

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 811**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2009** **E 09808928 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014** **EP 2377544**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene angiotensina (1-9) para tratamiento cardiovascular, pulmonar y/o cerebral**

30 Prioridad:

15.12.2008 CL 37362008

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

30.12.2014

73 Titular/es:

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE (50.0%)
Avda. Libertador Bernardo O'Higgins, 340
Santiago, CL y
UNIVERSIDAD DE CHILE (50.0%)

72 Inventor/es:

OCARANZA JERALDINO, MARÍA PAZ;
LAVANDERO GONZÁLEZ, SERGIO;
JALIL MILAD, JORGE y
CHIONG LA Y, MARIO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 525 811 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que contiene angiotensina (1-9) para tratamiento cardiovascular, pulmonar y/o cerebral

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo del péptido angiotensina (1-9). Particularmente, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden angiotensina (1-9) y a los efectos anti -remodelado de dichos péptidos, especialmente en el remodelado cardiovascular, cerebral, pulmonar y/o renal, y más particularmente a los efectos antihipertróficos, antihiperplásicos, antifibróticos, citoprotectores, antiapoptóticos, antinecróticos, antiautofágicos, antioxidantes, antiinflamatorios e inhibidores de la síntesis de colágeno sobre corazón, pulmón, riñón y vasos sanguíneos. Adicionalmente, esta invención se refiere al campo de elevar las concentraciones en sangre y/o tejido del péptido angiotensina (1-9) mediante la producción endógena aumentada de angiotensina (1-9) mediante un vector que expresa ACE2, la enzima responsable de la producción endógena de angiotensina (1-9).

ESTADO DE LA TÉCNICA

La activación aumentada del sistema de renina-angiotensina (RAS), específicamente la ruta clásica con más actividad de enzima convertidora de angiotensina I (ACE), y niveles más altos de angiotensina II se han identificado como los determinantes principales de la etiología de hipertensión (HT), insuficiencia cardiaca, en procesos fisiopatológicos de remodelado cardiovascular, disfunción diastólica y trastornos de vasodilatación en arterias de resistencia. Por lo tanto, ECA y angiotensina II constituyen una de las principales dianas terapéuticas del tratamiento actual de HT (Varagic y Frohlich, J. Mol. Cell. Cardiol. 34: 1435-42, 2002).

La cascada de SRA se inicia por la acción de la renina sobre el angiotensinógeno hepático en circulación. Esta reacción produce angiotensina I, que es fisiológicamente inactiva. La angiotensina I se transforma en el octapéptido angiotensina II biológicamente activo mediante la acción de ACE (Okunishi y col., Jpn. J. Pharmacol. 62: 207-10, 1993). La ACE es una metalopeptidasa dependiente de cinc encontrada principalmente en los pulmones, pero también en corazón, vasos sanguíneos, riñón así como plasma (Campbell, J. Cardiovasc. Pharmacol. 10:S1-S8, 1987; Johnston y col., J. Hypertens. Suppl. 10: S13-26, 1992). En seres humanos, la angiotensina II en tejido se produce también por otras enzimas tales como cinasa y factor activador de plasminógeno de tejido (Reilly y col., J. Biol. Chem. 257: 8619-22, 1982; Gibbons y Dzau, N. Engl. J. Med. 19:1431-8, 1994). La ACE es también responsable del catabolismo e inactivación de vasodilatadores tales como las bradisininas (BK).

El ARS está implicado en el desarrollo de HT (Dzau, J. Hypertens. Suppl. 6:7-12, 1988; Bader y col., Exp. Physiol. 85: 713-731, 2000; Bader y col., J. Mol. Med. 79: 76-102, 2001), con relación a la resistencia a insulina (Yavuz y col., J. Renin. Angiotensin Aldosterone Syst. 4: 197-203, 2003; Henriksen y Jacob, Diabetes Obes. Metab. 5: 214-22, 2003), el metabolismo del ácido nítrico (Liu y Person, Hypertension 43: 649-53, 2004), el estrés oxidativo (Zhou y col., Am. J. Hypertension 17: 167-71, 2004) y la hipertrofia de músculo liso cardiaco y vascular (Higashi y col., Circ. Res. 93: 767-75, 2003; Yamakawa y col., Eur. J. Pharmacol. 478: 39-46, 2003).

La angiotensina II ejerce su acción sobre células diana a través de receptores acoplados a proteína G de subtipos 1 y 2 (ATR 1 y ATR 2, respectivamente). La activación de ATR1 causa la mayoría de acciones cardiovasculares de la angiotensina II tales como vasoconstricción, efectos mitogénicos e hipertróficos, respuesta inflamatoria y retención de agua y sal (de Gasparo y col., J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 1: 151-8, 2000). Estos efectos están mediados por una compleja interacción de las rutas de señalización intracelular que implican varias fosfolipasas (PLC, PLD, PLA2), la estimulación de NAD(P)H oxidasa y especies de oxígeno reactivas (O_2^- , H_2O_2), la activación de la transcripción génica (protooncogenes: c-foc, c-jun, c-myc) y la activación de tirosina cinasa (Src, JAK/STAT, FAK, Pyk2, p130Cas y Pi3-cinasa). Algunas de estas acciones pueden estar mediadas, directa o indirectamente, por la transactivación de receptores de tirosina cinasa (Touyz y Berry, Braz. J. Med. Biol. Res. 35: 1001-15, 2002). Al contrario que las acciones mediadas por ATR1, el ATR2 ejerce efectos tales como apoptosis, natriuresis y vasodilatación mediados por BK y óxido nítrico (NO) (de Gasparo y col., J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 1: 151-8, 2000).

Recientemente, se ha descubierto una ruta paralela al ARS iniciada por una enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ACE-2) (Tipnis y col., J. Biol. Chem. 275: 33238-43, 2000; Donoghue y col., Circ. Res. 87: e1-9, 2000). Originalmente, esta enzima se encontró en testículos, riñones y corazón, sin embargo, los estudios de PCR instantánea realizados después mostraron que su expresión se encuentra también en tracto gastrointestinal,

- cerebro, pulmones, aorta e hígado (Harmer y col., FEBS Lett. 532: 107-10, 2002; Ferrario, Hypertension 47: 515-21, 2006). A nivel celular, se ha encontrado ACE2 principalmente en epitelio de túbulo renal, macrófagos, cardiomiocitos, endotelio de arterias grandes y pequeñas y músculo liso de estos vasos (Burell y col., Eur. Heart J. 26: 369-75, 2005). La ACE2 exhibe un 40 % de homología en su dominio catalítico con la ACE y es una ectoenzima cuyos sitios catalíticos están orientados hacia el espacio extracelular y, por lo tanto, es capaz de hidrolizar péptidos extracelulares. Adicionalmente, como la ACE, la ACE2 es capaz de desprenderse de la superficie celular y exhibe la topología de una proteína de membrana integral de tipo I. A pesar de esta similitud, la ACE2 difiere de la ACE en la especificidad de sustrato y en la falta de inhibición por los inhibidores clásicos de ACE.
- 10 En el ARS, la ACE2 compite con la ACE por la hidrólisis del decapeptido angiotensina I inactiva para formar angiotensina (1-9) (Donoghue y col., J. Mol. Cell Cardiol. 35: 1043-53, 2003), por lo tanto, se reduce la cantidad de angiotensina I disponible para generar angiotensina II mediante la acción de la ACE. Aunque no se han descrito los efectos de angiotensina (1-9) en corazón y riñones (Danilczyk y Penninger, Circ. Res. 98: 463-71, 2006), varios estudios han mostrado que la angiotensina (1-9) potencia la vasoconstricción mediada por angiotensina II en anillos aórticos de ratas y que posee efectos vasopresores sobre ratas conscientes (Huang y col., J. Biol. Chem. 278: 15532-40, 2003). Adicionalmente, se ha encontrado que los niveles de angiotensina (1-9) en plasma humano y de rata son mayores que los de angiotensina II (Johnson, Peptides 10: 489-92, 1989), y que este péptido se acumula en animales tratados con ACEi (Drummer, Biochem. Pharmacol. 39: 513-8, 1990). Otros estudios indican que la angiotensina (1-9) favorece la unión de bradicinina a su receptor B2, probablemente debido a los cambios conformacionales en el complejo de ACE-receptor B2 (Erdos y col., J. Mol. Cell. Cardiol. 34: 1569-76, 2002).

- La eficacia catalítica de la ACE2 es (400 veces) mayor para hidrolizar angiotensina II que la angiotensina I, y para formar el péptido vasodilatador angiotensina (1-7) (Donoghue y col., Circ. Res. 87: e1-9, 2000, Vickers y col., J. Biol. Chem. 277: 14838-43, 2003; Rice y col., Biochem. J. 383: 45-51, 2004). Este último se genera también hidrolizando angiotensina I mediante la acción de endopeptidasa neutra (NEP), prolil endopeptidasas o ACE (Welches y col., Life Sci. 52: 1461-80, 1993; Vickers y col., J. Biol. Chem. 277: 14838-43, 2003). Por lo tanto, la ACE2 desempeña un papel clave en el equilibrio de actividad vasoconstrictora y proliferativa de la angiotensina II a través de su ATR1, aumentando los niveles de angiotensina (1-7) (Der Sarkissian y col., Prog. Biophys. Mol. Biol. 91: 163-98, 2005).
- 30 Sin embargo, no hay evidencias que indiquen si la angiotensina (1-9) y/o derivados de la misma poseen efectos que prevengan, reviertan, inhiban y/o disminuya el remodelado cardiovascular, pulmonar, cerebral o renal.

Las angiotensinas se refieren a los péptidos derivados de angiotensinógeno que se obtienen por proteólisis. Estos péptidos son:

35 Angiotensinógeno*: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser

Angiotensina I: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

40 Angiotensina II: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

Angiotensina III: Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

Angiotensina IV: Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

45 Angiotensina (1-9): Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His

Angiotensina (1-7): Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro

50 *El primer aminoácido de las secuencias corresponde al extremo aminoterminal R, el resto de la secuencia al angiotensinógeno.

Se han descrito varias funciones fisiológicas y biológicas para diferentes angiotensinas.

55 Se ha descrito que la desaspartatoangiotensina I se usa para para el tratamiento y/o la prevención de hipertrofia cardiaca (documento US 5.773.415), de formación de neointima o reestenosis (documento US 6.100.237).

La angiotensina II está implicada en la hipertrofia cardiaca y la formación de neointima. La administración exógena de angiotensina II potencia la hipertrofia cardiaca (Dostal y Baker, Am. J. Hypertens., 5: 276-280, 1991) y la

formación de neointima (Osterrieder y col., Hypertension. 18: 1160-4, 1991; Daemen y col., Circ. Res. 68: 450-6, 1991).

La angiotensina III media la inducción de natriuresis dependiente del receptor AT₂, induce la vasoconstricción y la liberación de aldosterona (Fyhrquist y Saijonmaa, J. Intern. Med. 264: 224-36, 2008).

La angiotensina IV, un metabolito secundario de angiotensina II, posee actividad antihipertrófica e inhibe también la formación de neointima (documento EP 1846017).

10 La angiotensina (1-7) está implicada en acciones que se oponen a las acciones de la angiotensina II. Se ha descrito como un péptido inductor de vasodilatación con efectos hipertensores y antifibróticos (Katovich y col., Curr. Hypertens. Rep. 10:227-32, 2008).

Sin embargo, no se han descrito en la técnica anterior funciones fisiológicas y/o biológicas para el péptido angiotensina (1-9), ni usos médicos y/o tratamiento médico que comprenda la administración y/o uso de angiotensina (1-9) y/o derivados de la misma en medicina. La presente invención se refiere a y resuelve el problema de la falta de información con respecto a las acciones biológicas y/o fisiológicas de la angiotensina (1-9), describe los efectos antirremodelantes de este péptido y proporciona procedimientos para elevar las concentraciones en plasma y/o tejido de angiotensina (1-9), así como usos y/o composiciones farmacéuticas novedosos de angiotensina (1-9) o derivados de la misma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Hay varios procedimientos para elevar la concentración en plasma y/o tejido de angiotensina (1-9). La elevación de los niveles de concentración en plasma y/o tejido de angiotensina (1-9) está asociada a fenómenos de disminución del remodelado cardiovascular, renal, pulmonar y cerebral (véase el ejemplo 10). En la presente invención, se describe que la elevación de la concentración en plasma de angiotensina (1-9) puede conseguirse:

- a) Administrando composiciones farmacéuticas que contienen el péptido angiotensina (1-9) (véase el ejemplo 11).
- b) Administrando fármacos que elevan la enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ACE2), aumentando así la producción endógena de angiotensina (1-9) y causando la elevación en plasma y/o tejido de dicho péptido (véase el ejemplo 10).
- c) Administrando un gen que sobreexpresa la enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ACE2), enzima responsable de la producción endógena de angiotensina (1-9) (véanse los ejemplos 7 y 8).

