(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 387 890**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05763719 .1**
(96) Fecha de presentación: **29.04.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1755582**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

(54) Título: **Composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis**

(30) Prioridad:
29.04.2004 FR 0404569

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.10.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.10.2012

(73) Titular/es:
Université Paris Descartes
12, rue de l'Ecole de Médecine
75270 Paris Cedex 06, FR y
Assistance Publique - Hopitaux De Paris

(72) Inventor/es:
COUDERC, Rémy;
RASMUSEN, Carole;
MARTIN, Chantal;
TRICOTTET, Viviane;
CYNOBER, Luc y
MOINARD, Christophe

(74) Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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).

ES 2 387 890 T3

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de la aterosclerosis.

La presente invención se refiere a una nueva composición farmacéutica y a su utilización, en particular en el marco de la lucha contra la aterosclerosis.

La aterosclerosis es la primera causa de mortalidad en los países industrializados, con más del 20% de los fallecimientos (Murray JL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349: 1269-76). Según la OMS (1954), la aterosclerosis es una asociación variable de recomposición de la íntima de las arterias de grueso y mediano calibre, que consiste en la formación de una placa de ateroma, es decir una acumulación local de lípidos, de glúcidos complejos, de sangre y de productos sanguíneos, de tejidos fibrosos y de depósitos calcáreos; todo ello acompañado de modificaciones de la media. Esta patología se manifiesta sólo al cabo de varios años de evolución infra-clínica. Su prevención, más aún que su tratamiento, sigue siendo por lo tanto primordial.

La formación de la placa es una sucesión de cinco etapas (Tedgui A, Mallat Z. Formation de la plaque d'athérosclérose. Rev Prat 1999; 49: 2081-2086):

- acumulación de LDL (Low Density Lipoprotein) en la íntima,
- oxidación de las LDL (LDLox) en la pared mediante el contacto con unas células endoteliales, unas células musculares lisas (CML) o unos macrófagos,
- reclutamiento de monocitos circulantes gracias a la inducción de moléculas de adhesión, tales como VCAM1 o ICAM1, provocada por las LDL oxidadas,
- captación de las LDLox por los macrófagos gracias a los receptores "scavenger"; así el colesterol se acumula en los macrófagos,
- formación de una capa fibromuscular estabilizante, constituida por células musculares lisas y por proteínas de la matriz extracelular.

La L-arginina, aminoácido básico presente en las proteínas vegetales y animales, es indispensable para la síntesis de las proteínas tisulares. En diferentes estudios en animales, durante una suplementación de la dieta con L-arginina (el 2% en el agua de beber, dosis que permite duplicar la concentración plasmática de arginina), parece que ésta tiende a tener un efecto antiaterógeno. Este tratamiento parece tener también un efecto sobre la reactividad vascular. Böger *et al*. (Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Böhme M, Nafe R, *et al*. Dietary L-Arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1997; 96: 1282-1290), así como Behr-Roussel *et al.* (Behr-Roussel D, Rupin A, Simonet S, Bonhomme E, Coumailleau S, Cordi A, *et al*. Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2000; 102: 1033-1038) ponen en evidencia una estabilización del área de la placa ateromatosa con una dieta enriquecida durante 12 a 16 semanas.

Las estatinas son unos potentes inhibidores de la síntesis del colesterol. Su indicación principal es la reducción del LDL-colesterol plasmático en prevención primaria o secundaria de los accidentes isquémicos cardiacos (Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996; 348: 1079-1082).

Las estatinas inhiben la HMG-CoA reductasa por competición reversible con el sustrato HMG-CoA, para el sitio activo de la enzima. Por lo tanto, causan una disminución de la síntesis del mevalonato y de sus derivados, entre los cuales está el colesterol. Por tanto, las estatinas están indicadas para el tratamiento de la aterosclerosis.

Sin embargo, hoy en día, ninguno de los tratamientos citados permite prevenir y/o tratar totalmente la aterosclerosis.

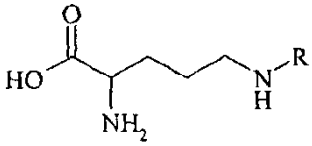
Un objetivo de la invención es por lo tanto proporcionar un modo de prevención y/o de tratamiento más eficaz de la aterosclerosis.

La presente invención se desprende en particular de la demostración de un efecto sinérgico inesperado de la asociación de una estatina y de la L-arginina en el marco de la prevención y/o del tratamiento de la aterosclerosis.

Así, la presente invención se refiere a la utilización

* de por lo menos una estatina, la atorvastatina, o de una sal farmacéuticamente aceptable de ésta, en asociación con

* por lo menos un compuesto de fórmula (I) siguiente:



(I)

en la que R representa

correspondiendo el compuesto de fórmula (1) a la arginina

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,

para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de la aterosclerosis, en particular de la aterosclerosis primaria o secundaria.

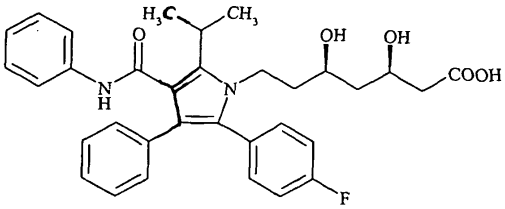
La hipertensión, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas, en particular la enfermedad de Alzheimer, presentan un componente vascular relacionado con una disfunción endotelial que puede ser compensada por la asociación sinérgica de un compuesto de fórmula (I) y de estatina, en particular por la asociación sinérgica arginina-estatina, según la invención.

La expresión "en asociación" significa que la estatina y el compuesto de fórmula (I) están presentes ambos de manera independiente en los medicamentos según la invención, en los que no están en ningún caso unidos entre sí, ya sea a través de enlaces débiles, tales como unas interacciones electroestáticas, para formar una sal por ejemplo, o a través de enlaces fuertes, tales como unos enlaces covalentes.

Como se entiende en la presente memoria, el término "estatina" designa un compuesto que pertenece a la clase de los inhibidores de HMG-CoA reductasa. En particular, el término estatina no corresponde en ningún caso a un derivado de aminoácido procedente de la pepstatina y que tiene unas propiedades de inhibición de la renina.

Por otra parte, ventajosamente, el compuesto de fórmula general (I), en particular la arginina, se utiliza como adyuvante para aumentar los efectos de las estatinas en el marco de la preparación de medicamentos destinados a la prevención o al tratamiento de la aterosclerosis, en particular de la aterosclerosis primaria o secundaria, de la hipertensión, de la diabetes o de las enfermedades neurodegenerativas, en particular la enfermedad de Alzheimer.

Según un modo de realización preferido de la invención, la estatina se selecciona de entre el grupo que comprende la atorvastatina.



Atorvastatina

Según un modo de realización particularmente preferido de la invención, la estatina es la atorvastatina.

