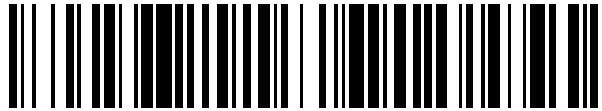


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 741**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2008** **E 08700472 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013** **EP 2124991**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas y métodos para tratar la disfunción eréctil**

30 Prioridad:

26.01.2007 US 897510 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.04.2014

73 Titular/es:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG (25.0%)

Avenida Antônio Carlos 6627, 7 andar - CTIT Pampulha

31270-901 Belo Horizonte - MG, BR;

BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA. (25.0%);

UNIÃO QUÍMICA FARMACÊUTICA NACIONAL S.

A. (25.0%) y

BIOSINTÉTICA FARMACÊUTICA LTDA (25.0%)

72 Inventor/es:

SOUZA DOS SANTOS, ROBSON AUGUSTO;

SINISTERRA MILLÁN, RUBÉN DARIO;

FREZARD, FRÉDÉRIC JEAN GEORGES;

DA COSTA GONÇALVES, ANDREY CHRISTIAN y

FRAGA DA SILVA, RODRIGO ARAÚJO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 454 741 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

Composiciones farmacéuticas y métodos para tratar la disfunción eréctil

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de la Angiotensina-(1-7), sola o en combinación con otros agentes terapéuticos en el tratamiento de la disfunción eréctil (DE). También se proveen, los métodos para tratar la DE y/o para restaurar la capacidad eréctil basados en el uso de la Angiotensina-(1-7) sola o en combinación con otros agentes terapéuticos.

Antecedentes de la invención

10 Se cree que la impotencia o la insuficiencia eréctil es un trastorno generalizado que afecta aproximadamente al doce por ciento de los hombres adultos de menos de cuarenta y cinco años, aproximadamente veinte por ciento de los hombres a los sesenta años, y aproximadamente cincuenta y cinco por ciento de los hombres a los setenta y cinco años. Se ha identificado un número de causas de la insuficiencia eréctil, además de las deficiencias anatómicas del pene o el escroto, que impide una erección suficiente para la penetración vaginal. Estas causas son psicológicas y físicas en origen y en cualquier individuo que sufre de impotencia pueden existir más de una causa de disfunción eréctil.

15 La disfunción eréctil puede ser psicológica, resultante, por ejemplo, de la ansiedad o la depresión, sin deterioro somático aparente u orgánico. Tal disfunción eréctil, que se conoce como "psicogénica", es responsable de aproximadamente quince a veinte por ciento de los casos de impotencia. En otros casos, la disfunción eréctil se asocia con la aterosclerosis de las arterias que suministran sangre al pene; tal disfunción se conoce como "arteriogénica" o "aterosclerótica". Aproximadamente del cuarenta al sesenta por ciento de los casos de la impotencia son de origen arteriogénico.

20 En incluso otros casos, existe pérdida en las venas en el pene de tal manera que no se obtiene ni se mantiene la presión suficiente para una erección. Esta disfunción se conoce como "fuga venosa", o "drenaje anormal". Esta condición a menudo es exacerbada mediante la presencia de alguna disfunción arteriogénica por medio de la cual se altera el suministro de sangre al pene. En incluso otros casos, la disfunción se asocia con una neuropatía, tal como daño de los nervios que se asocia, por ejemplo, a partir de una cirugía o una lesión pélvica, en el sistema nervioso que afecta el pene. Dicha disfunción se conoce como "neurogénica" y aproximadamente del diez al quince por ciento de los casos de la impotencia son de origen neurogénico.

25 También existe una alta incidencia de insuficiencia eréctil entre diabéticos, particularmente aquellos con diabetes mellitus dependiente de la insulina. La disfunción eréctil en diabéticos por lo general se clasifica como "diabetogénica", aunque la disfunción fundamental es neurogénica por lo general asociada con la neuropatía, pero puede ser arteriogénica o neurogénica y arteriogénica. Aproximadamente la mitad de los hombres diabéticos sufren de insuficiencia eréctil, y aproximadamente la mitad de los casos de impotencia neurogénica se da en los diabéticos.

30 Algunas veces, la insuficiencia eréctil es un efecto secundario de ciertos fármacos, tales como los beta-bloqueantes que se administran para reducir la presión sanguínea en personas que sufren de hipertensión, o fármacos administrados para tratar la depresión o la ansiedad. El consumo excesivo de alcohol también se ha relacionado con la insuficiencia eréctil. Estas formas de insuficiencia eréctil se pueden considerar como un subconjunto de insuficiencia neurogénica o psicogénica.

35 Un número de métodos para tratar la impotencia está disponible. Estos tratamientos incluyen, tratamientos farmacológicos, cirugía y, en casos de disfunción psicogénica, algunas veces es efectiva la asesoría psicológica.

40 En los casos raros, dónde la insuficiencia es intratable debido a una fuga venosa, generalmente se puede emplear la cirugía para reparar la lesión venosa y de ese modo curar la insuficiencia o, si sigue habiendo una insuficiencia eréctil después de la reparación de la lesión venosa, hace que la insuficiencia sea sensible al tratamiento por medio de métodos farmacológicos. Así mismo, son ampliamente utilizados los implantes de pene, que proveen un medio mecánico para producir una erección suficiente para la penetración vaginal, para tratar la impotencia. En los últimos años, se han empleado los implantes, especialmente en casos dónde la intervención farmacológica no es efectiva, que por lo general son casos de impotencia aterogénica severa. El tratamiento de la impotencia con implantes de pene, sin embargo, conlleva graves desventajas. Tal tratamiento requiere cirugía y necesita la destrucción total de los tejidos eréctiles del pene, siempre excluyendo la erección normal.

También son disponibles los métodos de tratamiento farmacológico. Sin embargo, no se ha demostrado que tales métodos, sean altamente satisfactorios o tengan efectos secundarios potencialmente severos.

5 El VIAGRA® (citrato de sildenafil, Pfizer, Inc., New York, N.Y.), tomado por vía oral, es efectivo para un máximo del 80% (dependiendo de la severidad de la disfunción eréctil (DE) y/o cualquier enfermedad subyacente) de los pacientes para producir una erección adecuada para el contacto sexual. Es efectivo para un amplio rango de causas. Los pacientes exitosos de VIAGRA® tienen erecciones naturales, normales. El VIAGRA® no tiene efecto en la libido (deseo sexual) de manera que no será efectivo a menos que un hombre se sienta estimulado.

10 El VIAGRA® suprime la enzima fosfodiesterasa de manera que el monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), la sustancia química que produce la erección, no se descompone, así que se produce una erección normal. El cGMP es un vasodilatador natural (dilata las arterias del pene), que relaja el músculo liso de las arterias del pene de manera que el músculo liso relajado, en combinación con la presión sanguínea normal, hace que las arterias del pene se dilaten de manera que las cámaras de erección se inundan con sangre para producir una erección.

15 Los hombres que no pueden tomar VIAGRA® o lo encuentran ineficaz, por lo general son capaces de lograr erecciones utilizando otro tratamiento que produce erecciones directamente, sin estimulación sexual. Este tratamiento utiliza la vasodilatación (dilatación del vaso) por medio de medicamentos (vasodiladores) que dilatan las arterias del pene de manera que las cámaras de erección se inundan con sangre para producir una erección. Estos medicamentos relajan el músculo liso de las arterias del pene para causar la dilatación de la arteria.

20 El vasodilatador más común es el ALPROSTADIL® (Caverjet, Edex, Schwarz Pharma USA Holdings, Inc., Wilmington, Del.). Este puede ser inyectado en la base del pene (en uno de los cuerpos cavernosos) con una aguja o insertado en la uretra en forma de pellet a través de un sistema de administración llamado MUSE (Supositorio Uretral Medicado para Erecciones). El ALPROSTADIL® es efectivo en más del 80% de los pacientes y MUSE para aproximadamente el 30% de los hombres con disfunción eréctil. Para los hombres para quienes el ALPROSTADIL® no es efectivo, una mezcla inyectada de vasodiladores (TRIMIX), es efectiva para aproximadamente el 62% de los pacientes.

25 Los hombres que son capaces de lograr una erección normal, pero no la pueden sostener porque tienen fuga venosa se pueden ayudar mediante una banda de constricción del pene. Este es un dispositivo similar a un anillo que se sujeta alrededor de la base del pene para evitar que la sangre se escape. Se encuentra disponible una banda para el pene denominada Actis (Vivus Corp.).

30 Un nuevo medicamento Uprima (apomorfina), tomado por vía oral, se encuentra en estudios. Busca dirigir los mecanismos en el cerebro para producir una erección. En Europa se ha aprobado para el tratamiento de la disfunción eréctil.

35 Un medicamento tópico Topiglan (ALPROSTADIL®) ha tenido resultados prometedores, aplicado en la cabeza del pene para producir una erección directamente, sin estimulación sexual. Un ungüento facilitaría el modo de administración, al tiempo que reduce el riesgo de efectos adversos en comparación con la inyección o el pellet uretral.

Dos medicamentos orales, vardenafil y tadalafil, como el sildenafil (VIAGRA®), son inhibidores de PDE-5 que suprime la enzima que descompone el vasodilatador natural cGMP, con el fin de facilitar y mantener una erección.

40 Cuando se utilizan dos o más medicamentos en combinación, el tratamiento se denomina farmacoterapia de combinación. Cuando un medicamento se utiliza solo, el tratamiento se denomina monoterapia. Cuando falla cualquier monoterapia, puede ser efectiva una farmacoterapia de combinación.

Las farmacoterapias de combinación que utilizan al menos dos medicamentos han sido utilizadas experimentalmente con resultados significativos. Se ha evaluado la combinación de VIAGRA® y MUSE (Eur. Urol. 2000; 38: 30-4 and BJU. Int. 2000; 86: 469-73 and Urol. 2000; 163: 198).

45 Otro estudio evaluó el beneficio de bloqueantes alfa orales (doxazosina oral diaria) en combinación con intracavernosa (inyectada) ALPROSTADIL® (Urol. 1998; 52: 739-43).

Otro estudio (Internat. J. Impot. Res. 2002; 14(1): 50-53) combinó el VIAGRA® con Cardura (doxazosina) oral diariamente.

Los péptidos de la angiotensina (Ang) son un grupo de péptidos reguladores en el sistema angiotensina-renina (RAS), que ayuda a regular la presión sanguínea y el volumen extracelular en el cuerpo. Se conocen varios péptidos

de la angiotensina, por ejemplo, Ang-(2-8) (angiotensina III), Ang-(3-8) (angiotensina IV), Ang II (4-8), Ang II (5-8), Ang II (1-4), Ang-(1-9), y Ang-(1-7).

5 La Ang-(1-7) es un heptapéptido biológicamente activo de (RAS), y sus funciones por lo general son opuestas a aquellas atribuidas a Ang II, que es el principal componente efector de RAS. La Ang-(1-7) se puede formar a partir de Ang II a través de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE-2), o directamente a partir de Ang I por la acción de neutra- o proli- endopeptidasas. El receptor para Ang-(1-7) es el receptor acoplado a la proteína G, Mas (véase Santos R.A.S., et al. (2003). PNAS, USA, 100: 8258-8263). Las principales actividades de Ang-(1-7) son la vasodilatación a través de la estimulación del óxido nítrico, prostaglandinas y potenciación de las actividades de la bradicinina, y anti- diuréticos.

10 Se conocen otras actividades importantes de Ang-(1-7), por ejemplo, Ang-(1-7) se puede involucrar en los mecanismos de aprendizaje y de memoria (véase, Santos, R.A. and Campagnole-Santos, M.J. (1994) Braz J Med Biol Res. 27(4):1033-47; Hellner, K., et al. (2005) Mol Cell Neurosci. 29(3):427-35).

La Tabla 1 resume las actividades biológicas de Ang-(1-7) y otras angiotensinas importantes (fuente: Ferreira AJ, and Santos RAS. (2005). Braz J Med Biol Res, 38:499-507).

15 Tabla 1. Efectos cardiovasculares mediados por los receptores de la angiotensina

Angiotensina	Receptor	Acciones
Ang II	AT ₁	Efecto presor y vasoconstricción Aumento de inotropismo y cronotropismo Efecto arritmogénico Remodelación y Proliferación celular Trombosis e inflamación
Ang II	AT ₂	Inhibición de Proliferación celular Apoptosis Vasodilatación
Ang-(1-7)	AT ₁₋₇ (Mas) *	Vasodilatación Potenciación de vasodilatación inducida por BK Efecto anti-arritmogénico Mejora de función contráctil post-isquémica Inhibición de Proliferación celular
Ang-(3-8) (Ang IV)	AT ₄ (IRAP)	Vasodilatación Inhibición de Proliferación celular
Des-Asp1-Ang I	AT ₁	Inhibición de Proliferación celular inducida por Ang II
* Las acciones mediadas por Mas se enumeran, basándose en la evidencia directa o indirecta (bloqueada por A-779). Ang = angiotensina; BK = bradiquinina; IRAP = aminopeptidasa regulada por la insulina		

Los beneficios del uso de la Angiotensina-(1-7) en una enfermedad cardíaca y sus complicaciones ha sido un tema importante relacionado con este heptapéptido. Por ejemplo, U.S. Patent Application 2004/171584 revela las

5 formulaciones que comprenden la angiotensina-(1-7) y/o el losartan para el tratamiento de la hipertensión arterial y otras enfermedades cardiovasculares. Además, U.S. Patent Application 2005/069533 revela las formulaciones de angiotensina-(1-7) para tratar la hipertensión arterial, heridas, quemaduras, eritema, tumores, alopecia, enfermedades de la sangre, diabetes mellitus, la motilidad del esperma, nefropatía, trastornos gastrointestinales y ginecológicos, angiogénesis y angioplastia.