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de angiotensina (1-9) y al menos un portador, excipiente, estabilizante, diluyente y/o coadyuvante farmacéuticamente aceptable para uso en la prevención, reversión, inhibición y disminución del remodelado cardiovascular, pulmonar, cerebral o renal. Adicionalmente, la presente invención describe el péptido angiotensina (1-9) para uso en la prevención, reversión, inhibición y disminución del remodelado cardiovascular, pulmonar, cerebral o renal, especialmente en animales o seres humanos, y más específicamente en pacientes necesitados de ello.

Se describe un procedimiento para prevenir, revertir, inhibir y/o disminuir el remodelado cardiovascular, pulmonar, cerebral o renal que consiste en elevar la concentración en plasma y/o tejido del péptido angiotensina (1-9) o derivados de la misma mediante una composición farmacéutica que contiene un vector de expresión de ACE2, enzima responsable de la producción endógena de angiotensina (1-9). Estos vectores corresponden a adenovirus, retrovirus, lentivirus o virus adenoasociados que contienen el gen que codifica ACE2. El procedimiento para prevenir, revertir, inhibir y/o disminuir el remodelado cardiovascular, pulmonar, cerebral o renal comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de angiotensina (1-9) y/o al menos un derivado de angiotensina (1-9). El paciente puede ser un ser humano o un animal. El uso de dicho medicamento o composición farmacéutica se prevé que eleve los niveles en plasma y/o tejido de angiotensina (1-9) y/o al menos uno de los derivados de la misma. Particularmente, está dirigido a elevar los niveles de dichos péptidos en el organismo, preferiblemente en plasma, corazón, riñón, pulmones, cerebro y/o lecho vascular.

El medicamento o composición farmacéutica para uso según la presente invención que comprende una cantidad eficaz de angiotensina (1-9) puede aplicarse mediante cualquier vía ya conocida de administración de medicación. Particularmente, dicho medicamento o composición farmacéutica se aplicará por inyección y/o por vía parenteral (por

ejemplo, pero sin limitación, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, subcutánea y por inyección directa en varios órganos, incluyendo corazón, pulmones, riñón y cerebro), por inhalación, por el uso de una composición farmacéutica de liberación continua, por el uso de bombas de liberación, por supositorios o por vía oral. Dicha administración puede ser como dosis única, dosis múltiples o administración continua.

5

La angiotensina (1-9), las composiciones farmacéuticas que la contienen y/o los medicamentos que la contienen para uso según la presente invención pueden ser sólidos o líquidos, incluyendo grageas, obleas, píldoras, comprimidos, cápsulas, suspensiones o disoluciones que contienen al menos un excipiente, portador, diluyente, estabilizante y/o coadyuvante farmacéuticamente aceptable. Los excipientes, portadores, diluyentes, estabilizantes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por los especialistas en la materia, y pueden ser sólidos, líquidos o una combinación de los mismos. Por tanto, las composiciones farmacéuticas o medicamentos pueden tomar la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, obleas, polvo, formulaciones recubiertas, formulaciones de liberación mantenida, formulaciones erosionables, dispositivos implantados o componentes derivados de dichos dispositivos, formulaciones de microesferas, disoluciones, suspensiones, elixires, aerosoles y similares. Los portadores, diluyentes y/o excipientes líquidos son preferiblemente agua, disolución salina, disolución de dextrosa y disolución de glicol, especialmente cuando se usan la vía parenteral y/o inyección como vía de administración. El portador y/o diluyente puede ser también un aceite, por ejemplo, aquellos derivados del petróleo, aceites de origen animal, vegetal o sintético. Los ejemplos específicos de aceites preferidos de la invención incluyen aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de girasol y similares. Algunos de los excipientes preferidos de la invención incluyen almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de magnesio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche desnatada desecada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Son evidentes otros portadores, diluyentes, estabilizantes, excipientes y/o coadyuvantes no mencionados en la presente memoria para los especialistas en la materia. La composición o medicamento para uso según la presente invención puede someterse a procesos farmacéuticos convencionales tales como esterilización, y puede contener otros aditivos farmacéuticos convencionales tales como conservantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes humectantes, sales para ajustar la presión osmótica, tampones o agentes tamponadores del pH, y similares. Los portadores, estabilizadores, diluyentes, excipientes y/o coadyuvantes pueden encontrarse en Martin, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15.^a Ed.; Mack Publishing Co., Easton (1975); véanse por ejemplo las páginas 1405-1412 y 1461-1487. Dichas composiciones contienen generalmente una cantidad eficaz de compuesto activo con una cantidad adecuada de uno o varios portadores, estabilizantes, diluyentes, excipientes y/o coadyuvantes, de modo que pueda prepararse la dosis y el modo apropiados de administrar angiotensina (1-9) y/o derivados de la misma al paciente. En la práctica, en los procedimientos de tratamiento, la dosis particular de una composición farmacéutica o medicamento para administrar a los pacientes dependerá de varias variables, incluyendo el estado patológico, la gravedad de la enfermedad, el programa de administración, edad, características físicas del paciente, etc. La dosificación apropiada puede establecerse usando aproximaciones clínicas conocidas por los especialistas en la materia.

Adicionalmente, la angiotensina (1-9), el medicamento o composición farmacéutica para uso según la presente invención, puede administrarse con al menos un compuesto farmacéutico. La frase "al menos un compuesto farmacéutico" se refiere a un inhibidor de la enzima convertora de angiotensina I, un antagonista del receptor de angiotensina II (AT1), un antagonista de canal L de calcio, un inhibidor Rho de cinasa y/o un diurético. La administración de cualquiera de estos compuestos farmacéuticos es capaz *per se* de elevar la concentración en plasma de angiotensina (1-9). El Ejemplo 10 describe que la administración de un inhibidor de enzima convertora (enalapril) o la administración de un antagonista de receptor de angiotensina II (candesartán) aumenta los niveles en plasma y/o tejido de angiotensina (1-9), y que dicho aumento está asociado a una disminución del remodelado cardiovascular, renal, pulmonar y cerebral.

Son ejemplos de enzima convertora de angiotensina I (ACE) lisinopril, enalapril, captopril, zofenopril, ramipril, quinapril, perindopril, benazepril y fosinopril. Son ejemplos de antagonistas de receptor de angiotensina II (AT1) valsartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán, eprosartán y saralasin. Son ejemplos de antagonistas de canal L de calcio las dihidropiridinas (nicardipina, nifedipina, amlodipina, felodipina, nitrendipina, nisoldipina, isradipina, nimodipina), las benzotiazepinas (diltiazem, clentiazem) y las fenilalquilaminas (verapamilo, galopamilo, anipamilo, RO5967, falipamilo). Son ejemplos de inhibidores Rho de cinasa fasudilo, hidroxilfasudilo, 3-(4-piridil)-1*H*-indol, (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]homopiperazina y *N*-(4-piridil)-*N'*-(2,4,6-triclorofenil)urea. Son ejemplos de diuréticos los diuréticos tiazídicos (bendroflumetiazida, bencitiazida, clorotiazida, clortalidona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, indapamida, meticlotiazida, metolazona, politiazida, quinetazona, triclormetiazida, xipamida), diuréticos de asa (furosemida, torasemida, bumetanida, ácido etacrínico), diuréticos inhibidores de anhidrasa carbónica (acetazolamida, dorzolamida), diuréticos ahorradores de potasio (amilorida, triamtereno), diuréticos ahorradores de potasio que son antagonistas de aldosterona (espironolactona, canrenoato,

eplerenona) y diuréticos osmóticos (manitol).

La presente invención considera también como parte de la invención aumentar los niveles en plasma y/o tejido de angiotensina (1-9) aumentando su producción y/o inhibiendo su degradación. Adicionalmente, la presente invención 5 implica la exacerbación, activación y/o inducción de señales de transducción intracelular activadas por angiotensina (1-9).

Puede conseguirse la producción aumentada de angiotensina (1-9) y/o derivados de la misma aumentando o sobreexpresando la enzima convertidora de angiotensina I homóloga (ACE2). Puede conseguirse la actividad 10 aumentada de ACE2 inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina I (ACE), específicamente, con el uso de inhibidores de esta enzima, particularmente fármacos que son ya conocidos en la materia tales como lisinopril, enalapril, captopril, zofenopril, ramipril, quinapril, perindopril, benazepril y fosinopril. Puede conseguirse la sobreexpresión de ACE2 introduciendo una o varias copias del gen que codifica ACE2 en el organismo. Se consigue la introducción del gen que codifica ACE2 en el organismo mediante técnicas ya descritas en la materia, incluyendo 15 ADN desnudo, liposomas (particularmente liposomas catiónicos) y mediante el uso de vectores víricos. En la presente invención, se describe más particularmente, sin limitación en cuanto a otros vectores víricos, el uso de vectores adenovíricos, retrovíricos, lentivíricos y de virus adenoasociados que contienen el gen que codifica ACE2 en su material genético. Es también conocido por los especialistas en la materia que, para que dicho gen esté activo, se requiere que su expresión esté guiada por un promotor y que el gen termine en un terminador. Los vectores 20 anteriormente citados de esta patente incluyen flanquear el gen que codifica ACE2 con un promotor y un terminador. Es también parte de la presente invención que los vectores que contienen el gen que codifica ACE2 tengan secuencias de ADN que son importantes para potenciar la estabilidad del ARNm, así como secuencias que permitan la transducción normal de ARNm a proteína. Igualmente, son bien conocidas en la materia varias estructuras promotoras que permiten la expresión constitutiva o regulada de los genes deseados. La presente invención 25 considera también que el promotor que regula la expresión del gen que codifica ACE2 sea constitutivo o esté regulado en la naturaleza mediante la inducción o represión de genes.

Adicionalmente, se usan ratas como ejemplo de mamífero al que puede aplicarse el procedimiento de tratamiento, y pueden ensayarse angiotensina (1-9) y/o derivados de la misma en forma de medicamentos y/o composición 30 farmacéutica. Los modelos animales para estudiar el remodelado cardiovascular, pulmonar, cerebral y/o renal, incluyendo mamíferos pequeños tales como ratas, son ampliamente aceptados en la técnica anterior (Everette y col., Hypertension, 23: 587-593, 1994; Indolfi y col., Circulation, 92: 1230-1235, 1995). Usar el modelo de rata no excluye su uso en seres humanos u otro tipo de animal necesitado de dicho tratamiento.

35 En la presente invención, remodelado hace referencia a los cambios complejos experimentados por órganos sometidos a condiciones de estrés. Los órganos particularmente preferidos en esta invención para prevenir el remodelado usando angiotensina (1-9) o derivados de la misma comprenden corazón, vasos sanguíneos, riñón, cerebro y pulmones, sin excluir otros órganos que podrían experimentar remodelado y podrían tratarse con angiotensina (1-9) o derivados de la misma. El remodelado debe entenderse en su forma más amplia posible y 40 comprende una serie de procesos celulares, bioquímicos y/o fisiológicos, que comprenden uno o varios procesos seleccionados entre hipertrofia de cardiomiocitos, formación de neoíntima, hiperplasia de fibroblastos, hiperplasia de células de músculo liso, citoprotección, fibrosis, deposición de colágeno, inflamación, apoptosis, necrosis y/o autofagia y oxidación. La hipertrofia de cardiomiocitos hace referencia al crecimiento de los cardiomiocitos, con un aumento del contenido de proteínas intracelulares, especialmente aquellas asociadas a la maquinaria contráctil, y a 45 la reexpresión de proteínas fetales tales como la cadena pesada de β -miosina (β -MHC) y el factor natriurético auricular (ANF). La hipertrofia de cardiomiocitos está asociada a la hipertrofia cardíaca. La hipertrofia cardíaca hace referencia al crecimiento observado en los corazones de atletas de alta competición (hipertrofia fisiológica o benigna) o en individuos con hipertensión tras infarto de miocardio (hipertrofia patológica). La formación de neoíntima hace referencia a la formación de tejido nuevo indiferenciado o de diferente tipo de tejido en vasos sanguíneos debido a 50 daño o a cualquier otra causa, incluyendo reestenosis. Reestenosis hace referencia al reestrechamiento de cualquier vaso sanguíneo, por ejemplo, reestrechamiento de una arteria coronaria después de angioplastia. La reestenosis puede estar causada por una serie de otras patologías y causas. Hiperplasia de fibroblastos hace referencia a un aumento del número de fibroblastos debido a un aumento de la proliferación. La hiperplasia de células de músculo liso hace referencia a un aumento del número de células de músculo liso debido a un aumento de la proliferación. 55 Citoprotección se entiende como cualquier fenómeno, proceso o mecanismo implicado en la reducción del daño o la reducción de la muerte celular. Fibrosis se entiende como un aumento del contenido de matriz extracelular de tejido debido a la acumulación de proteínas tales como colágeno fibronectina, elastina y similares. Apoptosis, necrosis y autofagia hacen referencia a diferentes tipos de muerte celular. Estrés oxidativo se entiende como un aumento de las especies de oxígeno reactivo y está causado por un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de especies

de oxígeno reactivo. Las especies de oxígeno reactivo comprenden el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH\cdot$) y/o productos de estas especies con otras moléculas generando, por ejemplo, peroxinitrito ($NOO\cdot$). La síntesis de especies de oxígeno reactivo puede conseguirse en la cadena de transporte de oxígeno mitocondrial, NADPH oxidasa, xantina oxidasa y NO sintasa, mediante reacciones inorgánicas tales como la reacción de Fenton y reacciones de Haber-Fenton y similares. Los mecanismos de degradación de especies de oxígeno reactivo incluyen antioxidantes naturales (por ejemplo, vitamina C, α -tocoferol, ácido úrico, manitol) y sistemas enzimáticos (por ejemplo, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y similares). En esta invención, los términos hipertrofia, formación de neoíntima, reestenosis, hiperplasia, citoprotección, fibrosis, deposición de colágeno, inflamación, estrés oxidativo, apoptosis, necrosis y autofagia deben entenderse de la manera más amplia posible.

