

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 455**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4178 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08016142 .5**

96 Fecha de presentación: **12.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2163259**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2010**

54

Título: **Uso de un agonista del receptor Ang-(1-7) en lesiones pulmonares agudas**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

21.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

21.12.2012

73

Titular/es:

**CHARITÉ-UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
(CHARITÉ) (100.0%)
CHARITÉPLATZ 1
10117 BERLIN, DE**

72

Inventor/es:

**WALTHER, THOMAS y
KÜBLER, WOLFGANG**

74

Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 393 455 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 un agonista del receptor Ang-(1-7) en lesiones pulmonares agudas

La presente invención se refiere a un agonista del receptor de la angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7) peptídico y no peptídico, preferentemente un agonista del receptor Mas, para la prevención y/o el tratamiento de las lesiones pulmonares agudas, preferentemente del síndrome de dificultad respiratoria aguda.

Antecedentes de la invención

Con incidencias ajustadas por edad de 86,2 por 100.000 persona-años y tasas de mortalidad global de ~ 43 %, la lesión pulmonar aguda (LPA) y su forma más grave, el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), siguen siendo una causa mayoritaria de muerte en los cuidados intensivos (1,2). Las características patológicas de la enfermedad comprenden lesión alveolo-capilar difusa e incremento de la permeabilidad pulmonar asociado con una fuerte respuesta inflamatoria (3,4). Estos cambios subyacen a la presentación clínica, que se caracteriza por un inicio agudo, hipoxemia grave y un edema pulmonar proteináceo. A pesar de la existencia de multitud de ensayos clínicos multicéntricos de tamaño grande para explorar el potencial de varias estrategias terapéuticas, incluido el uso de glucocorticoides, ketoconazol, lisofilina, alprostadilo, NO inhalado o suplemento de tensioactivo (5-7), ninguna intervención farmacológica terapéutica pudo mejorar el resultado clínico de la LPA/SDRA. Hasta ahora, la única mejora evidente para la supervivencia de los pacientes SDRA se ha conseguido mediante la implementación de estrategias de ventilación mínimamente invasivas con volúmenes corriente bajos en comparación con los volúmenes corriente altos usados anteriormente.

En un reciente estudio experimental, Imai y col. pudieron demostrar que la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ECA 2), que convierte la Ang II en Ang (1-7) mediante escisión de un aminoácido, protege a los ratones de la lesión pulmonar aguda grave inducida por aspiración de ácido o sepsis (8). Los autores atribuyeron este hallazgo al hecho de que la ECA 2 disminuirá la concentración de Ang II y, por tanto, reducirá la activación del receptor de tipo I de la Ang II (AT1). Esta idea ha desencadenado una serie de estudios en los que se demuestra la eficacia de los bloqueantes del receptor AT1 o de inhibidores de la ECA para el tratamiento de varias formas de lesión pulmonar aguda experimental (10-13).

No obstante, es importante el hecho de que el producto de escisión de la Ang II por la ECA 2, no es un producto de desecho inerte de la vía de la angiotensina, pero puede ejercer funciones biológicas activas. La Ang-(1-7) se une al receptor acoplado a proteína G Mas (14), que parece ser un antagonista fisiológico del receptor AT1a (15) y potencialmente a otros receptores. La unión de Ang-(1-7) a su(s) receptor(es) puede, por tanto, contribuir de forma crucial a los efectos beneficiosos previamente demostrados de intervenciones en la vía de la angiotensina sobre la enfermedad de LIPA/SDRA.

La patente US 6,235,766 se refiere a agonistas no peptídicos de receptores de Ang(1-7), y, particularmente, divulga 1-(p-tienilbencil)imidazoles que tienen una acción marcada sobre los receptores de Ang(1-7) y que simulan la acción biológica de la hormona efectora Ang(1-7).

La solicitud de patente internacional WO 2006/128266 se refiere a la interacción entre el receptor Mas y Ang(1-7) o sus análogos en el contexto de controlar las funciones del sistema reproductor.

La solicitud de patente internacional WO 2007/ 000036 se refiere al uso de agonistas y antagonistas del receptor Mas peptídicos o no peptídicos como moduladores de la actividad apoptótica.