10 Se sabe que existen al menos tres rutas diferentes para formar la Ang-(1-7) (véase, por ejemplo, Ferreira, A.J. and Santos, R.A.S. (2005) Braz J Med Biol Res, 38:499-507); Loot, A.E. (2005). Therapeutic perspectives of Angiotensina-(1-7) in heart failure. Thesis Dissertation. University of Groningen). La Ang-(1-7) se puede formar a partir de Ang I (1-10), (i) directamente, mediante la acción combinada de endopeptidasa neutra y prolil-endopeptidasa (NEP y PEP), o (ii) indirectamente, por la hidrólisis del intermedio Ang-(1-9) por la acción de la enzima convertidora de la angiotensina y la endopeptidasa neutra (ACE y NEP). Alternativamente, Ang-(1-7) se puede formar por la hidrólisis de Ang II (1-8) por la acción de prolilcarboxipeptidasa, prolil-endopeptidasa y la enzima convertidora de la angiotensina 2 (PCP, PEP y ACE2).

15 Los trastornos sexuales de la presente invención se conocen por aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, (DSM-IV), American Psychiatric Association, Washington D.C., 1994 así como the DSM-IV Guidebook, American Psychiatric Press, Inc., Washington D.C., 1995).

20 Por lo tanto, aunque la impotencia es un problema ubicuo, existen pocos métodos satisfactorios disponibles para tratar este trastorno. Por consiguiente, es un objeto en este documento proveer los métodos y las composiciones para tratar la impotencia.

Resumen de la invención

La presente divulgación se refiere al uso de Ang-(1-7) en el tratamiento de la disfunción eréctil (DE). Ang-(1-7) se puede utilizar sola o en combinación con otros agentes terapéuticos para DE.

25 La divulgación también incluye el uso de análogos de Ang-(1-7) en el tratamiento de DE. Los análogos de Ang-(1-7) se pueden utilizar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos para DE.

La divulgación también incluye el uso de agonistas del receptor de Ang-(1-7) en el tratamiento de DE. Los agonistas del receptor de Ang-(1-7) se pueden utilizar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos para DE.

30 Una primera modalidad de la invención actual se refiere a una composición farmacéutica en una forma de dosificación apropiada, dicha composición que comprende: (a) la Ang-(1-7) y/o un agonista del receptor de la Angiotensina-(1-7), y/o un análogo de la Angiotensina-(1-7) en una cantidad efectiva, tanto para disminuir los síntomas de la disfunción eréctil como para restaurar la capacidad eréctil; (b) un inhibidor de PDE o al menos un agente anti-hipertensivo, y (c) un portador farmacéuticamente aceptable.

35 En una segunda modalidad, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento de la disfunción eréctil en un individuo con necesidad de dicho tratamiento, dicho uso que comprende la administración a dicho individuo de una cantidad efectiva de Ang-(1-7) y/o un agonista del receptor de Ang-(1-7), y/o un análogo Ang-(1-7), solos o en combinación con otros ingredientes activos, en donde la composición es efectiva para revertir la disfunción eréctil causada por tratamiento a largo plazo de la hipertensión, como se define anteriormente.

En una modalidad preferida, la invención es un complejo de inclusión formado por la Ang-(1-7) y una ciclodextrina.

40 Adicionales objetos, características, y ventajas de la invención van a ser aclarados por medio de la siguiente descripción. Adicionalmente, las ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente explicación en referencia a los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 muestra la inmunolocalización de Mas en estructuras de penes de ratas y humanos. Mas fue localizado en membranas de células endoteliales del cavernoso (triángulos) y de músculo liso (flechas) de humano (**a-b**) y rata (**c-d**), células de músculo liso y endotelio arteriolar de rata (**d-e**).

La Figura 2 ilustra gráficamente el efecto *in vivo* de Ang-(1-7) en la respuesta eréctil por estimulación ganglionar en rata. La Ang-(1-7) (**a-b**) incrementó el aumento de CCP/MAP inducida por estimulación ganglionar que fue mitigado por la infusión de A-779 (**c**). A-779 reduce el aumento de CCP/MAP inducida por un estímulo mínimo en el cual se

observó el valor máximo del CCP/MAP (de). L-NAME atenuó el aumento de CCP/MAP inducido por la estimulación eléctrica que no fue superado por Ang(1-7) (f). Todos los resultados se expresan como la media \pm s.e.m. El análisis estadístico se realizó con ANOVA seguido por la prueba post hoc de Bonferroni. *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ en comparación con el control, registrado 10 min antes de la administración del fármaco. La prueba t se realizó en el protocolo A-779 y L-NAME. * $P < 0.05$ en comparación con el control.

La Figura 3 muestra óxido nítrico liberado en el cuerpo cavernoso humano inducido por Ang-(1-7). Ang-(1-7) estimuló la liberación de NO en tejido cavernoso de humanos sin disfunción eréctil (a-b) y con disfunción eréctil (c-d). H-WED, humano sin disfunción eréctil; H-DE, humano con disfunción eréctil.

La Figura 4 ilustra el óxido nítrico liberado en cuerpo cavernoso de rata inducido por Ang-(1-7). Ang-(1-7) indujo la liberación de NO en cuerpo cavernoso de rata no-estimulada (a-b). La estimulación ganglionar submáxima de la rata indujo la liberación de NO, que se aumentó por Ang-(1-7) (c-d). **ES**, estimulada eléctricamente.

La Figura 5 muestra el óxido nítrico liberado en cuerpo cavernoso de ratones inducido por Ang-(1-7). Ang-(1-7) estimuló la liberación de NO en ratones **WT** Mas (a-b) que fue suprimido en ratones carentes de Mas (c-d). **WT**, ratones de tipo salvaje; **KO**, ratones carentes.

La Figura 6 ilustra las membranas de transferencia mostrando que Ang-(1-7) estimula la fosforilación de eNOS (S1177) y aumenta la actividad de eNOS en células transfectadas CHO-Mas. a, Expresión del receptor de AT₁ y AT₂ Mas, en CHO y células transfectadas CHO-Mas, detectada por el análisis de transferencia de western con anticuerpos específicos. b, Aumento dependiente del tiempo en fosforilación eNOS. Las células transfectadas CHO-Mas fueron expuestas a Ang-(1-7), (10^{-7} M, 5 a 30 min) en la presencia o ausencia de su inhibidor, fosforilación de A-779 (10^{-6} M) y eNOS detectada por el análisis de transferencia de western con anticuerpo fosfo-específico (S1177). La fosforilación fue bloqueada completamente por el antagonista de Ang-(1-7), A-779. c, Ang-(1-7) indujo la liberación de NO de una manera dependiente de la dosis. La liberación de NO, durante 30 min se midió utilizando el fluorocromo 2,3-diaminonaftaleno (DAN). * $P < 0.05$ (LV, ventrículo izquierdo).

La Figura 7 ilustra gráficamente el efecto de la estimulación del nervio ganglionar sobre CCP/MAP de los ratones Mas^{+/-} y Mas^{-/-}. a. aumento de CCP/MAP inducido por la estimulación ganglionar en ratones Mas^{-/-} fue significativamente inferior que en Mas^{+/-}. b. aumento de CCP/MAP inducido por una segunda serie de estimulación ganglionar realizada 10 min más tarde, se atenuó aún más en Mas^{-/-} que en Mas^{+/-}. Todos los resultados se expresan como la media \pm s.e.m. ANOVA seguido por la prueba post hoc de Bonferroni. *, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ en comparación con Mas^{+/-}.

La Figura 8 muestra el aumento de tejido fibroso producido por la delección genética de Mas. a. Ratones Mas^{-/-} teñidos con tricrómico de Gomori mostró el aumento en tejido fibroso en comparación con Mas^{+/-} indicando un aumento del contenido de colágeno. b. Imagen representativa de tinción de tricrómico de Gomori en cuerpo cavernoso de ratones Mas^{+/-} y Mas^{-/-} (4x - imágenes altas; 40x - imágenes bajas). Los resultados expresados como la media \pm s.e.m, n=4. La prueba no apareada t de Student seguida por la prueba de Mann Whitney. $P < 0.05$ en comparación con ratones Mas^{+/-} (AU, unidad arbitraria).

La Figura 9 ilustra el efecto *in vivo* de Ang-(1-7) sobre ratas normotensas e hipertensas por sal-DOCA. El tratamiento con Ang-(1-7) (15.5 pmol/Kg/min de peso corporal) potenció el aumento dependiente del voltaje en CCP/MAP bajo estimulación ganglionar en ratas normotensas (a), y normalizó la función del pene en ratas hipertensas por sal-DOCA (b-c). Todos los resultados se expresan como la media \pm s.e.m. ANOVA seguido por la prueba post hoc de Bonferroni. *, $P < 0.05$ en comparación con el control, registrado 10 min, antes de la administración del fármaco.

La Figura 10 ilustra el efecto en la función eréctil de SHR tratado crónicamente con el Complejo de Inclusión Ang-(1-7)/HP β -CD y Atenolol. El tratamiento de los animales con Atenolol redujo el aumento de CCP/MAP que fue inducido por estimulación eléctrica ganglionar (1.5 V, 5 msec pulsos a una frecuencia de 12 Hz). El Complejo de Inclusión Ang-(1-7)/HP β -CD no alteró el aumento de CCP/MAP, pero anuló la atenuación del efecto inducido por Atenolol en la función eréctil.

Descripción detallada de la invención

DE es un trastorno que involucra la falla de un mamífero macho para lograr la erección, la eyaculación, o ambas. Un aumento en DE por lo general se asocia con la edad y generalmente se causa por una enfermedad física o como un efecto secundario del tratamiento del fármaco. Los principales medicamentos responsables de DE son los antihipertensivos (por ejemplo, beta-bloqueantes, simpaticolíticos, y diuréticos), y anti-diabéticos.

Se cree que DE y la enfermedad vascular (por ejemplo, hipertensión) están relacionadas en el nivel del endotelio. La disfunción endotelial resulta en una incapacidad del revestimiento de la célula del músculo liso en las arteriolas para

relajar, previniendo así la vasodilatación. El óxido nítrico (NO) es un potente vasodilatador y se secreta por el endotelio, que se sintetiza a partir de la L-arginina por la sintasa de NO de la enzima endotelial (eNOS).

Ang-(1-7) promueve la liberación de prostaglandinas a partir de células de músculo liso y endotelio vascular, liberación de NO, vasodilatación, inhibición de crecimiento de célula vascular y atenuación de vasoconstricción inducida por Ang II.

El sistema angiotensina-renina tiene dos brazos principales: un brazo vasoconstrictor/proliferativo en la cual el principal mediador es la Ang II que actúa sobre los receptores de AT₁; y un brazo vasodilatador/anti-proliferativo en el cual el principal efector es Ang-(1-7) que actúa a través del Mas receptor acoplado de la proteína G. Los péptidos del sistema renina-angiotensina, incluyendo el vasodilatador Ang-(1-7), se administran ampliamente, incluyendo dentro del cuerpo cavernoso (véase, por ejemplo, Kifer I., et al. (1997) J Urol. 157: 1920-1925).

Los inventores demostraron que Ang-(1-7) se puede utilizar para tratar DE debido a que: (i) la presencia del Mas en rata y cuerpo cavernoso humano, (ii) el efecto de la estimulación de Mas por Ang-(1-7) sobre la liberación de NO en cuerpo cavernoso humano, (iii) los mecanismos de señalización activados a partir de la liberación de NO por Ang-(1-7); y (iv) actividad en los modelos *in vivo* de erección del pene.

La mayoría de las causas de la disfunción eréctil resultan de los efectos adversos sobre los nervios o vasos sanguíneos hacia, de, o dentro del pene. Las causas de la disfunción eréctil incluyen: aterosclerosis (engrosamiento, estrechamiento, endurecimiento y menos elasticidad de los vasos sanguíneos del pene); la anomalía del mensaje químico hacia o dentro del pene (previniendo así que las cámaras de erección sean inundadas con sangre para producir la erección); fuga venosa (la sangre se filtra completamente de los vasos del pene); el daño de los nervios y vasos sanguíneos causado por la diabetes; el daño de los nervios, causado por enfermedades degenerativas tales como esclerosis múltiple y enfermedad de Parkinson; daño de los nervios causado por extirpación quirúrgica de la próstata, la vejiga o el recto; aneurisma de la aorta abdominal (los vasos y los nervios del pene se pueden dañar); deficiencia de B-12 (provoca problemas neurológicos en todo el cuerpo); los tratamientos de radiación contra cáncer de próstata, vejiga o rectal; factores psicológicos (estrés, depresión, ansiedad de rendimiento); desequilibrios hormonales tales como deficiencia de testosterona o niveles anormalmente altos de prolactina; alcohol; uso del tabaco; abuso de sustancias; enfermedad de Peyronie (el tejido conectivo del pene se engruesa, lo que interfiere con la capacidad para tener una erección); lesiones en los nervios o arterias necesarias para tener una erección (fractura de pelvis, cerebro, médula espinal, abdomen o pene); anti-hipertensivos; anti-depresivos; tranquilizantes; antifúngicos; antiácidos; fármacos para bajar el colesterol; diuréticos; nitratos; Proscar (medicamento para la hiperplasia de próstata benigna); propecia (para contrarrestar la calvicie); estrógenos; anti-andrógenos; anti-histaminas; anti-colinérgicos; fármacos contra el cáncer; el envejecimiento, la hipertensión; la obesidad; y la hipercolesterolemia.