Una cantidad eficaz hace referencia a la dosificación y al periodo de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico deseado, es decir, prevenir, revertir, inhibir y/o disminuir el remodelado cardiovascular, pulmonar, renal y/o cerebral. La cantidad eficaz puede depender de varios factores tales como estado y progresión de la enfermedad, edad, género, peso del paciente, dolencias concurrentes, medicamentos concurrentes, raza y similares. En esta patente, la invención está dirigida a elevar la concentración en plasma y/o tejido de angiotensina (1-9) hasta valores superiores a 10 fmol/g, más específicamente a valores superiores a 20 fmol/g, aún más específicamente a valores superiores a 40 fmol/g, todavía más específicamente a valores superiores a 80 fmol/g. Un derivado de angiotensina (1-9) hace referencia a cualquier mutación, fragmento, parte o porción de angiotensina (1-9), incluyendo moléculas con sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos de angiotensina (1-9) para imitar su efecto biológico y/o fisiológico, potenciar su efecto biológico y/o fisiológico, elevar su efecto biológico y/o fisiológico, aumentar su biodisponibilidad, aumentar su estabilidad, aumentar su absorción, aumentar su semivida en plasma y/o tejido, alterar su unión a proteína plasmática, aumentar su afinidad de receptor, reducir su degradación o cualquier otra propiedad biológica, fisiológica, farmacológica y/o farmacéutica de la que se desee potenciar su acción terapéutica. Los derivados de angiotensina (1-9) obtenidos mediante sustitución aminoacídica hacen referencia a un aminoácido sustituido por otro aminoácido o por otra molécula que puede corresponder a un derivado de aminoácido. En este caso, se desea un derivado funcional, estructural o estereoquímicamente similar u homólogo a angiotensina (1-9). Un derivado de angiotensina (1-9) incluye también mimótopos o péptidos o análogos miméticos, e incluye moléculas que contienen aminoácidos no naturales así como moléculas no relacionadas con aminoácidos, pero que no obstante su comportamiento, funciones y/o actividades son similares a los aminoácidos. Los derivados de angiotensina (1-9) incluyen también modificaciones como glucosilaciones, amidaciones, acetilaciones, hidroxilaciones, metilaciones, etilaciones, esterificaciones y similares, que son generalmente modificaciones de cadenas laterales de aminoácidos o moléculas contenidas en angiotensina (1-9) o derivados de la misma. La introducción de moléculas reticulantes que permitan a este péptido unirse a una estructura mayor, que a su vez ayuda por sus propiedades fisicoquímicas y/o farmacéuticas, se considera como parte de los derivados de angiotensina (1-9). Las moléculas reticulantes pueden tener diferentes longitudes de cadena de modo que pueda moverse más cerca o más lejos de la molécula mayor la angiotensina (1-9) o derivados de la misma. Los reticulantes pueden ser homofuncionales o bifuncionales, tales como imidóesteres bifuncionales que tienen un grupo metilo como cadena espaciadora de longitud entre $n = 1$ a 6, glutaraldehído, ésteres de *N*-hidroxisuccinimida y reactivos heterobifuncionales que contienen generalmente una parte amino reactiva tal como *N*-hidroxisuccinimida y otra parte que es específicamente reactiva con otros o con el mismo grupo funcional. Los derivados de angiotensina (1-9) se refieren también a derivados modificados químicamente que ayudan a la estabilización de la estructura tridimensional para facilitar imitar su efecto biológico y/o fisiológico, potenciar su efecto biológico y/o fisiológico, elevar su efecto biológico y/o fisiológico, aumentar su biodisponibilidad, aumentar su estabilidad, aumentar su absorción, aumentar su semivida en plasma y/o tejido, alterar su unión a proteína plasmática, aumentar su afinidad de receptor, reducir su degradación o cualquier otra propiedad biológica, fisiológica, farmacológica y/o farmacéutica de la que se desee mejorar su acción terapéutica.

Los ejemplos de aminoácidos no convencionales o no naturales y/o sus derivados que pueden introducirse durante la síntesis peptídica incluyen, pero sin limitación, el uso de norleucina, ácido 4-aminobutírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, *terc*-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienilalanina y/o D-isómeros de aminoácidos. Son otros ejemplos de aminoácidos no convencionales o no naturales y/o sus derivados: butirato de α -amino- α -metilo, ciclopentilalanina, ácido aminociclopropanocarboxílico, ciclohexilalanina, ácido aminoisobutírico, ácido aminonorbornilcarboxílico, D-alanina, D-arginina, D-ácido aspártico, D-cisteína, D-glutamina, D-ácido glutámico, D-histidina, D-isoleucina, D-leucina, D-lisina, D-metionina, D-ornitina, D-fenilalanina, D-prolina, L-*N*-metilalanina, L-*N*-metilarginina, L-*N*-metilasarparagina, ácido L-*N*-metilaspártico, L-*N*-metilcisteína, L-*N*-metilglutamina, ácido L-*N*-metilglutámico, ciclohexil-L-*N*-metilhistidina, L-*N*-metilisoleucina, L-*N*-metileucina, L-*N*-metilisina, L-*N*-metilmetionina, L-*N*-metilnorleucina, L-*N*-metilnorvalina, L-*N*-metilornitina, L-*N*-metilfenilalanina, L-*N*-metilprolina, L-*N*-metilserina, L-*N*-metiltreonina, L-*N*-

metilriptófano, L-N-metil tirosina, L-N-metilvalina, L-N-metiletilglicina, D-serina, D-treonina, D-riptófano, D-tirosina, D-valina, D- α -metilalanina, D- α -metilarginina, D- α -metilasparagina, D- α -metilaspartato, D- α -metilcisteína, D- α -metilglutamina, D- α -metilhistidina, D- α -metilisoleucina, D- α -metileucina, D- α -metilisina, D- α -metilmetionina, D- α -metilornitina, D- α -metilfenilalanina, D- α -metilprolina, D- α -metilserina, D- α -metiltreonina, D- α -metilriptófano, D- α -metiltirosina, D- α -metilvalina, D-N-metilalanina, D-N-metilarginina, D-N-metilasparagina, D-N-metilaspártato, D-N-metilcisteína, D-N-metilglutamina, D-N-metilglutamato, D-N-metilhistidina, D-N-metilisoleucina, D-N-metileucina, L-N-metil-*terc*-butilglicina, L-norleucina, L-norvalina, α -metil-aminoisobutirato, α -metil-a-amino-butirato, α -metilciclohexilalanina, α -metilciclopentilalanina, α -metil-a-naftilalanina, α -metilpenicilamina, N-(4-aminobutil)glicina, N-(2-aminoetil)glicina, N-(3-aminopropil)glicina, N-amino- α -metil-butirato, α -naftilalanina, N-bencilglicina, N-(2-carbamiletil)glicina, N-(carbamilmetil)glicina, N-(2-carboxietil)glicina, N-(carboximetil)glicina, N-ciclobutilglicina, N-cicloheptilglicina, N-ciclohexilglicina, N-ciclododeciliglicina, N-ciclododeciliglicina, N-ciclooctilglicina, N-ciclopropilglicina, N-cicoundeciliglicina, N-(2,2-difeniletil)glicina, N-(3,3-difenilpropil)glicina, N-(3-guanidinopropil)glicina, N-(1-hidroxietil)glicina, N-(hidroxietil)glicina, N-(imidazoliletal)glicina, N-(3-indoliletal)glicina, D-N-metilisina, N-metilciclohexilalanina, D-N-metilornitina, N-metilglicina, N-metilaminoisobutirato, N-(1-metilpropil)glicina, N-(2-metilpropil)glicina, D-N-metilriptófano, D-N-metiltirosina, D-N-metilvalina, ácido α -aminobutírico, L-*terc*-butilglicina, L-etilglicina, L-homofenilalanina, L-metilarginina, L-metilaspártato, L-metilcisteína, L-metilglutamina, L-metilhistidina, L-metilisoleucina, L-metileucina, L-metilmetionina, L-metilnorvalina, L-metilfenilalanina, L-metilserina, L-metilriptófano, L-metilvalina, N-(N-(2,2-difeniletil)carbamilmetil)glicina, 1-carboxi-1-(2,2-difeniletal)amino)ciclopropano, N-metil- α -aminobutirato, D-N-metilmetionina, N-metilciclopentilalanina, D-N-metilfenilalanina, D-N-metilprolina, D-N-metilserina, D-N-metiltreonina, N-(1-metiletil)glicina, N-metil- α -naftilalanina, N-metilpenicilamina, N-(*p*-hidroxifenil)glicina, N-(tiometil)glicina, penicilamina, L- α -metilalanina, L- α -metilasparagina, L- α -metil-*terc*-butilglicina, L-metiletilglicina, L- α -metilglutamato, L- α -metilhomofenilalanina, N-(2-metiltoetil)glicina, L- α -metilisina, L- α -metilnorleucina, L- α -metilornitina, L- α -metilprolina, L- α -metiltreonina, L- α -metiltirosina, L-N-metilhomofenilalanina y N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil)glicina.

25

Como se describe anteriormente, un análogo y/u homólogo químico de angiotensina (1-9) comparte ciertas similitudes conformacionales y/o funcionales, pero no deriva necesariamente de angiotensina (1-9). Por tanto, puede diseñarse un equivalente químico para imitar ciertas propiedades biológicas y/o fisiológicas de angiotensina (1-9).

30 Aunque la presente invención está particularmente ejemplificada en la presente memoria con relación al uso de angiotensina (1-9) y medicamentos o composiciones farmacéuticas de los mismos en ratas, se entiende que la presente invención extiende el uso de angiotensina (1-9) y medicamentos o composiciones farmacéuticas de los mismos a cualquier mamífero incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, ratones, conejos, primates, perros, gatos, mascotas, ganado, etc.

35

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Diseño experimental en animales.

40 Se mantuvieron ratas Sprague Dawley macho en jaulas con acceso a agua y alimento a voluntad. Se efectuó este procedimiento de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", publicada por los Institutos nacionales de la salud de Estados Unidos (publicación NIH n° 85-23, revisada en 1985) y se aprobó por el comité de ética institucional. Par estudios con enalapril y candesartán, se separaron aleatoriamente 71 ratas adultas normotensas en dos grupos y se sometieron a cirugía ficticia (cirugía sin

45 ligamiento de la arteria coronaria, n= 34) o a infarto de miocardio después de cirugía con ligamiento de la arteria coronaria izquierda (infarto, n= 37) como se ha descrito anteriormente (Ocaranza y col., *Hypertension* 48: 572-8, 2006). Brevemente, se ligó la arteria coronaria izquierda entre la salida de la arteria pulmonar y la aurícula izquierda con una sutura de seda 7-0 en condiciones asépticas en ratas anestesiadas con HCl de ketamina/xilazina (35/7 mg/kg intraperitoneal, respectivamente). Las ratas con tratamiento ficticio experimentaron el mismo procedimiento

50 quirúrgico, excepto porque la sutura no se pasó alrededor de la arteria coronaria. Se confirmó el infarto de miocardio mediante electrocardiografía 24 h después de la cirugía. La tasa de mortalidad por infarto de miocardio después de ligamiento de la arteria coronaria izquierda era del 25 % a las 48 h después de la oclusión. Se determinó el tamaño del infarto mediante planimetría de la circunferencia endocárdica del ventrículo izquierdo en secciones histológicas. Se aleatorizaron las ratas con tratamiento ficticio e infartadas para recibir portador, candesartán (10 mg/kg de peso

55 corporal al día) o enalapril (10 mg/kg de peso corporal al día) por sonda nasogástrica durante 8 semanas, empezando 48 h después del infarto.

