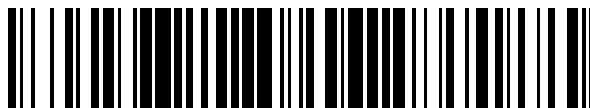


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 435**

21 Número de solicitud: 201130150

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.02.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.09.2012

Fecha de la concesión:

19.07.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

31.07.2013

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC)
C/ Serrano, 117
46000 Valencia (Valencia) y
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DEL
HOSPITAL LA FE DE VALENCIA**

72 Inventor/es:

**MARCOS LOPEZ, Jose F;
VALLES ALVENTOSA, Salvador;
MANZANARES MIR, Paloma;
RUIZ-GIMENEZ, Pedro;
TORREGROSA BERNABE, German;
ALBORCH DOMINGUEZ, Enrique y
SALOM SANVALERO, Juan B**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE HEPTAPÉPTIDOS PARA EL CONTROL DE LA HIPERTENSIÓN**

57 Resumen:

Uso de heptapéptidos para el control de la hipertensión.

La presente invención se refiere a heptapéptidos inhibidores de la enzima convertora de angiotensina (ECA). También se refiere al proceso de producción de los péptidos de la invención mediante estrategias biotecnológicas, por lo que además se refiere al ácido nucleico, al cassette de expresión y al vector que los codifican, así como a la célula hospedadora que los comprende. Así mismo también se refiere al uso de los péptidos para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión así como a la composición farmacéutica que los comprende.

ES 2 387 435 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de heptapéptidos para el control de la hipertensión.

La presente invención se refiere a heptapéptidos que se caracterizan por ser inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA). También se refiere al uso de los heptapéptidos para la preparación de un medicamento para la disminución de la hipertensión mediante inhibición de la actividad de la ECA.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La hipertensión se caracteriza porque la presión sanguínea es superior a la deseable para la salud. Los individuos hipertensos presentan mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares y cerebrovasculares, lo que produce un aumento de la mortalidad de forma prematura en dichos sujetos (Giles TD 2009. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 11(11):611-4). La reversión de la hipertensión mediante cambios en el estilo de vida o tratamientos farmacológicos consigue reducir el riesgo de padecer infarto (30-40%) y otros problemas coronarios (20%) y parece que también reduce la incidencia de otros desordenes vasculares. Dado que se han relacionado alteraciones en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) con la hipertensión, se han desarrollado medicamentos antihipertensivos que utilizan como diana diferentes componentes de este sistema, como por ejemplo inhibidores de renina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueantes de los receptores de angiotensina o antagonistas del receptor de aldosterona (Williams B 2009. *J Hypertens* 27(3):S19-26).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una peptidasa presente en las células endoteliales vasculares en pulmón, riñón y cerebro que convierte la angiotensina I en el péptido vasoconstrictor angiotensina II, contribuyendo así a aumentar la presión arterial. La inhibición de la ECA para el tratamiento de la hipertensión se realiza en la actualidad utilizando medicamentos, como el captopril cuyo principio activo es hidroclorotiazida, pero provocan efectos secundarios como la tos seca y el angioedema. Como alternativa, se han realizado estudios para la inhibición de la ECA con péptidos de distinta secuencia y longitud a la de los péptidos de la presente invención.

Se han utilizado péptidos derivados de proteínas de plantas y animales, tales como leche, soja o pescado, para la inhibición de la ECA. Dichos péptidos pueden ser producidos por hidrólisis enzimática desde las proteínas precursoras durante el procesamiento de los alimentos y la digestión. Estos péptidos pueden ser incorporados en alimentos funcionales para el desarrollo de productos beneficiosos para la salud y en la actualidad existen en el mercado o en desarrollo diversos productos que contienen estos péptidos bioactivos con actividad inhibitoria de la ECA. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados hasta el momento con varios de estos péptidos no han demostrado un claro efecto beneficioso en todos los pacientes hipertensos (Engberink MF *et al* 2008. *Hypertension* 51(2):399-405 y De Leo *et al* 2009. *Curr Pharm Des* 15(31):3622-43).