Particularmente, la presente divulgación se refiere al uso de Ang-(1-7) y/o un agonista del receptor de Ang-(1-7) y/o un análogo de Ang-(1-7) en el tratamiento de la disfunción eréctil (DE) en un paciente necesitado de dicho tratamiento, en donde la disfunción eréctil es causada por diabetes, enfermedad renal, alcoholismo crónico, esclerosis múltiple, aterosclerosis, enfermedad vascular, enfermedad neurológica o enfermedad psicológica. La Ang-(1-7) y/o el agonista del receptor de la Ang-(1-7) y/o el análogo de la Ang-(1-7), se puede utilizar solo o en combinación con otro ingrediente activo.

Además, la presente invención se relaciona particularmente con el uso de la Ang-(1-7) y/o un agonista del receptor de la Ang-(1-7) y/o un análogo de la Ang-(1-7) en el tratamiento/rehabilitación de la disfunción eréctil (DE), en un paciente necesitado de dicho tratamiento, en donde la disfunción eréctil es causada por anti-hipertensivos, antihistaminas, anti-depresivos, tranquilizantes, supresores del apetito, o por la cirugía o lesión que afecta la erección del pene.

La presente invención también provee una composición farmacéutica en una forma de dosificación apropiada, dicha composición que comprende un inhibidor de PDE combinado con la Ang-(1-7) y/o un agonista del receptor de la Ang-(1-7) y/o un análogo de la Ang-(1-7) y un portador farmacéutico. La composición además puede comprender un agente anti-hipertensivo.

El término "Angiotensina-(1-7)" como se utiliza en este documento, es el heptapéptido que tiene la secuencia Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro. Los términos "agonista del receptor de la Angiotensina-(1-7)" y "análogo de la Angiotensina-(1-7)" tienen la intención de incluir análogos o agonistas peptídicos, y agonistas no-peptídicos, por ejemplo, Ala1-Angiotensina-(1-7), AVE 0991 y aquellos revelados en U.S. Patent Application 2005/069533. Así mismo se incluyen agonistas no-peptídicos por ejemplo, en U.S. Patent 6,235,766

El término "agente anti-diabético" como se utiliza en este documento, tiene la intención de incluir, potenciadores de la secreción de la insulina, por ejemplo, un derivado de biguanida, por ejemplo, metformina o una sal de esta farmacéuticamente aceptable. Otros potenciadores de la secreción de la insulina incluyen sulfonilureas (SU),

incluyendo tolbutamida; clorpropamida; tolazamida; acetohexamida; 4-cloro-N-[(1-pirolidinilamino)carbonil]-benzensulfonamida (glicopiramida); glibenclamida (gliburida); glicazida; 1-butil-3-metanilurea; carbutamida; glibonurida; glipizida; gliquidona; glisoxepid; glibutiazol; glibuzol; glihexamida; glimidina; glipinamida; fenbutamida; y toliliclamida, o las sales de estos farmacéuticamente aceptables.

5 El término “agente anti-hipertensivo” como se utiliza en este documento, tiene la intención de incluir, antagonistas del receptor de la Angiotensina II, por ejemplo losartan, candersartan, irbersartan, valsartan, olmesartan, eprosartan, telmisartan; agentes β -bloqueantes; agentes bloqueantes del canal de calcio; inhibidores de ACE, por ejemplo captopril, enalapril, fosinopril, delapril, benzepril; y agentes diuréticos.

10 El término “agente β -bloqueante” como se utiliza en este documento, tiene la intención de incluir acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, esmolol, metropolol, propanolol, timolol, pindolol, penbutolol, labetalol, carvedilol. El atenolol fue utilizado como un ejemplo de agente β -bloqueante utilizado en la composición de la invención.

15 El término “agente diurético” como se utiliza en este documento, tiene la intención de incluir, clorotiazida, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida, manitol, metolazona, mezcla de amilorida e hidroclorotiazida, mezcla de triamtereno e hidroclorotiazida, y diuréticos ahorradores de potasio, tales como amilorida, espirolactona, y el ahorrador triamtereno.

El término “inhibidores de PDE” como se utiliza en este documento, tiene la intención de incluir, inhibidores de la fosfodiesterasa no-selectivos, por ejemplo papaverina, e inhibidores de la fosfodiesterasa 5, tal como sildenafil, vardenafil y tadalafil o una sal de estos farmacéuticamente aceptable.

20 Una “cantidad efectiva” es aquella que es suficiente para lograr una mejora en la función eréctil o un alivio de los síntomas de disfunción eréctil, o incluso para restaurar la capacidad eréctil. Las cantidades efectivas dependerán de la condición específica que se trata y la gravedad de la misma; las características individuales del paciente, incluyendo la edad, la condición física, el tamaño y el peso; tratamiento concurrente; y el modo de administración. Estos factores son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y pueden ser establecidos sin experimentación. Generalmente, las dosis de la Ang-(1-7) o el agonista del receptor de la Ang-(1-7) o el análogo de
25 la Ang-(1-7) variarán de aproximadamente 0.01 mg/kg de peso corporal por día a 100 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente de 0.1 mg/kg de peso corporal por día a 10 mg/kg de peso corporal por día. Las dosis múltiples por día, en la mayoría de los casos, se pueden contemplar para lograr niveles sistémicos apropiados de los ingredientes activos presentes en la composición de la invención.

30 La Ang-(1-7), los agonistas del receptor Ang-(1-7), o los análogos de Ang-(1-7) descritos en este documento pueden ser los disponibles comercialmente, o se derivan a partir de los compuestos disponibles comercialmente, o se sintetizan *de novo* utilizando no más allá de los procedimientos rutinarios que se conocen por los expertos en la técnica de preparación de péptidos.

35 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por medio de una variedad de rutas de administración, incluyendo, por vía oral, inyección intracavernosa, por vía tópica y transdérmica administrada a través de la piel en varios sitios o vías parenterales. El modo particular seleccionado dependerá de los ingredientes activos presentes en la composición, la severidad de la disfunción eréctil que se trata y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Preferiblemente, las composiciones de la invención están en forma de administración oral debido a la conveniencia del paciente y el programa de dosificación.

40 En una modalidad, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento de DE, mediante la administración a un individuo con necesidad de dicho tratamiento de una cantidad de la Ang-(1-7) efectiva para disminuir los síntomas de DE. La Ang-(1-7) se puede administrar en una dosis efectiva que mantiene la presión sanguínea sistémica en niveles superiores de los que pueden causar la disfunción sexual. Preferiblemente, la dosis efectiva por vía terapéutica es suficiente para mantener la presión intracavernosa a un nivel sustancialmente cerca de la presión arterial media.

45 En otra modalidad, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para utilizar en la restauración de la capacidad eréctil por la administración a un paciente de una cantidad de Ang-(1-7) y/o un agonista del receptor Ang-(1-7) y/o un análogo de Ang-(1-7), ya sea solo o combinado con otros ingredientes activos, efectiva para restaurar la capacidad eréctil.

50 Las composiciones que contienen Ang-(1-7) se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en el estado de la técnica. En conformidad, las instrucciones de Remington's Pharmaceutical Sciences o de una fuente de información similar se pueden utilizar para preparar una formulación apropiada de acuerdo con la invención.

Cuando se seleccionan las composiciones inyectables, la formulación para administración parenteral preferiblemente comprende una preparación acuosa estéril de Ang-(1-7) y otros ingredientes activos. La preparación inyectable

estéril puede ser apropiadamente una suspensión o solución inyectable estéril en un solvente o diluyente aceptable parenteralmente, no-tóxico que se conoce por el experto en la técnica farmacéutica.

De acuerdo con la invención, las composiciones para administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, comprimidos, comprimidos efervescentes, comprimidos masticables, píldoras, polvos, 5 gránulos y geles o formas farmacéuticas similares. Otras formas de formulación oral incluyen suspensiones o emulsiones en un portador acuoso o no-acuoso.

En las formas de dosificación sólidas, los ingredientes activos se pueden mezclar con un portador farmacéuticamente aceptable que comprende al menos un componente seleccionado del grupo que comprende 10 diluentes, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, agentes de coloración, y agentes saborizantes. Los diluentes inertes ejemplares son el carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio, fosfato tribásico de calcio, sulfato de calcio, celulosa-microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, dextrinas, ciclodextrinas, excipientes de dextrosa, fructosa, caolín, lactitol, lactosa, manitol, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, sacarosa, azúcar comprimible, y azúcar glass. Como aglutinantes pueden ser utilizadas una o más sustancias, por ejemplo, metil celulosa, hidroxipropil 15 celulosa, hidroxipropil metil celulosa, polivinilpirrolidona, gelatina, goma arábica, etil celulosa, alcohol polivinílico, pululano, almidón pregelatinizado, agar, tragacanto, alginato de sodio, propilenglicol, y alginato. Como desintegrante pueden ser utilizadas una o más sustancias seleccionadas a partir de hidroxipropil celulosa de baja sustitución, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa de sodio, almidón, celulosa cristalina, hidroxipropil almidón, y almidón parcialmente pregelatinizado, y croscarmelosa sódica. 20 Lubricantes ejemplares son el ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, aceite de ricino hidrogenado, sacarosa.

De acuerdo con la invención, en el caso de las cápsulas, comprimidos, comprimidos efervescentes, y píldoras, las formas de dosificación también pueden contener agentes de regulación. Las cápsulas de gelatina suave se pueden preparar para contener una mezcla de los ingredientes activos de la invención y aceites vegetales. Las cápsulas de 25 gelatina dura pueden contener gránulos de los ingredientes activos en combinación con un sólido, portador pulverulento tal como, lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón de patata, almidón de maíz, amilopectina, derivados de celulosa de gelatina. Además, los comprimidos y las píldoras se pueden preparar con cubiertas entéricas.

De acuerdo con la presente invención, se prefieren particularmente las formas de dosificación de un tipo de liberación controlada/retardada/modulada, que se basan en portadores o matrices incluyendo, polímeros 30 biocompatibles, polimérico farmacéuticamente aceptable, matrices, liposomas, liposomas de PEG, o una ciclodextrina o una matriz derivada de ciclodextrina. Se prefieren especialmente las formas de dosificación que comprenden los ingredientes activos encapsulados en una matriz de ciclodextrina como se revela en U.S. Patent Application 2005/069533. En dicha modalidad, la ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste de ciclodextrina alquilada, ciclodextrina hidroxialquilada, y ciclodextrina acilada. Se prefiere particularmente una ciclodextrina 35 hidroxialquilada, y más preferida es la hidroxipropil β -ciclodextrina. Además, los derivados de la ciclodextrina se describen en Szejtli, J. Chem Rev, (1998), 98, 1743-1753; and Szejtli, J., Advance Drug Delivery Reviews, 36 (1999) 17-28,. Ejemplos de derivados de la ciclodextrina incluyen CDs metilada (RAMEB = β -ciclodextrina metilada aleatoriamente); CDs hidroxialquiladas (hidroxipropil- β -CD e hidroxipropil γ -ciclodextrina); CDs acetiladas (acetil- γ -ciclodextrina); CDs reactivas (clorotriazinil β -CD); y CDs ramificadas (glucosil- y maltosil β -CD); 40 acetil- γ -ciclodextrina; acetil- β -CD, sulfobutil- β -CD, α -, β - y γ -ciclodextrinas sulfatadas; sulfociclodextrinas alquiladas.

En la modalidad más preferida, la composición de la invención comprende un Complejo de Inclusión hidroxipropil β -ciclodextrina-Ang-(1-7) (Ang-(1-7)/HP β -CD).

A continuación, se describirá la presente invención con más detalle a modo de Ejemplos.

Experimental

45 Animales

En los ensayos se utilizaron ratas Wistar macho intactas (220-250g), ratones machos Suizos, Mas-KO (Mas^{-/-}) ratones macho en los antecedentes genéticos puros C57BL/6, y ratones control WT C57BL/6 (Mas^{+/+}) criados en las 50 instalaciones para animales del Biological Science Institute (CEBIO, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil) para la práctica de la invención actual. Los animales se mantuvieron en cuartos con temperatura controlada, con ciclo de luz/oscuridad 14/10 h (luz a las 6:00 am) con acceso libre a agua y alimento. El comité para el cuidado para el animal del Federal University of Minas Gerais, Brazil, aprobó todos los protocolos experimentales.

Procedimiento quirúrgico

5 Ratas normotensas y ratas hipertensas por sal-DOCA, ratones Mas^{-/-} y WT fueron anestesiados con uretano intraperitoneal (140 mg/Kg). La arteria femoral izquierda de la rata y la arteria coronaria de los ratones fueron canulados para el seguimiento continuo de la presión arterial media (MAP). El eje del pene se liberó de la piel y de la fascia, y el cuerpo cavernoso derecho fue canulado mediante la inserción de una aguja de calibre 30, conectada a un transductor de presión, lo que permite el monitoreo continuo de la presión del cuerpo cavernoso (CCP) como se ha descrito en otra parte (véase, por ejemplo, T. M. Mills, et al., Biol Reprod 59, 1413 (Dec, 1998)). El cuerpo cavernoso izquierdo de la rata fue canulado con agujas de calibre 30 conectadas a jeringas de 10 mL a través de longitudes cortas de tubos de polietileno (PE)-10 y se utilizan para la administración de fármacos vasoactivos. Se abrió la cavidad abdominal, exponiendo el ganglio pélvico mayor derecho (MPG), y se colocaron en esta, electrodos bipolares de plata.