La solicitud de patente internacional WO 2007/ 121546 se refiere al uso de agonistas del receptor Mas peptídicos o no peptídicos para modular las actividades metabólicas relacionadas con la manifestación clínica del síndrome metabólico o sus complicaciones.

Los inventores han especulado que la Ang-(1-7) o agonistas relacionados pueden representar una nueva y prometedora estrategia para el tratamiento de la LPA/SDRA. Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar medios y procedimientos una intervención farmacológica en los acontecimientos fisiopatológicos subyacentes a la LPA/SDRA.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención se resuelve con un agonista del receptor de Ang(1-7) para usar en la prevención y/o tratamiento de una lesión pulmonar aguda en un sujeto.

El objeto de la presente invención se resuelve mediante un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de una lesión pulmonar aguda en un sujeto usando un agonista del receptor de Ang(1-7).

El objeto de la presente invención se resuelve además mediante el uso de un agonista del receptor de Ang(1-7) para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de una lesión pulmonar aguda en un sujeto.

El objeto de la presente invención se resuelve además mediante un procedimiento de prevención y/o tratamiento de una lesión pulmonar aguda administrando a un sujeto un agonista del receptor de Ang(1-7).

En una realización, el agonista del receptor de Ang(1-7) es un agonista del receptor Mas.

5 En una realización, el agonista del receptor de Ang(1-7) interacciona con un receptor Mas o un receptor asociado con un receptor Mas.

En una realización, el agonista del receptor de Ang(1-7) estimula un receptor que interacciona físicamente con un receptor Mas.

En una realización, el agonista del receptor de Ang(1-7) estimula un receptor que comparte similitudes farmacológicas con un receptor Mas.

10 En una realización, el agonista del receptor de Ang(1-7) es un metabolito de la Ang II que comparte similitudes estructurales con el péptido Ang-(1-7).

En una realización, el agonista del receptor es un agonista peptídico o no peptídico.

15 En una realización, el agonista peptídico es un péptido exógeno o endógeno Ang-(1-7) que comprende una secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ de acuerdo con la SEC ID N° 1 o es un derivado o análogo del mismo.

En una realización, el agonista peptídico es un derivado o análogo del péptido Ang-(1-7), en el que el derivado o análogo comprende una inserción, delección o intercambio de aminoácidos. Preferentemente, el derivado o análogo tiene propiedades conservadas o mejores.

20 En una realización, el agonista peptídico es un derivado o análogo del péptido Ang-(1-7), en el que el derivado o análogo comprende una secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-Val³-Ser⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ de acuerdo con la SEC ID N° 2, Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Cys⁷ de acuerdo con la SEC ID N° 3 o Asp¹-Arg²-Val³-Ser⁴-Ile⁵-His⁶-Cys⁷ de acuerdo con la SEC ID N° 4.

En una realización, el agonista peptídico es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 4.

25 En una realización, el agonista peptídico es un péptido exógeno o endógeno NorLeu³-Ang-(1-7) que comprende una secuencia de aminoácidos Asp¹-Arg²-NorLeu³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-Pro⁷ de acuerdo con la SEC ID N° 5 o es un derivado o análogo del mismo.

30 En una realización, el agonista peptídico es un péptido de AngIV exógeno o endógeno que comprende una secuencia de aminoácidos Val¹-Tyr²-Ile³-His⁴-Pro⁵-Phe⁶ de acuerdo con la SEC ID N° 6 o es un derivado o análogo del mismo.

En una realización, el agonista peptídico es un péptido de Ang III exógeno o endógeno que comprende una secuencia de aminoácidos Arg¹-Val²-Tyr³-Ile⁴-His⁵-Pro⁶-Phe⁷ de acuerdo con la SEC ID N° 7 o es un derivado o análogo del mismo.

35 En una realización, el agonista no peptídico se selecciona del grupo de compuestos de 1-(p-tienibencil)imidazol y, preferentemente, es Ave 0991 (es decir, 5-formil-4-metoxi-2-fenil-1-[[4-[2-(etilaminocarbonilsulfonamido)-5-isobutil-3-tienil]fenil]metil]-imidazol).

En una realización, la lesión pulmonar aguda es un síndrome de dificultad respiratoria aguda.

En una realización, la lesión pulmonar aguda está relacionada con una lesión pulmonar directa o extrapulmonar (indirecta).