Por otra parte, también se han descrito péptidos desarrollados *de novo* para la disminución de la hipertensión. Se ha descrito la importancia de la localización de diferentes aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de los péptidos para la inhibición de la actividad de la ECA. En relación a dipéptidos, se ha descrito que el dipéptido valina-triptófano es el que mayor actividad inhibitoria presenta (Cheung HS *et al* 1980. *J Biol Chem* 255(25):401-7). En péptidos de seis aminoácidos se ha descrito que los tres aminoácidos en el extremo carboxilo terminal influyen en la inhibición de la actividad de la ECA, siendo las secuencias terminales histidina-fenilalanina-triptófano (HFW) y leucina-fenilalanina-triptófano (LFW) las preferidas entre los péptidos estudiados (Centeno *et al* 2006. *J Agric Food Chem* 54(15):5323-9). Se han descrito como aminoácidos importantes para la inhibición de la actividad de la ECA el triptófano (W), tirosina (Y), fenilalanina (F), prolina (P), isoleucina (I), alanina (A), leucina (L) y metionina (M) situados en última posición en el extremo carboxilo terminal, mientras que los aminoácidos importantes en la penúltima posición son valina (V), isoleucina (I), alanina (A), arginina (R), tirosina (Y) y fenilalanina (F) (Cheung HS *et al* 1980. *J Biol Chem* 255(25):401-7). En una comparación entre péptidos derivados de la lactoferrina B se comprobó que al comparar la actividad inhibitoria de la ECA entre un heptapéptido y un hexapéptido cuya secuencia estaba contenida en la del primero, ambos de distinta secuencias a los de la invención, el heptapéptido presentaba menor actividad inhibitoria de la ECA que el hexapéptido, demostrándose que un aumento de la longitud de un péptido con actividad inhibitoria de la ECA no significa un mayor aumento de dicha actividad (Ruiz-Giménez P *et al* 2010. *58(11): 6721-27*).

Dado que los compuestos utilizados en la actualidad producen efectos secundarios y los ensayos clínicos realizados hasta la fecha con péptidos inhibidores de la actividad ECA no demuestran un claro efecto antihipertensivo, se hace necesaria una mejora en los medicamentos para controlar la hipertensión.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención trata de heptapéptidos con efecto antihipertensivo y del uso de dichos heptapéptidos para la elaboración de una composición farmacéutica para disminuir la hipertensión. Los péptidos de la invención son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA).

Con el fin de evaluar el potencial antihipertensivo de los péptidos de la invención, se comparó la actividad inhibitoria de la ECA de los péptidos de la invención con otros péptidos descritos anteriormente. Se demostró que la actividad antihipertensiva de los heptapéptidos es superior a los anteriormente descritos. La diferencia fundamental de los

péptidos de la invención con respecto a péptidos descritos anteriormente es que los aminoácidos presentes en el extremo carboxilo terminal de los péptidos de la invención varían con respecto a los aminoácidos que se consideran importantes para la actividad inhibitoria de la ECA en el estado de la técnica. De este modo, los heptapéptidos de la invención presentan un extremo carboxilo terminal diferente a los descritos previamente y esto resulta en un aumento de la actividad inhibitoria de la ECA.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un heptapéptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1, donde el primer aminoácido es una arginina (R) el segundo aminoácido es una lisina (K), el tercer aminoácido es un triptófano (W), el cuarto aminoácido es una histidina (H) o una leucina (L), el quinto aminoácido es una fenilalanina (F), el sexto aminoácido es una leucina (L) o una histidina (H) y el séptimo aminoácido es un triptófano (W).

Los heptapéptidos de la invención coinciden en secuencia de aminoácidos en las posiciones descritas pero varían en las posiciones cuarta y sexta contando desde el extremo amino terminal. Por este motivo, una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un heptapéptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2 donde el aminoácido de la cuarta posición es una histidina (H) y el aminoácido de la sexta posición es una leucina (L). Por otro lado, otra realización preferida se refiere al heptapéptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3 donde el aminoácido de la cuarta posición es una leucina (L) y el aminoácido de la sexta posición es una histidina (H). En el listado de secuencias se indica la variación ("variant"), el lugar de variación y cuál es el aminoácido que lo reemplaza ("replace").

La presente invención también se refiere tanto a los esteroisómeros dextrógiros (D) como los esteroisómeros levógiros (L), por lo que otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al heptapéptido cuya esteroisomería es D y otra realización preferida se refiere al heptapéptido cuya esteroisomería es L.