Modelo de animal

15 Las ratas Wistar machos (130-150g) fueron uninefrectomizadas y se impregnaron con un implante silástico subcutáneo que contiene DOCA (200 mg/kg) bajo anestesia tribromoetanol (por ejemplo, F. Ammarguella, et al. Circulation 103, 319 (Jan 16, 2001)). Los animales fueron mantenidos en agua que contiene NaCl al 1.0% y KCl al 0.2%, durante 4 semanas. Los animales control fueron uninefrectomizados pero no recibieron un implante DOCA y fueron mantenidos con agua potable normal. Se midieron las presiones sanguíneas sistólicas utilizando procedimientos de cola de manguito estándar.

Tejido humano

20 Los fragmentos descartados de tejido de cuerpo cavernoso humano (HCC) se recuperaron durante el implante de prótesis del pene o cirugía de cáncer de próstata, y fueron colocados en solución de Krebs helada para el transporte rápido al laboratorio. Fueron estudiadas las tiras de HCC de los pacientes con (H-DE) y sin disfunción eréctil (H-WED).

Procedimiento de inmunohistoquímica

25 Los animales se mataron y el cuerpo cavernoso se retiró. Las tiras de cuerpo cavernoso y HCC de rata fueron colocados en 4% de paraformaldehído durante 2 h. Posteriormente, se hicieron las secciones de tejido adyacente (10 µm) en un criostato. Después de este periodo, las secciones se incubaron en PBS, tween al 0.2 %, y BSA al 5%, cada una durante 15 min, y luego se incubaron secuencialmente con anticuerpo primario (1:500) o solución control [que consiste de anticuerpo primario (1:500) preincubado, durante 24 horas a 4 °C con 50 µg de péptido de bloqueo correspondiente al N-terminal de la proteína Mas], durante 24 h, a 4 °C. Después de la incubación del anticuerpo primario o la solución control, las secciones se lavaron en PBS (3 veces, durante 5 min), y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario (1:400, Alexa 594, Molecular Probes), durante 2 h a temperatura ambiente. La reacción se detuvo en solución reguladora Tris (50 mM) y los tejidos se montaron en portaobjetos cubiertos con cromo-alum, se secaron al aire, y se cubrió con el cubreobjetos con medio de montaje glicerol/Tris. Se obtuvieron las imágenes fluorescentes utilizando un microscopio confocal de barrido láser Zeiss 510 meta, equipado con un lente de objetivo de inmersión en aceite (x63).

Medición de NO DAF

El cuerpo cavernoso de ratón y humano se cargó con DAF-FM (1.0 µM) o DAF-FM más Ang-(1-7) (1.0 µM y 10.0 nM, respectivamente) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las tiras se lavaron en PBS (3 veces, durante 5 min) y se congelaron durante la noche a -80 °C.

40 Las ratas fueron anestesiadas con uretano intraperitoneal (140 mg/Kg). El eje del pene se liberó de la piel y de la fascia, y el cuerpo cavernoso derecho fue canulado mediante la inserción de una aguja de calibre 30 conectada a jeringas de 10-µL a través de longitudes cortas de tubos de PE-10 utilizadas para la infusión de DAF (1.0 µM) o soluciones DAF más Ang-(1-7) (1.0 µM y 15.5 pmol/Kg/min, respectivamente - 0.5 µL/min durante 5 min.). En algunas preparaciones, la cavidad abdominal se abrió, exponiendo el ganglio pélvico mayor derecho, y los electrodos bipolares de plata se colocaron en este. Se aplicó un estímulo submáximo durante 2 minutos mientras que la solución se infundió en los senos cavernosos como se describe anteriormente. Los animales se mataron y el cuerpo cavernoso se retiró y se congeló a -80 °C.

50 Las secciones adyacentes (20 µm) se prepararon utilizando un criostato. Los tejidos se montaron bajo portaobjetos cubiertos con cromo-alum, se secaron al aire, y se cubrió con el cubreobjetos con medio de montaje glicerol/Tris. Se obtuvieron las imágenes fluorescentes utilizando un microscopio láser confocal de barrido excitado a 488 nm con láser de ion argón (lente de objetivo de inmersión en aceite x63).

Células

Las células de ovario de hámster Chino (CHO) se transfectaron establemente con cADN *Mas* de rata impulsado por un promotor de citomegalovirus y se seleccionaron por neomicina como se describe previamente (J. B. Pesquero et al., *J Biol Chem* 269, 26920 (Oct 28, 1994)). Las células se cultivaron a 37 °C en DEMEM/F12 (GIBCO™), suplementado con suero fetal bovino al 10% en una atmósfera saturada con agua de 95% de O₂ y 5% de CO₂.

5 Transferencia Western

Las células se vuelven quiescentes en medio libre de suero 12h antes de la estimulación. Las células fueron expuestas a Ang-(1-7), (10⁻⁷ M, 5 a 30 min) en la presencia o ausencia de su inhibidor, A-779 (10⁻⁶ M, preincubación 10 min). Los lisados de células completas se prepararon y se llevó a cabo la transferencia de western como se describe (R. M. Touyz et al., *Circ Res* 90, 1205 (Jun 14, 2002)). En resumen, se determinaron las concentraciones de proteína de los lisados de células, los lisados fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida- sodio dodecil sulfato al 7.5% (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las manchas se bloquearon con leche descremada al 5% y se incubaron con anticuerpos específicos. La fosforilación de eNOS (S1177) se midió utilizando un anticuerpo fosfo-específico (S1177, 1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Se detectó la expresión del receptor *Mas*, AT₁ y AT₂ utilizando los anticuerpos específicos (AT₁, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, AT₂ 1:500, Alpha Diagnostics, San Antonio, Tex; *Mas*, 1:1000). Para confirmar la carga igual se utilizó el anticuerpo de β-actina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Las proteínas inmunoreactivas se detectaron por quimioluminiscencia, y las membranas de transferencia se analizaron densitométricamente (Image-Quant software, Molecular Dynamics).

Liberación de NO

20 Las células CHO₂ cultivadas en platos 6 de pozos se estimularon de una manera dependiente de la dosis con Ang-(1-7) (10⁻⁸ a 10⁻⁶ M). Se midió la cantidad de nitrato durante 30 min, utilizando el método de fluorocromo 2,3-diaminonaftaleno (DAN) como se describe previamente (D. J. Kleinhenz, X. Fan, J. Rubin, C. M. Hart, *Free Radic Biol Med* 34, 856 (Apr 1, 2003)).

Histología

25 La técnica histológica se aplicó al cuerpo cavernoso de ratones *Mas*^{+/+} y *Mas*^{-/-}. En el primer caso, las muestras de tejido fresco se congelaron a -80 °C. Las secciones de 20 micras se cortaron de las muestras de tejido fresco y se sometieron a la técnica histológica, específicamente, tricómico de Gomoris. Los datos del microscopio fueron capturados digitalmente.

30 Para el análisis cuantitativo del contenido del tejido fibroso, se mide la intensidad de tinción en diferentes zonas del cuerpo cavernoso a partir de *Mas* ^{+/+} y *Mas* ^{-/-}. La imagen de estas zonas se capturó a 12 bits utilizando un rango de la escala de grises de 0 a 255. Estas zonas se compararon y analizaron utilizando el software Scion Image (www.scioncorp.com).

Análisis estadístico

35 Todos los resultados se expresan como la media ± s.e.m. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un ANOVA de dos-vías seguido por Bonferroni pos-test. Para analizar el efecto intracavernoso de la A-779 y la influencia de L-NAME sobre el efecto de Ang-(1-7), se utilizó la prueba t de Student para datos no apareados. Se llevó a cabo, el análisis estadístico del contenido del tejido fibroso utilizando la prueba t de Student para datos no apareados seguido por la prueba de Mann Whitney. Un valor de p < 0.05 fue considerado significativo.

Efecto de Ang-(1-7) en los cambios ganglionares estimulados en CCP/MAP

40 Para examinar el efecto de Ang-(1-7) en cambios ganglionares estimulados en CCP/MAP, se estimuló el nervio con un rango de voltajes (0.5, 0.75, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 V, 5 msec pulsos a una frecuencia de 12 Hz), Después de la infusión intracavernosa de Ang-(1-7) (a una dosis de 15.5 pmol/Kg/min, 0.5 μL/min). Posteriormente, se repitió la estimulación ganglionar.

45 Para examinar el efecto del antagonismo de *Mas* en el aumento de CCP/MAP inducido ganglionar por Ang-(1-7), después de las mediciones iniciales de CCP y MAP, se administraron de forma simultánea A-779 y Ang-(1-7), y se repitió la estimulación ganglionar.

Con el fin de evaluar el papel de la Ang-(1-7) liberada de forma endógena, en primer lugar se determinó el estímulo mínimo en el cual se logró el valor máximo de CCP/MAP. Posteriormente (10 minutos después), se infundió A-779 (155 pmol/Kg/min) en los senos cavernosos y se repitió la estimulación.

Para evaluar el efecto de Ang-(1-7) sobre el aumento de CCP/MAP ganglionar estimulado en la presencia de la inhibición de NOS, se determinó un estímulo sub-máximo y aplicó al MPG. Posteriormente, se inyectó intracavernosamente L-NAME (200 µg/Kg) y se repitió la estimulación ganglionar. En lo sucesivo, se administró Ang-(1-7) y se aplicó un estímulo sub-máximo mientras que CCP/MAP se registró continuamente.

5 EJEMPLO 1

Determinación de la Inmunolocalización de Mas en las Estructuras del Pene en Ratas y Humanos

Utilizando la inmunofluorescencia, en primer lugar el receptor Ang-(1-7) Mas se localizó en las estructuras de pene de ratas y humanos. Se incubaron cortes del cuerpo cavernoso de ratas y humanos durante 24 horas con un anticuerpo primario policlonal anti-Mas o solución control de ratón [anticuerpo primario (1:500) pre-incubado durante 10 24 horas a 4 °C con 50 µg del péptido de bloqueo correspondiente al N-terminal de la proteína Mas de rata, y posteriormente, con IgG anti-ratón de cabra Alexa 594-marcado, durante 2 horas. La figura 1 muestra que Mas se localizó en la membrana de célula del músculo liso cavernoso de humano y rata, músculo liso esponjoso de rata y células endoteliales arteriolares.

Utilizando un modelo de rata *in vivo*, la siguiente etapa fue examinar el efecto de infusión intracavernosa de Ang-(1-7) en la presión del cuerpo cavernoso (CCP) y la presión arterial media (MAP). La estimulación eléctrica del ganglio pélvico mayor (MPG) resultó en un aumento dependiente del voltaje en la relación de CCP/MAP, consistente con estudios previos de los mecanismos de erección del pene (por ejemplo, K. K. Chen, et al., J Urol 147, 1124 (Apr, 1992); K. Chitale, et al., Int J Impot Res 13 Suppl 5, S16 (Dec, 2001); y C. M. Reilly, et al. J Androl 18, 110 (Mar-Apr, 1997). Como se ilustra en la Figura 2a-b, inyección de Ang-(1-7) produjo un aumento pequeño pero significativo en CCP sin alterar MAP inicial (CCP/MAP media \pm SEM \rightarrow Anteriormente: 0.1760.014, n=10; Después de Ang-(1-7): 0.2560.027; P < 0.05, n=10). Sorprendentemente, Ang-(1-7) potenció notablemente el aumento de la relación de CCP/MAP inducida por la estimulación ganglionar. Este efecto fue abolido por el antagonista Mas del receptor A-779 (véase Figura 2c), como se describe previamente (véase R. A. Santos et al., Brain Res Bull 35, 293 (1994)). Es de destacar, como se ilustra en Figura 2d-e, la infusión intracavernosa de A-779 atenuó el aumento de CCP/MAP inducida por la estimulación mínima en la cual se logró el valor máximo de la CCP/MAP, lo que sugiere que Ang-(1-7) liberado de forma endógena contribuye al aumento de CCP/MAP estimulado ganglionar.

EJEMPLO 2

El Efecto Potenciador de la Función Eréctil producida por Ang-(1-7) es dependiente de NO

Para determinar si el efecto potenciador en la función eréctil producido por Ang-(1-7) fue dependiente de NO, se llevaron a cabo experimentos adicionales en la presencia del inhibidor NOS, Nw-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). La administración de L-NAME en los senos cavernosos izquierdos no alteró la CCP o MAP inicial. Por otro lado, como se esperaba (véase descripciones previas en C. M. Reilly et al. (1997), and K. Chitale et al., Nat Med 7, 119 (Jan, 2001)), el tratamiento con L-NAME atenuó significativamente el aumento en CCP/MAP inducido por el estímulo submáximo [media \pm s.e.m. Contr.: 0.57 \pm 0.06 frente a L-NAME: 0.38 \pm 0.05; P < 0.05, n=6]. La respuesta eréctil atenuada inducida por la inhibición de NOS no se superó mediante la administración de Ang-(1-7), lo que sugiere que NO es un importante mediador corriente abajo de su efecto potenciador en este modelo experimental. Este resultado se ilustra en la Figura 2f.