Según otro modo de realización preferido de la invención, el compuesto de fórmula (I) corresponde al isómero L.

Según aún otro modo de realización preferido de la invención, R representa

correspondiendo el compuesto de fórmula (I) entonces a la arginina, en particular a la L-arginina.

La invención se refiere más particularmente a la utilización tal como se ha definido anteriormente, de una estatina, en particular de atorvastatina, en una cantidad conveniente para la administración a un individuo de una dosis de aproximadamente 5 mg/d a aproximadamente 80 mg/d.

La invención se refiere asimismo más particularmente a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de un compuesto de fórmula (I), en particular de L-arginina, en una cantidad conveniente para la administración a un individuo de una dosis de 1 g/día a 30 g/día, en particular de 5 g/día a 30 g/día.

De manera ventajosa, las dosis de L-arginina inferiores a 5 g/d son convenientes particularmente para los niños.

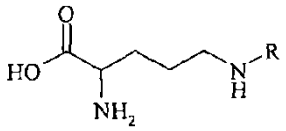
La invención se refiere asimismo muy particularmente a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de L-arginina en una cantidad conveniente para la administración a un individuo de una dosis de por lo menos 10 g/día.

En un modo de realización particular, la invención se refiere a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de L-arginina, en una cantidad conveniente para la administración a un individuo de una dosis de 0,15 g/kg/día, es decir una dosis de 0,15 g/día de L-arginina por kg de peso corporal del individuo en cuestión.

Según otro modo de realización particular de la utilización tal como se ha definido anteriormente, el medicamento es conveniente para la administración a un individuo de una dosis unitaria de 5 mg a 80 mg de estatina y de 5 g a 30 g, en particular 10 g, de L-arginina.

La presente invención se refiere asimismo a unos productos que contienen

* por lo menos una estatina, la atorvastatina, o una sal farmacéuticamente aceptable de ésta, y
* por lo menos un compuesto de fórmula (I) siguiente:



(I)

en la que R representa

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,

como productos de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo, en el marco del tratamiento de la aterosclerosis, en particular de la aterosclerosis primaria o secundaria.

La expresión "productos de combinación" significa que la estatina y el compuesto de fórmula (I) están ambos presentes de manera independiente en los productos según la invención, en los que no están en ningún caso unidos entre sí, ya sea a través de enlaces débiles, tales como interacciones electroestáticas, para formar una sal por ejemplo, o a través de enlaces fuertes, tales como unos enlaces covalentes.

Según un modo de realización preferido de la invención, la estatina es la atorvastatina.

Según un modo de realización particularmente preferido, la estatina es la atorvastatina.

Según otro modo de realización preferido de la invención, el compuesto de fórmula (I) corresponde al isómero L.

Según aún otro modo de realización preferido de la invención, R representa

correspondiendo el compuesto de fórmula (I) entonces a la arginina, en particular a la L-arginina.

Según un modo de realización particularmente preferido de la invención, dichos productos son convenientes para la administración a un individuo de una dosis de 5 mg/d a 80 mg/d de estatina, en particular de atorvastatina.

Según otro modo de realización particularmente preferido de la invención, dichos productos son convenientes para la administración a un individuo de una dosis de 1 g/día a 30 g/día, en particular de 5 g/día a 30 g/día, de un

compuesto de fórmula (I), en particular de L-arginina.

De manera ventajosa, las dosis de L-arginina inferiores a 5 g/d son convenientes particularmente para los niños.

Según otro modo de realización particularmente preferido, dichos productos son convenientes para la administración a un individuo de una dosis de L-arginina de por lo menos aproximadamente 10 g/día.

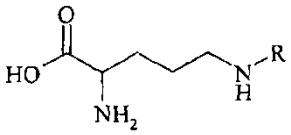
En un modo de realización particular, dichos productos son convenientes para la administración a un individuo de una dosis de L-arginina de 0,15 g/kg/día.

Según otro modo de realización particular de los productos tales como los definidos anteriormente, los productos son convenientes para la administración a un individuo de una dosis unitaria de 5 mg a 80 mg de estatina y de 5 g a 30 g, en particular 10 g, de L-arginina.

La presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende, a título de sustancia activa:

* por lo menos una estatina, la atorvastatina, o una sal farmacéuticamente aceptable de ésta, y

* por lo menos un compuesto de fórmula (I) siguiente:



(I)

en la que R representa

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,

en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Cuando R representa , el compuesto de fórmula (I) corresponde a la arginina.

Estos tres aminoácidos poseen un metabolismo común en el organismo.

Como se entiende en la presente memoria, la atorvastatina y el compuesto de fórmula (I) están ambos presentes de manera independiente en las composiciones farmacéuticas según la invención, en las que no están en ningún caso unidos entre sí, ya sea a través de enlaces débiles, tales como unas interacciones electroestáticas, para formar una sal por ejemplo, o a través de enlaces fuertes, tales como unos enlaces covalentes.

Según un modo de realización preferido de la invención, la estatina es la atorvastatina.

Según un modo de realización particularmente preferido de la invención, la estatina es la atorvastatina.

Según otro modo de realización preferido de la invención, el compuesto de fórmula (I) corresponde al isómero L.

Los aminoácidos naturales encontrados en el organismo son esencialmente de tipo L.

Según aún otro modo de realización preferido, R representa

correspondiendo entonces el compuesto de fórmula (I) a la arginina, en particular a la L-arginina.

Según otro modo de realización preferido de la invención, la composición farmacéutica según la invención es conveniente para la administración a un individuo de una dosis de 5 mg/d a 80 mg/d de estatina, en particular de atorvastatina.

Según aún otro modo de realización preferido de la invención, la composición farmacéutica según la invención es

conveniente para la administración a un individuo de una dosis de 1 g/día a 30 g/día, en particular de 5 g/día a 30 g/día, de un compuesto de fórmula (I), en particular de L-arginina.

De manera ventajosa, las dosis de L-arginina inferiores a 5 g/d son convenientes particularmente para los niños.

Según un modo de realización particularmente preferido, la composición farmacéutica según la invención es conveniente para la administración a un individuo de una dosis de L-arginina de por lo menos 10 g/día.

En un modo de realización particular, la composición farmacéutica, tal como se ha definido anteriormente, es conveniente para la administración a un individuo de una dosis de L-arginina de 0,15 g/kg/día.

Según otro modo de realización particular de las composiciones farmacéuticas tales como las definidas anteriormente, las composiciones farmacéuticas son convenientes para la administración a un individuo de una dosis unitaria de 5 mg a 80 mg de estatina y de 5 g a 30 g, en particular 10 g, de L-arginina.

Según otro modo de realización preferido de la invención, la composición farmacéutica según la invención es conveniente para una administración por vía oral.

