



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 210 562**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/505** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **97937845 .2**  
86 Fecha de presentación : **29.08.1997**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0908182**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.1999**

54 Título: **Preparaciones que sirven para la prevención y el tratamiento de enfermedades provocadas por una hipofunción del óxido nítrico sintasa.**

30 Prioridad: **30.08.1996 JP 8-231103**  
**10.04.1997 JP 9-92213**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.07.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.11.2007**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.11.2007**

73 Titular/es: **ASUBIO PHARMA Co., Ltd.**  
**9-11 Akasaka 2 chome**  
**Minato-ku, Tokyo, JP**

72 Inventor/es: **Ishihara, Takafumi;**  
**Kanayama, Yoshiharu;**  
**Okamura, Mikio;**  
**Yoshikawa, Junichi y**  
**Shintaku, Haruo**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

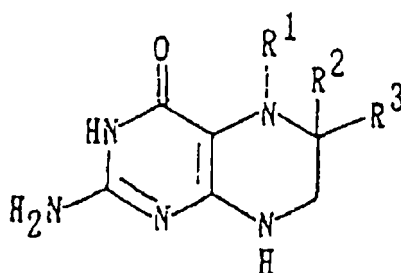
ES 2 210 562 T5

## DESCRIPCIÓN

Preparaciones que sirven para la prevención y el tratamiento de enfermedades provocadas por una hipofunción del óxido nítrico sintasa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar enfermedades asociadas con la disfunción de la NOS, que comprende como ingrediente eficaz, un compuesto de fórmula (I):



25 donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno y R<sup>3</sup> representa (6R)-L-eritro-CH(OH)CH(OH)CH<sub>3</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

**Técnica anterior**

30 Se sabe que el endotelio vascular juega un importante papel en el tono vascular o tromboptosis, y fue en 1.980 cuando se informó por primera vez de la presencia del factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Se demostró que la entidad del EDRF era monóxido de nitrógeno (NO) en 1.987. El NO es producido cuando la L-arginina es oxidada de N<sup>ε</sup>-hidroxil-L-arginina a L-citrulina y la reacción es catalizada por una enzima denominada NO sintasa (NOS). La NOS existe ampliamente en el endotelio vascular, los sistemas nerviosos, los riñones, las plaquetas, los músculos cardíacos, los músculos lisos, etc. y tiene un importante papel en el control de la circulación general debido a que el NO resultante tiene una amplia variedad de acciones. Se conocen las siguientes enfermedades con una disminución de la producción de NO: enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión, la hiperlipemia, la arterioesclerosis, la enfermedad cardíaca isquémica, la insuficiencia cardíaca, la trombosis; las enfermedades respiratorias tales como el asma, las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, la hipertensión pulmonar, ARDS; las enfermedades gastro-intestinales tales como la hepatopatía, la cirrosis hepática, las alteraciones de la mucosa gastrointestinal, la estenosis pilórica hipertrófica, la pancreatitis; las enfermedades cerebrovasculares tales como la isquemia cerebral, el infarto, la insuficiencia cerebrovascular, la demencia senil; las enfermedades renales o urológicas tales como la alteración renal, la impotencia; las enfermedades ginecológicas tales como la toxemia; las enfermedades infecciosas, las alteraciones inmunológicas, la diabetes, las quemaduras; o las enfermedades causadas por fármacos que disminuyen la producción de NO. El gen de la NOS fue clonado y analizado estructuralmente. Como resultado, se encontró que el gen de la NOS contiene un sitio de unión para (6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (referida en adelante como "BH4") incluida en los compuestos de fórmula (I) como ingrediente activo de la presente invención, además de aquellos para coenzimas tales como calmodulina (CaM), flavina, NADPH. Además, se ha sugerido que la BH4 está realmente implicada en el control de la función de la NOS.

50 Por otra parte, se ha informado que la presión sanguínea aumentaba en animales experimentales a los que se había inyectado intravenosamente un inhibidor de NOS (Sakuma I. y col., Circ. Res. 70: 607-611, 1.992). El descenso de la producción endógena de NO también fue referido en un modelo animal de hipertensión tal como ratas con hipertensión por sal DOCA, ratas SHR-SP, ratas Dahl-S, ratas con hipertensión de Goldblatt.

55 INOUE, K. Y COL.: JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 7, Núm. 9, Septiembre de 1.996 (1.996-09), páginas 1534-1535, describen que la tetrahidro-biopterina abroga el desarrollo de la hipertensión por sal DOCA en ratas. Dicho documento es un documento publicado con posterioridad de los autores de la presente invención.

60 Además, PRAST, H. Y COL, BIOLOGY OF NITRIC OXIDE, PROC. INT. MEET., 2ND, vol. 1, 1.992, páginas 10-12 describen los efectos del tratamiento con sepiapterina sobre los niveles de tetrahidrobiopterina y la presión sanguínea en ratas hipertensas por naturaleza.

65 KUZOR, Z. Y COL., PLACENTA, vol. 17, Núm. 1, Enero 1.996, páginas 69-73, hacen referencia de un modo similar a la síntesis de óxido nítrico dependiente de calcio que es estimulada potentemente por tetrahidrobiopterina en placenta primordial humana. Ningún documento proporciona una evidencia directa que muestre los efectos farmacológicos de BH4 sobre las enfermedades asociadas con la disfunción de NOS.

## ES 2 210 562 T5

A partir del artículo de Amoah-Apraku B. y col. en The Journal of the American Society of Nephrology, vol. 5, Núm. 8, 1.995, páginas 1630-1633, se sabe que la guanosin trifosfato ciclohidrolasa regula la síntesis de óxido de nítrico en los túbulos proximales renales.

5 Además, Bune A.J. y col., en Experimental Neurology, vol. 4, Núm. 1, 1.996, páginas 43 a 47 informan que la inhibición de la síntesis de tetrahidrobiopterina reduce la producción de óxido nítrico por los glomérulos aislados en la glomerulonefritis compleja inmune. Esta enfermedad está asociada con un incremento de la actividad de la NOS.

10 Sin embargo, la causa del descenso de producción de NO en estos modelos no ha sido aclarada. También existen numerosos informes de que la producción de NO está bastante intensificada en ratas con hipertensión espontánea (SHR) que se utilizan a menudo como modelos de animales hipertensos (Dominizak AF y col., Hypertension 25: 1202-2111, 1.995). En el caso de las SHR, también se puede suponer que se libera NO en exceso contra la afección hipertensa para disminuir la presión sanguínea pero la acción de NO es insuficiente (Nava E. y col., Circulation 92: I-347, 1.995). Aunque se ha apuntado que el NO puede estar implicado en la etiología de la hipertensión, la  
15 relación entre la actividad de la NOS y la hipertensión no ha sido completamente elucidada todavía. El descenso de la reacción vasodilatadora en la hipertensión también puede estar causado por el descenso de la actividad del factor de hiperdespolarización derivado del endotelio (EDHF) o por un incremento de las cantidades del factor circulante derivado del endotelio (EDCF), cuyas dos identidades se desconocen.

20 Así, la acción vasorrelajante del NO y el control de las funciones de la NOS por BH4 se conocen hasta cierto punto. Sin embargo, la causa del descenso de producción de NO y la relación entre la actividad de la NOS y la hipertensión no han sido elucidadas, y no se sabe nada acerca de la acción antihipertensora de BH4, ni tampoco del papel de BH4 en la regulación de la presión sanguínea.

25 En muchos países industrializados, las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte. Se han utilizado diversos fármacos tales como antihipertensores, agentes antihiperlipémicos, diuréticos, vasodilatadores, antiplaquetas en el tratamiento de las enfermedades. Sin embargo, muchos de ellos están diseñados para mejorar parámetros tales como la presión sanguínea o el nivel de colesterol, pero todavía son poco satisfactorios en la prevención de su aparición, el retraso del deterioro o el progreso y la prognosis a largo plazo de estas enfermedades.  
30 Recientemente, sobre las enfermedades mencionadas antes, investigando a nivel molecular, se ha propuesto una estrategia terapéutica dirigida a los vasos sanguíneos especialmente células endoteliales y se ha presentado como una de las terapias más prometedoras, el tratamiento con un agente que regule la producción de la entidad de EDRF, es decir NO, o un agente que tenga una acción antioxidante. (Gibbons, G.H., Dzau, V.J., Science. Vol. 272, 689-693, 1.996). Sin embargo, todavía no se ha establecido ningún fármaco o terapia que satisfaga esta estrategia terapéutica.

35 Se ha considerado que los agentes de nitrato (preparaciones de nitroglicerina, etc) son eficaces como donadores exógenos de NO para tratar la angina, la insuficiencia cardíaca o similares entre las enfermedades anteriores, pero muestran tolerancia durante el uso a largo plazo. Esto es, los grupos tiol (grupos SH) se agotan durante el uso a largo plazo de los agentes de nitrato, debido a que los grupos SH son indispensables para la producción de NO a partir de estos agentes de nitrato. Por otra parte, el equilibrio de otras sustancias endógenas puede ser alterado durante el uso a largo plazo, debido a que la producción de NO requiere enzimas metabólicas y a que se producen otras sustancias relacionadas con NO tales como nitrosotiol durante la reacción. También ha sido desarrollado un nuevo tipo de donadores de NO con las propiedades de los  $\beta$ -bloqueantes o de los agentes para la apertura del canal de  $K^+$ , pero todavía están en la gama de los donadores de NO anteriormente mencionados. Por lo tanto, se propone que la  
40 mejoría de las funciones de las células endoteliales a través de la regulación de la función de NO endógena es una de las vías terapéuticas más ideales para la prevención de la aparición, el retraso del deterioro o el progreso y la prognosis a largo plazo de estas enfermedades.