Para los estudios con angiotensina (1-9), se distribuyeron aleatoriamente 28 ratas en dos grupos y experimentaron una cirugía ficticia (n=8) o infarto después de ligamiento de la arteria coronaria izquierda (n=20). Se aleatorizaron las

ratas infartadas para recibir el portador, angiotensina (1-9) (463 ng/kg de peso corporal durante 14 días) o angiotensina (1-9) más A779 (463 ng de angiotensina (1-9)/kg de peso corporal/min y 100 ng de A779/kg/min durante 14 días) mediante minibombas osmóticas (ALZET) implantadas en la yugular con sedación con HCl de ketamina/xilazina (35/7 mg/kg intraperitoneal, respectivamente).

5

Ejemplo 2. Ensayos hemodinámicos y funcionales

Se determinó la presión sanguínea sistólica (PSS) usando el procedimiento de “manguito de cola” por investigadores desconocedores del grupo de tratamiento. Se determinó la función del ventrículo izquierdo mediante ecocardiografía bidimensional transtorácica usando un Sonos 5000 equipado con un transductor S12 Phillips ultrabanda electrónico sectorial a 5 a 12 MHz. Se determinaron los siguientes parámetros ecocardiográficos: diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo (DSFVI), diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (DDFVI), fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FAVI), grosor de la pared anterior del ventrículo izquierdo (GPAVI) y grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (GPPVI).

15

Ejemplo 3. Valoración del remodelado cardiovascular, renal, pulmonar o cerebral

Se determinó el remodelado cardiovascular, pulmonar, renal y cerebral en secciones histológicas de tejido que contiene colágeno, los contenidos de fibroblastos, la tasa de proliferación celular, la infiltración de macrófagos (inflamación) y los niveles de muerte celular (apoptosis, necrosis y autofagia). En el caso de remodelado cardiaco, se valoró también la hipertrofia cardiaca y la valoración morfológica y morfométrica cardiaca. En el caso de remodelado de vasos sanguíneos, se determinó también la hipertrofia de vasos sanguíneos.

Valoración de la hipertrofia cardiaca

25

Se calculó la extensión de la hipertrofia del ventrículo izquierdo mediante la relación entre el peso del ventrículo izquierdo (PVI), el peso corporal (PC), los niveles relativos de ARNm del factor natriurético auricular (ANF), el contenido de proteína del ventrículo izquierdo (PVL) y los niveles de proteína de la cadena pesada de β -miosina (β -MHC) como se describe en Ocaranza y col., Hypertension 48: 572-8, 2006.

30

Valoración morfológica y morfométrica del tejido cardiaco

Se embebieron en parafina secciones transversales del ventrículo cardiaco medio (10 μ m), se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron con microscopio óptico (x20). Se determinó el tamaño de los cardiomiocitos como se describe por Nakamura y col. (Circulation 98: 794-9, 1998). Brevemente, se proyectaron en un monitor las imágenes celulares visualizadas en un registrador de vídeo unido al microscopio y se marcaron. Se determinaron el área y perímetro usando el software Image J. Todas las medidas se hicieron por un observador independiente. Se midieron al menos 70 células por animal.

Valoración de la hipertrofia de vasos sanguíneos

Se siguió la técnica descrita por Igase y col. (Am. J. Physiol. 289: H1013-9, 2005). Brevemente, se determinaron las áreas medial y de lumen midiendo la longitud de la lámina elástica interna (LEI) y la longitud de la lámina elástica externa (LEE) mediante imágenes digitalizadas. Se convirtieron los valores de píxeles entre láminas en área calculando su relación. Se obtuvo el área medial mediante LEI-LEE. Se representó el área de lumen por el área limitada por la LEI. Se calculó la relación lumen-medial a partir de la relación de área de lumen/área medial. Se calculó el grosor medial por (diámetro de LEE-diámetro de LEI)/2.

Valoración del contenido de colágeno

50

Se determinó el colágeno efectuando un análisis morfométrico del colágeno. Se cortaron secciones de 5 μ m de grosor de ventrículo izquierdo, riñón, vaso sanguíneo y/o cerebro y se tiñeron con rojo Picrosirius como se describe por Jalil y col (Circ. Res. 64: 1041-50, 1989). Se observaron los cortes a través de un microscopio óptico conectado a un ordenador, donde se obtuvieron imágenes con el programa Video Player con 200 aumentos y se calculó el resultado semiautomáticamente por un software preparado en laboratorio con Math Lab, previamente validado (Ocaranza y col., J. Cardiovasc. Pharmacol. 40: 246-54, 2002).

55

Valoración del contenido de fibroblastos y determinación de la proliferación celular

Se deshidrataron vasos sanguíneos, riñón, pulmones, cerebro y/o corazón a temperatura ambiente y se embebieron en parafina. Se inmunotifieron secciones de 5 µm con anticuerpos anti-antígeno de proliferación celular nuclear Ki-67 (Ocaranza y col., Am. J. Physiol. 286: H498-506, 2004). Para la determinación del tipo de célula teñido positivamente, se cortaron secciones en serie seguido de tinción con anticuerpos antivimentina (fibroblastos), anti-α-actina esquelética (SKA, miocitos), anti-factor de Von Willebrand (células endoteliales) y anti-vimentina, anti-α-actina de músculo liso (células de músculo liso). Para la detección de la reacción, se contratiñeron con hematoxilina anticuerpos biotinilados conjugados con peroxidasa y secciones cortadas.

Valoración de citoprotección, apoptosis, necrosis y autofagia

Se determinó la apoptosis mediante la fragmentación de ADN. Esto se efectuó por la técnica TUNEL y por análisis de ADN purificado en gel de 2 % de agarosa. Se usaron procedimientos como se describen por (Gálvez y col., Cell Tissue Res. 304: 279-85, 2001; Ibe y col. Eur. J. Heart Fail. 9: 160-7, 2007). Se demostró una apoptosis aumentada por un mayor número de células teñidas (positivas) al microscopio usando la técnica TUNEL, mientras que en geles de agarosa se observó una cantidad más aumentada de fragmentos de ADN (de entre 200 y 1000 pb) que en los controles. Se determinó la necrosis por la liberación de lactato deshidrogenasa en el medio extracelular (Parra y col., Cardiovasc. Res. 77: 387-97, 2008). Se determinó la autofagia por la fragmentación de la proteína LC3 y por la presencia de vesículas autofágicas (Wohlgemuth y col., Rejuvenation Res. 10: 281-92, 2007). Se determinó la citoprotección por análisis morfométricos de tejidos teñidos con eosina y se visualizó por microscopía óptica.

Valoración de la inflamación

Se deshidrataron vasos sanguíneos, riñón, pulmones, cerebro y/o corazón a temperatura ambiente y se embebieron en parafina. Se inmunotifieron secciones de 5 µm con anticuerpos anti-ED-1, un marcador de macrófago/monocito. Al mismo tiempo, se determinaron los niveles de ARNm de MCP-1 en diferentes tejidos. Se aisló el ARN mediante el procedimiento TRIZOL y se determinaron concentración y pureza mediante espectrometría UV. Se valoró la integridad del ADN por las bandas de ARNr de 18 y 28S. Se calcularon los niveles de ARNm de MCP-1 por PCR-TI (Ocaranza y col., Hypertension 48: 572-8, 2006).

30 Ejemplo 4. Determinación del nivel de ARNm, proteína enzima convertora de angiotensina I (ECA) y enzima convertora de angiotensina I homóloga (ECA2)

Se aisló el ARN total (1,5 µg) de una zona del ventrículo izquierdo no infartada usando el reactivo Trizol, se trató con ADNasa y se cuantificó mediante espectroscopia UV. Se efectuó una reacción de transcriptasa inversa acoplada con una reacción de polimerización en cadena (PCR-TI) usando cebadores de ACE y ACE2 ya descritos (Ocaranza y col., Hypertension 48: 572-8, 2006). Las condiciones de amplificación de ADNc para CAE2 se han descrito ya por Ocaranza y col., Hypertension 48: 572-8, 2006. Después de la PCR, se fraccionaron los productos de amplificación en geles de 1,5 % de agarosa (p/p) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Se cuantificaron las intensidades de banda por densitometría y se normalizaron con respecto a ARN de 18S.

40 Expresión de las proteínas ACE y ACE2

Se trataron muestras de ventrículo con formalina al 4 %, se fijaron durante 24 h, se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 5 µm. Se inmunodetectó en las secciones la ACE con un anticuerpo monoclonal de IgG (1/100, Chemicon) o la ACE2 con un anticuerpo policlonal (1/500, Millenium Pharmaceuticals) y con anticuerpo biotinilado de IgG anti-ratón o anti-conejo (Dako). Se revelan las secciones usando fucsina (Dako) como cromógeno, se contratiñen con hematoxilina y se valoran por microscopía.

50 Ejemplo 5. Determinación de los niveles en plasma de angiotensina y bradicinina

Se determinaron los niveles en plasma de angiotensina y bradicinina como se describe por Ocaranza y col., Hypertension 48: 572-8, 2006; Ocaranza y col., Life Sci. 78: 1535-42, 2005; Campbell y col., J. Mol. Cell. Cardiol. 27: 1545-60, 1995. Brevemente, se anestesiaron ratas con una combinación de ketamina (125 mg/kg) y xilazina (12,5 mg/kg) administradas mediante inyección intraperitoneal. Se extrajo sangre de la vena cava inferior directamente en una jeringuilla que contenía 5 ml de isotiocianato de guanidinio 4 M usando una aguja 25G. Se almacenaron los plasmas a -80 °C hasta su extracción usando cartuchos C18 Sep-Pak y se acetilaron los péptidos. Se separaron angiotensina II, angiotensina I, angiotensina (1-7), angiotensina (1-9), bradicinina (1-7) y bradicinina (1-9) acetiladas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se detectaron por radioinmunoensayo.

Ejemplo 6. Hipertrofia de cardiomiocitos cultivados**Condiciones de ensayo**

- 5 Se aislaron cardiomiocitos de rata Sprague-Dawley neonata como se describe por Foncea y col., *J. Biol. Chem.* 272: 19115-24, 1997. Cada estudio es de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio "Guide for the care and use of laboratory animals", publicada por los Institutos nacionales de salud de EE.UU. (publicación NIH n° 85-23, revisada en 1985) y se aprobó por el comité ético institucional. Los cultivos celulares eran >95 % puros. Se sembraron cardiomiocitos a una densidad final del 70 % en placas recubiertas con gelatina y se mantuvieron a 37 °C
- 10 en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂/95 % de aire durante 24 h en DMEM/M199 (4:1) con 10 % de suero fetal bovino y 5 % de suero de ternero. Se retiró el suero 24 h antes de preincubar las células con angiotensina (1-9) 10 o 100 µM durante 1 h antes de incubar con norepinefrina 100 µM (Sigma) o IGF-1 10 nM (Austral Biological) durante 24 h.

15 Ensayos de carcomerización y determinación del tamaño de cardiomiocitos

- Se cultivaron las células sobre portaobjetos y se incubaron en un tampón que confiere estabilidad al citoesqueleto (MES 10 mM pH 6,0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, 3 % de sacarosa, MgCl₂ 5 mM) durante 5 min. Se fijaron entonces las células y se permeabilizaron usando metanol durante 10 min. Se bloquearon los sitios de unión no específica
- 20 durante 1 h con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con 3 % de seroalbúmina bovina. Se lavaron los cardiomiocitos con PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min con faloidina-rodamina 1:400 (para tinción con F-actina, rojo). Se lavaron los portaobjetos y se montaron en "DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium". Se evaluó la tinción celular con un microscopio confocal (Carl Zeiss Axiovert 135, LSM Microsystems). Se determinó el tamaño de los cardiomiocitos en células fijadas con paraformaldehído al 4 % durante
- 25 10 min y se permeabilizaron con metanol durante 10 min. Se incubaron entonces las células durante una noche a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-β-MHC (1:80). Se determinó el tamaño de al menos 100 células de campos seleccionados aleatoriamente usando el software Image J (NIH).