40 En una realización, la lesión pulmonar de pulmón se selecciona del grupo que consiste en traumatismo por inhalación, traumatismo por aspiración, edema pulmonar tóxico, infección pulmonar, preferentemente neumonía, contusión pulmonar y embolia.

45 En una realización, el daño extrapulmonar de pulmón se asocia con un trastorno seleccionado del grupo constituido por sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), politraumatismo, shock, quemadura, pancreatitis aguda, intoxicación por fármacos, abuso de alcohol, enfermedad pulmonar crónica, transfusión en masa, coagulación intravascular diseminada, eritema y enfermedad pulmonar autoinmunitaria.

En una realización, el sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano, más preferentemente un ser humano adulto.

50 El objeto de la presente invención se resuelve además mediante una composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de Ang(1-7) para usar en la prevención y/o tratamiento de una lesión pulmonar aguda en un

sujeto.

El objeto de la presente invención se resuelve además mediante un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de una lesión pulmonar aguda en un sujeto usando una composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de Ang(1-7).

- 5 En una realización de la composición farmacéutica, el agonista del receptor de Ang(1-7) es un agonista del receptor Mas.

En una realización de la composición farmacéutica, el agonista del receptor es un agonista peptídico o no peptídico.

En una realización de la composición farmacéutica, el agonista peptídico es un péptido Ang-(1-7) que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 1 o es un derivado o análogo del mismo.

- 10 En una realización de la composición farmacéutica, el agonista peptídico es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 4.

En una realización de la composición farmacéutica, el agonista peptídico es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 5 o es un derivado o análogo del mismo.

- 15 En una realización de la composición farmacéutica, el agonista peptídico es un péptido Ang IV que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 6 o es un derivado o análogo del mismo.

En una realización de la composición farmacéutica, el agonista peptídico es un péptido Ang III que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 7 o es un derivado o análogo del mismo.

- 20 En una realización de la composición farmacéutica, el agonista no peptídico se selecciona del grupo de compuestos de 1-(p-tienibencil)imidazol y, preferentemente, es Ave 0991 (es decir, 5-formil-4methoxi-2-fenil-1-[[4-[2-(etilaminocarbonilsulfonamido)-5-isobutil-3-tienil]fenil]metil]-imidazol).

En una realización de la composición farmacéutica, la lesión pulmonar aguda es un síndrome de dificultad respiratoria aguda.

En una realización de la composición farmacéutica, la lesión pulmonar aguda está relacionada con una lesión pulmonar directa o extrapulmonar (indirecta).

- 25 En una realización de la composición farmacéutica, la lesión pulmonar de pulmón se selecciona del grupo que consiste en traumatismo por inhalación, traumatismo por aspiración, edema pulmonar tóxico, infección pulmonar, preferentemente neumonía, contusión pulmonar y embolia.

- 30 En una realización de la composición farmacéutica, el daño extrapulmonar de pulmón se asocia con un trastorno seleccionado del grupo constituido por sepsis, politraumatismo, shock, quemadura, pancreatitis aguda, intoxicación por fármacos, abuso de alcohol, enfermedad pulmonar crónica, transfusión en masa, coagulación intravascular diseminada, eritema y enfermedad pulmonar autoinmunitaria.

En una realización de la composición farmacéutica, el sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano, más preferentemente un ser humano adulto.

- 35 En una realización, la composición farmacéutica está formulada para administración parenteral o enteral, preferentemente para administración parenteral por medio de inhalación, infusión o inyección. También se considera una composición farmacéutica formulada para una administración intramuscular, intravenosa, subcutánea, tópica, transdérmica, rectal, vaginal, pulmonar, intranasal, intrabucal o sublingual.

- 40 En una realización, la composición farmacéutica está formulada como un comprimido, una píldora, una cápsula, gránulos, un jarabe, un atomizador, un aerosol, una composición liposomal, una pomada, un supositorio, un implante, un emplastro o una formulación de liberación lenta.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además uno o más excipientes farmacológicamente inertes y farmacéuticamente aceptables, tales como un vehículo polimérico, un agente de disgregación, un lubricante, un disolvente o un agente expansor.