45 La producción de NO espontánea *in vivo* o la activación de la NOS parece ser el mejor método terapéutico. Se han examinado los efectos de un sustrato para la NOS, la L-arginina, contra enfermedades tales como la hipertensión (Higashi, Y. y col., Hypertension 1.995, 25, 898-902), la angina (Egashira, K. y col., Circulation 1.996, 94, 130-134), la insuficiencia cardíaca (Rector T.S. y col., Circulation 1.996, 93, 2135-2141) o similares.

50 No obstante, se ha informado que la reacción de vasodilatación dependiente del endotelio y la producción de NO renal eran recuperadas sólo parcialmente mediante la administración a largo plazo de L-arginina (Hayakawa H., Hirata Y., Omata M. y col., Hypertension 1.994: 23: 752-756) en ratas con hipertensión por sal DOCA, un modelo hipertensor bien conocido en el cual la reacción de vasodilatación dependiente del endotelio por acetilcolina y la producción de NO renal basal y mediante la estimulación de receptores de endotelina ( $ET_B$ ) disminuyen (Hirata Y., Hayakawa H., Omata M. y col., Circulation 1.995: 91: 1229-1235). Asimismo se informó que la administración de  
60 L-arginina producía una disminución de la presión sanguínea en pacientes con hipertensión de un modo similar a la gente sana, pero no ocasionaba un incremento del flujo sanguíneo renal ni el descenso del fraccionamiento de la filtración y la resistencia de los vasos renales encontrados en la gente sana, y se observaba un descenso significativo en el GMPc en sangre en pacientes con hipertensión (Higashi Y., Ohshima T., Kajiyama G. y col., Hypertension 1.996: 25: 898-902). Estos hechos sugieren que la producción de NO insuficiente en la circulación renal puede no resultar de la carencia del sustrato L-arginina ni del sólo declinar de la actividad enzimática de la NOS. Por consiguiente, la participación del sistema de L-arginina-NO en el control de la circulación renal y el mecanismo de reducción de la reacción de vasodilatación dependiente del endotelio no puede ser explicada por la utilización insuficiente o la carencia

## ES 2 210 562 T5

del sustrato L-arginina. Por lo tanto, se deberá investigar adicionalmente si el cambio de la actividad o la cantidad de NOS está implicado en estos fenómenos.

5 El propósito de la terapia antihipertensiva es prolongar la vida del paciente en un estado satisfactorio evitando las complicaciones cardiovasculares debidas a la hipertensión. Para este propósito, se debe controlar la presión sanguínea durante un largo período a lo largo de la vida mediante antihipertensores además de las terapias generales tales como la reducción de sal, el alivio de la obesidad por cinetoterapia etc.:

10 Entre los antihipertensores principales utilizados terapéuticamente en la actualidad se incluyen tiazidas,  $\beta$ -bloqueantes, antagonistas del Ca, inhibidores de la enzima conversora de angiotensina (ACE) y  $\alpha_1$ -bloqueantes. No obstante, ninguno de ellos satisface todas las condiciones siguientes deseables para los antihipertensores:

1. Acción suave y efectos estables;
- 15 2. Menos efectos secundarios en la primera fase de su uso;
3. Influencia deseable sobre los sistemas circulatorios y las funciones orgánicas;
4. Sin efectos no deseables sobre los factores perjudiciales para los sistemas cardiovasculares sino más bien mejoría durante el uso a largo plazo;
- 20 5. Mejor conformidad de los pacientes con la terapia;
6. Sin contraindicaciones debidas a diversas complicaciones y síntomas accidentales;
- 25 7. Se puede esperar una vida más satisfactoria como resultado de la terapia.

Los antihipertensores utilizados actualmente tienen los siguientes problemas.

30 Los diuréticos basados en tiazida se aplican favorablemente cuando la limitación de sal es difícil de obedecer o se observa una tendencia a la retención de líquidos, pero no se deben recomendar a pacientes con una tolerancia a la glucosa anómala, hiperuricemia, disfunción renal, hiperlipemia o hipopotasemia.

35 Los  $\beta$ -bloqueantes se aplican favorablemente a pacientes jóvenes o taquicárdicos, pero no están recomendados en pacientes con asma bronquial, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, lesiones obstructivas en arterias periféricas o síntomas de Raynaud. También son inapropiados para pacientes con diabetes hipertensos debido a la influencia sobre la secreción de insulina.

40 Los derivados de dihidropiridina entre los antagonistas del Ca tienen los siguientes efectos secundarios, a saber su acción vasodilatadora puede producir rubor facial y dolor de cabeza, y su potente acción hipotensora puede causar hipotensión, vértigo y taquicardia o palpitación debido a una hipersimpaticotonía refleja.

45 Los inhibidores de la ACE tienen efectos secundarios tales como hipotensión ortostática, tos seca, edema vascular, hiperpotasemia etc. En los casos de disfunción renal, se debe prestar atención a la dosificación y a la hiperpotasemia debido a que son excretados principalmente a partir del riñón. Se ha informado que algunos de ellos producen efectos nocivos sobre el feto, y por lo tanto están contraindicados en mujeres embarazadas.

50 Los  $\alpha_1$ -bloqueantes deben ser aplicados cuidadosamente con el fin de no causar efectos secundarios tales como hipotensión ortostática.

Así, ningún fármaco es completamente satisfactorio en términos de efectos secundarios, seguridad durante el uso a largo plazo y mejoría de QOL en la actualidad, aunque existen muchos agentes antihipertensores con diversas acciones. Además, el objeto primario de la terapia antihipertensora consiste en prevenir el progreso de las alteraciones orgánicas inducidas por la hipertensión y disminuir la incidencia de la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal o la apoplejía cerebral y su mortalidad. La terapia antihipertensora no puede prevenir un aumento del número de pacientes con insuficiencia renal inducida por hipertensión, aunque se ha informado que la terapia antihipertensora mejoraba la mortalidad de la insuficiencia cardíaca y la apoplejía cerebral. En la glomerulonefritis aguda o crónica o similar, la hipertensión es producida por una alteración glomerular. Se sabe que la glomerulonefritis crónica con hipertensión tiene una mala prognosis, y la hipertensión es uno de los factores de exacerbación en el pronóstico independiente en la glomerulonefritis crónica. No obstante, no se ha establecido una terapia para la hipertensión con glomerulonefritis crónica.

65 Por lo tanto, se requieren agentes terapéuticos que proporcionen acciones realmente deseables, y especialmente existe una fuerte demanda para desarrollar agentes que tengan una acción protectora renal.

El compuesto de fórmula (I) como ingrediente eficaz de los agentes terapéuticos de la presente invención, es un compuesto conocido por su uso en agentes terapéuticos. Por ejemplo, remitirse a la Descripción Pública de las Patentes Japonesas (KOKAI) Núms. 25325/84, y 267781/88 (JP63 267 781).

### Compendio de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico seguro para enfermedades asociadas con la disfunción de la NOS que mejore las funciones circulatorias y orgánicas, retrase el progreso de las complicaciones y mejore la calidad de vida de los pacientes evitando la disminución de la producción de NO endógeno y regulando las funciones de las células endoteliales.

Basándose en los resultados de diversos estudios, se supone que el nivel de BH<sub>4</sub> también debería disminuir en las enfermedades asociadas con la disfunción de la NOS. De este modo, se administró BH<sub>4</sub> a ratas con hipertensión por sal DOCA y SHR con sal DOCA para someter a ensayo la hipótesis. Se ha encontrado que el nivel de BH<sub>4</sub> y más sorprendentemente, el nivel de expresión de NOS realmente disminuyen en las ratas con hipertensión por sal DOCA. En la administración de BH<sub>4</sub> se evitaba la disminución de producción de NO endógeno y se obtenían efectos antihipertensores fisiológicamente naturales. Las SHR con sal DOCA también manifestaban realmente una disminución del nivel de BH<sub>4</sub> así como descubrimientos histopatológicos tales como glomerulitis necrotizante y angiitis necrotizante. En la administración de BH<sub>4</sub>, se obtuvieron efectos antihipertensores así como efectos de mejoría notable de dichos descubrimientos histopatológicos regulando las funciones de las células endoteliales. De este modo, la presente invención fue completada basándose en el descubrimiento de que BH<sub>4</sub> tiene una acción que activa la función disminuida de la NOS. Por consiguiente, la presente invención está dirigida a una terapia eficaz con preparaciones de BH<sub>4</sub> para enfermedades asociadas con la disfunción de la NOS.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el cambio de la presión sanguínea en el transcurso del tiempo en un grupo de control (-○-), un grupo con DOCA (-△-) y un grupo de ratas con hipertensión por sal DOCA al que se ha administrado oralmente BH<sub>4</sub> (grupo DOCA + BH<sub>4</sub>, -□-).

La Fig. 2 muestra el cambio de contenido en NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> en la orina en el transcurso del tiempo en un grupo de control (-○-), un grupo con DOCA (-△-) y un grupo de ratas con hipertensión por sal DOCA al que se ha administrado oralmente BH<sub>4</sub> (grupo DOCA + BH<sub>4</sub>, -□-).

La Fig. 3 muestra el cambio de contenido en BP en la orina en el transcurso del tiempo en un grupo de control (-○-), un grupo con DOCA (-△-) y un grupo de ratas con hipertensión por sal DOCA al que se ha administrado oralmente BH<sub>4</sub> (grupo DOCA + BH<sub>4</sub>, -□-).