30 Ejemplo 7. Producción de vectores víricos que sobreexpresan la enzima convertora de angiotensina I homóloga (ECA2)**Producción de un adenovirus que sobreexpresa la enzima convertora de angiotensina I homóloga**

- Se subclonó inicialmente el gen de ACE2 (código de acceso a Genebank humano: N_021804; código de acceso a
- 35 Genebank de rata: NM_001012006) en el plásmido adenovírico pDC316 (Microbix Byosystem Inc). Se confirmaron los clones positivos por secuenciación. Después, se cotransfectó el plásmido pDC316 que contiene el gen de ACE2 con el plásmido adenovírico pBHGlox(delta)E1,3Cre en células HEK293. Se obtuvo el adenovirus recombinante mediante recombinación homóloga entre dos plásmidos como se describe por Hardy y col (*J. Virol.* 71: 1842-9, 1997). Se llevó a cabo la confirmación de que el adenovirus producido sobreexpresaba ACE2 mediante transducción
- 40 de cardiomiocitos de rata neonata en cultivo con una multiplicidad de infecciones (MOI) con adenovirus que expresan ACE2. Se verificó la sobreexpresión de ACE2 mediante la determinación de los niveles de proteína ACE2 por transferencia Western y por la actividad enzimática de ACE2. La Figura 1 exhibe la sobreexpresión en cardiomiocitos cultivados usando diferentes multiplicidades de infección (MOI) con un adenovirus que sobreexpresa ACE2. A nivel de bases, no es posible detectar la presencia de ACE2 en cardiomiocitos cultivados, sin embargo,
- 45 mediante la expresión de ACE2 usando un adenovirus, es posible elevar los niveles de ACE2 varios cientos de veces (Figura 1).

Producción de un lentivirus que sobreexpresa la enzima convertora de angiotensina I homóloga

- 50 Se subclonó inicialmente el gen de ACE2 (código de acceso a Genebank humano: N_021804; código de acceso a Genebank de rata: NM_001012006) en el plásmido lentivírico PHAGE-PGK. Se produjeron los lentivirus en células HEK293T mediante la cotransfección simultánea del vector lentivírico que contiene ADNc de ACE2 y los vectores pCMVdeltaR8.9 y pHCMV-G según el procedimiento descrito por Zufferey y col (*J. Virol.* 72: 9873-80, 1998). Se efectuó la confirmación de que el lentivirus producido sobreexpresaba ACE2 mediante cardiomiocitos de rata
- 55 neonata cultivados con diferentes multiplicidades de infección (MOI) con el lentivirus que expresa ACE2. Se verificó la sobreexpresión de ACE2 mediante la determinación de los niveles de proteína ACE2 mediante transferencia Western y por la actividad enzimática de ACE2.

Producción de un retrovirus que sobreexpresa la enzima convertora de angiotensina I homóloga

Se subclonó inicialmente el gen de ACE2 (ser humano= código de acceso a Genebank: NM_021804; rata= código de acceso a Genebank: NM_001012006) en el plásmido retrovítico pCnBgSN (o cualquier otro plásmido retrovítico). Se produjeron los retrovirus a partir de células HEK293T mediante cotransfección simultánea del vector retrovítico que contiene ADNc de ACE2 y los vectores pHIT60 (por gal-pol) y pCVG (por VSV-G) según los procedimientos descritos por Yu y Kwon ("Methods in Molecular Biology", vol. 433: volumen 1: "Production and In Vivo Applications", editado por: J. M. Le Doux © Humana Press, Totowa, NJ, páginas 1-16). Se efectuó la confirmación de que el retrovirus producido sobreexpresaba ACE2 mediante transducción de cardiomiocitos de rata neonata cultivados con diferentes multiplicidades de infección (MOI) con el retrovirus que expresa ACE2. Se verificó la sobreexpresión de ACE2 determinando los niveles de proteína ACE2 por transferencia Western y por la actividad enzimática de ACE2.

Producción de un virus adenoasociado que sobreexpresa la enzima convertora de angiotensina I homóloga

Se subclonó inicialmente el gen de ACE2 (ser humano= código de acceso a Genebank: NM_021804; rata= código de acceso a Genebank: NM_001012006) en el plásmido de virus adenoasociado pAAV-MCS (Stratagene). Se produjeron los virus adenoasociados a partir de células HEK293T mediante cotransfección simultánea del vector de virus adenoasociado que contiene ADNc de ACE2 y los vectores pAAV-RC (pAAV-helper o pRC, que contienen los genes rep y cap) y pAdV-Helper (o pHelper, que porta los genes de ARN de E2A, E4 y VA) según el procedimiento descrito por Stratagene. Se efectuó la confirmación de que el virus adenoasociado producido sobreexpresaba ACE2 mediante la transducción de cardiomiocitos de rata neonata cultivados con diferentes multiplicidades de infección (MOI) con el virus adenoasociado que expresa ACE2. Se verificó la sobreexpresión de ACE2 determinando los niveles de proteína ACE2 mediante transferencia Western y por la actividad enzimática de ACE2.

Ejemplo 8. Administración intracardiaca y en vaso sanguíneo de vectores víricos que sobreexpresan enzima convertora de angiotensina I homóloga (ACE2)

Se efectuaron las infecciones en animales según la técnica descrita por Coleman y col. (*Physiol. Genomics* 12: 221-8, 2003). Brevemente, se anestesiaron ratas macho de 150 ± 10 g de peso con ketamina y xilazina a dosis de 50 mg/kg/peso y 10 mg/kg/peso respectivamente por vía intraperitoneal, seguido de intubación por la laringe insertando un catéter blando de calibre 18, y se ventiló con un volumen tidal de aproximadamente 2 ml a 60 ciclos/min (ventilador mecánico de animales pequeños SAR-830). Se efectuó una toracotomía al nivel del quinto espacio intercostal y se introdujo un catéter de calibre 24 con 30 μ l de solución adenovirica, lentivirica o de virus adenoasociado en la cámara ventricular izquierda. Después de insertar el tubo de drenaje para retirar aire y sangre, se cerró la incisión; se dejaron recuperar los animales y se devolvieron a sus respectivas jaulas. La tasa de mortalidad después de esta cirugía era de alrededor del 20 % y se ha establecido para transferencia génica a largo plazo de tejido de miocardio (para detalles, véase "Methods in Molecular Biology", vol. 219: "Cardiac Cell and Gene Transfer", editado por: J. M. Metzger © Humana Press Inc., Totowa, NJ).

Ejemplo 9: Efecto de la administración de angiotensina (1-9) sobre los parámetros hemodinámicos

La administración continua de angiotensina (1-9) a través de minibombas osmóticas (ALZET) (véase el ejemplo 1) no altera la presión sanguínea en animales tratados (tabla 1). Sin embargo, se observa una reducción significativa del peso del ventrículo izquierdo (PVI) (tabla 1).

TABLA 1. Efectos de la administración de angiotensina (1-9) sobre los parámetros hemodinámicos

Parámetro	S	IM	IM-Ang (1-9)	IM-Ang (1-9)-A779
N	8	8	6	6
PC (g)	255 \pm 6	264 \pm 6	274 \pm 24	277 \pm 4
PSS (mm Hg)	115 \pm 4	110 \pm 3	112 \pm 2	117 \pm 9
PVI (mg)	830 \pm 20	910 \pm 20*	810 \pm 7 [#]	823 \pm 31 [#]
PVI/PC (MV/100 g de PC)	325 \pm 9	355 \pm 10*	310 \pm 16 [#]	305 \pm 19 [#]
CPVI (mg)	8,2 \pm 0,4	9,8 \pm 0,3*	8,0 \pm 0,3 [#]	8,4 \pm 0,2 [#]
RC (latidos/min)	276 \pm 14	271 \pm 7	259 \pm 14	260 \pm 10

Los valores son medias \pm EEM. Abreviaturas: IM: infarto de miocardio, N: número de animales, PC: peso corporal, PSS: presión sanguínea sistólica, PVI: peso del ventrículo izquierdo, RC: ritmo cardiaco. * $p < 0,05$ frente a ficticio, [#] $p < 0,05$ frente a IM (después de un ANOVA significativo).

Ejemplo 10. Los efectos antirremodelantes de inhibidor de enzima convertora de angiotensina I (CEA) y antagonista de receptor de angiotensina II (AT1) están mediados por niveles de angiotensina (1-9) aumentados

5 Para demostrar que la angiotensina (1-9) está implicada en los efectos farmacológicos de los fármacos cardiovasculares que actúan sobre el sistema de renina-angiotensina, y que este péptido es un nuevo factor antihipertrófico, se compararon los efectos del inhibidor de ACE clásico enalapril con los obtenidos con el antagonista de receptor AT1 candesartán sobre un modelo de infarto de miocardio. Se valoró la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) por ecocardiografía, el peso relativo del ventrículo izquierdo (PRVI, mg, peso del ventrículo izquierdo (PVI)/peso corporal (PC)), los niveles relativos de ARNm de factor natriurético auricular (ANF), el contenido de proteína del ventrículo izquierdo (PVI) y el contenido de cadena pesada de β -miosina (β -MHC) se describen en el ejemplo 1.

15 El tamaño medio de infarto era similar en todas las ratas infartadas tratadas y no tratadas. Cuatro marcadores de la hipertrofia (relación PVI/PC, contenido de PVI, ARNm de ANF y niveles de β -MHC) aumentaron significativamente en la semana 8 después del ligamiento de la arteria coronaria descendente, y se redujeron mediante la administración de candesartán o enalapril. Ambos fármacos prevenían significativamente la dilatación del ventrículo izquierdo, mientras que solo el candesartán reducía el grosor de pared del ventrículo izquierdo (GPVI) en ratas infartadas (Tabla 2).

20

TABLA 2. Efecto del inhibidor de receptor de angiotensina AT1 e inhibidor de ACE enalapril sobre la presión sanguínea, morfometría y función del ventrículo izquierdo inducido por el ligamiento de arteria coronaria.

Parámetro	S	IM	C-F	C-IM	E-F	E-IM
N	11	12	13	13	10	12
PC (g)	380 ± 8	372 ± 10	346 ± 11* [#]	357 ± 10* [#]	350 ± 7* [#]	345 ± 4* [#]
PSS (mm Hg)	123 ± 2	117 ± 2	84 ± 4* [#] ¶	88 ± 4* [#] ¶	113 ± 2* [#]	110 ± 3* [#]
Volumen de infarto del VI (%)	NA	29 ± 1	NA	30 ± 1	NA	31 ± 2
PVI/PC (mg/g)	3,0 ± 0,1	3,6 ± 0,1*	2,7 ± 0,1* [#]	2,8 ± 0,1* [#]	2,7 ± 0,2*	2,9 ± 0,3* [#]
ARNm de ANF (veces)	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,2*	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,2* [#] ¶	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Contenido de PVI (mg)	11,1 ± 0,3	30,1 ± 3,3*	11,6 ± 1,1	12,3 ± 1,4* [#]	12,4 ± 0,8	12,8 ± 0,5* [#]
β -MHC (veces)	1,0 ± 0,2	2,2 ± 0,2*	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1* [#]	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1* [#]
DSFVI (mm)	5,2 ± 0,1	6,9 ± 0,3*	5,1 ± 0,1	5,9 ± 0,4* [#]	5,2 ± 0,1	5,4 ± 0,3* [#]
DDFVI (mm)	7,4 ± 0,2	8,8 ± 0,2*	7,7 ± 0,2	8,0 ± 0,3* [#]	7,5 ± 0,3	7,1 ± 0,2* [#]
FAVI (%)	29 ± 2	22 ± 3*	30 ± 2	22 ± 2*	30 ± 1	21 ± 1*
GPVI (mm)	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1*	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,4*	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,1*
GPPVI (mm)	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1*	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0* [#]	1,4 ± 0,0	1,5 ± 0,1

25 Los valores son medias ± EEM. Abreviaturas: F: ficticio, IM: infarto de miocardio; C: candesartán; E: enalapril; N: número de animales; PC: peso corporal; PSS: presión sanguínea sistólica; PVI: peso del ventrículo izquierdo; ANF: factor natriurético auricular; PVI: contenido de proteína del ventrículo izquierdo; β -MHC: cadena pesada de β -miosina; DSFVI: diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo; DDFVI: diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo; FAVI: fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo; GPVI: grosor de pared infartada anterior del ventrículo izquierdo; GPPVI: grosor de pared infartada posterior del ventrículo izquierdo; NA: no aplicable. *p<0,05 frente a F; #p<0,05 frente a IM, ¶p<0,05 frente a E-IM (después de ANOVA significativo).