Según aún otro modo de realización preferido de la invención, la composición farmacéutica según la invención se caracteriza porque se presenta en forma de polvo para diluir, de tableta, de bolsita, de comprimido, de cápsula, o cualquier otra forma galénica aceptable.

Descripción de las figuras

Figura 1

La figura 1 representa la evolución del peso de los animales (en kilogramos, eje de las ordenadas) en función del tiempo (eje de las abscisas) desde su llegada, y después desde el comienzo (T0) hasta el final del tratamiento (semanas T1 a T8) para el grupo control (primer histograma), el grupo arginina (segundo histograma), el grupo estatina (tercer histograma) y el grupo estatina + arginina (cuarto histograma).

Figura 2

La figura 2 representa la ingesta alimenticia media de los animales (en gramos/días, eje de las ordenadas) en función del tiempo (eje de las abscisas) desde el comienzo del tratamiento (T0) hasta el final del tratamiento (semanas T1 a T8) para el grupo control (primer histograma), el grupo arginina (segundo histograma), el grupo estatina (tercer histograma) y el grupo estatina + arginina (cuarto histograma).

Figura 3

La figura 3 representa la colesterolemia media (en mmol/l, eje de las ordenadas) para el grupo control, el grupo arginina, el grupo estatina y el grupo estatina + arginina, en los tiempos (eje de las abscisas) T0 (primer histograma), T4 (segundo histograma), T8 (sacrificio) (tercer histograma).

Figura 4

La figura 4 representa la trigliceridemia media (en mmol/l, eje de las ordenadas) para el grupo control, el grupo arginina, el grupo estatina y el grupo estatina + arginina, en los tiempos (eje de las abscisas) T0 (primer histograma), T4 (segundo histograma), T8 (sacrificio) (tercer histograma).

Figura 5

La figura 5 representa la concentración plasmática media de las HDL (en mmol/l, eje de las ordenadas) para el grupo control, el grupo arginina, el grupo estatina y el grupo estatina + arginina, en los tiempos (eje de las abscisas) T0 (primer histograma), T4 (segundo histograma), T8 (sacrificio) (tercer histograma).

Figura 6

La figura 6 representa la concentración plasmática media de las LDL calculada según la fórmula de Frieldwald (en mmol/l, eje de las ordenadas) para el grupo control, el grupo arginina, el grupo estatina y el grupo estatina + arginina, en los tiempos (eje de las abscisas) T0 (primer histograma), T4 (segundo histograma), T8 (sacrificio) (tercer histograma).

Figura 7

La figura 7 representa la concentración plasmática media de la arginina (en µmol/l, eje de las ordenadas) para el

grupo control, el grupo arginina, el grupo estatina y el grupo estatina + arginina, en los tiempos (eje de las abscisas) T0 (primer histograma), T4 (segundo histograma), T8 (sacrificio) (tercer histograma).

Figura 8

La figura 8 representa la concentración plasmática media de la ornitina (en µmol/l, eje de las ordenadas) para el grupo control, el grupo arginina, el grupo estatina y el grupo estatina + arginina, en los tiempos (eje de las abscisas) T0 (primer histograma), T4 (segundo histograma), T8 (sacrificio) (tercer histograma).

Figura 9

La figura 9 representa la concentración plasmática media de la citrulina (en µmol/l, eje de las ordenadas) para el grupo control, el grupo arginina, el grupo estatina y el grupo estatina + arginina, en los tiempos (eje de las abscisas) T0 (primer histograma), T4 (segundo histograma), T8 (sacrificio) (tercer histograma).

Figura 10

La figura 10 representa el porcentaje de la superficie de las lesiones (eje de las ordenadas) en los diferentes grupos (eje de las abscisas) en el momento del sacrificio (T8).

Figura 11

La figura 11 representa el porcentaje de la superficie de las lesiones (eje de las ordenadas) a nivel distal de la aorta en los diferentes grupos (eje de las abscisas) en el momento del sacrificio (T8).

Ejemplo

Materiales y métodos

1. Animales y protocolo experimental

Se utilizan veinticuatro conejos Watanabe (Centre de production animale, Olivet, Francia) hiperlipidémicos por deficiencia hereditaria en el receptor de los LDL (LDL-R) homocigotos, de seis semanas de edad. Cada animal se coloca en una jaula individual y recibe una ración alimenticia de 200 g a 250 g por día. Después de 7 días de aclimatación al animalario, se forman cuatro grupos de seis conejos:

* un grupo control recibe una dieta normal para conejo que contiene 16% de proteínas, 3,2% de lípidos y 49,3% de glúcidos (EXT C15, Dietex, St Gratien, francia).

* los conejos del segundo grupo, denominado grupo "arginina", reciben una dieta enriquecida en L-arginina con el fin de duplicar su concentración plasmática en este aminoácido. La L-arginina (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia) se ha mezclado con el alimento, a razón de 15 g/kg de alimento que realiza un aporte de 1 g de arginina/kg de peso vivo/d,

* un tercer grupo, denominado grupo "estatina" recibe una dieta con una estatina (Atorvastatine, Tahor® 10 mg, Godeche-Pfizer, Friburg, Alemania) en el agua de beber, a razón de 2,5 mg/kg/d (Maeso R, Aragoncillo P *et al.* Effect of Atorvastatin on endothelium-dependant constrictor factors in dyslipidemic rabbits. *Gen Pharma*. 2000; 34: 263-272),

* y por último un cuarto grupo, denominado "grupo estatina/arginina" recibe una dieta enriquecida en arginina y un tratamiento por la atorvastatina, también a 2,5 mg/kg/d.

El aporte de L-arginina en la dieta enriquecida se realiza con el fin de corresponder a un aporte de aproximadamente 0,15 g/kg/d de L-arginina en el ser humano.

La ingesta alimenticia se mide diariamente y los animales se pesan una vez por semana. Se extraen unas muestras de plasma cada quince días a partir de la vena marginal de la oreja. La sangre, recogida en tubos heparinizados, se centrifuga (4ºC, 2.000 g, 15 min.). Una parte del plasma se desproteiniza mediante una disolución de ácido sulfosalicílico (30%) y después se reparte en fracciones alícuotas para la dosificación de los aminoácidos. El resto del plasma se alícuota en varias fracciones de aproximadamente 200 µl, y se conserva a -80ºC.

Después de ocho semanas, se efectúa una extracción de suero (aproximadamente 1 ml), a continuación los animales son anestesiados mediante una inyección de pentobarbital heparinizado, y por último se sacrifican.

El conjunto del estudio se realiza según la reglamentación en vigor referente a la experimentación animal.