La Fig. 4 muestra los resultados de la medida de la expresión de ARNm de E-NOS en tejidos renales.

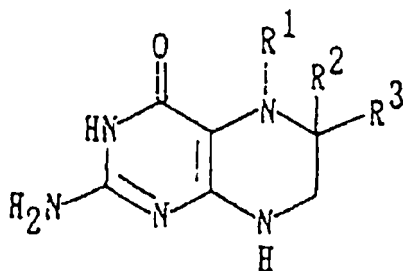
La Fig. 5 muestra el cambio de la presión sanguínea en el transcurso del tiempo en un grupo de control (-●-), un grupo con DOCA (-△-) y un grupo de SHR con sal DOCA al que se ha administrado oralmente BH<sub>4</sub> (grupo DOCA + BH<sub>4</sub>, -□-).

La Fig. 6 muestra el cambio de contenido en BP en la orina en el transcurso del tiempo en un grupo de control (-●-), un grupo con DOCA (-△-) y un grupo de SHR con sal DOCA al que se ha administrado oralmente BH<sub>4</sub> (grupo DOCA + BH<sub>4</sub>, -□-).

La Fig. 7 muestra las incidencias de los descubrimientos histopatológicos en muestras de tejido renal sobre la glomerulitis necrotizante, angiitis necrotizante en un grupo de control, un grupo con DOCA y un grupo con DOCA + BH<sub>4</sub>.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención hace referencia a una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar enfermedades asociadas con la disfunción de la NOS, que comprende como ingrediente eficaz, un compuesto de fórmula (I):



donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno y R<sup>3</sup> representa (6R)-L-eritro-CH(OH)CH(OH)CH<sub>3</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

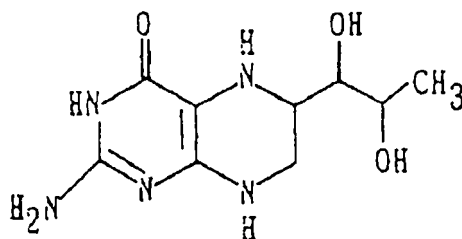
Utilizado aquí, la disfunción de la NOS significa que la expresión de NOS, que existe ampliamente en el endotelio vascular, los sistemas nerviosos, el riñón, las plaquetas, el miocardio, la musculatura lisa u otros órganos, se ha reducido por alguna razón o la actividad de la NOS no se manifiesta por una disfunción de estas células incluso si es expresada. Un ejemplo típico de disfunción de la NOS es un descenso del nivel de NO endógeno. Entre las enfermedades asociadas con la disfunción de la NOS se incluyen aquellas inducidas, deterioradas o cuya cura está impedida por una disfunción de la NOS, tales como la hipertensión, la hiperlipemia, la arterioesclerosis, el vasoespasmo coronario, las enfermedades cardíacas isquémicas, la insuficiencia cardíaca, la trombosis, la hipertensión pulmonar, la insuficiencia cerebrovascular, el vasoespasmo cerebral, la glomerulonefritis, la insuficiencia renal crónica, la diabetes, la restenosis postoperatoria, la acalasia, la hipertensión portal, las alteraciones hepáticas, las alteraciones de la mucosa gastrointestinal, la estenosis pilórica hipertrófica, la enteritis, la impotencia, la coriorretinopatía, etc.

Cuando se administra a pacientes con estas enfermedades, BH4 puede evitar o tratar estas enfermedades normalizando las funciones de la NOS por medio del efecto estimulador de la producción de NOS *in vivo* o a través de la restauración de la función disminuida de las células endoteliales.

Por consiguiente, la presente invención se aplica para tratar o prevenir enfermedades que pueden ser tratadas mediante la acción estimuladora de BH4 para activar la función de la NOS.

El compuesto de fórmula (I) como ingrediente eficaz de la presente invención incluyen es el siguientes y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

(6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4)



El compuesto de fórmula (I) utilizado como ingrediente eficaz en la presente invención es el compuesto conocido. Por ejemplo, remitiéndose a las Descripción Pública de las Patentes Japonesas (KOKAI) Núms. 25323/84, y 267781/88 (JP 6326778). El compuesto puede ser utilizado como sales apropiadas con ácidos farmacológicamente no tóxicos, incluyendo ácidos minerales tales como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido bórico; y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fórmico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido mesílico.

Una composición farmacéutica de la presente invención es eficaz contra las enfermedades anteriormente mencionadas asociada con la disfunción de la NOS. Por ejemplo, es eficaz contra la hipertensión incluyendo no sólo la hipertensión esencial sino también la hipertensión maligna con necrosis de las paredes arteriolares en el riñón y la retina que se producen en un corto período, y la hipertensión renal acompañada de alteración renal. Esto es, es eficaz contra todas las clases de hipertensión tales como la hipertensión esencial, la hipertensión renal, la hipertensión renovascular, la hipertensión inducida por el embarazo, la hipertensión senil o la hipertensión adrenal, en tanto este asociado con la disfunción de la NOS.

Una composición farmacéutica de la presente invención se prepara formulando un compuesto de fórmula (I) con portadores utilizados normalmente mediante procedimientos convencionales en una forma de dosificación adecuada para la administración oral, rectal o parenteral (incluyendo la administración en vena y fluido cerebroespinal).

Entre los portadores utilizados para estas formulaciones farmacéuticas se incluyen excipientes, aglutinantes, disgregantes, etc. dependiendo de la forma de dosificación elegida.

Entre los ejemplos típicos de excipientes se incluyen almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y celulosa, y entre los ejemplos de los aglutinantes se incluyen polivinilpirrolidona, almidón, sacarosa, hidroxipropilcelulosa, goma arábiga. Entre los ejemplos de los disgregantes se incluyen almidón, gelatina, agar, polvo de gelatina, celulosa, CMC, pero también se puede utilizar cualquier otro excipiente, aglutinante y disgregante convencional.

Además de semejantes portadores, la composición farmacéutica de la presente invención también puede contener antioxidantes para estabilizar los ingredientes eficaces. Los antioxidantes pueden ser apropiadamente seleccionados entre los utilizados convencionalmente para las preparaciones farmacéuticas, tales como ácido ascórbico, N-acetilcisteína, L-cisteína, dl- $\alpha$ -tocoferol, tocoferol natural etc. Estos se utilizan en una cantidad que estabiliza el ingrediente activo y generalmente, la razón de antioxidante está entre 0,2 y 2,0 partes en peso con respecto a 1 parte del ingrediente activo.

## ES 2 210 562 T5

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden ser proporcionadas en forma de tabletas, tabletas sublinguales, cápsulas, polvos, gránulos o gránulos finos, o suspensiones en un líquido no acuoso tal como un jarabe, emulsión o poción (preparación pro re nata) que contienen la cantidad prescrita del ingrediente activo.

Por ejemplo, los gránulos se preparan mezclando homogéneamente el ingrediente activo con uno o más ingredientes coadyuvantes tales como los portadores y antioxidantes mencionados antes, seguido de granulación y tamizado para uniformar el tamaño del grano. Las tabletas pueden ser preparadas comprimiendo o moldeando el ingrediente activo opcionalmente junto con uno o más ingredientes coadyuvantes. Las cápsulas son preparadas cargando el polvo o los gránulos de ingrediente activo opcionalmente mezclados homogéneamente con ingredientes coadyuvantes (uno o más) en cápsulas apropiadas utilizando una máquina para rellenar cápsulas o similar. Las formulaciones para la administración rectal pueden ser proporcionadas en forma de supositorios utilizando portadores convencionales tales como manteca de cacao. Las formulaciones parenterales pueden ser proporcionadas en forma de sólidos secos de ingrediente activo sellados en contenedores esterilizados cargados con nitrógeno. Semejantes preparaciones sólidas secas pueden ser administradas a los pacientes después de dispersarlas o disolverlas en una cantidad determinada de agua esterilizada justo antes de la administración.

Al fabricar estas formulaciones, se pueden añadir preferiblemente los antioxidantes mencionados antes a una mezcla del ingrediente eficaz y los portadores convencionales, y opcionalmente también se pueden añadir uno o más ingredientes coadyuvantes seleccionados entre tampones, aromas, tensioactivos, agentes para conferir viscosidad, lubricantes, etc., si fuera necesario.

La dosificación de los ingredientes activos, es decir el compuesto de fórmula (I) puede variar con la ruta de administración, los síntomas que se vayan a tratar y el estado del paciente, y la determinación final de la dosis deberá ser realizada por el médico que atienda.

Por ejemplo, una dosificación apropiada para tratar la hipertensión oscila entre 0,1 y 50 mg/kg (de peso corporal)/día, y la dosis óptima representativa es de 0,5 a 10 mg/kg (de peso corporal)/día.

Una dosificación deseada de dichos ingredientes activos puede ser administrada una vez al día o en dosis divididas de dos a cuatro veces la día a un intervalo apropiado.

El ingrediente activo puede ser administrado solo o combinado con formulaciones farmacéuticas que contienen otros ingredientes activos adecuados para la enfermedad en tratamiento para facilitar el control de la dosificación, por ejemplo.

Además del compuesto de fórmula (I) como ingrediente activo eficaz, las formulaciones de la presente invención pueden contener al menos un ingrediente eficaz coadyuvante seleccionado entre los sustratos o la coenzima o el cofactor de NOS tales como L-arginin-flavinas, por ejemplo, FAD, FMN, etc., o calcio. Se pueden esperar unos efectos terapéuticos mucho mejores cuando el compuesto de la fórmula (I) se mezcla con estos ingredientes eficaces que cuando se utilizan solos. La proporción de cada uno de los ingredientes eficaces coadyuvantes mencionados en las formulaciones de la presente invención no está específicamente limitada. Por ejemplo, la razón en peso de al menos uno seleccionado entre L-arginina, flavinas y calcio con respecto a una parte de los compuestos de fórmula (I) puede estar en el intervalo de 0,1 a 10, preferiblemente de 0,5 a 2.