El término "esteroisómero" en la presente invención se refiere a un isómero óptico o enantiómero, es decir, en la presente invención un heptapéptido de la misma forma molecular y secuencia de aminoácidos pero de diferente fórmula estructural. Los esteroisómeros D y los esteroisómeros L se diferencian en la propiedad de desviar el plano de la luz polarizada en diferente dirección, siendo los esteroisómeros D los que la desvían hacia la derecha (isómero dextrógiro) y los isómeros L (isómero levógiro) los que la desvían hacia la izquierda. En la naturaleza los enantiómeros que forman las proteínas son isómeros L pero para aumentar la estabilidad y resistencia a la degradación por proteasas presentes en los fluidos biológicos, en la presente invención se han generado también isómeros D.

En la presente invención los extremos amino terminal y carboxilo terminal de los heptapéptidos pueden o no estar modificados. Por ejemplo el extremo amino terminal puede estar acetilado y el extremo carboxilo terminal puede estar amidado siguiendo los procedimientos conocidos por el experto en la materia, y dicha modificación se puede realizar en la síntesis química en fase sólida. Dichas modificaciones favorecen la estabilidad de los péptidos frente a la degradación por proteasas pero no afectan a la actividad biológica de los mismos. Por estos motivos otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un heptapéptido donde el extremo amino terminal está acetilado y el extremo carboxilo terminal está amidado. Por este motivo, otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un heptapéptido que consiste en la SEQ ID NO: 4. Otra realización preferida se refiere a un heptapéptido que consiste en la SEQ ID NO: 5. En el listado de secuencias se indica la modificación (MOD_RES), el lugar de modificación y cuál es el dicha modificación ("acetylation" se refiere a acetilación y "amidation" se refiere a amidación).

El término "heptapéptido" se refiere a un péptido formado por siete aminoácidos unidos por enlace peptídico. A partir de ahora nos referiremos a los "heptapéptidos de la invención" como cualquiera de los péptidos descritos en el primer aspecto de la invención. En la presente descripción nos referiremos a los "heptapéptidos naturales de la invención" como los heptapéptidos de isomería L ya que son los que se presentan en la naturaleza.

El término "inhibición" como se usa aquí, se refiere principalmente a que el heptapéptido inhibe (disminuye) la actividad de la ECA y por lo tanto reduce la hipertensión. Un agente antihipertensivo es por lo tanto un agente que disminuye la hipertensión.

La enzima convertora de angiotensina I (ECA, peptidyl-dipeptidase A, BC036375.2, EC 3.4.15.1, "angiotensin converting enzyme" o ACE) se refiere a la enzima que utiliza como sustrato la angiotensina I convirtiéndola en angiotensina II (que es una molécula vasoconstrictora) y la bradiquinina (que es una molécula vasodilatadora), a la cual convierte en un péptido no funcional. La actividad de esta enzima aumenta la presión arterial y por lo tanto contribuye a la hipertensión en humanos. Existen tres isoformas principales de la ECA, somática, testicular o germinal y plasmática o soluble, siendo la primera de ellas la principal productora de angiotensina II.

La hipertensión tal y como se describe en la presente invención es una enfermedad de etiología diversa que se caracteriza por una elevada presión sanguínea en la circulación sistémica (diastólica \geq 90 mm Hg; sistólica \geq 140 mm Hg;).

Los péptidos de la invención pueden obtenerse mediante síntesis química o mediante estrategias derivadas de la biotecnología.

Mediante estrategias biotecnológicas conocidas por el experto en la materia, se podría producir el heptapéptido de la invención a partir de un polipéptido que comprendiera el heptapéptido de la invención, por ejemplo tras fragmentación del mismo. Por este motivo, un segundo aspecto de la invención se refiere a un polipéptido que comprende el heptapéptido de la invención.

5 También mediante estrategias biotecnológicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica, el heptapéptido natural de la invención, o el polipéptido que lo comprendiera, podría ser producido a partir de un ácido nucleico que lo codificara. Por este motivo, un tercer aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para los heptapéptidos naturales de la invención.

10 En el supuesto de la producción mediante biotecnología, la secuencia del péptido sería codificada por un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico o ADN) de acuerdo a las leyes del código genético. Todos estos procedimientos son habituales para toda aquella persona experta en el área de conocimiento de la presente invención.