2. Análisis bioquímicos

El perfil lipídico, es decir, colesterol, triglicéridos, colesterol de las HDL (High Density Lipoproteins) y de las LDL (Low Density Lipoproteins), se efectúa sobre Hitachi 911 por los métodos habituales. El colesterol se dosifica según un ensayo de colorimetría enzimática con la ayuda de una colesterol-esterasa y de una colesterol-oxidasa, seguido de una reacción con una peroxidasa. Ésta reacciona con el agua oxigenada y libera un derivado rojo cuya intensidad de coloración (medida entre 550 y 700 nm) es directamente proporcional a la concentración de colesterol. La dosificación de los triglicéridos se basa también en este principio utilizando una lipasa que libera el glicerol, y una peroxidasa que reacciona con el peróxido de hidrógeno y forma un compuesto rojo. El colesterol de las HDL se dosifica mediante un ensayo colorimétrico enzimático de dos fases. La primera selecciona las diferentes fracciones lipídicas gracias a sulfato de dextrano. La segunda etapa es similar a la dosificación del colesterol con la intervención de una colesterol-esterasa y de una colesterol-oxidasa modificadas por polietilenglicol, y de una peroxidasa que libera un derivado azul-violeta. Los resultados están expresados en mmol/l. Los kits necesarios para el conjunto de estas dosificaciones están proporcionados por RANDOX (Montpellier, Francia). Las LDL se calculan con la ayuda de la fórmula de Frieldwald a partir del colesterol total, del colesterol de las HDL y de los triglicéridos (Friedewald *et al.* (1972) Clin. Chem. 18: 499-502).

Las concentraciones plasmáticas de arginina, de ornitina y de citrulina se determinan sobre un analizador de aminoácidos, JEOL (Tokio, Japón). Los aminoácidos se separan mediante cromatografía intercambiadora de cationes. A la salida de la columna, se revelan mediante una reacción coloreada con ninhidrina. La reacción obtenida se cuantifica mediante fotometría a 570 y 400 nm. Los resultados están expresados en µmol/l.

3. Estudio morfológico e histológico

El día del sacrificio, después de la anestesia, en un mínimo de tiempo, el animal se abre en toda la longitud de la región cervicotorácica. La aorta se secciona lo más abajo posible. Con la ayuda de tijeras curvas, la aorta se extrae del arco hasta el nivel de la bifurcación iliaca siguiendo la columna vertebral. La aorta se limpia en primer lugar en un suero fisiológico y su capa externa se libera de los tejidos grasos. Se fija durante 20 minutos en una mezcla de paraformaldehído al 2%-glutaraldehído al 2% y después se abre a lo largo de la longitud. Después, se vuelve a sumergir en el mismo fijador durante 24h. Al final de lo cual, la aorta se aclara en etanol al 70%, y después se colorea con Soudan IV durante 15 minutos. Se aclara nuevamente en el etanol al 80% durante 20 minutos y después bajo agua corriente durante 1h (22). Después, se fotografía la aorta en plano con un aparato digital Nikon 995. Las fotografías se analizan gracias a un programa de planimetría (Scion Image) que permite determinar la superficie de las lesiones. Por último la aorta se fija en el mismo fijador para el estudio microscópico.

Para la microscopía óptica, la aorta se corta en cuatro segmentos:

- uno al principio y uno al final de arco,
- uno en el centro y uno al final de la aorta.

Se extraen unos fragmentos adyacentes para la microscopía electrónica.

Las extracciones se deshidratan progresivamente en etanol hasta el etanol al 100% y después se tratan mediante parafina. Las secciones así empapadas de parafina son incluidas según una inclusión orientada que permite obtener unos cortes transversales. Se realizan unos cortes de 5 µm que se pegan sobre láminas y después se colorean con HES (hemalo/eritrosina/azafrán de Gâtinais).

4. Análisis estadísticos

Se utilizó el programa StatView, versión 5.0, para el análisis estadístico de los datos. Todos los valores se proporcionan como la media ± SEM. La comparación entre los grupos se realiza mediante un ensayo de Krustkal-Wallis. Este ensayo es una versión no paramétrica del análisis de varianza con un factor sobre los rangos. La comparación entre dos grupos se realiza mediante un ensayo de Mann-Whitney, que es la versión no paramétrica del ensayo t sobre series independientes. Se consideran los valores significativos para $p \leq 0,05$. El significado de las correlaciones entre variables cuantitativas se aprecia mediante el ensayo de Spearman.

Resultados

El tratamiento se efectuó durante 8 semanas (desde T0 al comienzo del tratamiento hasta T8).

1. Animales y parámetros generales

1.1. Seguimiento de los animales: peso e ingesta alimenticia

Durante el experimento, los animales de los cuatro grupos presentan una curva de crecimiento idéntica (Figura 1). Cuando llegaron al animalario, los animales del grupo control y del grupo arginina estaban menos gordos, y esta

diferencia con el grupo estatina y el grupo estatina/arginina se atenúa a partir del comienzo del tratamiento (T0).

La ingesta alimenticia media (Figura 2) aumenta entre el periodo T0-T4, y después tiende a ser regular hasta T8. La disminución de ingesta alimenticia del grupo estatina después de T5 está relacionada con la presencia de dos animales enfermos. Además, dos animales del grupo arginina han muerto antes del final del protocolo y no se han incluido en el estudio.

La medición de los pesos y de la ingesta alimenticia diaria refleja la homogeneidad de los animales sobre estos parámetros sea cual sea el grupo. Con 10 semanas de edad (T4), su peso está comprendido entre 1,9 y 2,1 kg, lo cual corresponde a los datos encontrados en la bibliografía (Murakami S, Kondo Y, Sakurai T, Kitajima H, Nagate T. Taurine suppresses development of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits. *Atherosclerosis*. 2002; 163: 79-87). La ingesta alimenticia aumenta en función de la edad (de 97,6 a 139,5 g/d para el grupo control por ejemplo) y sigue relativamente constante después de T3.

1.1. El perfil lipídico

Los tratamientos por la atorvastatina y por la atorvastatina más arginina tienen un efecto beneficioso sobre el colesterol plasmático (Figura 3); éste disminuye durante el tratamiento. Esta disminución es significativa para los dos grupos frente al control en el tiempo T8. La dieta de arginina no tuvo efecto sobre el colesterol.

La concentración plasmática de los triglicéridos (Figura 4) aumenta con la edad en el grupo control y el grupo arginina. Se observa un efecto positivo significativo en los animales tratados por la atorvastatina sola (frente al control) en T8: la concentración en triglicéridos no aumenta. Este efecto se observa también para el grupo estatina/arginina (no significativo).

La concentración de HDL (Figura 5) en los diferentes grupos evoluciona de la misma manera que los triglicéridos durante el protocolo.

Asimismo, la concentración de LDL (Figura 6) sigue la misma línea que la del colesterol. El tratamiento por atorvastatina induce una disminución de esta concentración, así como para el tratamiento atorvastatina más arginina.