Por ejemplo, una dosificación apropiada de semejantes formulaciones mixtas para tratar la hipertensión oscila entre 0,1 y 50 mg/kg (de peso corporal)/día, preferiblemente 0,5 a 10 mg/kg (de peso corporal)/día en términos de la cantidad total de ingredientes activos.

Un físico puede elegir apropiadamente formulaciones que contengan el compuesto de fórmula (I) solos o combinados con otros ingredientes activos, dependiendo de la edad, el estado, u otros factores del paciente.

El ingrediente activo utilizado en la presente invención es (6R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) y las sales de la misma. No es necesario decir que BH4, el componente de origen natural es el más preferible. El dihidrocloruro de BH4 tiene una baja toxicidad para las ratas a juzgar por el hecho de que la toxicidad aguda fuera de más de 2 g/kg (de peso corporal). Ópticamente inactivo, la (6R,S)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina es asimismo sólo ligeramente tóxica como se informa en la Descripción Pública de la Patente Japonesa Núm. 25323/84 para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, de manera que puede ser utilizada según la presente invención. Los siguientes ejemplos explican adicionalmente la presente invención con detalle, pero la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### *Gránulos y gránulos finos*

A una parte (en peso) de polivinilpirrolidona (Kollidon 30) disuelta en agua purificada estéril se añadieron 10 partes de ácido ascórbico y 5 partes de hidrocloreuro de L-cisteína para dar una solución homogénea, y después se añadieron 10 partes de dihidrocloruro de BH4 para preparar una solución homogénea.

## ES 2 210 562 T5

Esta solución se añadió a 59 partes de un excipiente (manitol o lactosa) y 15 partes de un disgregante [almidón de maíz o hidroxipropilcelulosa (LH-22)], y la mezcla se amasó, se granuló, se secó, después se tamizó.

### Ejemplo 2

5

#### *Tabletas*

La solución homogénea del ingrediente activo preparada en el Ejemplo 1 se mezcló con 58 partes de lactosa y 15 partes de celulosa microcristalina, después con 1 parte de estearato de magnesio y se formaron tabletas.

10

### Ejemplo 3

#### *Cápsulas*

15

La forma de dosificación preparada en el Ejemplo 1 se cargó en cápsulas, en las que la formulación incluía el 0,2% de estearato de magnesio como lubricante.

### Ejemplo 4

20

#### *Inyectable*

25

Dihidrocloruro de BH4	1,5 g
Ácido ascórbico	1,5 g
Hidrocloruro de L-cisteína	0,5 g
Manitol	6,5 g

30

### Ejemplo 5

#### *Inyectable*

35

Se disolvieron 2,0 g de dihidrocloruro de BH4 en agua purificada estéril para completar 100 ml en una atmósfera anaerobia y después se esterilizaron y se sellaron de la misma manera que en el Ejemplo 4.

### Ejemplo 6

40

#### *Supositorios*

45

Dihidrocloruro de BH4	150 partes
Ácido ascórbico	150 partes
Hidrocloruro de L-cisteína	50 partes

Los ingredientes anteriores fueron molidos homogéneamente y dispersados en 9.950 partes de manteca de cacao.

### Ejemplo 7

50

#### *Gránulos*

55

Dihidrocloruro de BH4	5 partes
Ácido ascórbico	5 partes
Hidrocloruro de L-cisteína	2 partes

Los ingredientes anteriores fueron utilizados para preparar una solución homogénea.

60

Esta solución fue añadida a una mezcla homogénea de 55 partes de manitol, 1 partes de polivinilpirrolidona, 14 partes de hidroxipropilcelulosa y 5 partes de L-arginina o calcio, y la mezcla se amasó, se granuló, se secó, después se tamizó.

65

## ES 2 210 562 T5

### Ejemplo 8

#### *Gránulos*

5	Dihidrocloruro de BH4	5 partes
	Ácido ascórbico	5 partes
	Hidrocloruro de L-cisteína	5 partes
	Manitol	52 partes
10	Polivinilpirrolidona (Kollidon 30)	1 parte
	Hidroxipropilcelulosa (LH-22)	12 partes
	L-arginina o calcio	10 partes

15 Los ingredientes anteriores se granularon y se tamizaron de la misma manera que en el Ejemplo 7.

### Ejemplo 9

#### *Gránulos*

20	Dihidrocloruro de BH4	5 partes
	Ácido ascórbico	5 partes
	Hidrocloruro de L-cisteína	2 partes

25 Los ingredientes anteriores se utilizaron para preparar una solución homogénea.

Esta solución se añadió a una mezcla homogénea de 10 partes de L-arginina o calcio, 50 partes de manitol, 1 parte de polivinilpirrolidona (Kollidon 30) y 9 partes de hidroxipropilcelulosa (LH-22), y la mezcla se amasó, se granuló, se secó, después se tamizó.

### 30 Ejemplo 10

#### *Preparación de ratas con hipertensión por sal DOCA*

35 Se separó un riñón de cada una de las ratas Sprague-Dawley de 8 semanas de edad (suministradas por Charles River) excepto para un grupo de control. Después, los animales fueron divididos en los siguientes tres grupos experimentales.

1) Un grupo al que se administraba sólo agua de bebida (grupo de control); tamaño de la muestra n = 3;

40 2) Un grupo de ratas con hipertensión por sal DOCA preparado administrando 30 mg/kg de peso corporal de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) subcutáneamente una vez a la semana y solución salina al 1% en forma de agua de bebida a partir de una semana después de la nefrectomía (grupo DOCA); n = 6;

45 3) Un grupo de ratas con hipertensión por DOCA al que se ha administrado BH4 (10 mg/kg de peso corporal/día) oralmente (grupo DOCA + BH4); n = 5.

50 Se recogió orina durante 24 horas utilizando una jaula metabólica al principio del experimento y al cabo de 2, 4 y 5 semanas (al terminar el período de observación). Al terminar el período de observación, se recogió una muestra de sangre de la aorta abdominal con anestesia de Phenobarbital. El riñón fue aislado tras perfundir con solución salina fisiológica, y se examinó histológicamente e inmunohistológicamente.

#### *Medida de la presión sanguínea*

55 Se midió la presión sanguínea mediante el método de los golpecitos en la cola al inicio del experimento y a las 2, 4 y 5 semanas.

#### *Medida de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> en orina*

60 La medida se llevó a cabo utilizando el estuche de análisis Nitrato-Nitrito, (estuche Núm. 780001, Cyman Chemical Company) según el método de Griess. Los valores de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> en orina representan la actividad de NOS, es decir, a mayor valor, mayor actividad.

#### *Medida de BP en orina*

65 La biopterina (BP), un metabolito de BH4, fue medido mediante una HPLC según el procedimiento de Fukushima y Nixon (Anal. Biochem. 102: 176-188, 1.980). Los efectos de la administración de BH4 son evaluados basándose en el cambio de nivel de BP en orina.

*Inmunotinción de NOS en tejido renal*

Se examinó la expresión de la NOS endotelial (e-NOS) y la NOS cerebral (b-NOS) en tejidos renales en secciones de tejidos renales congeladas aisladas mediante inmunotinción con anticuerpos anti-e-NOS y anti-b-NOS (Affinity Bioreagents), respectivamente.

*Medida de la expresión de ARNm de NOS*a) *Extracción de ARN completo a partir de tejidos renales*

La extracción de ARN de los tejidos renales se realizó mediante el método de extracción con guanidinio/cloruro de cesio.

Es decir, se añadió inmediatamente una pequeña cantidad de los tejidos recogidos de la corteza renal del riñón aislado a una solución de lisis de tiocianato de guanidinio 4M y se homogeneizó mediante un homogeneizador de vidrio/Teflon. Se aplicó una capa de este producto lisado sobre cloruro de cesio y se centrifugó a 80.000 rpm durante 2 horas, después el producto precipitado se disolvió en una solución de pirocarbonato de dietilo (DEP) al 0,1%. Esta solución se precipitó con acetato de amonio 2,5M y etanol a -20°C durante una hora y se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 20 minutos para dar un producto precipitado. El producto precipitado se disolvió en una solución de DEP al 0,1% a una concentración de aproximadamente 1 µg/µl y se almacenó a -20°C antes de su uso.

b) *Reacción de la transcriptasa inversa (RT)*

Se sintetizó ADNc a partir del ARN total utilizando la transcriptasa inversa MoMLV.

En resumen, una mezcla de ARN total, cebadores, tampón y H<sub>2</sub>O se calentó a 95°C durante 2 minutos y después se enfrió con hielo. Después, la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos para recoger los cebadores con el ARN. Después, se añadieron a la mezcla una solución que contenía, ditiotreitól (DTT) 0,2 M, y desoxirribonucleótido 5 mM (dNTP), ARNsina, y transcriptasa inversa MoMLV. La mezcla resultante se calentó a 90°C durante 5 minutos y la reacción se detuvo enfriando con hielo.

c) *PCR*

Se realizó la PCR utilizando como molde el ADNc sintetizado mediante la reacción RT.