15 Por lo tanto también forman parte de la invención las construcciones genéticas de DNA que codifican secuencias de los péptidos naturales de la invención. Dicha construcción genética de DNA dirigiría la transcripción intracelular de la secuencia del heptapéptido, y comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de DNA que comprende la secuencia de nucleótidos codificante para el heptapéptido natural de la invención para su transcripción y traducción intracelular; b) un *cassette* de expresión génica que comprende la secuencia de DNA definida en a) unido operativamente a elementos de control de la transcripción y opcionalmente de traducción; c) secuencia de DNA correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante del heptapéptido natural de la invención definida en a) o el *cassette* de expresión definido en b),
20 operativamente enlazados con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia, y con otras secuencias para regular su transcripción tales como, por ejemplo, señales de inicio y terminación, o señal de poliadenilación, donde preferentemente el vector es un plásmido. Esto queda reflejado en el tercer, cuarto y quinto aspecto de la presente invención.

25 Un sexto aspecto de la invención se refiere a la célula hospedadora que comprende el ácido nucleico, el *cassette* de expresión o el vector que codifican secuencias del heptapéptido natural de la invención, donde la célula preferentemente es una célula de mamífero (no perteneciente al grupo de las células embrionarias o germinales humanas), de insecto, de hongo (entre los que se incluyen las levaduras) o bacteria. La introducción de dichas construcciones génicas se puede realizar con los métodos conocidos en el estado de la técnica.

30 Un séptimo aspecto de la invención se refiere al proceso de producción del heptapéptido natural de la invención que comprende cultivar las células hospedadoras descritas en el sexto aspecto de la invención y la posterior purificación del péptido natural de la invención.

35 Los heptapéptidos de la invención se pueden sintetizar también mediante síntesis química, preferiblemente sobre fase sólida. En este caso se pueden producir tanto enantiómeros L como D. El procedimiento de síntesis permite que el extremo N-terminal de los péptidos se pueda encontrar acetilado y el extremo C-terminal amidado, lo que no afectaría significativamente la actividad inhibitoria de la ECA de dichos péptidos.

40 En la presente invención se han realizado estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* en animales espontáneamente hipertensos con los péptidos de la invención y se han comparado los resultados con esteroisómeros de los mismos y con un péptido más corto de seis aminoácidos ya conocido. Los resultados obtenidos demuestran que ambos poseen actividad inhibitoria de la ECA *in vitro*, inhibición de la contracción arterial inducida por Angiotensina I y efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Además, en la presente invención se demuestra que no cualquier secuencia peptídica produce el mismo efecto antihipertensivo y que los esteroisómeros no presentan los mismos efectos. Comparativamente en los ensayos *in vivo* con administración oral, el uso de uno de los heptapéptidos produjo una mayor disminución de la presión arterial que el uso del hexapéptido analizado en el ensayo, así como también en comparación con un compuesto antihipertensivo conocido (captopril); mientras que
45 el uso del otro heptapéptido produjo resultados similares a los observados con el hexapéptido. Además, también se han realizado ensayos *in vivo* en animales normotensos no observándose hipotensión en los mismos. Ensayos de citotoxicidad con el heptapéptido de mayor actividad antihipertensiva *in vivo* han revelado que presentaba una baja toxicidad en varios tipos celulares.

50 Por todo lo aquí descrito un aspecto de la presente invención se refiere al uso del heptapéptido de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del heptapéptido de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la hipertensión arterial.

55 El término "composición farmacéutica" hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de enfermedades. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición que comprenda al menos los heptapéptidos de la invención para el tratamiento de la hipertensión arterial, es decir la disminución de la hipertensión.

La composición farmacéutica de la invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones para el tratamiento de la hipertensión.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica que comprende el heptapéptido de la invención. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica que además comprende un excipiente y/o al menos un vehículo farmacéuticamente aceptables. Otra realización aún más preferida se refiere a la composición farmacéutica que además también comprende al menos otro principio activo.

5 El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la composición farmacéutica de la invención, estabiliza dicha composición farmacéutica o ayuda a su preparación en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección de la composición farmacéutica como por ejemplo para aislarla del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

10 Un "vehículo farmacológicamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensoactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del producto de expresión de la invención así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente. El término "farmacológicamente aceptable" se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

15 Los heptapéptidos de la invención pueden consumirse como tales, formando parte de composiciones farmacéuticas o de productos alimenticios. Por lo que otra realización aún más preferida del último aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica que se presenta en una forma adaptada a la administración por vía oral, parenteral o intradérmica.