- 45 La expresión "agonista del receptor" se refiere a un agente capaz de activar un receptor, es decir de provocar una respuesta del receptor. La expresión "agonista del receptor Ang-(1-7)" se refiere a un agente capaz de activar un receptor que también es activado por Ang-(1-7). La expresión "agonista del receptor Mas" se refiere a un agente capaz de activar el receptor Mas acoplado a proteína G. Como respuesta adecuada del receptor, se inicia una cascada de señalización mediada por la proteína directa o indirecta (debido a un receptor que interacciona físicamente con Mas) cadena abajo del receptor que tiene como resultado, por ejemplo liberación de ácido araquidónico, formación de PGI2, formación de NO y/o generación de GMPc.
- 50

Dado que la señalización de Ang-(1-7) es bloqueada por A779 ([D-Ala⁷-Ang-(1-7); Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-DAla⁷, SEC ID N° 8) y/o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (Asp¹-Arg²-Val³-Tyr⁴-Ile⁵-His⁶-D-Pro⁷, SEC ID N° 9), una característica adicional de un agonista de Ang-(1-7) es la inhibición de sus efectos por A779 y/o D-Pro⁷-Ang-(1-7). También se consideran otros inhibidores no competitivos y competitivos.

- 5 La expresión "agonista peptídico" se refiere a un compuesto que comprende uno o más enlaces peptídicos. El término abarca compuestos que consisten en una estructura peptídica pura, es decir un péptido compuesto por dos o más aminoácidos, así como compuestos que comprenden estructuras peptídicas y no peptídicas.

La expresión "agonista no peptídico" se refiere a un compuesto que no comprende un enlace peptídico. Preferentemente, dicho compuesto es de peso molecular bajo, es decir una molécula pequeña.

- 10 El término "derivado" significa un compuesto que difiere de otro compuesto en una modificación estructural, por ejemplo mediante sustitución de un átomo o un grupo de átomos o un grupo funcional con otro átomo o grupo de átomos o grupo funcional.

El término "análogo" significa un compuesto que tiene una estructura o función similar a la de otro compuesto.

- 15 La expresión "An-(1-7) exógena" significa An-(1-7) que se ha producido fuera del cuerpo del sujeto que se va a tratar y se aplica de forma exógena. No obstante, esto no excluye que la An-(1-7) se produzca en, por ejemplo, un animal transgénico que no se vaya a tratar. En general se considera que la Ang-(1-7) se produce por biosíntesis o síntesis en laboratorio convencional, por ejemplo síntesis de fase sólida.

- 20 La expresión "Ang-(1-7) endógena" significa que la Ang-(1-7) ha sido producida por el cuerpo del sujeto que se va a tratar. Una producción endógena (incrementada) de Ang-(1-7) puede ser el resultado de una estimulación de su generación de Ang II, por ejemplo activando farmacológicamente la ECA 2, bloqueando el receptor AT1a o inhibiendo la degradación de Ang II en Ang III por APA. De un modo similar, la producción de Ang-(1-7) endógena se puede incrementar mediante la estimulación de su generación a partir de Ang I por NEP. Una producción endógena (incrementada) también puede ser el resultado de una intervención terapéutica génica, por ejemplo mediante sobreexpresión de la ECA 2 o una construcción que genera directamente Ang-(1-7) o uno de sus precursores. Una mayor concentración de Ang-(1-7) producida endógenamente también puede ser el resultado de una degradación reducida de Ang-(1-7), por ejemplo mediante inhibición farmacológica de la ECA que degrada la Ang-(1-7) en Ang-(1-5).

- 30 La ECA 2 recombinante o sobreexpresada aumentará la concentración de Ang-(1-7) directamente estimulando su conversión a partir de Ang II. Los inhibidores de la ECA reducirá la degradación de Ang-(1-7) en Ang-(1-5), mientras que los bloqueantes del receptor AT1a aumentarán los niveles de Ang-(1-7) a través de la elevación de la disponibilidad del sustrato de la ECA2.

También se consideran moléculas, por ejemplo péptidos o proteínas, que comprenden la secuencia peptídica de Ang-(1-7) o la estructura química.