Específicamente, la solución de reacción de la RT se añadió a una mezcla de cebadores 5' y 3' para cada e-NOS que iba a ser detectada y para la malato deshidrogenasa (MDH) utilizada como patrón interno, tampón para PCR, solución mixta de dNTP 2,5 mM y ADN polimerasa Taq. La mezcla de reacción se cubrió con aceite mineral y se centrifugó, después de lo cual la reacción se inició en un aparato para PCR automático. Los productos de la PCR fueron obtenidos estableciendo 30 ciclos en los que cada ciclo constaba de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Los cebadores utilizados para la detección de e-NOS y MDH fueron seleccionados basándose en el informe de Ujiiie. K. y col., Am. J. Physiol. 267 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 36): F296-F302. 1.994. Específicamente, las secuencias de bases de los cebadores utilizados para la detección de e-NOS eran TACG-GAGCAGCAAATCCAC (SEC ID NUM: 1) para el cebador 5' y CAGGCTGCAGTCCTTTGATC (SEC ID NUM: 2) para el cebador 3'. Las secuencias de bases de los cebadores utilizados para la detección de MDH eran CAAGAAG CATGGCGTATACAAACCC (SEC ID NUM: 3) para el cebador 5' y TTTCAGCTCAGGGATGGCCTCG (SEC ID NUM: 4) para el cebador 3'.

d) *Medida de la expresión del ARNm de NOS mediante electroforesis en gel de poliacrilamida e hibridación Southern*

Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 5% y se midió la expresión de ARNm de NOS mediante hibridación Southern.

Específicamente, la solución de reacción de la PCR fue sometida a electroforesis sobre poliacrilamida al 5% y después, el gel fue transferido a filtros de membrana. La hibridación fue realizada sobre filtros de membrana utilizando sondas marcadas con ATP-P<sup>32</sup>γ en el cebador 5' para la detección de e-NOS y MDH (Ujiiie, K. y col., 1.994, supra). La secuencia de bases de la sonda era CTGGAACAATTTCCATCCG (SEC ID NUM: 5) para la detección de e-NOS y TTTGTCTTCTCCCTGGTGGGA (SEC ID NUM: 6) para la detección de MDH. Después, se realizó la autorradiografía a -70°C durante varias horas y los autorradiogramas expuestos fueron analizados mediante un densitómetro. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

Basándose en los resultados de la autorradiografía, se normalizó la cantidad de los productos de la PCR de e-NOS frente a los productos de la PCR de MDH del gen "housekeeping" para semicuantificar la expresión del gen e-NOS.

## ES 2 210 562 T5

### Estadística

Los valores medidos fueron expresados como las medias  $\pm$  el error estándar y se evaluaron estadísticamente utilizando el ensayo ANOVA de dos vías. En los siguientes análisis, el nivel de significación se ajustó a  $p < 0,05$ .

El cambio de presión sanguínea se muestra en la Tabla 1 y en la Fig. 1. El grupo con DOCA desarrolló hipertensión a las 4 semanas del inicio de la observación. El aumento de la presión sanguínea en el grupo con DOCA era significativo en comparación con los otros dos grupos. Sin embargo, el grupo con DOCA + BH4 permanecía a presiones sanguíneas normales de un modo similar al grupo de control hasta la terminación del período de observación.

TABLA 1

*Presión sanguínea (mmHg)*

	<u>Inicio</u>	<u>Semana 2</u>	<u>Semana 4</u>	<u>Semana 5</u>
Grupo de control	101,38 ( $\pm 7,12$ )	102,85 ( $\pm 11,07$ )	91,77 ( $\pm 7,88$ )	111,70 ( $\pm 10,10$ )
Grupo DOCA	107,03 ( $\pm 2,04$ )	137,53 ( $\pm 4,63$ )	153,53 ( $\pm 7,71$ )	150,68 ( $\pm 3,35$ )
Grupo DOCA + BH4	105,72 ( $\pm 5,63$ )	120,54 ( $\pm 6,57$ )	111,91 ( $\pm 7,52$ )	107,78 ( $\pm 7,93$ )

El cambio de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  en orina se muestra en la Tabla 2 y en la Fig. 2. En el grupo con DOCA, el valor de  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  en orina disminuía con el tiempo y caía por debajo de la sensibilidad de la medida al terminar el período de observación. Sin embargo, el grupo con DOCA + BH4 mostraba un incremento del valor. El descenso en el grupo con DOCA era significativo en comparación con los otros dos grupos, y no se encontró una diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo con DOCA + BH4.

TABLA 2

*$\text{NO}_2/\text{NO}_3$  en orina (mmoles/día)*

	<u>Inicio</u>	<u>Semana 2</u>	<u>Semana 4</u>	<u>Semana 5</u>
Grupo de control	2,91 $\pm$ 0,09		1,51 $\pm$ 0,79	4,54 $\pm$ 0,32
Grupo DOCA	3,11 $\pm$ 1,09		0,34 $\pm$ 0,34	por debajo del límite de detección
Grupo DOCA + BH4	2,22 $\pm$ 0,70		2,00 $\pm$ 0,55	5,95 $\pm$ 1,90

El cambio de BP en orina se muestra en la Tabla 3 y en la Fig. 3. En el grupo con DOCA, el valor de BP disminuía con el tiempo. Sin embargo, el grupo con DOCA + BH4 mostraba un incremento en el valor de BP con el tiempo. La disminución en el grupo con DOCA era significativa en comparación con los otros grupos, y no se encontró una diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo con DOCA + BH4.

## ES 2 210 562 T5

TABLA 3

*BP en orina (nmoles/día)*

	<u>Inicio</u>	<u>Semana 2</u>	<u>Semana 4</u>	<u>Semana 5</u>
5 Grupo de control	26,76±3,01	21,71±0,61	27,79±2,03	34,96±0,96
10 Grupo con DOCA	23,77±0,77	19,49±2,52	15,93±3,46	19,25±1,96
15 Grupo con DOCA+BH4	21,87±0,60	35,58±3,74	52,60±13,13	34,26±4,08

Como se muestra en la Tabla 4, el peso corporal aumentaba con el tiempo en todos los grupos y no se encontraba una diferencia significativa entre los tres grupos.

TABLA 4

*Peso corporal (g)*

	<u>Inicio</u>	<u>Semana 2</u>	<u>Semana 4</u>	<u>Semana 5</u>
25 Grupo de control	390,67±18,49	433,33±21,49	456,00±21,63	458,00±20,43
30 Grupo con DOCA	376,00±3,69	399,67±19,44	430,33±20,08	435,67±23,34
35 Grupo con DOCA + BH4	383,40±10,83	386,40±12,84	431,20±13,31	446,80±15,81

Los resultados de la inmunotinción mostraban que la expresión de e-NOS en los vasos pequeños y la expresión de b-NOS en la mácula densa disminuían en el grupo con DOCA mientras estas expresiones en el grupo con DOCA +BH4 eran comparables con el grupo de control o se intensificaban ligeramente.

### *Resultados de la medida de la expresión de ARNm de NOS*

Como se muestra en la Figura 4, los resultados de la medida revelaban que la expresión de del ARNm de e-NOS resultaba significativamente intensificada en el grupo con DOCA + BH4 en comparación con el grupo con DOCA.

Como se ha descrito antes, las ratas con hipertensión por sal DOCA manifestaban un incremento en la presión sanguínea, un descenso en NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> en orina y una disminución en la expresión de NOS en los tejidos renales, indicando que en este modelo de ratas se producía una disfunción de las células vasoendoteliales. En este modelo de ratas también se observaba un descenso de BP en orina. Por otra parte, la administración oral de BH4 suprimía el aumento de presión sanguínea y conducía a un incremento de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> en orina y un incremento de la expresión de NOS en los tejidos renales, indicando que BH4 es útil para el tratamiento de las enfermedades causadas por una disminución de la producción endógena de NOS por medio de la activación de la función de NOS (a través de la regulación del nivel de NOS/actividad de NOS).

## ES 2 210 562 T5

### Ejemplo 11

#### *Preparación de SHR por sal DOCA*

5 Se separó un riñón de SHR de 8 semanas de edad (suministradas por Charles River) excepto para un grupo de control. Después, los animales fueron divididos en los siguientes tres grupos experimentales.

1) Un grupo al que se administraba agua de bebida solamente (grupo de control); tamaño de la muestra  $n = 8$ );

10 2) Un grupo de SHR con sal DOCA preparado administrando 30 mg/kg de peso corporal de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) subcutáneamente una vez a la semana y solución salina al 1% en forma de agua de bebida a partir de una semana después de la nefrectomía (grupo con DOCA);  $n = 4$ ;

15 3) Un grupo de SHR con sal DOCA al que se ha administrado BH4 (10 mg/kg de peso corporal/día) oralmente (grupo con DOCA + BH4);  $n = 6$ .

20 Se recogió la orina durante 24 horas utilizando una jaula metabólica al inicio del experimento y al cabo de 2, 3, 4, 5 y 6 (al terminar el período de observación) semanas. Al terminar el período de observación, se recogió una muestra de sangre de la aorta abdominal bajo anestesia con Phenobarbital. El riñón fue aislado tras la reperfusión con solución salina fisiológica, y fue examinado histológicamente.

#### *Medida de la presión sanguínea*

25 Se midió la presión sanguínea mediante el método de los golpecitos en la cola al inicio de los experimentos y a las 2, 3, 4, 5 y 6 semanas.

#### *Medida de BP en orina*

30 La biopterina (BP), un metabolito de BH4, fue medido mediante una HPLC según el procedimiento de Fukushima y Nixon. Los efectos de la administración de BH4 son evaluados basándose en el cambio de nivel de BP en orina.