Por un lado, el perfil lipídico es coherente con la bibliografía: los animales de la presente invención al comienzo de estudio (de seis semanas de edad) presentan una colesterolemia entre 20,4 mmol/l (grupo control) y 25,4 mmol/l (grupo estatina/arginina), de acuerdo con el trabajo de Clubb *et al.* (Clubb FJ, Cerny JL, Deferrari DA, Butler-Aucoin MM, Willerson JT, Buja LM. Development of atherosclerotic plaque with endothelial disruption in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit aortas. Cardiovasc Pathol 2001; 10: 1-11) que aporta un valor medio de 21,9 ±1,5 mmol/l. Por otro lado, Dowell *et al.* (Dowell FJ, Hamilton CA, Lindop GB, Reid JL. Development and progression of atherosclerosis in aorta from heterozygous and homozygous WHHL rabbits. Effects of simvastatin treatment. Arterioscler Thromb Vase Biol. 1995; 15: 1152-60) han efectuado un estudio comparativo entre conejos Watanabe heterocigotos y homocigotos, y han definido los homocigotos como que tienen un porcentaje de colesterol superior a 10 mmol/l, lo cual es el caso de los animales de la presente invención.

Se observa, entre T0 y T9, en el grupo control y el grupo arginina un aumento de la concentración plasmática del colesterol del 20% y del 30% respectivamente con la edad (Figura 3), mientras que con el tratamiento de estatina y de estatina/arginina esta concentración disminuye en un 27% para los dos grupos. Así, según los resultados, la atorvastatina tiene un efecto hipocolesterolémico en el animal homocigoto: podría intervenir a nivel de la síntesis hepática del colesterol disminuyendo ésta. Unos resultados similares se encuentran en la bibliografía pero con unos modelos diferentes: un trabajo con la lovastatina, que se extiende durante 16 semanas en el conejo New Zealand White (Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Böhme M, Nafe R, *et al.* Dietary L-Arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1997; 96: 1282-1290) muestra una disminución del colesterol en 32%. Además, un estudio reciente (Suzuki H, Kobayashi H, Sato F, Yonemitsu Y, Nakashima Y, Sueishi K. Plaque-Stabilizing Effect of Pitavastatin in Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) Rabbits. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10: 109-16) con unos conejos Watanabe durante 16 semanas, y utilizando la pitavastatina, muestra una disminución del colesterol plasmático del 28,6%. La disminución de la colesterolemia se refiere principalmente a la fracción LDL como muestran los resultados presentados (disminución del 27,16% para el grupo estatina y del 24,5% para el grupo estatina/arginina), datos que se encuentran también en el estudio de Suzuki *et al*.

A nivel de los triglicéridos, se observa el mismo perfil para el grupo control y el grupo arginina: los triglicéridos aumentan en más de la mitad durante el protocolo (entre T0 y T8). Por el contrario, los animales con estatina (grupo estatina y grupo estatina/arginina) presentan una concentración casi constante entre T0 y T8, lo cual implica un efecto positivo de la atorvastatina contra la hipertrigliceridemia.

La arginina sola aparece sin efecto notable sobre este perfil lipídico, lo cual está de acuerdo con numerosos trabajos (Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Böhme M, Nafe R, *et al*. Dietary L-Arginine reduces

the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1997; 96: 1282-1290; Brandes RP, Brandes S, Böger RH, Bode-Böger SM, Mugge A. L-Arginine supplementation in hypercholesterolemic rabbits normalizes meukocyte adhesion to non-endothelial matrix. *Life Sci* 2000; 66: 1519-1524; Singer AH, Tsao PS, Wang BY, Bloch DA, Cooke JP. Discordant effects of dietary L-arginine on vascular structure and reactivity in hypercholesterolemic rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 710-716).

1.3. Concentración de arginina, de ornitina y de citrulina

La concentración plasmática de arginina (Figura 7) es la misma para el grupo control y el grupo estatina. Ésta se duplica en el grupo arginina en T4 (significativo frente al control), pero cae en T8. El aumento de la concentración de arginina en el grupo estatina/arginina es regular, pero sigue siendo muy inferior al observado para el grupo arginina.

El perfil de ornitina (Figura 8) es parecido al de la arginina.

La concentración plasmática en citrulina (Figura 9) para el grupo estatina/arginina sigue sustancialmente la concentración en arginina.

De manera general, la concentración en L-arginina (este parámetro se dosificó en los tiempos T0, T2, T4, T6 y T8, datos no mostrados) se duplicó en los grupos tratados, es decir el grupo arginina y el grupo estatina/arginina.

3. Estudio morfológico e histológico de las lesiones arteriales

3.1. Estudio macroscópico de las aortas

La evaluación de la superficie de las lesiones (Figura 10) mediante planimetria muestra que ésta es más baja con arginina sola, y aún significativamente más baja con arginina/estatina (frente al control). Sin embargo, no se observa ninguna diferencia entre el grupo control y el grupo tratado con estatina sola. De manera sorprendente, la asociación estatina/arginina presenta por lo tanto un efecto sinérgico sobre la disminución de la superficie de las lesiones.

Si sólo interesa la mitad distal de la aorta, los resultados son muy significativos (Figura 11): bajo un tratamiento de atorvastatina/arginina, la superficie de las lesiones disminuye significativamente. La asociación de la administración de atorvastatina y de arginina presenta unos efectos sinérgicos inesperados sobre la disminución de las lesiones ateroescleróticas, ya que los tratamientos con atorvastatina sola y arginina sola no tienen efecto.

3.2. Estudio microscópico de la pared arterial

La observación de las láminas muestra un grosor menor de las lesiones para el grupo estatina/arginina en comparación con el grupo estatina. Las lesiones más grandes se encuentran en las dos primeras secciones (al principio y al final del arco); en los dos últimos cortes (en el medio y al final de la aorta), las lesiones son menos frecuentes. Al nivel de su composición, las lesiones son en su mayoría más fibrosas que celulares (compuesto de macrófagos espumosos y algunos polinucleares). No hay tendencia particular sobre la composición de las lesiones entre los grupos.

Al nivel macroscópico, la superficie de lesión no tiene cambios en el grupo estatina frente al grupo control, mientras que abundan numerosos trabajos en el sentido inverso, en particular el de Kroon *et al.* (Aliev G, Bumstock G. Watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia: a model of atherosclerosis. *Histol Histopathol*. 1998; 13: 797-817). Después de la administración de pravastatina a razón de 40 mg/kg/d durante nueve meses, muestra una disminución de la incidencia de las lesiones del 53 al 80%. Asimismo, Maeso *et al.* muestran una disminución del tamaño de las lesiones en unos conejos New Zealand White tratados con atorvastatina, 2,5 mg/kg/d (Maeso R, Aragoncillo P *et al*. Effect of Atorvastatin on endothelium-dependant constrictor factors in dyslipidemic rabbits. *Gen Pharma*. 2000; 34: 263-272). Asimismo, Böger (Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Böhme M, Nafe R, *et al*. Dietary L-Arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1997; 96: 1282-1290) ha mostrado que la lovastatina ralentizaba la progresión de la placa en el conejo New Zealand White.

