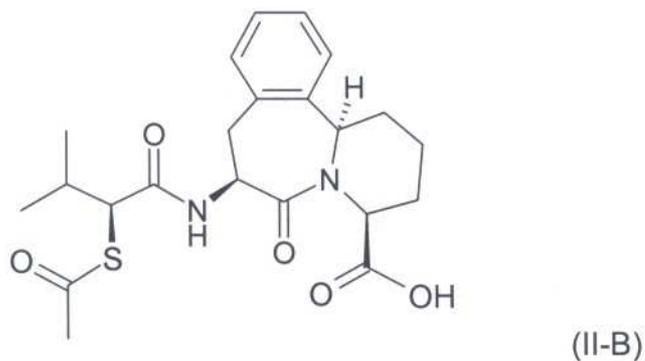
6.- Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula (II) se caracteriza por un compuesto de la fórmula (II-A):

30



en donde R₁ es acetilo o hidrógeno.

- 5 7.- Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula (II) se caracteriza por un compuesto de la fórmula (II-B)



- 10 8.- Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula (II) se caracteriza por un compuesto de la fórmula (II-C)

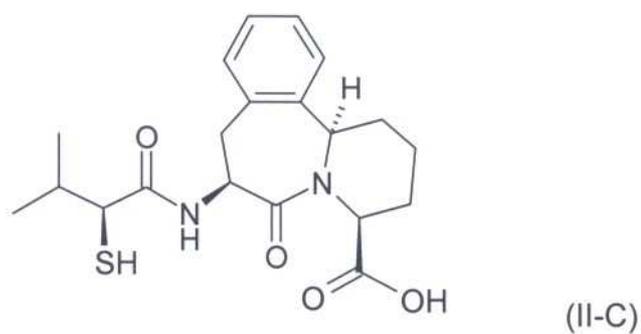
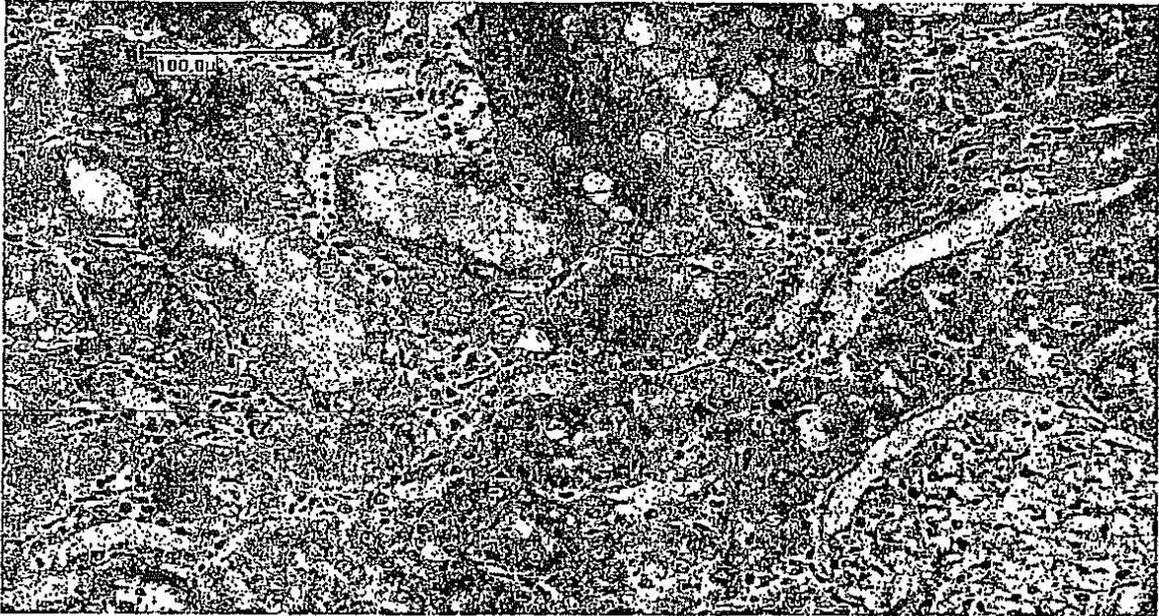


Figura 1



Riñón de una rata placebo que exhibe lesiones túbulo-intersticiales moderadas (formaciones proteínicas en los túbulos, infiltración celular inflamatoria, túbulos basófilos; aum. orig. $\times 100$).