#### *Descubrimientos histopatológicos*

35 Tras recoger la orina y medir la presión sanguínea a la 6 semanas, se realizó una incisión en los animales bajo anestesia, se desangraron a partir de la aorta abdominal y se sometieron a perfusión con solución salina fisiológica por esta vía. El riñón aislado fue fijado en una solución de formaldehído al 10%, embebido en parafina, después cortado en rodajas con un grosor de 4  $\mu\text{m}$  por medio de un microtomo. Las muestras fueron teñidas con hematoxilina/eosina (HE) y ácido de Shiff periódico. Se compararon las incidencias de los descubrimientos histopatológicos sobre la glomerulitis necrotizante y la arteriolitis necrotizante entre los grupos.

#### *Estadística*

45 Los valores de las medidas fueron expresados como las medias  $\pm$  el error estándar y se evaluaron estadísticamente utilizando el ensayo ANOVA de dos vías. En los siguientes análisis, el nivel de significación se ajusta a  $p < 0,05$ .

El cambio de presión sanguínea se muestra en la Tabla 5 y en la Fig. 5. El grupo con DOCA desarrolló una hipertensión notable a las 3 semanas del inicio de la observación. El aumento de la presión sanguínea en el grupo con DOCA era significativo en comparación con los otros dos grupos. Sin embargo, el grupo con DOCA + BH4 mostraba el mismo nivel de presión sanguínea que el grupo de control hasta la terminación del período de observación.

50

TABLA 5

*Presión sanguínea (mmHg)*

	<u>Inicio</u>	<u>Semana 2</u>	<u>Semana 3</u>	<u>Semana 4</u>	<u>Semana 5</u>	<u>Semana 6</u>
55 Grupo de control	129,44 ( $\pm 2,20$ )	119,44 ( $\pm 2,97$ )	143,83 ( $\pm 0,62$ )	151,20 ( $\pm 0,90$ )	158,01 ( $\pm 1,63$ )	161,91 ( $\pm 4,20$ )
60 Grupo con DOCA	132,00 ( $\pm 5,18$ )	132,88 ( $\pm 3,88$ )	162,28 ( $\pm 1,87$ )	169,83 ( $\pm 2,57$ )	182,98 ( $\pm 2,04$ )	178,10 ( $\pm 9,85$ )
65 Grupo con DOCA + BH4	130,22 ( $\pm 3,75$ )	133,60 ( $\pm 2,05$ )	143,63 ( $\pm 0,85$ )	150,90 ( $\pm 0,94$ )	159,30 ( $\pm 2,84$ )	162,95 ( $\pm 1,52$ )

## ES 2 210 562 T5

El cambio de BP en orina se muestra en la Tabla 6 y en la Fig. 6. En el grupo con DOCA, el valor de BP disminuía con el tiempo. Sin embargo, el grupo con DOCA + BH4 mostraba un incremento en el valor de BP con el tiempo. La disminución en el grupo con DOCA era significativa en comparación con los otros dos grupos, y no se encontró una diferencia significativa entre el grupo de control y el grupo con DOCA y BH4.

TABLA 6

*BP en orina (nmoles/día)*

	<u>Inicio</u>	<u>Semana 4</u>	<u>Semana 6</u>
Grupo de control	22,91±1,53	25,13±1,23	43,07±7,24
Grupo con DOCA	17,87±1,65	3,18±2,14	16,33±5,77
Grupo con DOCA+BH4	24,26±1,58	45,21±10,31	71,78±32,08

Las incidencias de los descubrimientos histopatológicos en las muestras de tejido renal se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 7. El grupo con DOCA mostraba incidencias significativamente superiores de glomerulitis necrotizante y angiitis necrotizante en comparación con los otros dos grupos.

TABLA 7

*Porcentaje (%) de incidencias de los descubrimientos histopatológicos en tejidos renales*

	<u>Glomerulitis Necrotizante</u>	<u>Angiitis Necrotizante</u>
Grupo de control	0,06±0,06	0,00±0,00
Grupo con DOCA	10,78±0,77	9,03±1,65
Grupo con DOCA+BH4	2,47±1,07	3,34±0,94

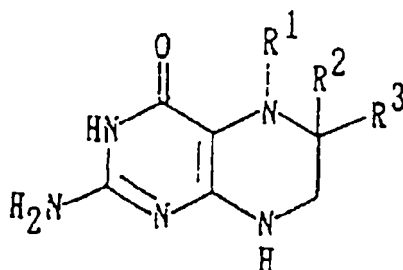
Como se ha descrito antes, las SHR por sal DOCA manifestaban una subida de la presión sanguínea y los descubrimientos histopatológicos de la glomerulitis necrotizante o la angiitis necrotizante. Asimismo también se observó un descenso de BP en este modelo de ratas. Por otra parte, la administración oral de BH4 suprimía la subida de la presión sanguínea y mejoraba notablemente los descubrimientos histopatológicos, indicando que BH4 es útil para el tratamiento de las enfermedades asociadas con la disfunción de las células endoteliales a través de la activación de la función de NOS.

Como se ha explicado, la presente invención proporciona un agente de composición farmacéutica que evitan y/o alivian eficazmente las enfermedades asociadas con la disfunción de la NOS. Además, el ingrediente activo del agente terapéutico de la presente invención no tienen efectos adversos o similares sobre el uso a largo plazo debido a que es una sustancia que existe inherentemente *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto de fórmula (I):

5



10

15

donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno y R<sup>3</sup> representa (6R)-L-eritro-CH(OH)CH(OH)CH<sub>3</sub>,

20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar enfermedades asociadas con la disfunción de la NOS.

2. El uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad asociada con la disfunción de la NOS es una enfermedad acompañada por un descenso de la producción de NO endógeno.

25

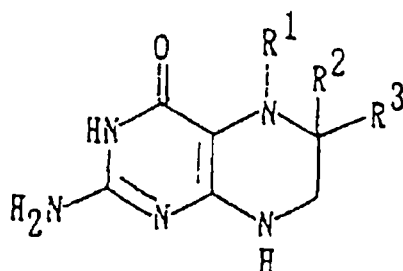
3. El uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad asociada con la disfunción de la NOS es una enfermedad acompañada por la disfunción de las células endoteliales.

4. El uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad asociada con la disfunción de la NOS está asociada con una disminución de la expresión de la NOS.

30

5. El uso del compuesto de fórmula (I):

35



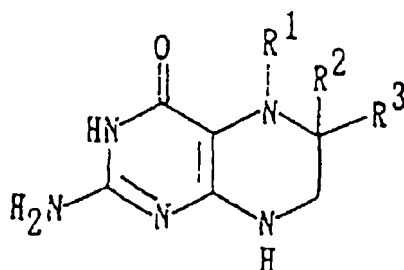
40

45

donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno y R<sup>3</sup> representa (6R)-L-eritro-CH(OH)CH(OH)CH<sub>3</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la preparación de un agente profiláctico o terapéutico para la hipertensión, asociado con la disfunción de la NOS.

6. El uso del compuesto de fórmula (I):

50



55

60

donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno y R<sup>3</sup> representa (6R)-L-eritro-CH(OH)CH(OH)CH<sub>3</sub>, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la preparación de un agente profiláctico o terapéutico para las alteraciones renales, asociado con la disfunción de la NOS.