EJEMPLO 3

Ang-(1-7) Libera NO en el Cuerpo Cavernoso

Adicionalmente, para demostrar que Ang-(1-7) libera NO en el cuerpo cavernoso, se utilizó el indicador de NO 4-amino-5 metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM) (véase A. Patzak et al., Kidney Int 66, 1949 (Nov, 2004)). Tiras del cuerpo cavernoso de humano, ratones deficientes de Mas (véase T. Walther et al., J Biol Chem 273, 11867 (May 8, 1998)) y animales de tipo salvaje (WT) Mas se cargaron con DAF-FM o DAF-FM combinado con solución de Ang-(1-7). En el protocolo de rata *in vivo*, las mismas soluciones se infundieron en los senos cavernosos durante 5 min con o sin estimulación eléctrica. En humanos con (H-DE) y sin (H-WED) disfunción eréctil (véase Figura 3a-d), rata (véase Figura 4 a-b) y cuerpo cavernoso de ratones WT (véase Figura 5a-b), Ang-(1-7) indujo una sustancial liberación de NO en el cuerpo cavernoso. Como se ilustra en la Figura 4c-d, la estimulación eléctrica del MPG con estímulo submáximo indujo la liberación de NO en el cuerpo cavernoso de rata que fue notablemente potenciado por Ang-(1-7). La liberación de NO inducida por Ang-(1-7) estuvo ausente en los ratones carentes de Mas como se muestra en la Figura 5c-d.

EJEMPLO 4

Acumulación de NO Inducida por Ang-(1-7) se debe al Efecto Directo en la Producción de NO

Para probar si la acumulación de NO inducida por Ang-(1-7) se debió a un efecto directo en la producción de NO, se llevó a cabo la determinación del efecto del heptapéptido sobre la fosforilación de NOS endotelial. Para estos experimentos, se utilizaron células CHO Mas-transfectadas (CHO-Mas) para evitar la interferencia de otros receptores. Como se muestra en la Figura 6a, estas células no expresan los receptores de AT₁ o AT₂. Ang-(1-7) fosforila eNOS en la serina 1179, que fue bloqueada por A-779 (véase Figura 6b). Para confirmar la viabilidad de la CHO-Mas, estas células se incubaron con Ang-(1-7), o A-779, o Ang-(1-7) más A-779. Como se observa en la Figura 6c, Ang-(1-7) aumentó la liberación de NO mediante CHO-Mas, y este efecto fue bloqueado por A-779.

EJEMPLO 5**Efectos de Ang-(1-7) en DE**

La pertinencia *in vivo* de los hallazgos de los precedentes ejemplos se probó en ratones Mas^{-/-} y ratas hipertensas por sal-DOCA. Como se muestra en la Figura 7 (a-b), la estimulación eléctrica del MPG de ratones Mas^{-/-} indujo un cambio en CCP que fue atenuada significativamente en comparación con la observada en ratones Mas^{+/+}. Debido a que las disfunciones eréctiles en estos animales podrían ser subestimadas por la existencia de compuestos nitrosos almacenados, una segunda serie de estimulación se llevó a cabo 10 minutos después de la primera. De hecho, la disfunción eréctil se vuelve notablemente evidente con una segunda serie de estimulación (véase Figura 7b). Como se muestra en la Figura 8, la delección genética de Mas conduce a un aumento marcado en el tejido fibroso en el cuerpo cavernoso del pene, que probablemente comprende la función eréctil de estos animales.

Con el fin de probar si Ang-(1-7) podría mejorar la DE, se determinó su efecto en ratas hipertensas por sal-DOCA (179 ± 4 mm de Hg vs. 116 ± 2 mm de Hg; P < 0.01) que presentan disfunción eréctil severa, y una actividad del sistema renina-angiotensina suprimida. Las ratas hipertensas por sal-DOCA mostraron función eréctil reducida en nuestro protocolo experimental (2.5 V: 0,55 ± 0,10 vs. 0,30 ± 0,06; 3.0 V: 0,57 ± 0,11 vs. 0,33 ± 0,09, n=8 y 6 para Sham y DOCA, respectivamente). La administración local de Ang-(1-7) incrementó el aumento inducido eléctricamente de CCP/MAP tanto en ratas de operación Sham (véase Figura 9a) e hipertensas por sal-DOCA (véase Figura 9b), normalización de la función eréctil de ratas hipertensas por mineralocorticoides (véase Figura 9c). Estos datos sugieren que el efecto facilitador de Ang-(1-7) se puede disociar a partir de su actividad antagonista en los efectos de Ang II mediados por AT₁.

Ang-(1-7) actúa como un mediador de la erección del pene mediante la activación de Mas y la posterior fosforilación de eNOS que conduce a la liberación de NO. En la ausencia de función eréctil, Mas se vio gravemente comprometido como se demuestra mediante la fibrosis del pene asociada a una respuesta notablemente deprimida a la estimulación eléctrica del ganglio pélvico mayor. Adicionalmente, la función eréctil severamente deprimida de ratas hipertensas por sal-DOCA se normalizó esencialmente por medio de la administración de Ang-(1-7).

El aumento observado en la fibrosis por medio del antagonismo de la señalización de Ang-1-7 (por ejemplo, la delección de su receptor mostró en este ejemplo o el uso de un antagonista del receptor) sugiere que Ang-1-7 se puede utilizar para reducir la formación de fibrosis en tejidos, en particular, tejidos del pene (por ejemplo, el cuerpo cavernoso). Otra modalidad de esta invención es el uso de Ang-1-7 para reducir la formación de fibrosis en tejidos del pene para la prevención o tratamiento de las enfermedades del pene relacionadas con la fibrosis, por ejemplo, la disfunción eréctil.

EJEMPLO 6**Preparación de Ang-(1-7) en una matriz de hidroxipropil β-ciclodextrina**

El péptido de Ang-(1-7) se incluyó en una matriz de hidroxipropil β-ciclodextrina como se describe en la U.S. Patent Application 2005/069533. En resumen, la preparación se basa en cantidades equimolares de Ang-(1-7) y/o un agonista del receptor de Ang-(1-7) y/o un análogo de Ang-(1-7) y una ciclodextrina, por ejemplo hidroxipropil β-ciclodextrina. El componente ciclodextrina se disuelve en agua mediante el uso de la agitación y el calentamiento. A continuación, se adiciona la cantidad apropiada de Ang-(1-7) a la solución acuosa. Después de la disolución, la mezcla se congeló en nitrógeno líquido y a continuación se liofilizó para obtener un complejo de inclusión sólido seco. El producto resultante se sometió a la caracterización físico química por espectroscopía de infrarrojo FT, análisis térmico (TG/DTG y DSC), difracción de rayos X y espectroscopía NMR ¹H, ¹³C y tiempos de relajación T1, y se confirmó la estructura esperada del complejo de inclusión Ang-(1-7) /HPβ-CD.

EJEMPLO 7**Ensayos de Absorción y Estabilidad Biológica en el Complejo de Inclusión Ang-(1-7) /HPβ-CD**

Los ensayos para determinar la absorción y la estabilidad biológica del complejo de inclusión Ang-(1-7)/HPβ-CD se hicieron en solución acuosa. Doce ratas Wistar normales preparadas apropiadamente se utilizaron para llevar a cabo los experimentos. Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales y se sometieron a un procedimiento de alimentación forzada con una solución salina (0.9%/50μl) de Ang-(1-7) (100μg/50μl) y Ang-(1-7)/HPβ-CD (100μg/50μl). Se recolectaron cuatro muestras de sangre (1 ml, cada una) a partir de los animales. La primera recolección se produjo antes del procedimiento de alimentación forzada, y las tres 2, 6 y 24 horas restantes después de la alimentación forzada.

Los resultados demuestran una absorción completa de Ang-(1-7)/HPβ-CD por el tracto gastrointestinal de los animales, con una concentración máxima en sangre de aproximadamente 6 horas después de la administración (620 ± 194 pg/ml), y 24 horas después de la alimentación forzada los niveles de concentración en sangre se redujeron a un nivel basal (30 ± 0.8 pg/ml contra 25 ± 10 pg/ml (antes de la alimentación forzada)). Cuando el péptido de Ang-(1-7) se administró solo, la concentración del péptido en plasma también ha aumentado, pero dicho aumento fue aproximadamente 8-veces menor que el valor observado para Ang-(1-7)/HPβ-CD. En resumen, el complejo de inclusión de Ang-(1-7)/HPβ-CD se absorbe significativamente mejor por medio del tracto gastrointestinal en comparación con el péptido de Ang-(1-7).

EJEMPLO 8

Preparación de una Forma de Dosificación de Ang-(1-7)/HPβ-CD + Atenolol

El complejo de inclusión Ang-(1-7)/HPβ-CD (relación equimolar) se preparó como se describe en el Ejemplo 6. A continuación, el sólido liofilizado se mezcló con el Atenolol en una cantidad determinada en una base de una dosis diaria de 10 mg/kg de peso corporal. Se llevó a cabo la mezcla del complejo de inclusión Ang-(1-7)/HPβ-CD y Atenolol mediante un método apropiado bien conocido en la técnica farmacéutica. En conformidad la mezcla resultante se diluye por medio de un portador apropiado, por ejemplo, los citados en otra parte en este documento, y la mezcla final se comprime en forma de comprimidos o se rellena en cápsulas.

EJEMPLO 9

Evaluación del Efecto del Complejo de Inclusión [Ang-(1-7)/HPβ-CD + Atenolol] en DE

Ocho semanas después del tratamiento con el Complejo de Inclusión Ang- (1-7) /HPβ-CD y/o Atenolol, se evaluó la función eréctil de los animales (SHR, ratas hipertensas espontáneamente). En particular, se evaluó la función eréctil de los animales tratados crónicamente con Atenolol después de la administración concomitante con el Complejo de Inclusión Ang- (1-7) /HPβ-CD. Los fármacos fueron administrados por vía oral a través de soluciones que los contienen, solos o en combinación. Como control, un grupo de animales se trató con HPβ-CD.

El procedimiento para inducir la erección y la medición presión intracavernosa se realizaron como se describe previamente (véase, T. M. Mills, R. W. Lewis, V. S. Stopper, *Biol Reprod* 59, 1413 (Dec, 1998). En primer lugar, los animales (SHR) fueron anestesiados con uretano intraperitoneal (140 mg/kg) y se colocaron sobre una placa térmica para mantener la temperatura corporal a 37°C. Una cánula de polietileno fue introducida en la tráquea del animal para mantener la permeabilidad de las vías respiratorias. Después, la arteria femoral izquierda de la rata fue canulada con un tubo de polietileno (PE-50) con solución salina heparinizada (200 U/ml) para el seguimiento continuo de la presión arterial media (MAP). El catéter se conectó a un transductor de presión. La erección del pene se obtuvo por medio de la aplicación de estimulación eléctrica en el ganglio pélvico mayor (MPG). Para evaluar los efectos de los cambios de los ganglios estimulados en CCP (presión del cuerpo cavernoso)/MAP (presión arterial media), el nervio se estimuló con un rango de voltajes (0.5, 0.75, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 V, 5 msec pulsos a una frecuencia de 12 Hz). Después, el cuerpo cavernoso izquierdo de la rata fue canulado con agujas de calibre 30 conectadas a un sistema de adquisición de datos de ordenador a través de tubos de longitudes cortas de polietileno (PE)-10 que contiene solución salina heparinizada (200 U/ml). Los resultados se presentan como una relación de CCP/MAP a partir de la función de los voltajes empleados para estimular el MPG de acuerdo con el rango de secuencia propuesto.

La Figura 10 muestra claramente que el Atenolol ha reducido el aumento de presión intracavernosa que fue inducida por la estimulación en el ganglio pélvico mayor con un voltaje máximo de 1.5V. Los animales SHR tratados crónicamente con el complejo de inclusión Ang-(1-7)/HPβ-CD no presentaron parámetros alterados de presión intracavernosa. No obstante, el complejo de inclusión Ang-(1-7)/HPβ-CD anuló el efecto de atenuación inducido por el Atenolol en la función eréctil de los animales tratados crónicamente con dicho β-bloqueante.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica en una forma de dosificación apropiada para utilizar en el tratamiento de disfunción eréctil, dicha composición que comprende:

5 (a) Angiotensina-(1-7) y/o un agonista del receptor de la Angiotensina-(1-7) y/o un análogo de la Angiotensina-(1-7), en donde el agonista del receptor o el análogo de la Angiotensina-(1-7) se selecciona del grupo que consiste de D-Ala⁷-Ang-(1-7), D-Pro⁷-Ang-(1-7), y AVE 0991, en una cantidad efectiva; y

(b) un portador farmacéuticamente aceptable;

10 en donde la composición además comprende al menos un agente anti-hipertensivo o un inhibidor de PDE, en donde al menos un agente anti-hipertensivo se selecciona del grupo que consiste de los antagonistas del receptor de la Angiotensina II, los inhibidores de ACE, los agentes β-bloqueantes y los agentes diuréticos, en donde

el antagonista del receptor de la Angiotensina II, se selecciona del grupo que consiste de losartan, candersartan, irbersartan, valsartan, olmesartan, eprosartan y telmisartan;

el inhibidor de ACE se selecciona del grupo que consiste de captopril, enalapril, fosinopril, delapril, benzepril;

15 el agente β-bloqueante se selecciona del grupo que consiste de acebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, esmolol, metropolol, propanolol, timolol, pindolol, penbutolol, labetalol, carvedilol;

el agente diurético se selecciona del grupo que consiste de clorotiazida, clortalidona, furosemida, hidroclorotiazida, manitol, metolazona, mezcla de amilorida e hidroclorotiazida, mezcla de triamtereno e hidroclorotiazida, y diuréticos ahorradores de potasio, tales como amilorida, espirolactona, y triamtereno;

y en donde el inhibidor de PDE se selecciona del grupo que consiste de papaverina, sildenafil, vardenafil, tadalafil.