Por otra parte, el grupo arginina tiene una superficie de lesión inferior al control en un factor 1,3, y el tratamiento estatina/arginina muestra la superficie de lesión más baja con el 8,8% de lesión con respecto al 13,7% para el grupo control.

Además, se encuentra una correlación inversa significativa entre la superficie de lesión total y la concentración en arginina, durante todo el protocolo. Esta correlación se encuentra también para la ornitina.

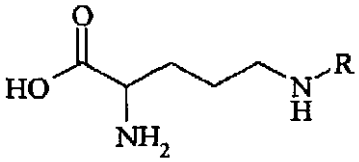
Por último, a nivel microscópico, parece que para el grupo estatina/arginina, las lesiones son menos gruesas que para los demás grupos.

REIVINDICACIONES

1. Utilización,

* de por lo menos una estatina, la atorvastatina, o de una sal farmacéuticamente aceptable de ésta, en asociación con

* por lo menos un compuesto de fórmula (I) siguiente:



(I)

en la que R representa , correspondiendo entonces el compuesto de fórmula (I) a la arginina,

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,

estando dicho compuesto de fórmula (I) presente en una cantidad conveniente para la administración a un individuo de una dosis de 1 g/día a 30 g/día, en particular de 5 g/día a 30 g/día,

para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de la ateroesclerosis, en particular la ateroesclerosis primaria o secundaria.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto de fórmula (I) corresponde al isómero L.

3. Utilización, según una de las reivindicaciones 1 a 2, de atorvastatina en una cantidad conveniente para la administración a un individuo de una dosis de 5 mg/d a 80 mg/d.

4. Utilización, según la reivindicación 1, de L-arginina, en una cantidad conveniente para la administración a un individuo de una dosis de por lo menos 10 g/día.

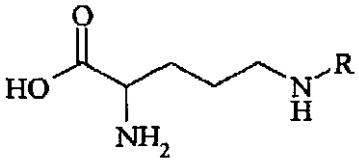
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento conveniente para una administración por vía oral.

6. Utilización según la reivindicación 5, para la preparación de un medicamento que se presenta en forma de polvo para diluir, de tableta, de bolsita, de comprimido, de cápsula, o de cualquier otra forma galénica aceptable.

7. Producto que contiene

* por lo menos una estatina, la atorvastatina, o una sal farmacéuticamente aceptable de ésta, y

* por lo menos un compuesto de fórmula (I) siguiente:



(I)

en la que R representa , correspondiendo entonces el compuesto de fórmula (I) a la arginina,

o una sal farmacéuticamente aceptable de éste,

estando dicho compuesto de fórmula (I) presente en una cantidad conveniente para la administración a un individuo de una dosis de 1 g/día a 30 g/día, en particular de 5 g/día a 30 g/día,

como productos de combinación para un uso simultáneo, separado o espaciado en el tiempo, en el marco del

tratamiento de la ateroesclerosis, en particular de la ateroesclerosis primaria o secundaria.

8. Productos según la reivindicación 7, en los que el compuesto de fórmula (I) corresponde al isómero L.

9. Productos según una de las reivindicaciones 7 y 8, convenientes para la administración a un individuo de una dosis de 5 mg/d a 80 mg/d de atorvastatina.

10. Productos según la reivindicación 8, que convienen para la administración a un individuo de una dosis de L-arginina de por lo menos 10 g/día.