65

Fig. 1

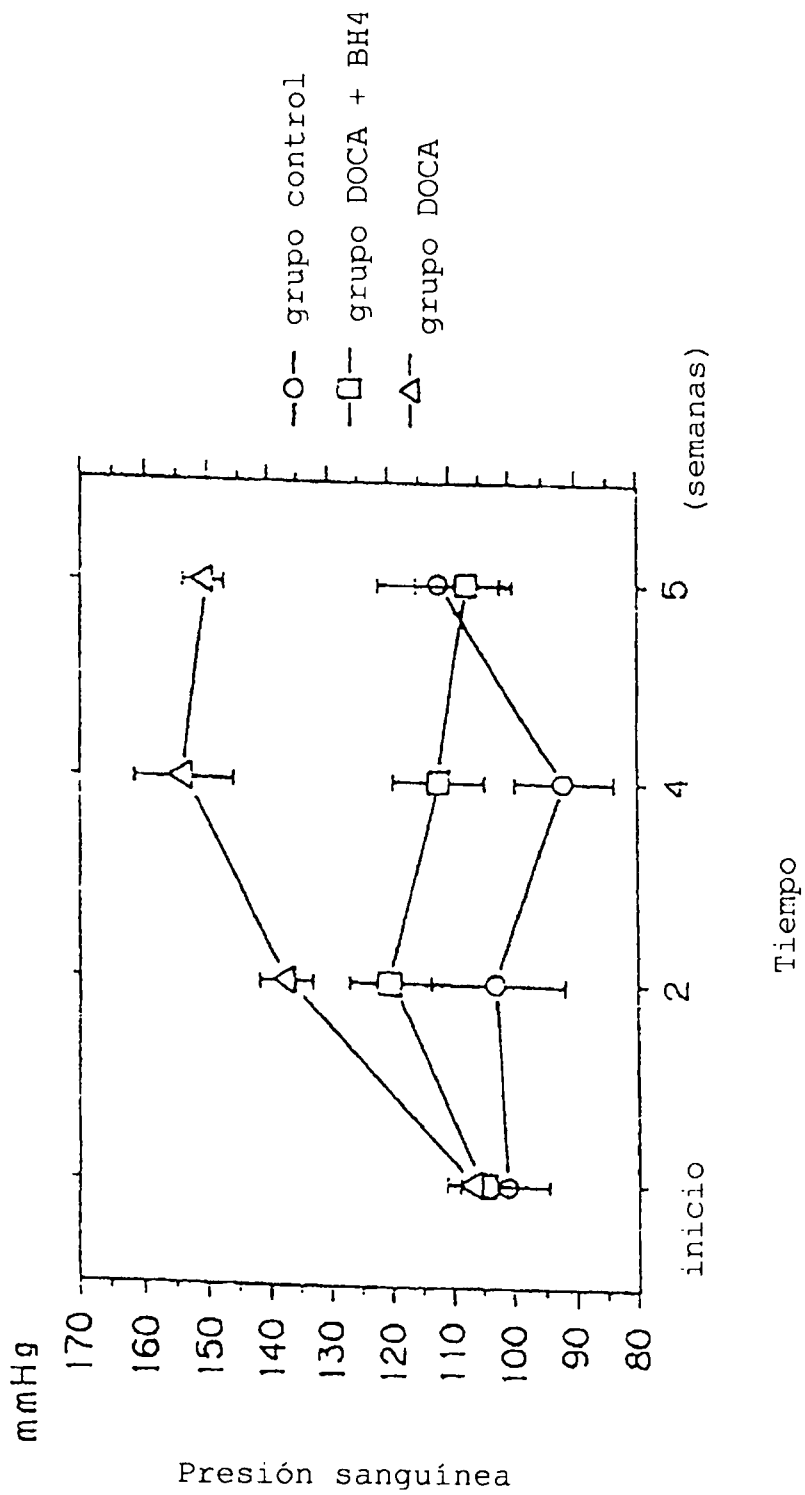


Fig. 2

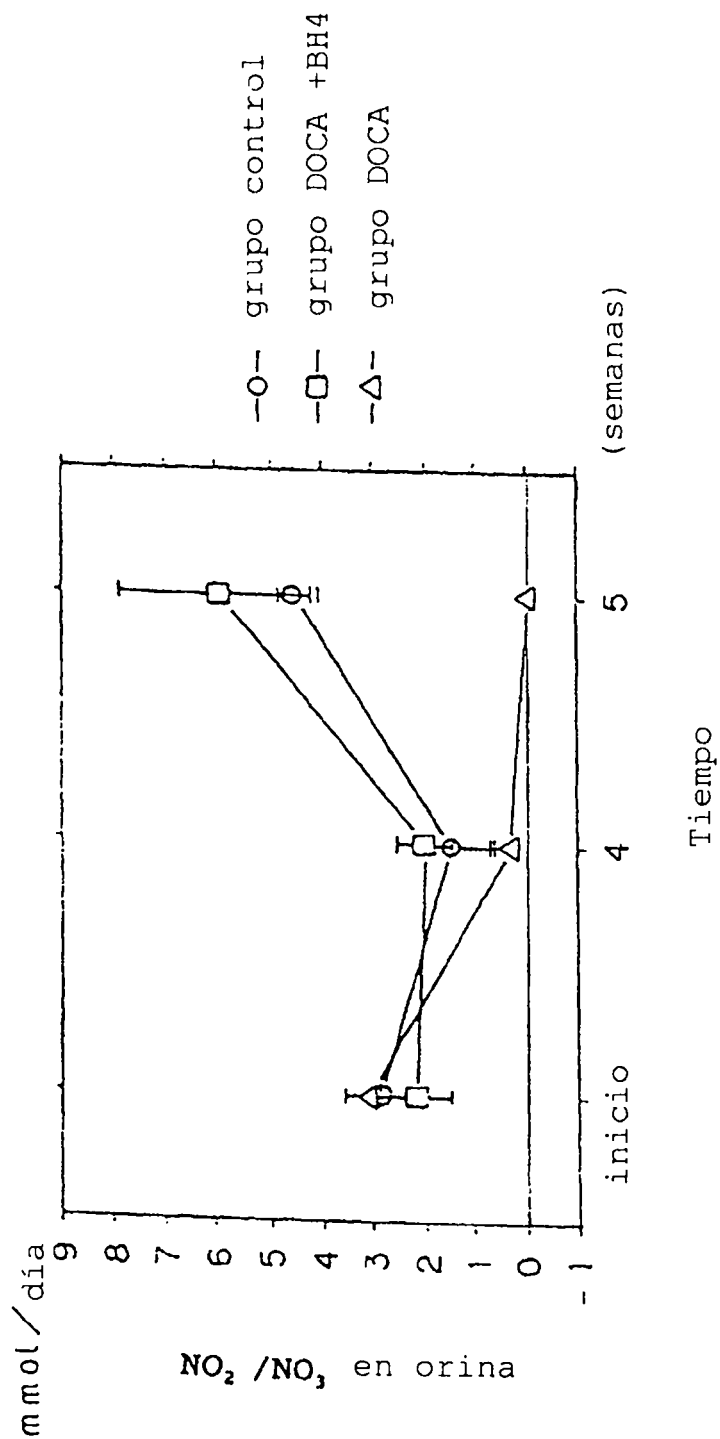


Fig. 3

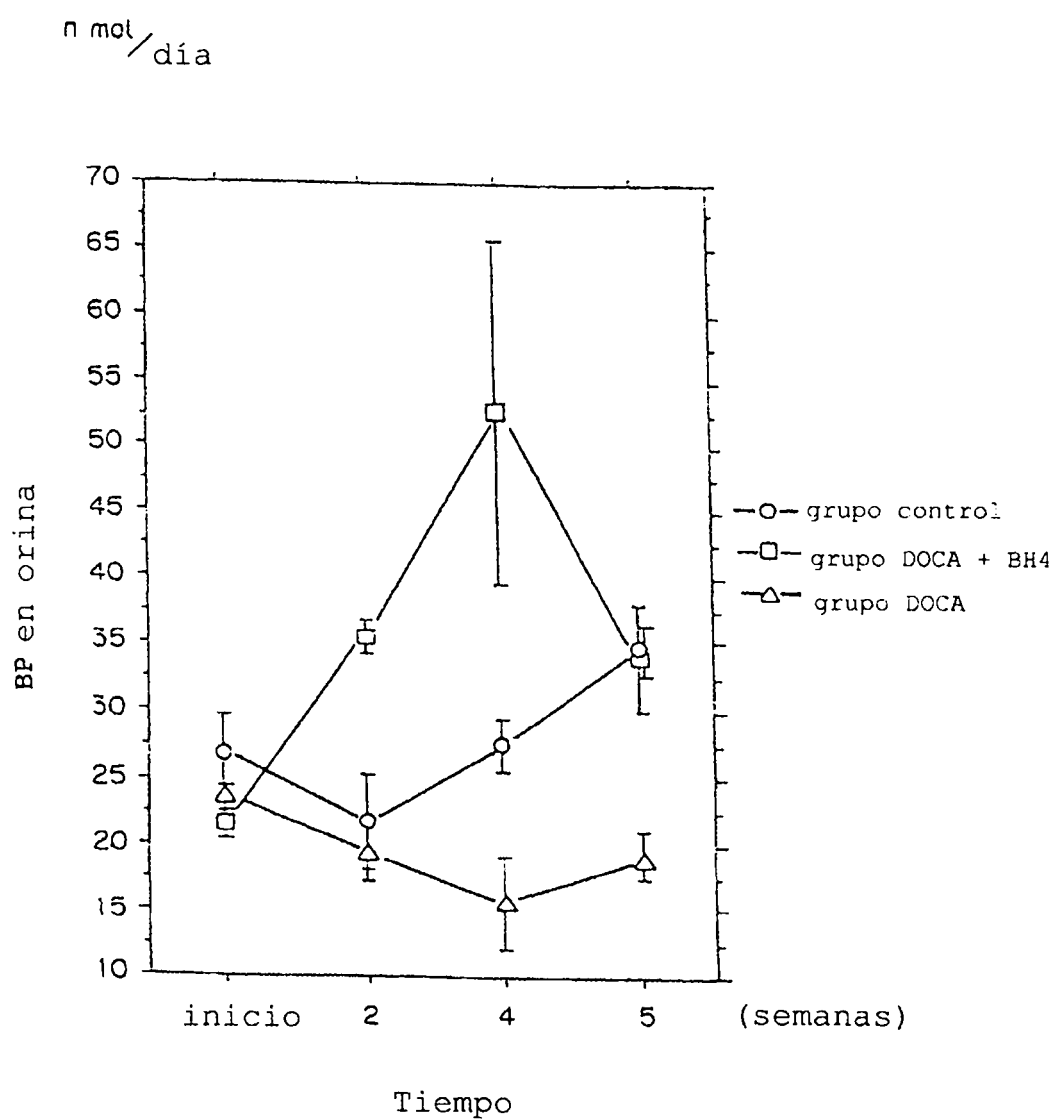