35 Se determinaron los niveles en plasma de angiotensina y bradicinina (BK) mediante cromatografía líquida de alta resolución y radioinmunoensayo como se describe en el ejemplo nº 2. Los niveles de angiotensina I son menores en el grupo de ratas infartadas, asociado a niveles más altos de angiotensina II. Sin embargo, los niveles en plasma de angiotensina (1-7) y angiotensina (1-9) eran similares en ratas con tratamiento ficticio y ratas infartadas. Enalapril y candesartán aumentan tanto los niveles en circulación de angiotensina (1-9) como las relaciones de angiotensina (1-7)/angiotensina II y angiotensina (1-9)/angiotensina I en ambos grupos experimentales. Se aumentaron los niveles en plasma de angiotensina (1-7) por candesartán, y se aumentaron los niveles de bradicinina (1-9) por enalapril tanto en ratas infartadas como con tratamiento ficticio (Tablas 3 y 4).

40

TABLA 3. Efectos del antagonista de receptor AT1 candesartán y el inhibidor de ACE sobre los niveles en circulación de angiotensina I, angiotensina II, angiotensina (1-7) y angiotensina (1-9) después de ligamiento de la arteria coronaria

45

Parámetro	S	IM	C-S	C-IM	E-S	E-IM
N	10	9	12	11	10	10
Ang I (fmol/g)	29,8 ± 4,0	13,1 ± 1,6*	22,6 ± 5,3	30,7 ± 1,9 [#]	30,7 ± 1,0	32,4 ± 0,8 [#]
Ang (1-7) (fmol/g)	4,3 ± 1,1	2,9 ± 0,5	10,9 ± 1,6 ^{*#¶}	14,4 ± 2,7 ^{*#¶}	4,1 ± 0,5	3,8 ± 0,6
Ang (1-9) (fmol/g)	5,3 ± 0,8	5,7 ± 0,9	36,2 ± 4,1 ^{*#¶}	43,8 ± 2,9 ^{*#¶}	25 ± 5*	29 ± 3 ^{*#¶}
Ang II (fmol/g)	24,3 ± 3,0	33,0 ± 2,5*	38,6 ± 7,2*	34,6 ± 4,2 ^{*¶}	15,4 ± 3,8*	23,3 ± 5,4 [#]
Ang II/Ang I	0,86 ± 0,08	2,83 ± 0,11*	3,3 ± 0,9*	4,5 ± 0,6 ^{*#¶}	0,45 ± 0,05*	0,72 ± 0,1 ^{*¶}
Ang (1-9)/Ang I	0,18 ± 0,02	0,42 ± 0,06*	2,6 ± 0,7*	2,8 ± 1,1 ^{*#¶}	0,75 ± 0,03*	0,89 ± 0,02 ^{*#¶}
Ang (1-7)/Ang II	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,01*	0,49 ± 0,15*	1,02 ± 0,06 ^{*#¶}	0,25 ± 0,07	0,26 ± 0,02 ^{*#¶}

Los valores son medias ± EEM. Abreviaturas: F: ficticio; IM: infarto de miocardio; C: candesartán; E: enalapril; N: número de animales; Ang: angiotensina. *p<0,05 frente a F; #p<0,05 frente a IM; ¶p<0,05 frente a E-IM (después de un ANOVA significativo).

TABLA 4. Efectos del antagonista de receptor AT1 candesartán y el inhibidor de ACE enalapril sobre los niveles en circulación de bradicinina (1-7) y bradicinina (1-9) después de ligamiento de la arteria coronaria

Parámetro	S	IM	C-S	C-IM	E-S	E-IM
N	10	9	12	11	10	10
Bk (1-7) (fmol/g)	3,16 ± 0,84	2,80 ± 0,54	4,41 ± 1,5	5,44 ± 1,60	1,48 ± 0,46 ^{*#¶}	1,40 ± 0,17 ^{*#¶}
Bk (1-9) (fmol/g)	3,89 ± 1,12	4,25 ± 1,00	4,30 ± 1,36	4,08 ± 1,43 [¶]	9,53 ± 2,99*	7,89 ± 1,22 ^{*#¶}
Bk (1-7)/Bk (1-9)	1,09 ± 0,85	0,75 ± 0,42	1,69 ± 0,51	1,18 ± 0,21 [¶]	0,19 ± 0,04 ^{*#¶}	0,17 ± 0,06 ^{*#¶}

10

Los valores corresponden a medias ± EEM. Abreviaturas: F: ficticio; IM: infarto de miocardio; C: candesartán; E: enalapril; N: número de animales; Bk: bradicinina. *p<0,05 frente a F; #p<0,05 frente a IM; ¶p<0,05 frente a E-IM (después de un ANOVA significativo). Entre los grupos experimentales, solo los niveles en plasma de angiotensina (1-9), pero no los niveles de angiotensina II ni angiotensina (1-7), se correlacionaban significativamente con los niveles de HVI y proteína (r= -0,35, F= 8,44, p<0,01; n= 62, r= -0,35, F= 7,25, p<0,01, respectivamente, Figuras 2a-b). Estos resultados indican que tanto el inhibidor de ACE como el antagonista de receptor AT1 aumentan los niveles en plasma de angiotensina (1-9) y que este efecto estaba asociado a una hipertrofia del ventrículo izquierdo y una atenuación del remodelado del ventrículo izquierdo.

15

20 Ejemplo 11. La administración de angiotensina (1-9) inhibe el remodelado

Se valoran ahora los efectos de la administración crónica de angiotensina (1-9) durante dos semanas a ratas con infarto de miocardio mediante minibombas osmóticas Alzet (véase el ejemplo 3) sin observar cambios en peso corporal, presión sanguínea ni ritmo cardiaco en los grupos experimentales (Tabla 4).

25

En estos experimentos, se determinaron el área y el perímetro de los cardiomiocitos cardiacos de ratas con tratamiento ficticio, infartadas e infartadas y tratadas con angiotensina (1-9) (Figura 3a-b). En ratas infartadas, el área celular aumentó un 69 % en comparación con las ratas con tratamiento ficticio (p<0,01), mientras que la administración de angiotensina (1-9) previno el aumento del área celular en comparación con las ratas infartadas (p<0,01, Figura 3b). El perímetro de cardiomiocitos siguió la misma tendencia que el área celular y aumentó un 28 % en ratas infartadas con respecto a ratas con tratamiento ficticio (p<0,01), y se redujo un 31 % mediante la administración de angiotensina (1-9) con respecto a ratas infartadas (p<0,01, Figura 3b). Los genes fetales se activan normalmente durante el desarrollo embrionario y se suprimen en la madurez. Sin embargo, en condiciones patológicas, estos genes se sobreexpresan y se consideran tradicionalmente como marcadores moleculares de hipertrofia cardiaca patológica (Schneider y col., *Basic Res. Cardiol.* 87 supl 2: 33-48, 1992; van Bilsen y Chien, *Cardiovasc. Res.* 27:1140-9, 1993). Se determinaron tanto la expresión de ARNm del factor natriurético auricular (ANF) como los niveles de proteína β-MHC por PCR-TI y transferencia Western, respectivamente (véase el ejemplo 4). Las ratas infartadas exhibían un aumento del 310 % de los niveles de ARNm de ANF en comparación con las ratas con tratamiento ficticio (p<0,01, Figura 4a-b) y una reducción del 81 % en las ratas infartadas tratadas con angiotensina (1-9) en comparación con las ratas infartadas (p<0,01, Figura 4b). Los niveles de proteína β-MHC en el ventrículo izquierdo (Figura 5a-b) aumentaron un 90 % en las ratas infartadas en comparación con las ratas con tratamiento ficticio (p<0,01, Figura 5b) y se redujeron un 48 % en comparación con las ratas infartadas (p<0,01) tratadas con angiotensina (1-9) en comparación con ratas infartadas (p<0,01). En conjunto, estos resultados indican que la administración de angiotensina (1-9) previene el remodelado cardiaco después de infarto de miocardio. Puesto que la angiotensina (1-9) puede hidrolizarse por ACE formando angiotensina (1-7), se ha probado esta

45

hipótesis coadministrando A799, el antagonista descrito para el receptor de angiotensina (1-7) (Lara y col., Regul. Pept. 103: 17-22, 2002), con angiotensina (1-9) a ratas infartadas durante 2 semanas. A799 no modificaba los efectos preventivos de la angiotensina (1-9) sobre los aumentos de área y perímetro de cardiomiocitos inducidos después de infarto de miocardio (Figura 3a). Se corroboró el efecto de A779 midiendo los niveles en circulación de angiotensina (1-7) en ratas infartadas tratadas con angiotensina (1-9) y A779, y en ratas infartadas tratadas con angiotensina (1-9). A779 aumentaba los niveles en plasma de angiotensina (1-9), siendo los niveles de $9,26 \pm 1,25$ frente a $6,8 \pm 0,8$ fmols/g (ratas con infarto de miocardio y tratadas frente a ratas infartadas no tratadas con A779, respectivamente, $p < 0,01$). En conjunto, estos datos indican que los efectos antirremodelantes *in vivo* de angiotensina (1-9) sobre el tejido cardíaco no están mediados por la angiotensina (1-7).

10

Ejemplo 12. La angiotensina(1-9) inhibe la hipertrofia de cardiomiocitos primarios cultivados

Se confirmaron estos efectos antihipertróficos *in vivo* de angiotensina (1-9) mediante experimentos *in vitro* usando cultivos de cardiomiocitos neonatos. Se efectuó la hipertrofia de cardiomiocitos cultivados administrando norepinefrina (NE) y factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1). Como se muestra en la Figura 6, los aumentos de las áreas de cardiomiocitos inducidos por NE (10 μ M) o IGF-1 (10 nM) se prevenían significativamente mediante la coadición de angiotensina (1-9) 10 o 100 μ M. Se observaron efectos similares sobre el perímetro de cardiomiocitos y la carcomerización con angiotensina (1-9).

20 Interpretaciones de las figuras

Figura 1. Sobreexpresión de enzima convertora de angiotensina I (ECA2) mediante transducción adenovírica en cardiomiocitos cultivados

Se transdujeron cardiomiocitos cultivados con un adenovirus que sobreexpresa ACE2 usando diferentes multiplicidades de infección (MOI). Las MOI usadas fueron: carril 1: MOI= 0, carril 2: MOI= 1000, carril 3: MOI= 2000, carril 4: MOI= 3000; carril 5: MOI= 4000. Después de 48 h de incubación a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂/95 % de aire, se lisaron las células y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, seguido de transferencia Western usando un anticuerpo policlonal anti-ACE2.

30

Figura 2. Correlación de los niveles en plasma de angiotensina (1-9), angiotensina II o angiotensina (1-7) con la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) y los niveles de proteína

En los modelos animales ya descritos en el ejemplo 1, se han descrito niveles en plasma de angiotensina (1-9) [Ang-(1-9)], angiotensina (1-7) [Ang-(1-7)] y angiotensina II [Ang II] como en el ejemplo 5. Al mismo tiempo, se determinó la hipertrofia del ventrículo izquierdo mediante la relación de peso de ventrículo izquierdo (PVI) y peso corporal (PC), o mediante el contenido de proteína total del ventrículo izquierdo (véase el ejemplo 3). En el panel A), se muestran las correlaciones entre la relación de PVI/PC y los niveles en plasma de Ang II, Ang-(1-7) y Ang-(1-9). En el panel B), se muestra la correlación entre el contenido de proteína total del ventrículo izquierdo y los niveles en plasma de Ang-(1-9). Se efectuó el análisis estadístico usando la correlación de Pearson.

40

Figura 3. La angiotensina (1-9) previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca determinada por el área y perímetro de cardiomiocitos

En modelos animales como se describen en el ejemplo 1, se extrajo el corazón, se realizaron cortes histológicos y se efectuó un análisis morfológico y morfométrico de tejido cardíaco según el procedimiento descrito en el ejemplo 3. El panel A) refleja figuras representativas de cortes histológicos de ratas con tratamiento ficticio (F), ratas infartadas (IM), ratas infartadas tratadas con angiotensina (1-9) (Ang-(1-9)-IM) y ratas infartadas tratadas con angiotensina (1-9) y A778 (Ang-(1-9)-A779-IM). En el panel B), se ilustra la cuantificación. ** $p < 0,01$ frente a ficticio; ### $p < 0,01$ frente a IM.