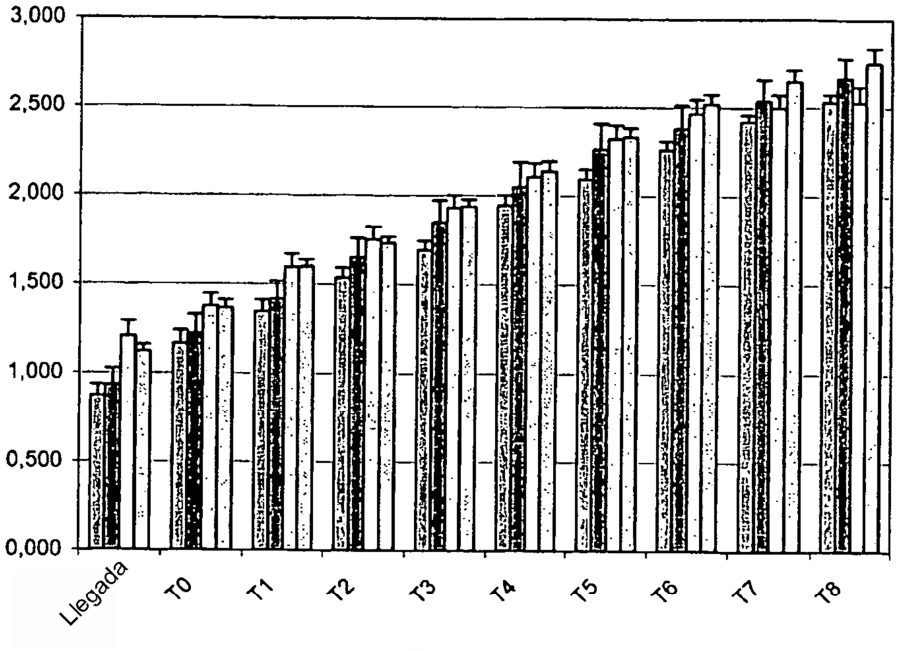


Figura 1

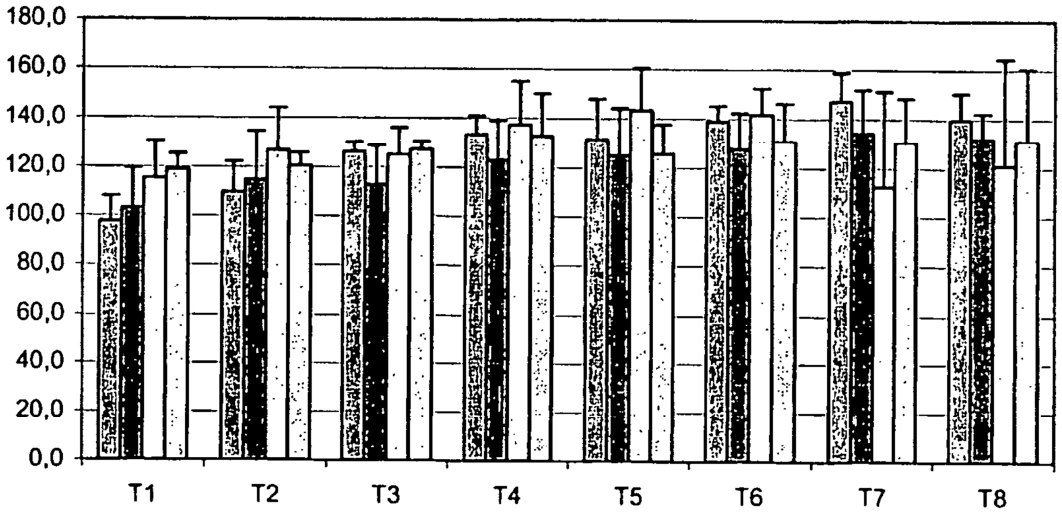


Figura 2

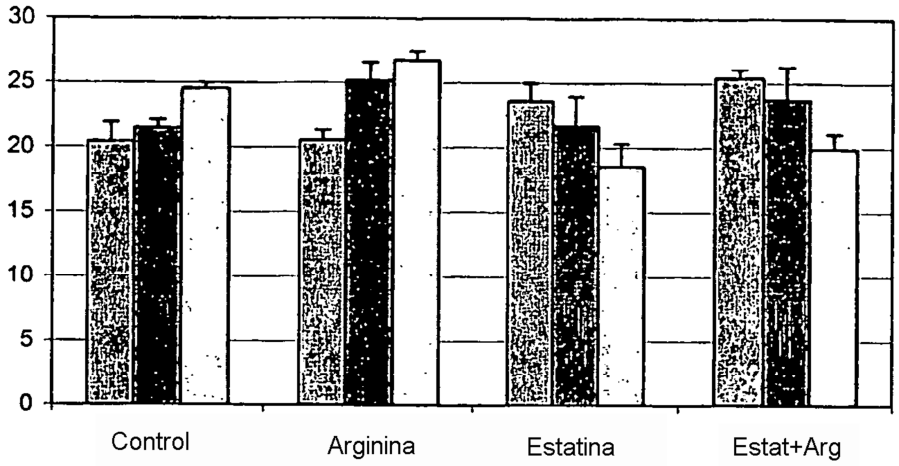


Figura 3

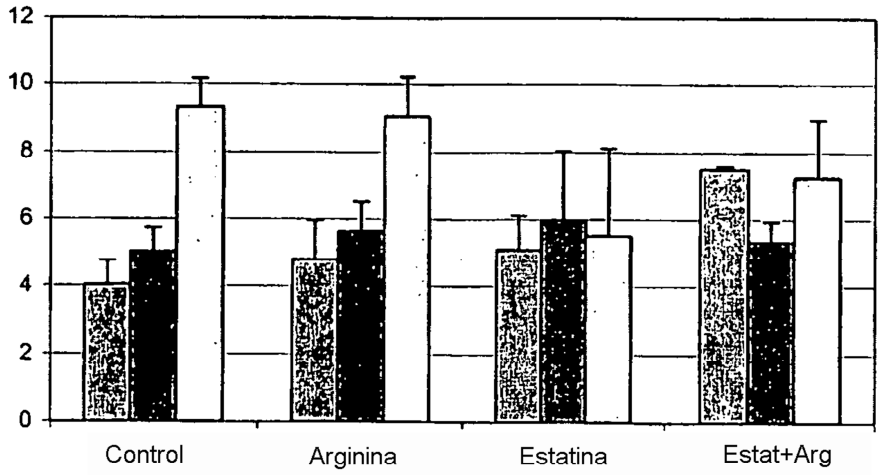


Figura 4

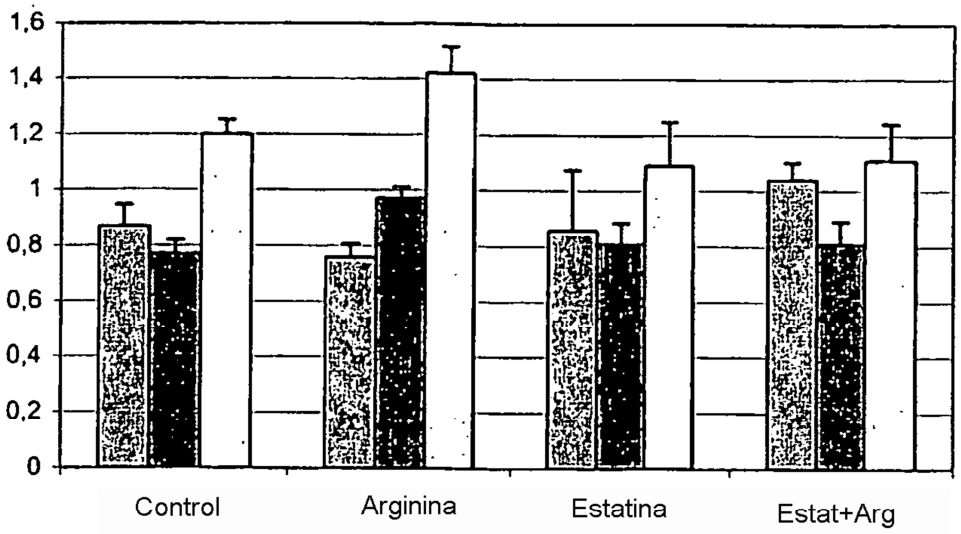


Figura 5

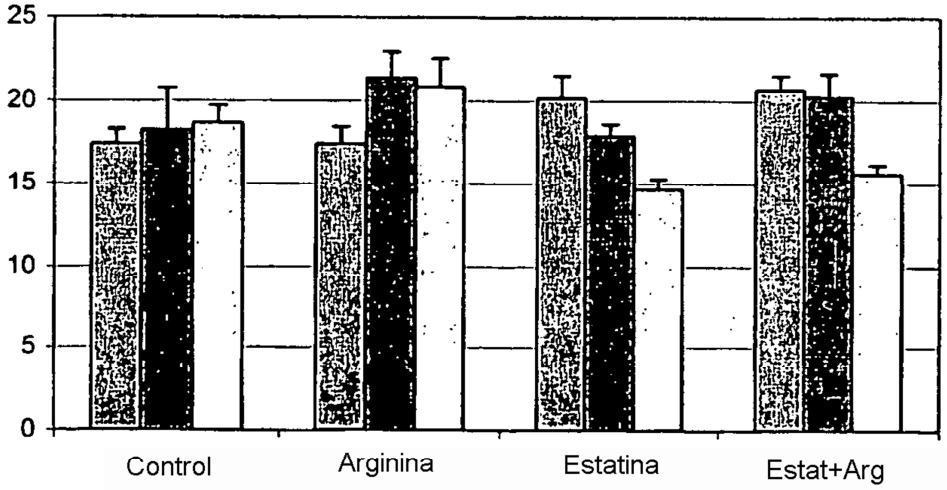