- 35 "Lesión pulmonar aguda" (LPA) y "síndrome de dificultad respiratoria aguda" (SDRA) son trastornos inflamatorios del pulmón con mayor frecuencia causada por sepsis, neumonía, traumatismo y/o aspiración. La inflamación puede estar localmente restringida a los pulmones o la inflamación pulmonar puede ser parte de un proceso inflamatorio sistémico. La LPA y el SDRA se caracterizan por hipoxemia e infiltrados difusos en la radiografía torácica en ausencia de presión elevada en la aurícula izquierda. La LPA y el SDRA solo difieren en el grado de hipoxemia en cuanto a que la LPA se define como una proporción de presión parcial de oxígeno arterial sobre la fracción inspiratoria de oxígeno ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) < 300 y el SDRA como $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ < 200 (16). El diagnóstico se realiza por la presentación clínica, AGA (análisis de gas en sangre arterial) y estudios de imagen. El tratamiento es con protector pulmonar, ventilación mecánica con volumen corriente bajo, terapia de soporte y tratamiento de las causas subyacentes.

Descripción detallada de la invención

- 45 La Figura 1 muestra los efectos de Ang-(1-7) sobre la actividad de MPO pulmonar (Fig. 1(A)), la proporción del peso húmedo/seco (Fig. 1(B)), la presión arterial media (Fig. 1(C)) y la resistencia vascular pulmonar (Fig. 1(D)) en ácido oleico inducida por la lesión pulmonar aguda. Todos los datos son la media \pm SEM de n= 6 animales cada uno; p<0.05 frente a control; # p<0,05 frente a OA.

Ejemplo

- 50 *Animales.* Se realizaron experimentos en ratas Sprague-Dawle macho (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Alemania) con un peso corporal (pc) de 330-360 g. Los animales recibieron cuidados de acuerdo con la Guía para Atención y Uso de Animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, 7ª edición 1996). El estudio fue aprobado por el comité local de atención y uso de animales.

Preparación quirúrgica y monitorización hemodinámica. Se anestesió a las ratas mediante inyección intraperitoneal de medetomidina (0,5 mg/kg pc, Domitor®, Dr. E. Graeb AG, Basel, Suiza), fentanilo (0,05 mg/kg pc, JanssenCilag, Neuss, Alemania) y midazolam (5 mg/kg pc, Dormicum®, Roche, Basilea, Suiza) como se ha descrito anteriormente (17). Tras traqueotomía, la tráquea se canuló y se estableció ventilación (Advanced Animal Respirator, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Alemania) con un volumen corriente de 6 ml/kg pc a 80 respiraciones/minuto. Los catéteres (diámetro interno 0,58 mm; Sims Portex Ltd., Hythe, Reino Unido) se introdujeron en la arteria carótida izquierda y la vena yugular interna derecha para monitorizar la presión sanguínea arterial (PA), la reposición de fluidos y la liberación de fármacos como se ha descrito anteriormente (18). Una sonda para flujo ultrasónico (Transonic®, Transonic Systems Inc., Ithaca, UY) se colocó alrededor de la aorta ascendente distal a la ramificación de las arterias coronarias para monitorización continua del gasto cardíaco (GC). Tras una toracotomía mediana se introdujo un catéter a través del ventrículo derecho en la arteria pulmonar para la medición de la presión en la arteria pulmonar (PAP). La PA, la PAP y el GC se registraron de forma continua mediante el paquete de software DasyLab 32 (DasyLab, Moenchenglbadach, Alemania). La resistencia vascular pulmonar (RVP) se calculó como las diferencias de la presión arteriovenosa sobre el flujo bajo la suposición de una presión en la aurícula izquierda constante de 2 mm Hg.

Grupos experimentales y protocolo. Las ratas fueron asignadas de forma aleatoria a tres grupos de seis animales cada uno: Animales del grupo (I) control no recibieron ninguna intervención farmacológica. En el grupo 2 (AO) se indujo LPA mediante infusión intravenosa de 0,2 mg/kg de ácido oleico (Sigma, Munich, Alemania) en 30 minutos en ausencia de cualquier tratamiento. En el grupo 2 (AO+Ang-(1-7)), se indujo LPA como en el grupo II y se inició una infusión de Ang-(1-7) a 5 pmol/kg por minuto inmediatamente después de la inducción de LPA. En dos grupos adicionales de n= 6 cada uno, en los que solo se midió la actividad de mieloperoxidasa, se inició la infusión del bloqueante del receptor de Ang-(1-7) A779 (10 pmol/kg por minuto) solo (grupo 4) o en combinación con Ang-(1-7) A779 5 pmol/kg por minuto) inmediatamente después de la inducción de LPA.