50

Figura 4. La angiotensina (1-9) previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca determinada por los niveles de ARNm de factor natriurético auricular (ANF)

En modelos animales como se describen en el ejemplo 1, se extrajo el corazón y se purificó el ARN según el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Después, se determinó la cantidad de ARNm de ANF mediante transcripción inversa seguida de reacción en cadena de polimerización (PCR-TI) (véase el ejemplo 3). El panel A) ilustra un gel de agarosa representativo correspondiente a una PCR-TI amplificada de ARN de ANF obtenido del ventrículo izquierdo de ratas con tratamiento ficticio (F), ratas infartadas (IM) y ratas infartadas tratadas con angiotensina (1-9) (Ang-(1-

55

9)-IM), y los controles de carga respectivos con ARN ribosómico de 18S. El panel B) ilustra la cuantificación de PCR-Tl. **p<0,01 frente a ficticio; ##p<0,01 frente a IM.

Figura 5. La angiotensina (1-9) previene el desarrollo de hipertrofia cardiaca determinada por los niveles de cadena pesada de β -miosina (β -MHC)

En modelos animales como se describen en el ejemplo 1, se extrajo el corazón y se obtuvieron las proteínas totales según el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Se resolvieron entonces las proteínas por electroforesis en poliacrilamida-SDA y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se determinó la β -MHC usando anticuerpos
 10 específicos como se describe en el ejemplo 3. El panel A) ilustra una transferencia Western representativa de los niveles de β -MHC en los ventrículos izquierdos de ratas con tratamiento ficticio (F), ratas infartadas (IM) y ratas infartadas tratadas con angiotensina (1-9) (Ang-(1-9)-IM). Adicionalmente, se muestran los controles de carga respectivos con β -actina. El panel B) ilustra la cuantificación de transferencias Western. **p<0,01 frente a ficticio; ##p<0,01 frente a IM.

Figura 6. La angiotensina (1-9) antagoniza el desarrollo de hipertrofia de cardiomiocitos inducida por IGF-1 y norepinefrina

Se dejaron adherir a placa cardiomiocitos cultivados recién obtenidos, incubándolos durante 24 h en medio de
 20 cultivo (DME:M199= 4:1) suplementado con 5 % de suero fetal bovino más 10 % de suero de ternero. Se reemplazó entonces el medio por un medio de cultivo sin suero y se incubaron durante 18 h adicionales. Se preincubaron las células entonces con angiotensina (1-9) (10 y 100 μ M) durante 1 h, seguido de la adición de norepinefrina (NE, 10 μ M final) o factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1, 10 nM final) y se incubaron durante 48 h adicionales. Se
 25 fijaron las células con formaldehído al 4 %, se permeabilizaron con 0,2 % de Triton X-100 en PBS durante 6 min, y se bloquearon con BSA al 3 % en PBS durante 1 h. Se reveló el citoesqueleto de actina por faloidina-rodamina (1:400, color rojo) y se tiñó el núcleo con Hoescht (1:1000, color azul) durante 1,5 h. Se visualizaron las células usando un microscopio de epifluorescencia. Las figuras son representativas de 3 experimentos separados. La barra corresponde a 50 μ M.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE UNIVERSIDAD DE CHILE

<120> Composiciones farmacéuticas que comprenden angiotensina (1-9), derivados de la misma o un vector que
 35 expresa ACE2, útiles para tratar el remodelado cardiovascular, pulmonar, cerebral y/o renal

<130> EP2638.1

<150> PCT/CL2009/00029
 40 <151> 15-12-2009

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5
 45

<210> 1
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 1

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu Leu Val Tyr Ser
 1 5 10

55 <210> 2
 <211> 10
 <212>PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 525 811 T3

<400> 2

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His Leu
1 5 10

5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 3

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
1 5

15 <210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 4

Arg Val Tyr Ile His Pro Phe
1 5

<210> 5

25 <211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

30

Val Tyr Ile His Pro Phe
1 5

<210> 6

<211> 9

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro Phe His
1 5

40

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

Asp Arg Val Tyr Ile His Pro
1 5

50

REIVINDICACIONES

1. Angiotensina (1-9) para uso en la prevención, reversión, inhibición y/o disminuir el remodelado cardiovascular, pulmonar, renal y/o cerebral.
- 5 2. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de angiotensina (1-9) y al menos un transportador, excipiente, estabilizante, diluyente y/o coadyuvante farmacéuticamente aceptable para uso en la prevención, reversión, inhibición y/o disminución del remodelado cardiovascular, pulmonar, renal y/o cerebral.
- 10 3. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición farmacéutica está en forma líquida o sólida.
4. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en la que se administra angiotensina (1-9) concomitantemente con al menos un compuesto farmacéutico.
- 15 5. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el compuesto farmacéutico corresponde a un compuesto farmacéutico seleccionado de inhibidor de enzima convertora de angiotensina I, antagonista de receptor de angiotensina II (AT1), antagonista de canal L de calcio, inhibidor de Rho cinasa o diurético.
- 20 6. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el inhibidor de enzima convertora de angiotensina I es cualquier fármaco seleccionado de lisinopril, enalapril, captopril, zofenopril, ramipril, quinapril, perindopril, benazepril y fosinopril; el antagonista de receptor de angiotensina II (AT1) es cualquier fármaco seleccionado de valsartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán, eprosartán y saralasinina; el antagonista de canal L de calcio es cualquier fármaco seleccionado de nifedipina, nifedipina, amlodipina, felodipina, nitrendipina, nisoldipina, isradipina, nimodipina, diltiazem, clentiazem, verapamilo, galopamilo, anipamilo, RO5967, falipamilo; el inhibidor de Rho cinasa es cualquier fármaco seleccionado de fasudilo, hidroxilfasudilo, 3-(4-piridil)-1*H*-indol, (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]homopiperazina, *N*-(4-piridil)-*N'*-(2,4,6-triclorofenil)urea y el diurético es cualquier fármaco seleccionado de bendroflumetiazida, bencitiazida, clorotiazida, clortalidona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, indapamida, meticlotiazida, metolazona, politiazida, quinetazona, triclorometiazida, xipamida, furosemida, torasemida, bumetanida, ácido etacrínico, acetazolamida, dorzolamida, amilorida, triamtereno, espironolactona, canrenoato, eplerenona y manitol.
- 30 7. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en la que el remodelado cardiovascular comprende: fibrosis cardiaca, hipertrofia de cardiomiocitos y/o proliferación de fibroblastos, o fibrosis vascular, proliferación de células de músculo liso vascular y/o proliferación de fibroblastos.
- 35 8. Angiotensina (1-9) para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en las que su vía de administración es por inyección y/o parenteral, por inhaladores, liberación continua, bombas de liberación continua, supositorios y/o vía oral.
- 40 9. Composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que se administra una dosis única, dosificación múltiple o administración continua.
- 45 10. Angiotensina (1-9) para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en las que la cantidad eficaz de dicha composición permite elevar las concentraciones en plasma y/o tejido de angiotensina (1-9) a valores superiores a 10 fmol/g, más específicamente a valores superiores a 20 fmol/g, aún más específicamente a valores superiores a 40 fmol/g, y todavía más específicamente a valores superiores a 80 fmol/g.
- 50 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de angiotensina (1-9), al menos un portador, excipiente, estabilizante, diluyente y/o coadyuvante farmacéuticamente aceptable y al menos un compuesto farmacéutico seleccionado de inhibidor de enzima convertora de angiotensina I, antagonista de receptor de angiotensina II (AT1), antagonista de canal L de calcio, inhibidor Rho de cinasa o diurético.
- 55 12. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho inhibidor de enzima convertora de angiotensina I es cualquier fármaco seleccionado de lisinopril, enalapril, captopril, zofenopril, ramipril, quinapril, perindopril, benazepril y fosinopril; el antagonista de receptor de angiotensina II (AT1) es cualquier fármaco seleccionado de valsartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán, eprosartán y saralasinina; el

antagonista de canal L de calcio es cualquier fármaco seleccionado de nicardipina, nifedipina, amlodipina, felodipina, nitrendipina, nisoldipina, isradipina, nimodipina, diltiazem, clentiazem, verapamilo, galopamilo, anipamilo, RO5967, falipamilo; el inhibidor Rho de cinasa es cualquier fármaco seleccionado de fasudilo, hidroxilfasudilo, 3-(4-piridil)-1*H*-indol, (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]homopiperazina, *N*-(4-piridil)-*N'*-(2,4,6-triclorofenil)urea y el

5 diurético es cualquier fármaco seleccionado de bendroflumetiazida, bencitiazida, clortiazida, clortalidona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, indapamida, meticlotiazida, metolazona, politiazida, quinetazona, triclormetiazida, xipamida, furosemida, torasemida, bumetanida, ácido etacrínico, acetazolamida, dorzolamida, amilorida, triamtereno, espironolactona, canrenoato, eplerenona y manitol.