20 Para que el heptapéptido de la invención sea capaz de inhibir la actividad de la ECA y por lo tanto disminuir la hipertensión, es necesario que la cantidad de dicho péptido presente en la composición farmacéutica o en los productos alimenticios que los contengan sea la suficiente para ejercer dicha acción. Por este motivo, la composición proporcionada por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. La cantidad del heptapéptido de la invención en dichas composiciones se administra a una concentración terapéuticamente efectiva.

25 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "concentración terapéuticamente efectiva" se refiere a la concentración de los heptapéptidos de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos heptapéptidos y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1. Contracción de segmentos de arteria carótida de conejo.** **A**, efecto del cloruro potásico (KCl) para comprobar la viabilidad del segmento y la reproducibilidad de la vasoconstricción mediada por angiotensina I (Ang I). **B**, efecto del heptapéptido PIECA50L sobre la contracción inducida por angiotensina I. La tensión isométrica se midió en gramos (g) y el tiempo en minutos (min).

40 **Figura 2. Disminución de la presión arterial sistólica (PAS) obtenida en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).** Se muestra la disminución de la PAS en SHR ("*spontaneous hypertensive rats*") tras la administración oral de 1ml del control de solución salina (○), 50 mg/Kg de captopril (●), 10 mg/Kg de PIECA32L (▼), 10 mg/Kg PIECA50L (△), 10 mg/Kg PIECA52L (□). Los datos representan la media ± SEM para un mínimo de 5 animales y fueron sometidos a un análisis ANOVA de una vía seguido de un test Dunnett. *, **, significativamente diferente con respecto al control a P < 0.05 y P < 0.01, respectivamente. □PAS, cambio de la PAS, al ser un cambio negativo se traduce en disminución de la PAS. Milímetros de mercurio, mm Hg.

45 **Figura 3. Registro de la presión arterial medida en la arteria femoral de ratas espontáneamente hipertensas.** Se muestran los cambios inducidos por la inyección intravenosa de **A**, solución salina (salino); **B**, PIECA50L (1 mg/Kg); y **C**, PIECA 50D (1 mg/Kg). ABP, presión arterial ("*arterial blood pressure*"), Milímetros de mercurio, mm Hg.

EJEMPLOS ILUSTRATIVOS DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1: Síntesis de péptidos.

Los péptidos analizados y caracterizados en la presente invención se sintetizaron químicamente sobre fase sólida siguiendo procedimientos habituales que utilizan el grupo N-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl (Fmoc) para la protección del grupo α -amino de los aminoácidos constituyentes (Fields G B *et al.* 1990. *International Journal of Peptide and Protein Research* 34:161-214). El extremo amino-terminal de los péptidos se encontraba acetilado (Ac) y el extremo carboxilo-terminal amidado (NH₂). Después de la síntesis, los péptidos se purificaron mediante RP-HPLC (del inglés “reverse phase-high performance liquid chromatography”, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa) y su identidad se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés “matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight”). Todos estos procedimientos son habituales para toda aquella persona experta en el área de conocimiento de la presente invención.

Las modificaciones que se producen en los extremos de los péptidos mostrados en este ejemplo de la invención no son esenciales para la actividad inhibitoria de la ECA y se pueden introducir mediante procesos habituales en el proceso de síntesis química. En la tabla 1 se muestran los péptidos de la invención sin modificar y modificados de dicha manera.

Tabla 1. Péptidos de la invención.

Nomenclatura	SEQ ID NO:	Secuencia
PIECA 50L sin modificar	SEQ ID NO: 2	RKWHFLW
PIECA 50D ^a sin modificar	SEQ ID NO: 2	RKWHFLW
PIECA 52L sin modificar	SEQ ID NO: 3	RKWLFHW
PIECA 52D ^a sin modificar	SEQ ID NO: 3	RKWLFHW
PIECA 50L	SEQ ID NO: 4	Ac-RKWHFLW-NH ₂ ^b
PIECA 50D ^a	SEQ ID NO: 4	Ac-RKWHFLW-NH ₂ ^b
PIECA 52L	SEQ ID NO: 5	Ac-RKWLFHW-NH ₂ ^b
PIECA 32L ^c	SEQ ID NO: 6	Ac-RKWHFW-NH ₂ ^b

^a PIECA50D sin modificar, PIECA52D sin modificar y PIECA 50D son, respectivamente los isómeros dextrógiros (D) de PIECA50L sin modificar, PIECA52L sin modificar y PIECA 50L. Dado que tienen la misma secuencia de aminoácidos, se refieren también a las secuencias de aminoácidos de sus respectivos isómeros L.