Tras la preparación quirúrgica y la estabilización hemodinámica en al menos 15 minutos, se registró la hemodinámica basal y se analizaron los gases de sangre arterial (RapidLab 348; Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald, Alemania). El volumen de sangre retirada se sustituyó por hidroxietil almidón (6 % de hidroxietil almidón 200/0,6; Fresenius, Bad Homburg, Alemania). Inmediatamente tras los registros basales se infundieron 0,2 mg/kg de ácido oleico por vía intravenosa en 30 minutos en los grupos II-V o un volumen igual de NaCl al 0,9 % en el grupo I. En todos los grupos, las mediciones se repitieron a intervalos de 60 minutos hasta un total de 4 horas, momento en el cual se sacrificó a los animales mediante exanguinación. Tras la ligadura in situ del bronquio principal derecho, se escindieron los pulmones y se procesaron para determinar la proporción del peso húmedo:seco y la actividad mieloperoxidasa (MPO) como se describe más adelante.

Evaluación del agua pulmonar y de la respuesta inflamatoria. Para la determinación del contenido en agua de los pulmones se midió la proporción del peso húmedo/seco mediante el uso de la técnica de secado en microondas (18). El reclutamiento de células inflamatorias se analizó mediante mediciones de la actividad MPO en homogeneizados de pulmón, como se ha descrito anteriormente (19). En resumen, la actividad MPO se determinó mediante un ensayo fotométrico basado en 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina (TMB), en comparación con curvas estándar adecuadas y se expresó en unidades por gramo de tejido pulmonar ((U/g).

Análisis estadístico. Todos los datos se presentan en forma de medias \pm SEM. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias entre grupos. La significación estadística se asumió en $P < 0,05$.

Resultados. La LPA inducida por ácido oleico se caracterizó por un incremento de la actividad MPO (Fig. 1(A)), la proporción del peso húmedo/seco (Fig. 1(B)) y la resistencia vascular pulmonar Fig. 1(D)), mientras que la presión arterial sistémica (Fig. 1(C)) disminuyó. La Ang-(1-7) previno completamente el desarrollo de LPA inducida por AO, como demostró el hecho de que la infusión de Ang-(1-7) anulaba los cambios inducidos por AO en la proporción del peso húmedo/seco, la actividad MPO y la resistencia vascular pulmonar. Aparentemente, el efecto protector de la Ang-(1-7) no se podría atribuir a su efecto vasodilatador descrito en los vasos sanguíneos sistémicos, ya que la infusión de Ang-(1-7) atenuó la hipotensión sistémica en las ratas a las que se infundió AO. Análisis adicionales de la MPO en los grupos 4 y 5 indican que el bloqueo del receptor MAS por A779 agrava la LPA inducida por AO y bloquea el efecto de rescate de la infusión de Ang-(1-7).

Conclusiones. Los presentes hallazgos muestran que la infusión de Ang-(1-7) previene completamente el edema y la inflamación pulmonar en un modelo experimental de LPA inducida por ácido oleico. Este efecto protector está mediado por el receptor Mas acoplado a proteína G, ya que se pierde tras el bloqueo de Mas por A779. La Ang-(1-7) formada endógenamente sirve como mecanismo de protección intrínseca contra la LPA, que se agrava tras el bloqueo de Mas por A779.

Referencias

1. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stem EJ, Hudson LD (2005) Incidence and outcomes of acute lung injury. N Engl J Med 353:1685-1693
2. Zamboni M, Vindent J-L (2008) Mortality rates for patients with ALI/ARDS have decreased over time. Chest,