Figura 6

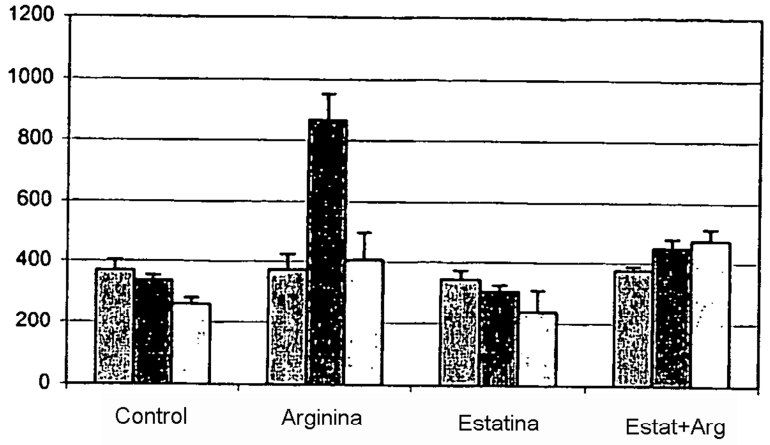


Figura 7

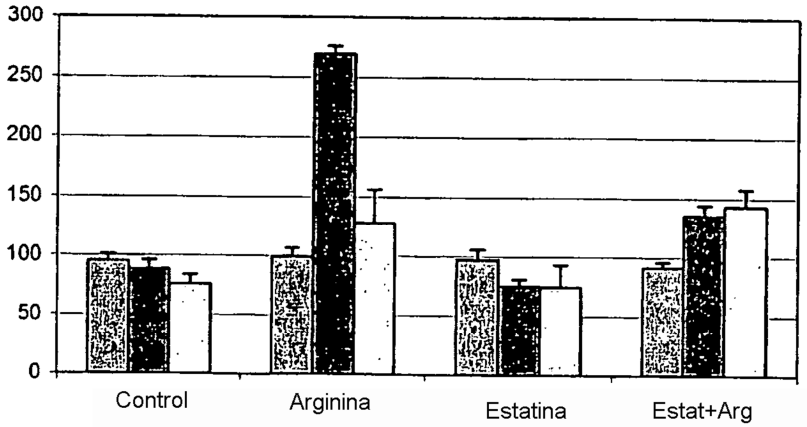


Figura 8

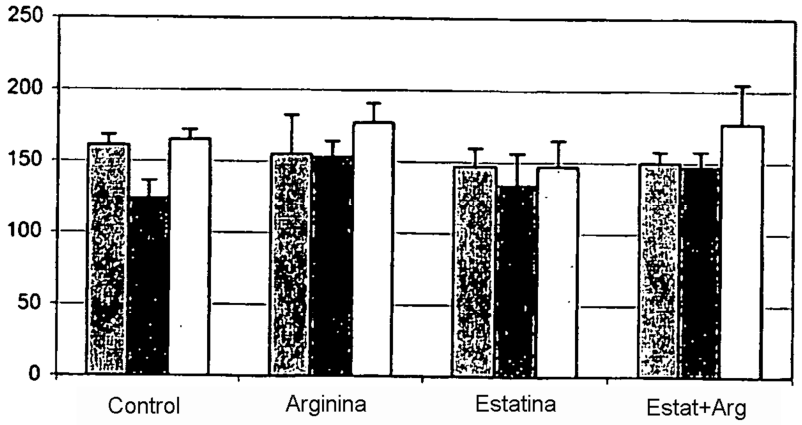


Figura 9

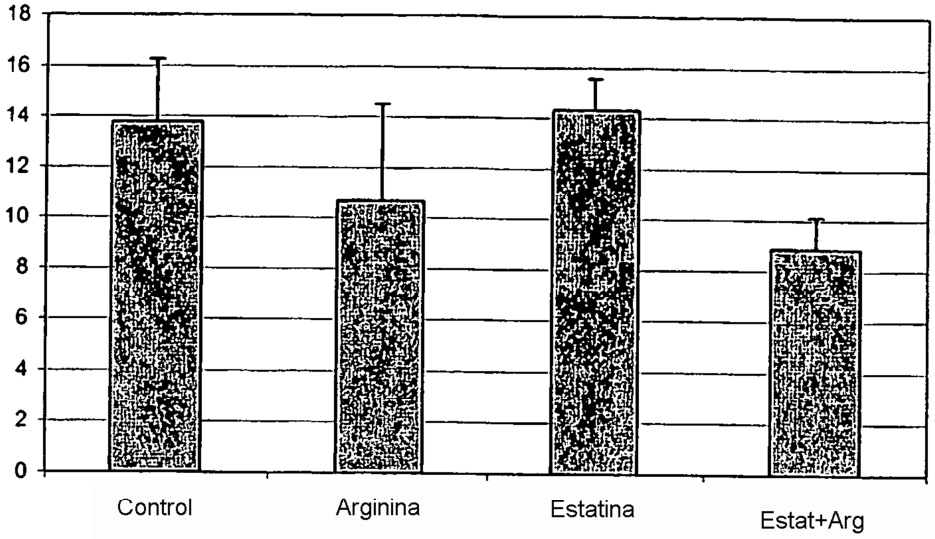


Figura 10

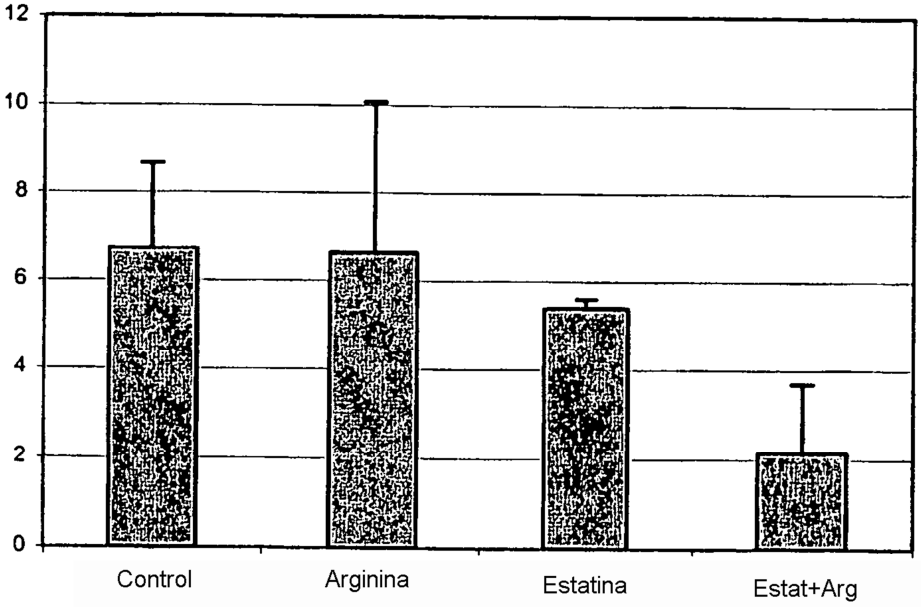


Figura 11