^b heptapéptidos acetilados en su extremo amino-terminal (Ac-) y amidados en su extremo carboxilo-terminal (NH₂).

^c hexapéptido descrito en Centeno *et al.* 2006. *J Agric Food Chem* 54(15):5323-9.

PIECA se refiere a “péptido inhibitor de la actividad de la ECA” (también se puede referir al término en inglés “PACEI”, de “peptide ACE inhibitor”).

EJEMPLO 2: Potencia inhibitoria de ECA sobre el sustrato natural Angiotensina I y Bradiquinina

La capacidad inhibitoria de los péptidos se determinó midiendo por HPLC (del inglés “high performance liquid chromatography”) la Angiotensina II o el fragmento Bradiquinina 1-5 resultante de la hidrólisis del sustrato natural Angiotensina I o Bradiquinina, (Calbiochem Co,) respectivamente, basándose en el método propuesto en la literatura (Centeno *et al.* 2006. *J Agric Food Chem* 54(15):5323-9). Brevemente, el método consistió en poner en contacto 75 μ l de ECA (20 mU/ml en tampón Tris-HCl 200 mM pH 8.3, 600 mM NaCl y 10 μ M ZnCl₂) con 50 μ l de angiotensina I (0.31 mM) o 20 μ l de bradiquinina (0.94 mM) con diferentes concentraciones de los péptidos, todo ello se incubó a 37 °C durante 30 min. A partir de los resultados obtenidos con Angiotensina I, se calcularon los valores de IC₅₀ (concentración de péptido a la cual se consigue una inhibición de la actividad enzimática del 50%) para ambos péptidos (tabla 2). Cabe destacar la potencia de ambos péptidos, cuyos valores de IC₅₀ fueron inferiores a 10 μ M. Los resultados obtenidos con bradiquinina pusieron de manifiesto que ninguno de los péptidos ensayados fue capaz de inhibir la hidrólisis de la bradiquinina (resultados no mostrados).

Tabla 2. Efecto inhibitor de los péptidos descritos en la presente invención expresado como IC₅₀, que se define como la concentración de péptido capaz de inhibir el 50% de la actividad de ECA y calculado para cada ensayo por regresión no-lineal de los datos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM (error estándar de la media) para un número de repeticiones (n).

Peptido	IC ₅₀ (μM)
PIECA 50L (SEQ ID NO: 4)	8.2 ± 1.0 (3)
PIECA 52L (SEQ ID NO: 5)	3.0 ± 0.2 (4)

EJEMPLO 3: Ensayos *ex vivo* de la inhibición de la contracción de arterias aisladas.

Se llevaron a cabo ensayos empleando segmentos de arteria carótida de conejo. Tras comprobar la viabilidad de dichos segmentos arteriales, se llevaron a cabo los ensayos cuyos resultados se resumen en la tabla 3. Los dos péptidos de secuencia PIECA50L y PIECA52L produjeron inhibiciones significativas de la contracción dependiente de ECA en comparación con el control sin péptido, más acusada en el caso de PIECA 50L. A modo de ejemplo ilustrativo, se muestra en la Figura 1 el efecto causado por el péptido PIECA 50L.

Tabla 3. Efecto inhibitor de los péptidos descritos en la presente invención sobre la contracción arterial ECA-dependiente con Angiotensina I en arterias aisladas de conejo. Los resultados indican la contracción en respuesta a Angiotensina I (1 μM), en % respecto a una respuesta previa en el mismo segmento arterial y se expresan como la media ± SEM de los experimentos realizados en (n) segmentos arteriales. Los datos fueron sometidos a un análisis de ANOVA de una vía seguido de un test Student-Newman-Keuls. Los datos seguidos de letras distintas son diferentes entre sí (a) y (b) (P<0.01). *Significativamente diferente con respecto al control P<0.01.