publicación electrónica previa a la impresión

3. Bachofen M, Weibel ER (1982) Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 3:35-56
4. Ware LB, Matthay MA (2000) The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1334
5. Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, Hough CL, Lanken PN, Hyzy R, Thompson BT, Ancukiewicz M; National Heart, Lung, and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network (2006) Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 354:1671-1684.
6. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2002) Randomized, placebo-controlled trial of lisofylline for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 30:1-6.
7. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000) Ketoconazole for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 283: 1995-2002
8. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000) Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1301-1308
9. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, Yang P, Sarao R, Wada T, Leong-Poi H, Crackower MA, Fukamizu A, Hui CC, Hein L, Uhlig S, Slutsky AS, Jiang C, Penninger JM (2005) Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436:112-116.
10. Wösten-van Asperen RM, Lutter R, Haitsma JJ, Merkus MP, van Woensel JB, van der Loos CM, Florquin S, Lachmann B, Bos AP (2008) ACE mediates ventilator-induced lung injury in rats via angiotensin II but not bradykinin. *Eur Respir J* 31: 363-371.
11. Yao S, Feng D, Wu Q, Li K, Wang L (2008) Losartan attenuates ventilator-induced lung injury. *J Surg Res* 145:25-32.
12. He X, Han B, Mura M, Xia S, Wang S, Ma T, Liu M, Liu Z (2007) Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents oleic acid-induced severe acute lung injury in rats. *Shock* 28:106-11.
13. Jiang JS, Wang LF, Chou HC, Chen CM (2007) Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril attenuates ventilator-induced lung injury in rats. *J Appl Physiol* 102:2098-2103.
14. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8258-8263.
15. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T (2005) G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type I receptor. *Circulation* 111: 1806-1813.
16. Matthay MA (1999) Acute lung injury: conference summary. *Chest* 116:119S-126S.
17. Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM (2008) Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol* 104: 338-346.
18. Hentschel T, Yin N, Riad A, Habbazettl H, Weimann J, Koster A, Tschope C, Kuppe H, Kuebler WM (2007) Inhalation of the phosphodiesterase-3 inhibitor milrinone attenuates pulmonary hypertension in a rat model of congestive heart failure. *Anesthesiology* 106:124-131.
19. Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE (1996) Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc Clin Exp* 16:89-97.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Charité -Universitätsmedizin Berlin
- 45 <120> Uso de un agonista del receptor de Ang-(1-7) en lesiones pulmonares agudas
- <130> FB20108
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 50 <211> 7
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Ang-(1-7)
- 55 <400> 1

ES 2 393 455 T3

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
1 5

5 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Derivado de Ang-(1-7)

<400> 2

Asp Arg Val Ser Ile His Pro
1 5

10 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> Derivado de Ang-(1-7)

<400> 3

Asp Arg Val Tyr Ile His Cys
1 5

20 <210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Derivado de Ang-(1-7)

<400> 4

Asp Arg Val Ser Ile His Cys
1 5

25 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<221> Fuente
<223> Nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido NorLeu3-Ang-(1-7)".

<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> /sustitución="Nle"

<400> 5

Asp Arg Leu Tyr Ile His Pro
1 5

ES 2 393 455 T3

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Ang IV

<400> 6

Val Tyr Ile His Pro Phe
1 5

10 <210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Ang III

15 <400> 7

Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<221> Fuente
<223> Nota= "Descripción de la secuencia artificial: A779"

<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> /sustitución= "D-Ala"

<400> 8

Asp Arg Val Tyr Ile His Ala
1 5

30 <210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <221> Fuente
<223> Nota= "Descripción de la secuencia artificial: DPro7-Ang-(1-7)"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
40 <223> /sustitución= "D-Pro"

<400> 9

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un agonista del receptor de Ang(1-7) para usar en la prevención y/o tratamiento de una lesión pulmonar aguda en un sujeto.
- 5 2. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agonista del receptor es un agonista del receptor Mas.
3. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el agonista del receptor es un agonista peptídico o no peptídico.
- 10 4. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agonista peptídico es un péptido Ang-(1-7) exógeno o endógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 1 o es un derivado o análogo del mismo.
5. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agonista peptídico es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 4.
- 15 6. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agonista peptídico es un péptido NorAng-(1-7) exógeno o endógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 5 o es un derivado o análogo del mismo.
7. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agonista peptídico es un péptido Ang IV exógeno o endógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 6 o es un derivado o análogo del mismo.
- 20 8. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agonista peptídico es un péptido Ang III exógeno o endógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N° 7 o es un derivado o análogo del mismo.
9. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agonista no peptídico se selecciona del grupo de compuestos de 1-(p-tienilbencil)imidazol, preferentemente es Ave 0991.
- 25 10. El agonista del receptor para usar de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la lesión pulmonar aguda es un síndrome de dificultad respiratoria aguda.
11. El agonista del receptor para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, en el que la lesión pulmonar aguda está relacionada con una lesión de pulmón pulmonar o extrapulmonar.
- 30 12. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la lesión pulmonar de pulmón se selecciona del grupo que consiste en traumatismo por inhalación, traumatismo por aspiración, edema pulmonar tóxico, infección pulmonar, preferentemente neumonía, contusión pulmonar y embolia.
13. El agonista del receptor para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el daño pulmonar extrapulmonar está asociado con un trastorno seleccionado del grupo constituido por sepsis, politraumatismo, shock, quemadura, pancreatitis aguda, intoxicación por fármacos, abuso de alcohol, enfermedad pulmonar crónica, transfusión en masa, coagulación intravascular diseminada, eritema y enfermedad pulmonar autoinmunitaria.
- 35 14. El agonista del receptor para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el que el sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano, más preferentemente un ser humano adulto.
15. Una composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de Ang-(1-7) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para usar en la prevención y/o tratamiento de una lesión pulmonar aguda en un sujeto.