20 2. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la Angiotensina-(1-7) y/o un agonista del receptor de la Angiotensina-(1-7) y/o un análogo de la Angiotensina-(1-7) está presente en una cantidad efectiva para reducir sustancialmente los síntomas de la disfunción eréctil.

25 3. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la Angiotensina-(1-7) y/o un agonista del receptor de la Angiotensina-(1-7) y/o un análogo de la Angiotensina-(1-7) está presente en una cantidad efectiva para restaurar sustancialmente la capacidad eréctil.

4. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente β-bloqueante es el atenolol.

30 5. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste de diluentes, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, agentes de coloración, y agentes saborizantes.

6. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la forma de dosificación apropiada se selecciona del grupo que consiste de cápsulas, comprimidos, comprimidos efervescentes, comprimidos masticables, píldoras, polvos, gránulos, geles, suspensiones, emulsiones, formulaciones inyectables, o una forma de dosificación de tipo de liberación controlada/retardada/modulada.

35 7. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la forma de dosificación de tipo de liberación controlada/retardada/modulada es una combinación de los ingredientes activos con un material portador o matriz seleccionado del grupo que consiste de polímeros biocompatibles, matrices poliméricas farmacéuticamente aceptables, liposomas, liposomas de PEG, y ciclodextrina o derivados de la ciclodextrina seleccionados del grupo que consiste de ciclodextrina metilada, hidroxipropil β-ciclodextrina, hidroxipropil γ-ciclodextrina, acetil γ-ciclodextrina, clorotriazinil β-ciclodextrina, glucosil y maltosil β-ciclodextrina, acetil β-ciclodextrina, sulfobutil β-ciclodextrina, α-, β- y γ-ciclodextrinas sulfatadas.

40

8. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste de ciclodextrina alquilada, ciclodextrina hidroxialquilada y ciclodextrina acilada.

45 9. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la ciclodextrina hidroxialquilada es la hidroxipropil β-ciclodextrina.

10. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un Complejo de Inclusión de la Angiotensina-(1-7) con una ciclodextrina o derivado de la ciclodextrina como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 5 11. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el Complejo de Inclusión de la Angiotensina-(1-7) es un complejo con la hidroxipropil β -ciclodextrina.
12. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el complejo de inclusión se combina con el atenolol.
13. Una composición farmacéutica en una forma de dosificación apropiada para utilizar en el tratamiento de la disfunción eréctil, dicha composición que comprende:
- 10 (a) Angiotensina-(1-7) y/o un agonista del receptor de la Angiotensina-(1-7) y/o un análogo de la Angiotensina-(1-7), en donde el antagonista del receptor o análogo de la Angiotensina-(1-7), se selecciona del grupo que consiste de D-Ala⁷-Ang-(1-7), D-Pro⁷-Ang-(1-7), y AVE 0991, en una cantidad efectiva; y
- (b) un portador farmacéuticamente aceptable;
- 15 en donde la composición es efectiva para revertir la disfunción eréctil causada por el tratamiento de la hipertensión a largo plazo con agentes anti-hipertensivos como se define en la reivindicación 1.
14. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el agente anti-hipertensivo es un compuesto β -bloqueante.
15. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el compuesto β -bloqueante es el atenolol.
- 20 16. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la Angiotensina-(1-7) es un Complejo de Inclusión hidroxipropil β -ciclodextrina-Ang-(1-7) combinado con un compuesto β -bloqueante.
17. La composición farmacéutica para utilizar de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el compuesto β -bloqueante es el atenolol.