Fig. 4

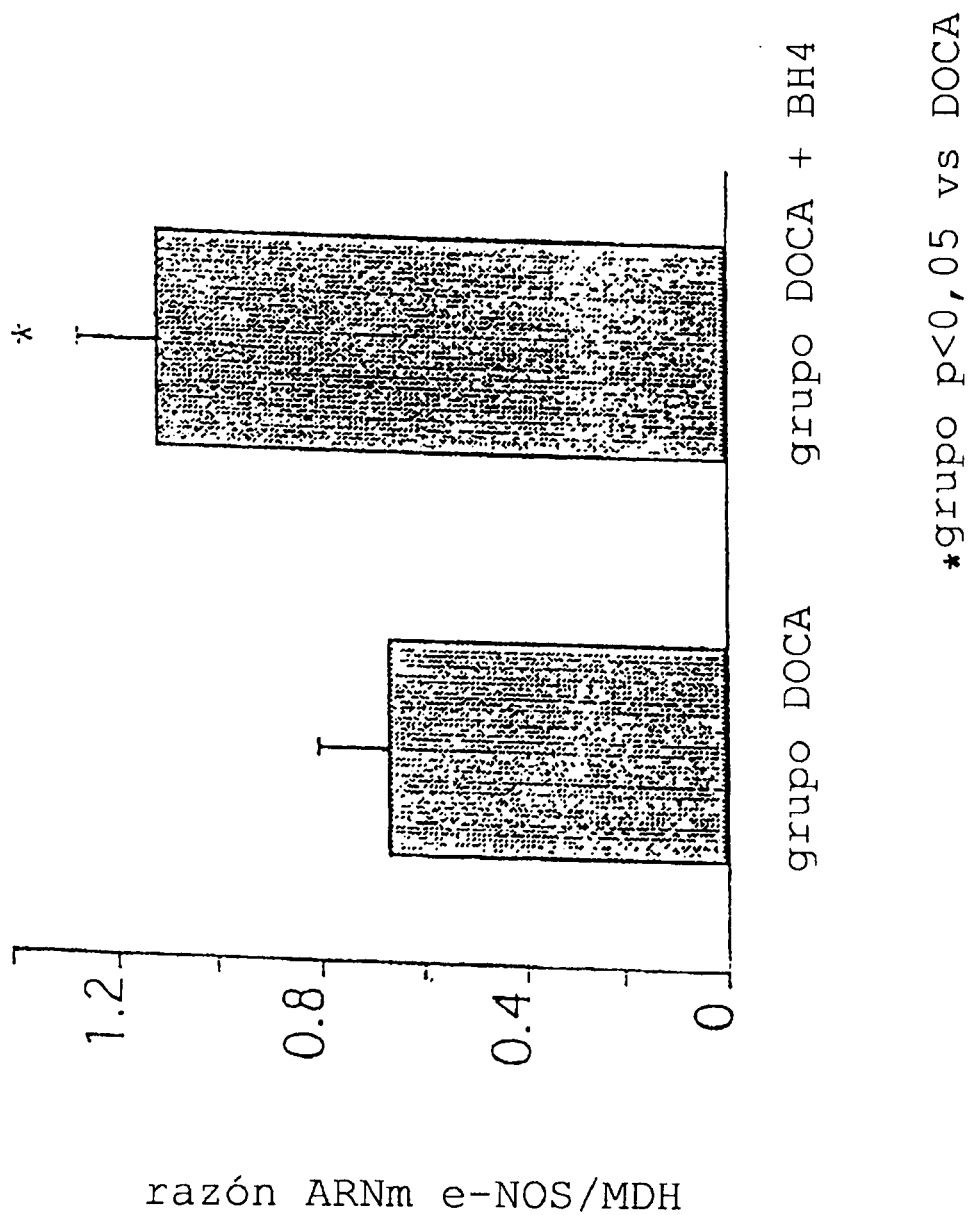


Fig. 5

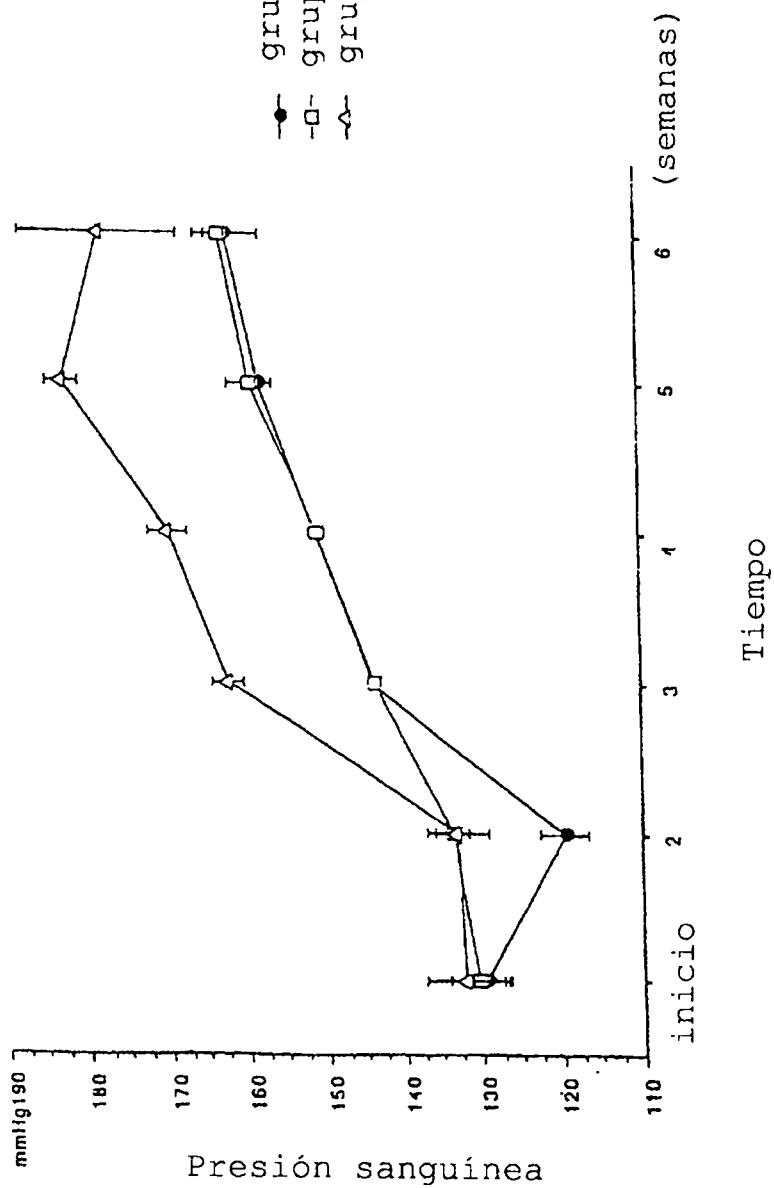


Fig. 6

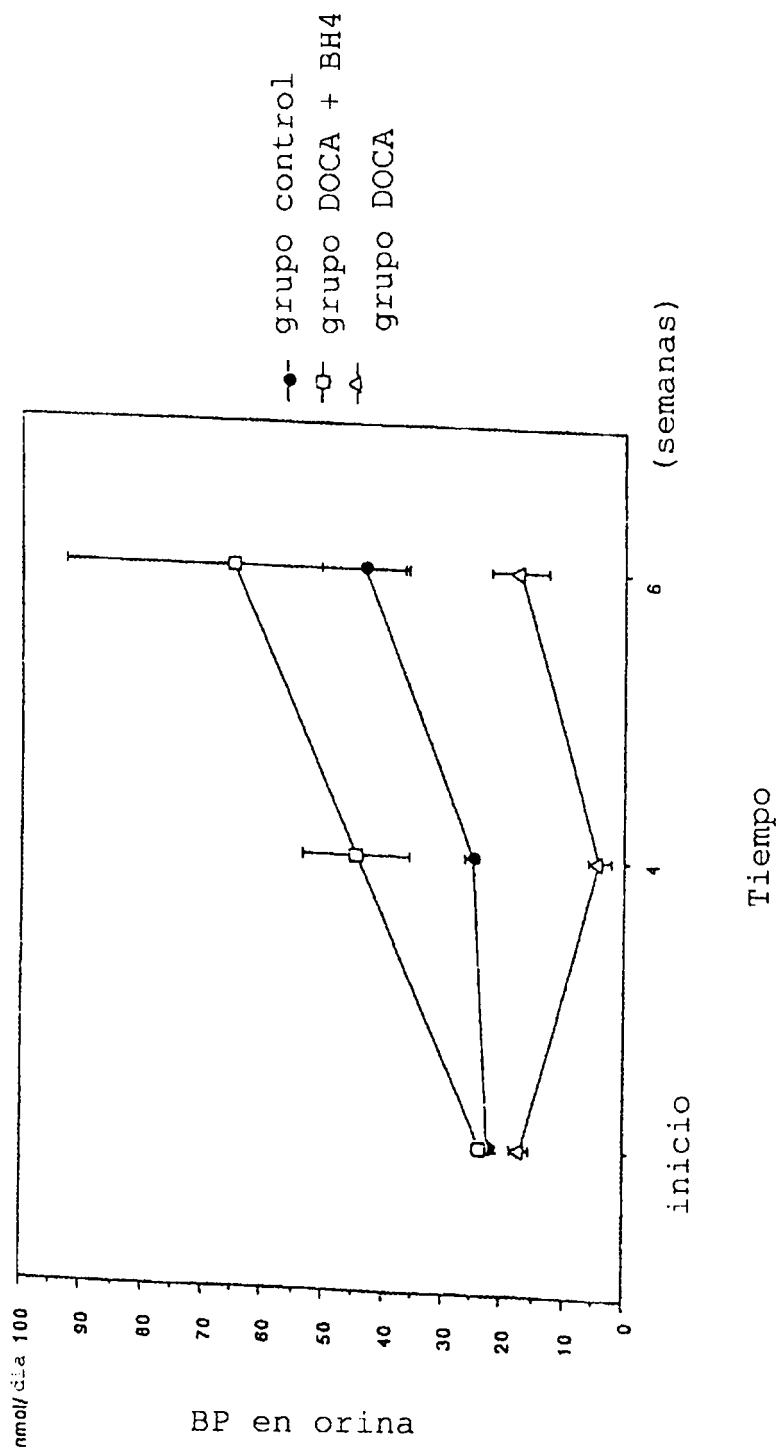


Fig. 7