Fig. 1(A)

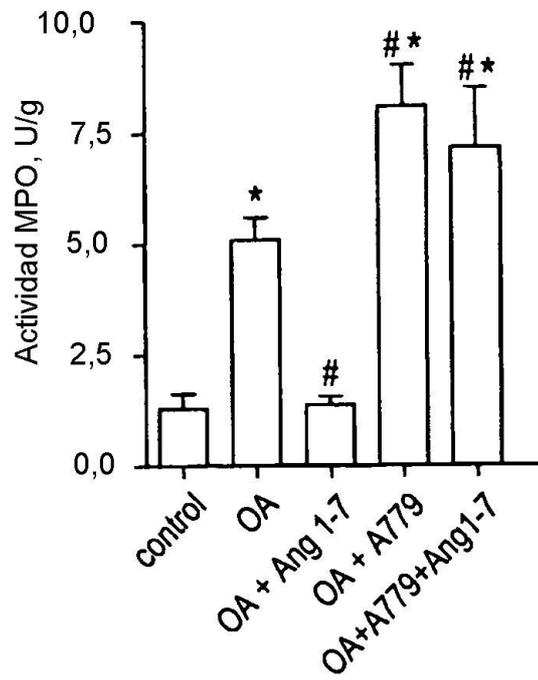


Fig. 1(B)

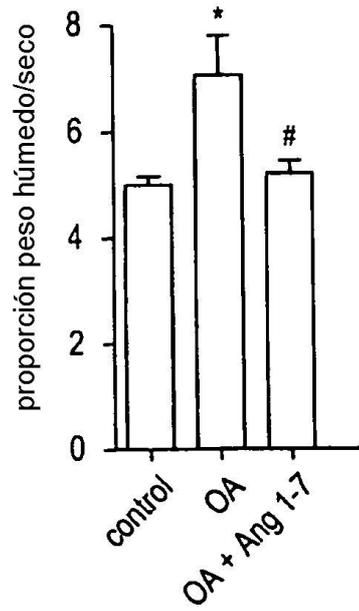


Fig. 1(C)

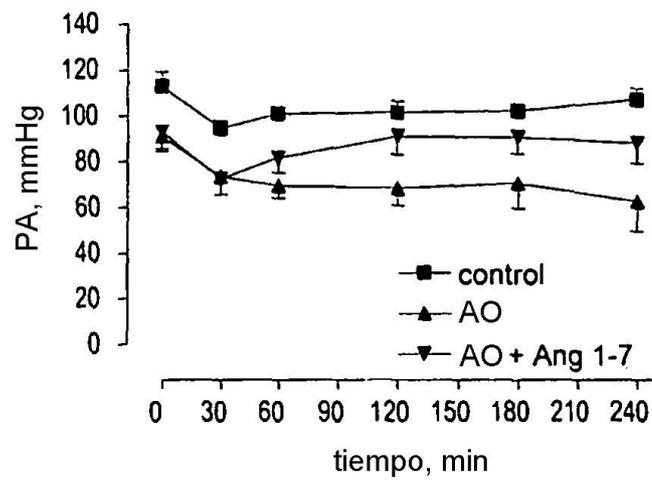


Fig. 1(D)