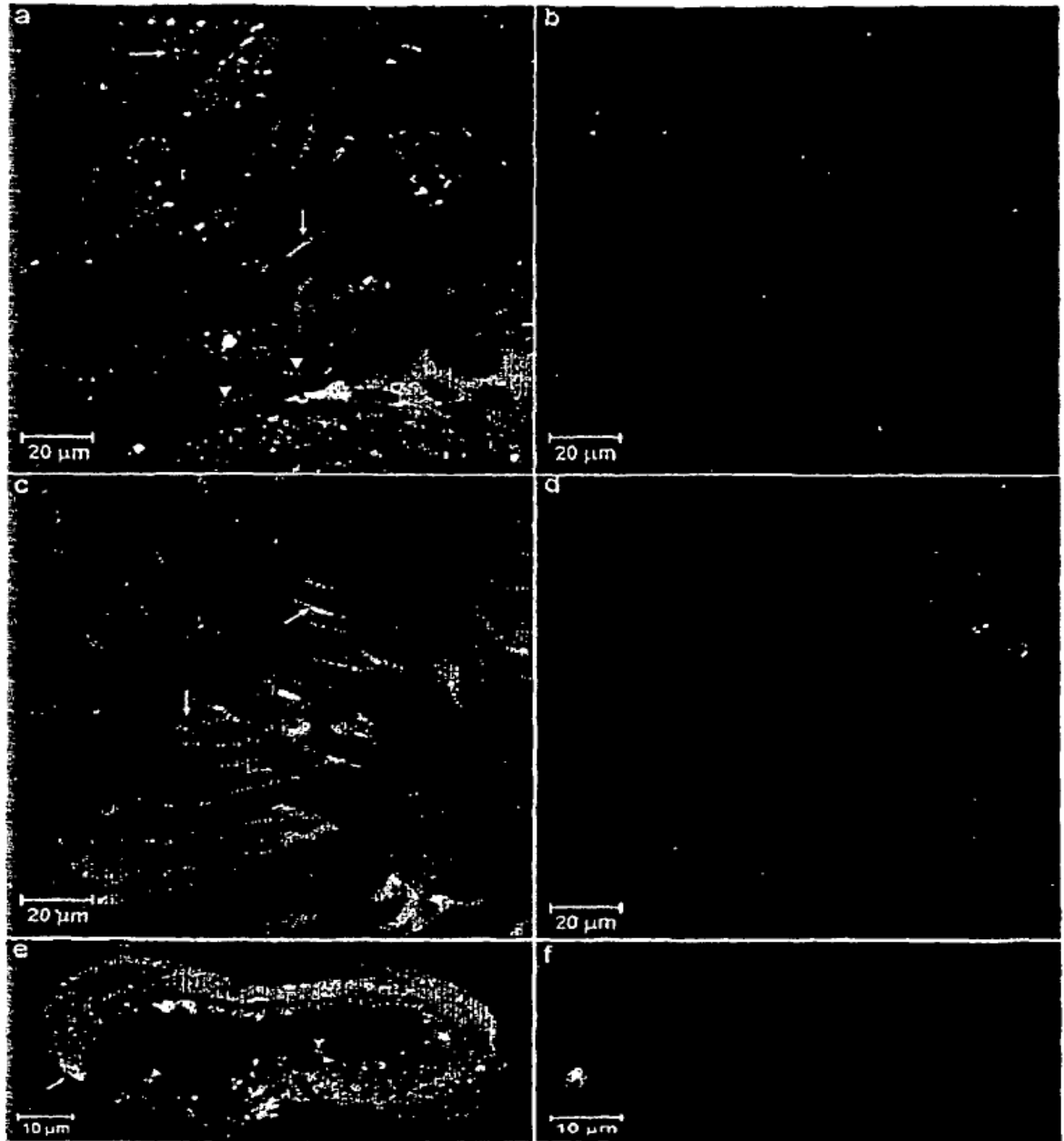


FIGURA 1

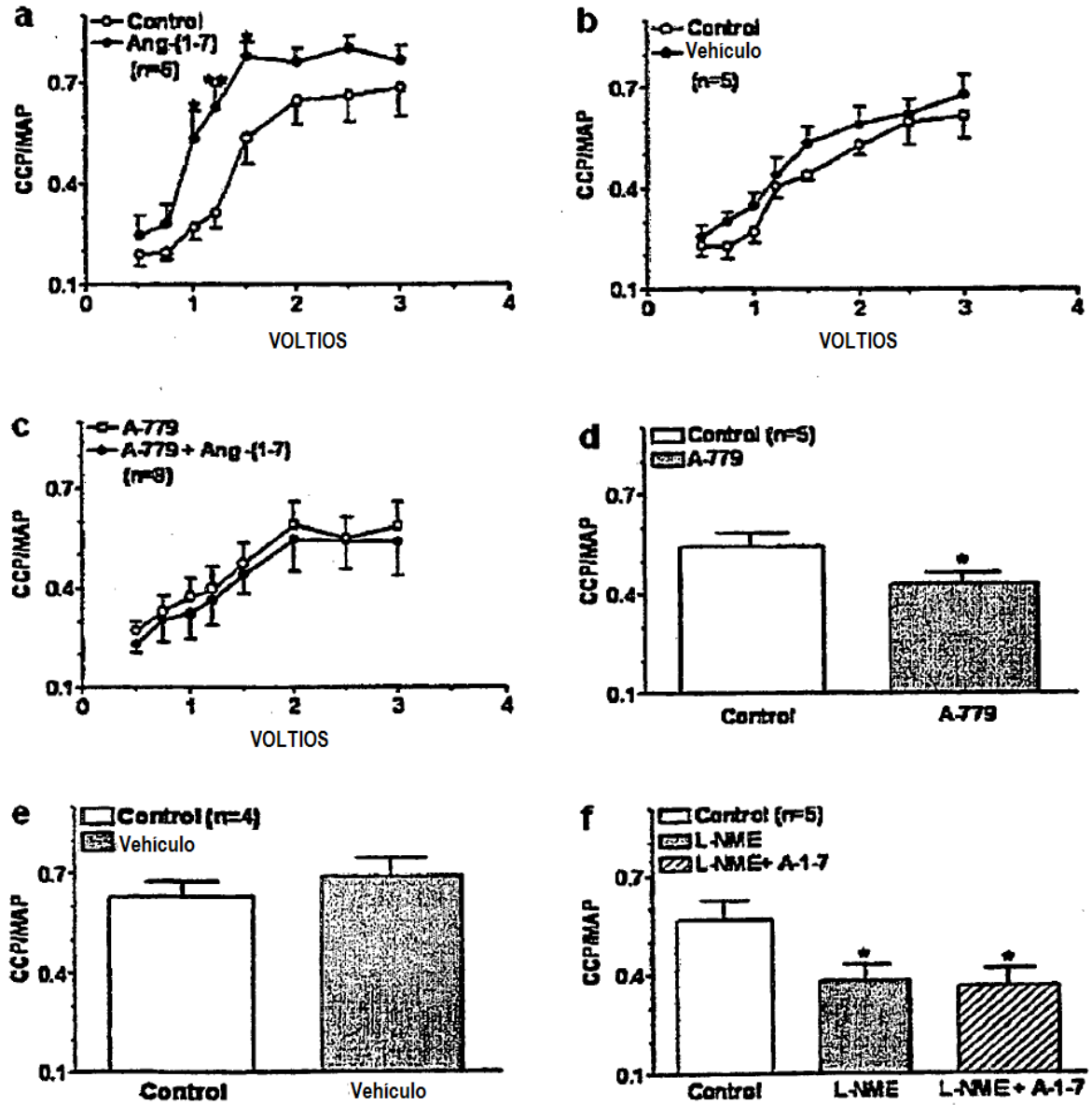


FIGURA 2

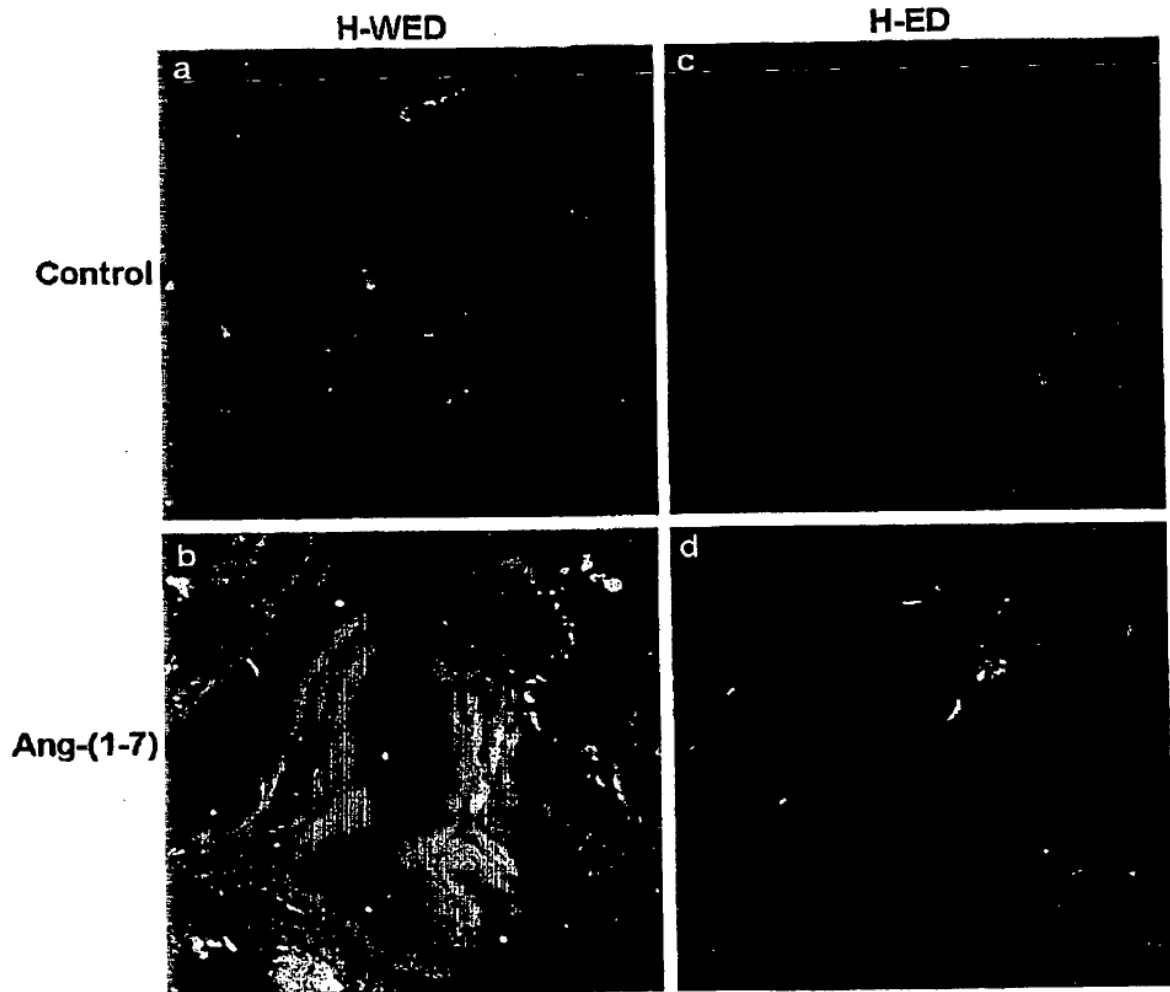


FIGURA 3

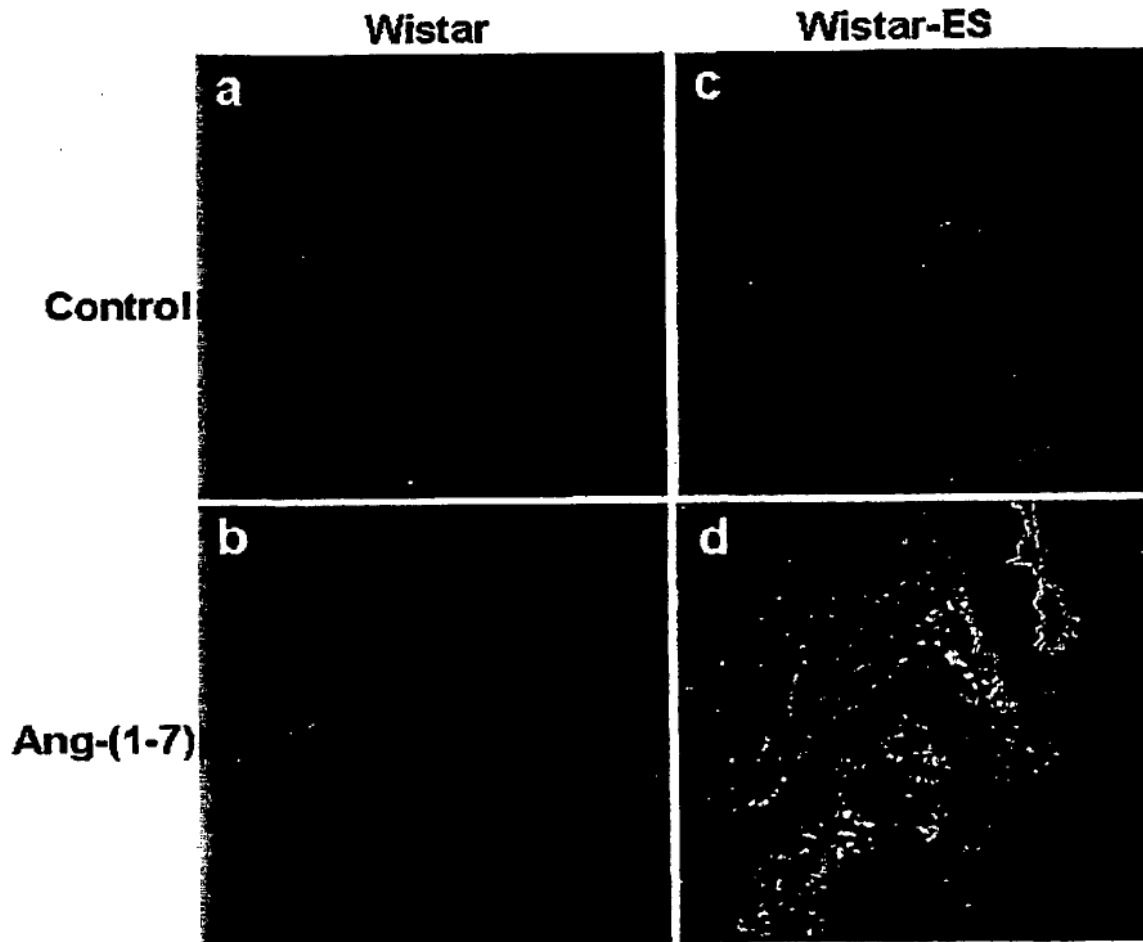


FIGURA 4

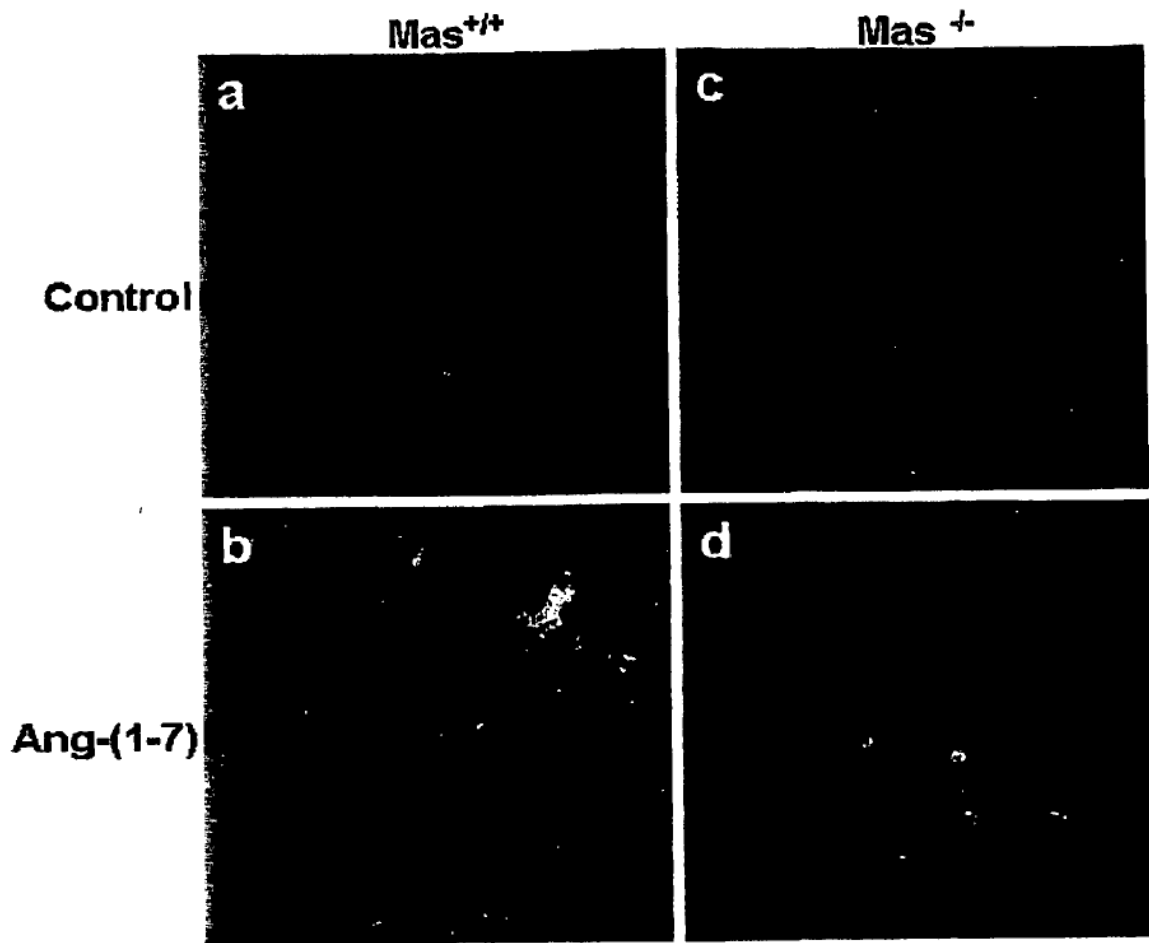


FIGURA 5