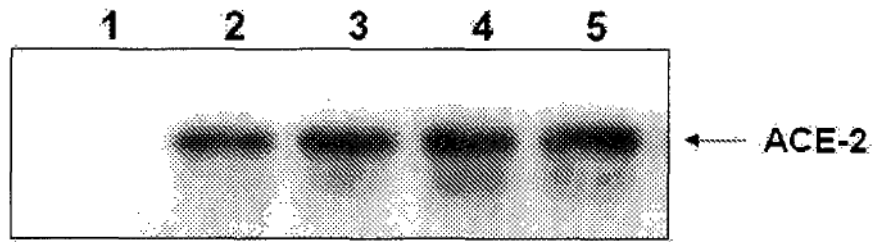


Figura 1

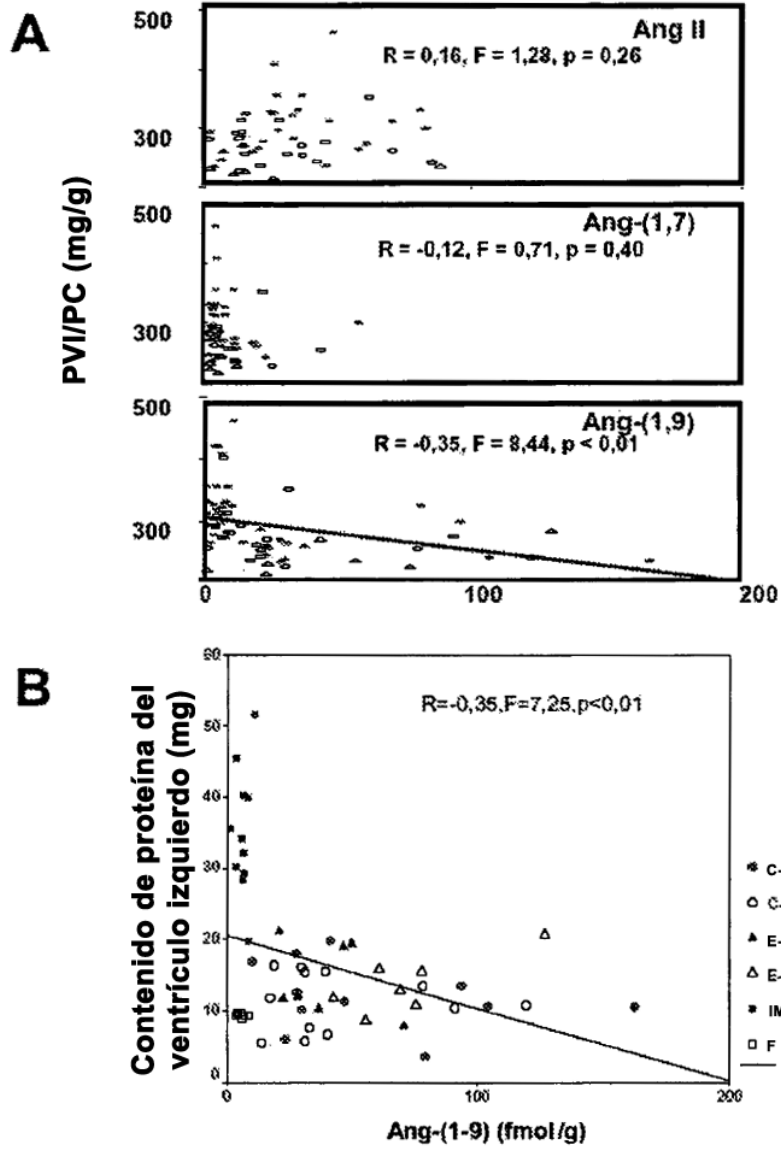


Figura 2

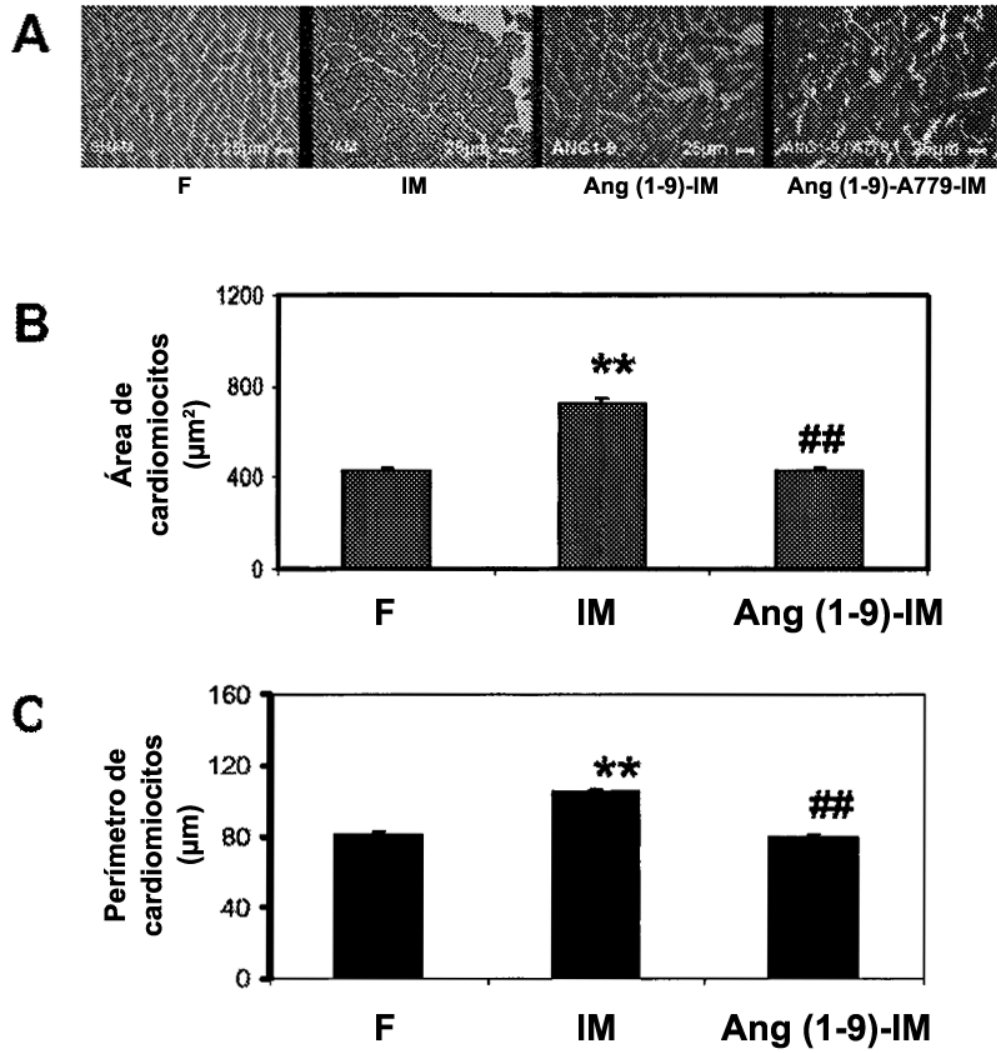


Figura 3

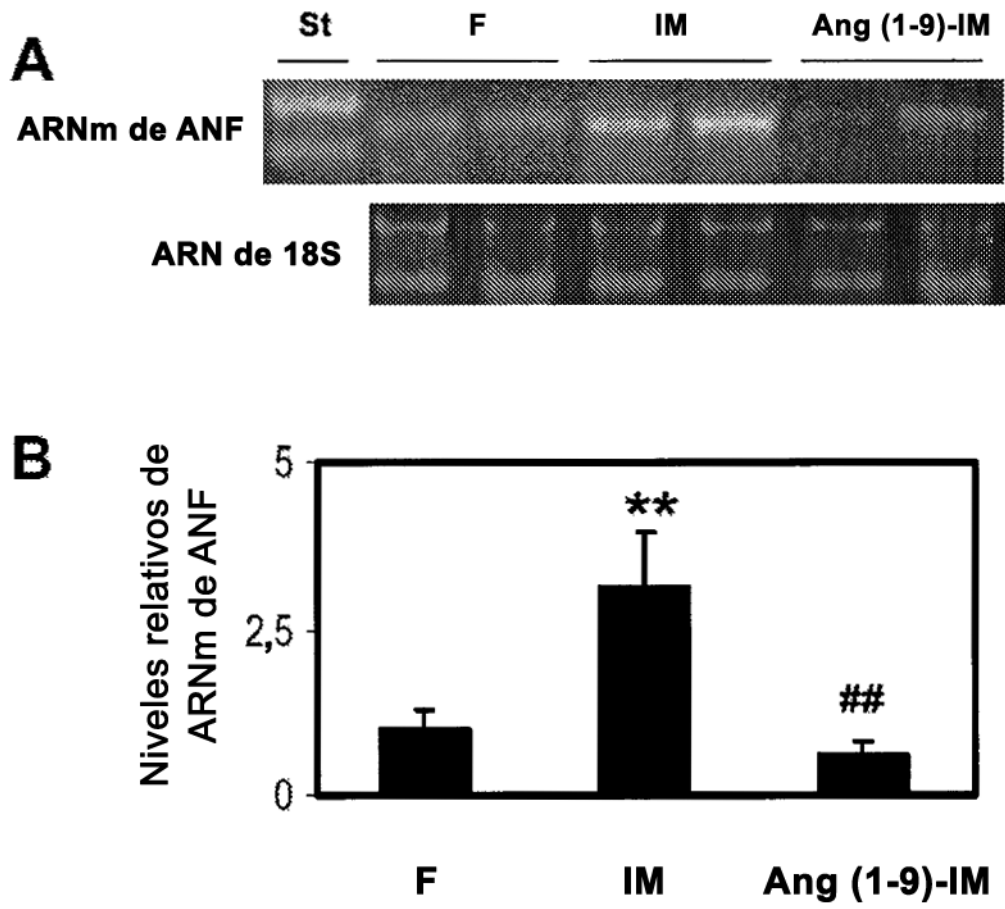


Figura 4

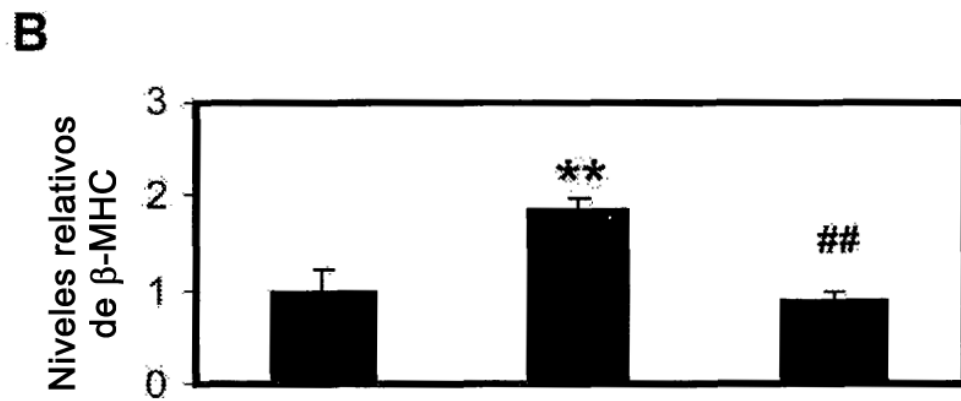
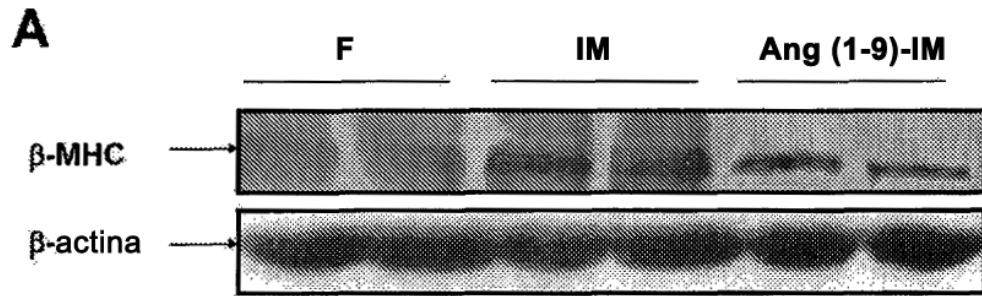


Figura 5

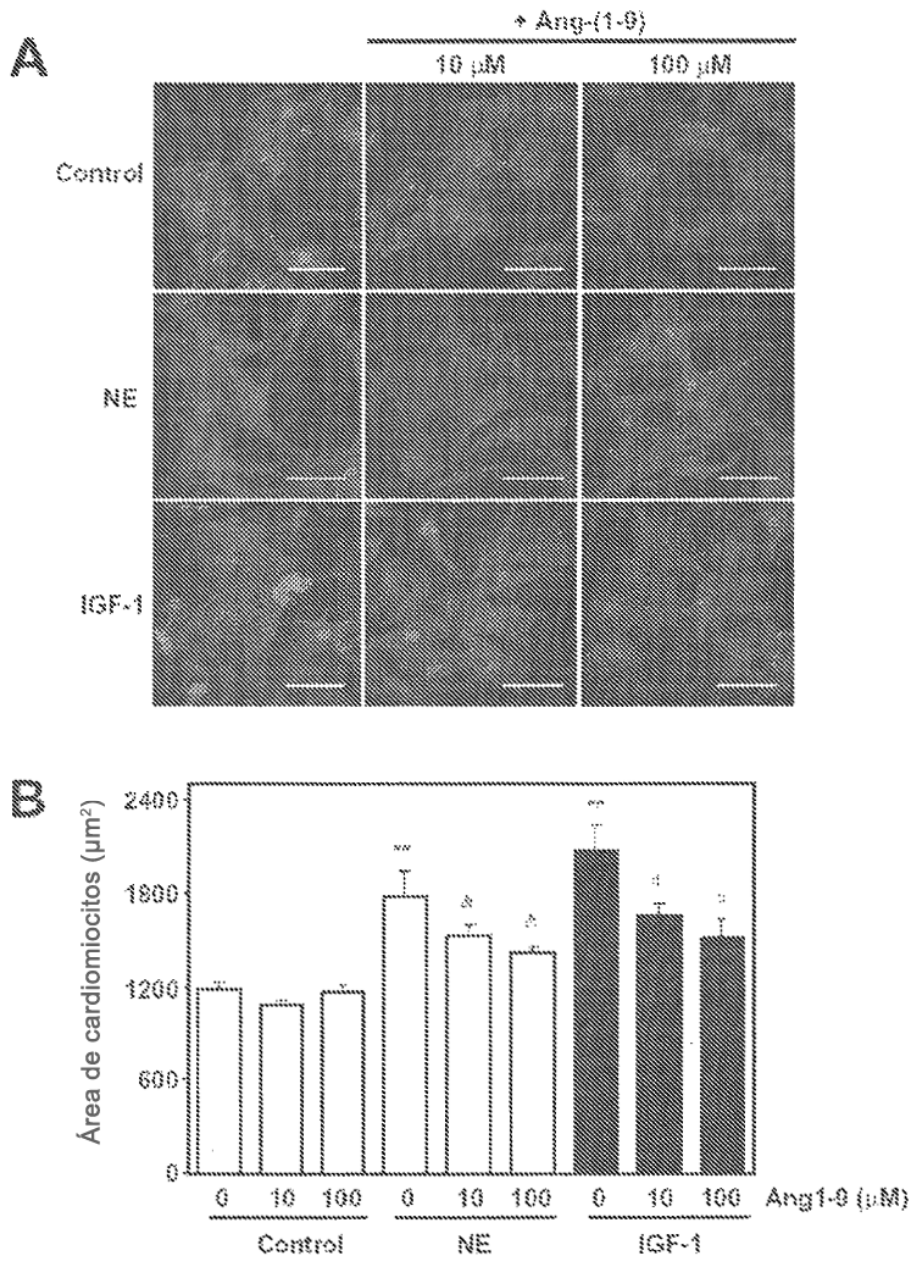


Figura 6