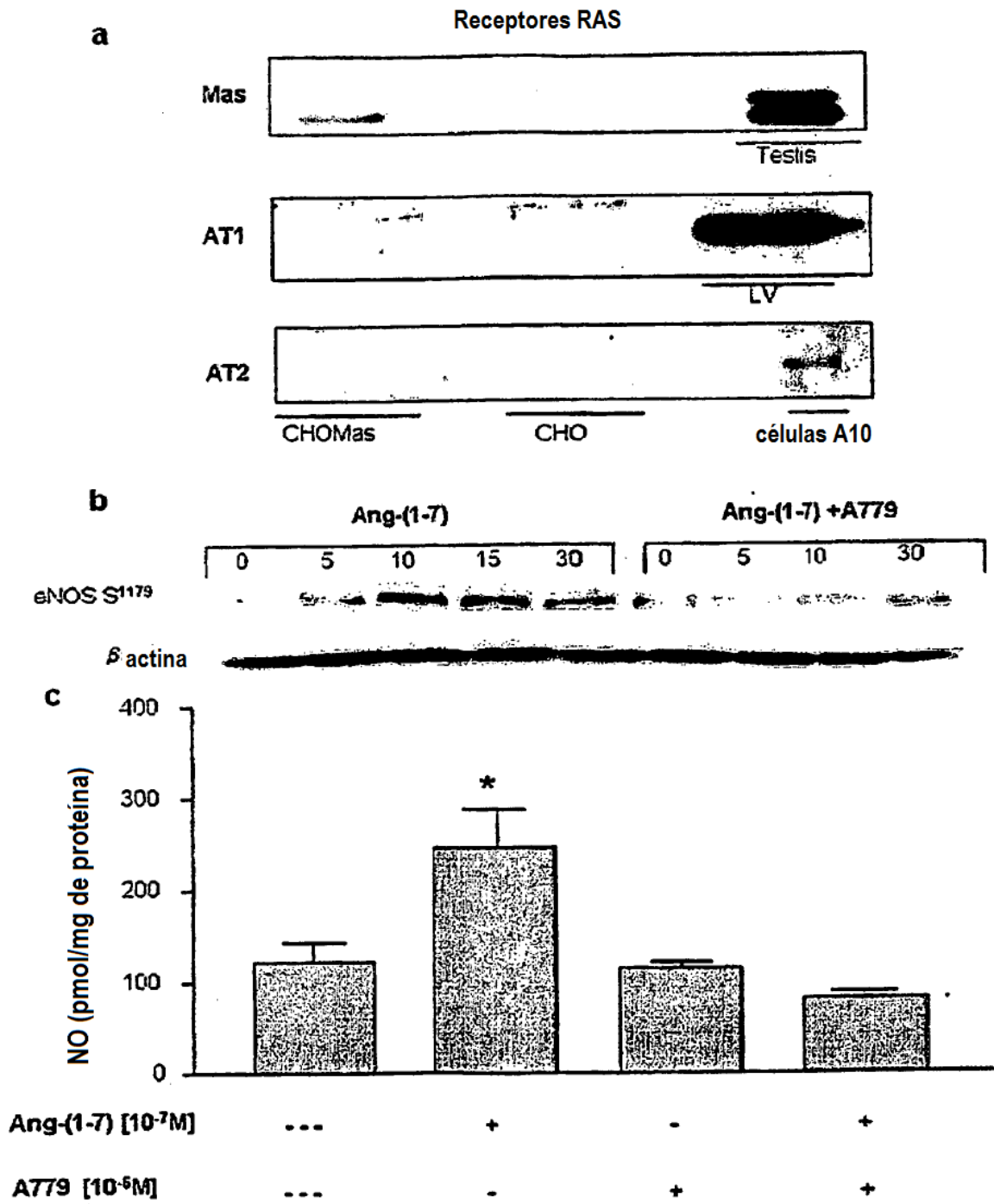


FIGURA 6

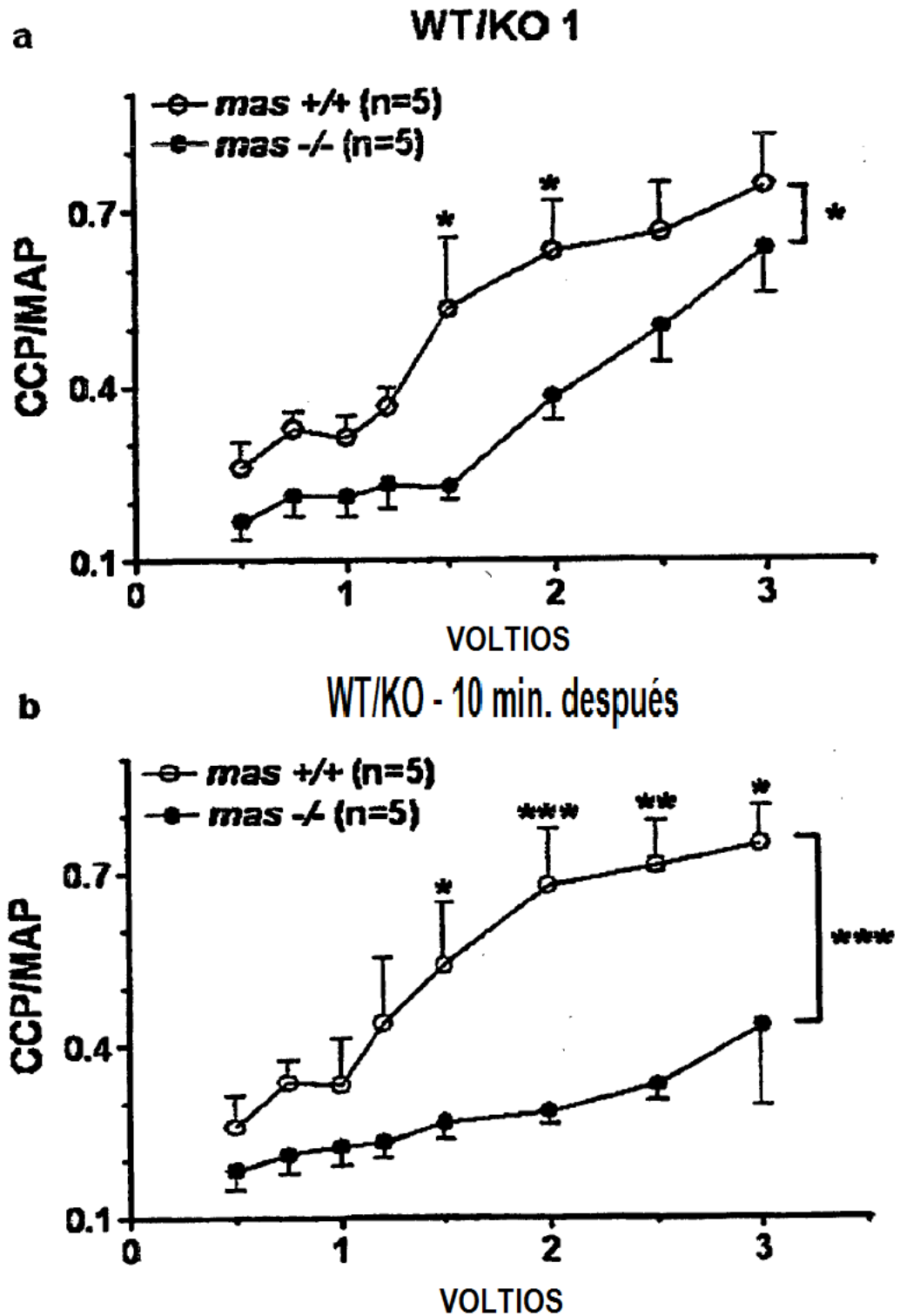


FIGURA 7

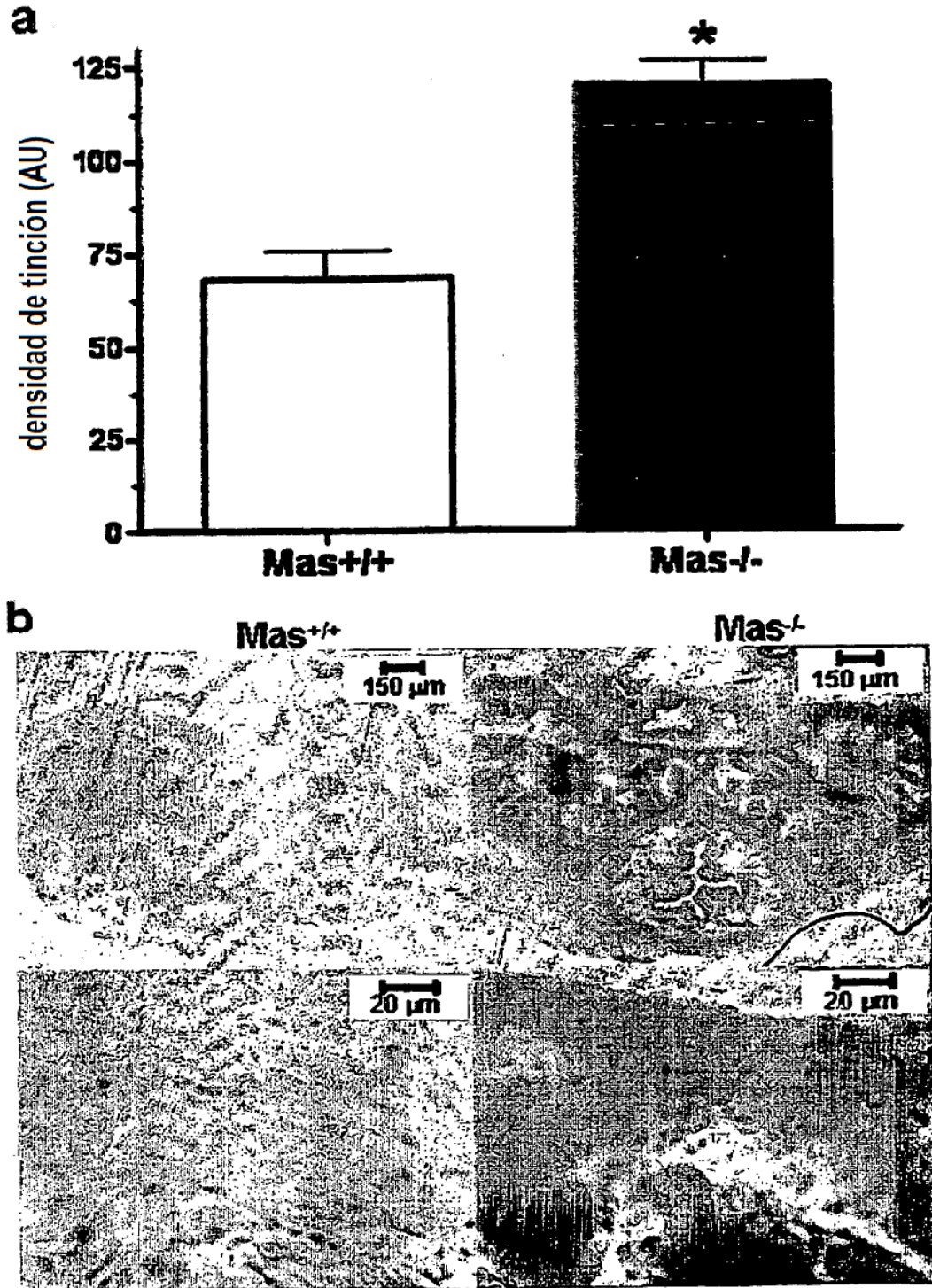


FIGURA 8

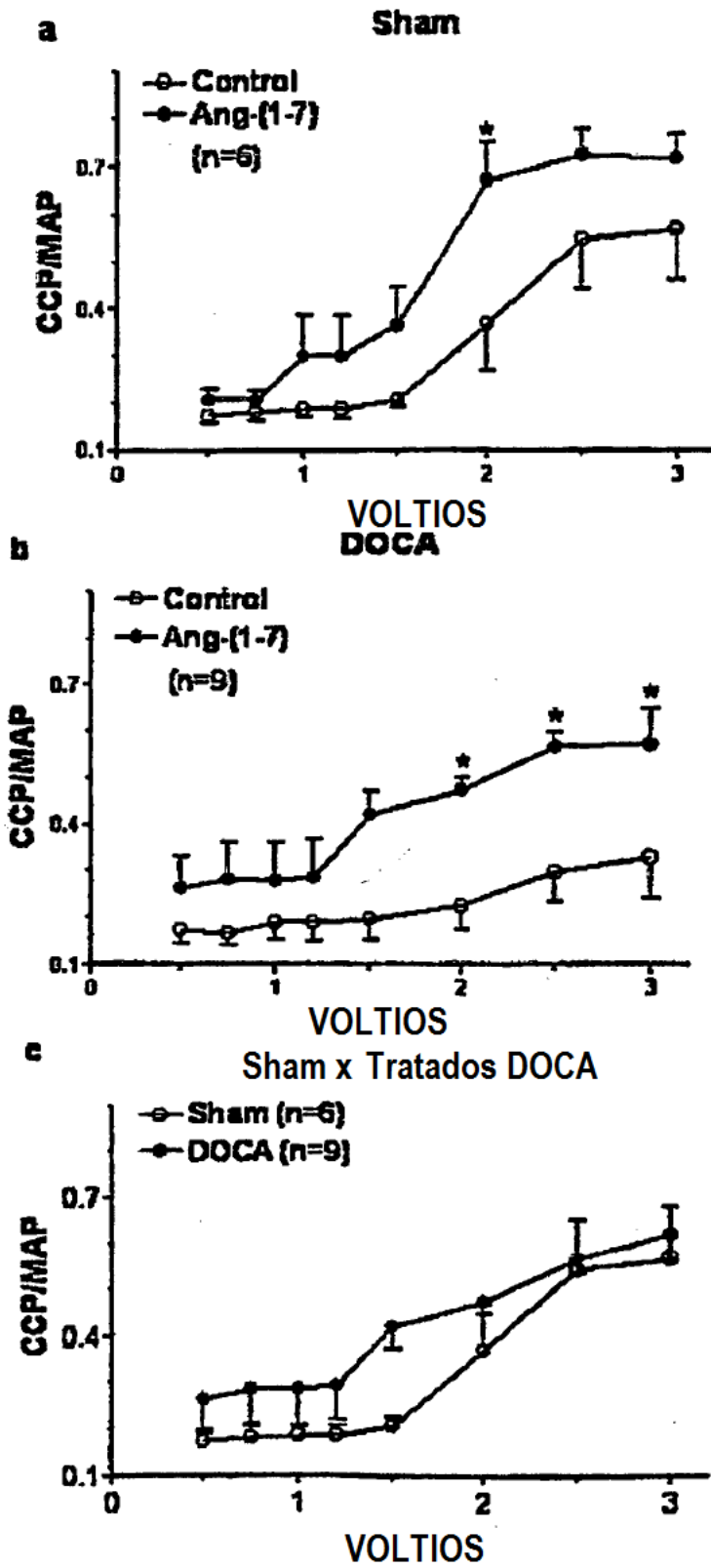


FIGURA 9

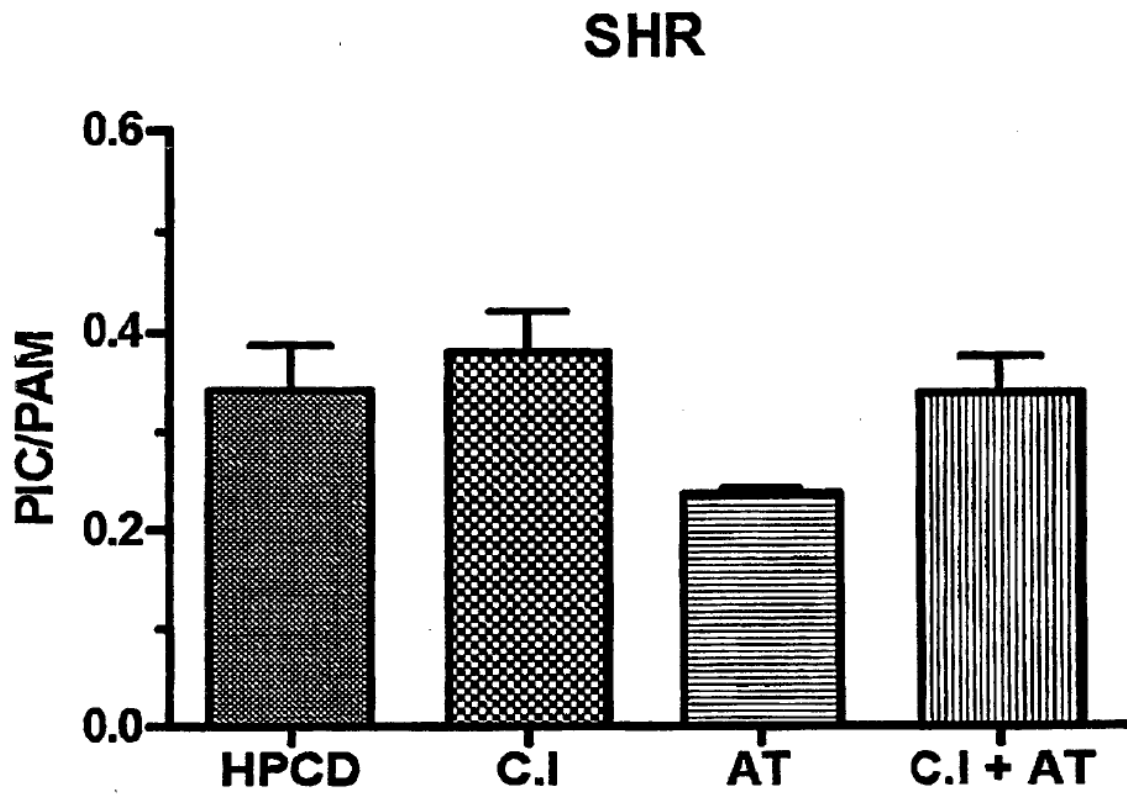


FIGURA 10