Peptido	Contracción (%)
Control	87 ± 3 (33)
PIECA 50L (SEQ ID NO: 4)	33 ± 5 (9)* (a)
PIECA 52L (SEQ ID NO: 5)	62 ± 5 (9)* (b)

EJEMPLO 4: Ensayos *in vivo* del efecto antihipertensivo tras administración oral.

Se evaluó el efecto antihipertensor de los péptidos administrándolos vía oral a una dosis de 10 mg/Kg a ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y normotensas Wistar-Kyoto (WKY). La Figura 2 muestra los cambios de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas SHR a distintos tiempos tras su administración oral. Así mismo incluye la disminución de la PAS observada tras la administración de 50 mg/Kg de captopril (Sigma Chemical Co.) o solución salina.

La presión arterial sistólica (PAS) de las ratas SHR control, medida por el método del manguito en la cola ("tail-cuff"), fue de 201 ± 2 mm Hg (n = 59). La administración oral de los péptidos descritos PIECA 50L, PIECA 52L y PIECA 32L a 10 mg/Kg indujo una reducción significativa en la PAS cuya evolución en el tiempo se muestra en la Figura 2. En esta misma figura puede observarse la falta de efecto de la solución salina y el efecto antihipertensivo del captopril (50 mg/Kg). Para los péptidos PIECA 50L y PIECA 32L el efecto antihipertensivo máximo aparece transcurrida una hora después de su administración (-36.3 ± 3.3 mm Hg y -24.6 ± 5.3 mm Hg, respectivamente), mientras que para el péptido PIECA 52L se consigue el máximo efecto a las 2 horas (-18.6 ± 5.3 mm Hg). El efecto antihipertensivo de PIECA 50L se mantiene de forma significativa hasta tres horas después de su administración, mientras que el efecto de PIECA52L y de PIECA 32L se mantiene, respectivamente, hasta dos y una hora después de su administración. La administración oral de PIECA 50D a 10 mg/Kg no produjo cambios en la PAS en ratas SHR (no se muestran los datos).

En ratas normotensas WKY, la administración oral de PIECA 50L o PIECA 52L a 10 mg/Kg no produjo ningún cambio en la PAS. Estos resultados permiten descartar posibles efectos indeseables de los péptidos ensayados sobre la presión arterial de sujetos normotensos (no se muestran los datos).

EJEMPLO 5: Ensayos *in vivo* del efecto antihipertensivo tras administración intravenosa.

Con el objetivo de valorar el uso *in vivo* de los heptapéptidos de la invención, se procedió a inyectar por vía intravenosa dichos péptidos en ratas espontáneamente hipertensas.

La inyección intravenosa de PIECA 50L a una dosis de 1 mg/Kg provocó una reducción aguda y transitoria de la presión arterial media (MABP), mientras que PIECA 52L a la misma concentración no produjo ningún cambio en la MABP. El esteroisómero D de PIECA 50L (PIECA 50D) (1 mg/Kg) provocó una reducción mantenida de la MABP. La magnitud de los distintos efectos antihipertensivos se resumen en la tabla 4, junto con el control negativo correspondiente (suero salino). En la Figura 3 se muestran, a modo de ejemplo, registros de los efectos causados por el péptido PIECA 50L y su esteroisómero D sobre la presión arterial (ABP).

Tabla 4. Efecto de los péptidos descritos, administrados por vía intravenosa, sobre la presión arterial media (MABP) en ratas SHR. Los resultados indican el cambio de dicha presión arterial (Δ MABP) con respecto a la presión arterial anterior a la administración del péptido. Los datos son la media \pm SEM para un número (n) de determinaciones y fueron sometidos a un análisis de ANOVA de una vía seguido de un test Student-Newman-Keuls. Los datos seguidos de letras distintas son diferentes entre sí, (a) y (b) ($P < 0.01$). *Significativamente diferente con respecto al control $P < 0.01$.

Péptido	Δ MABP (mm Hg)
Control (salino)	5.9 \pm 5.2 (5)
PIECA 50L (SEQ ID NO 4)	-76.1 \pm 8.7 (8)* (a)
PIECA 50D (SEQ ID NO 4)	-83.5 \pm 6.7 (3)* (a)
PIECA 52L (SEQ ID NO 5)	-1.6 \pm 2.1 (5) (b)

EJEMPLO 6: Ensayos de citotoxicidad

Para evaluar la posible toxicidad de PIECA 50L, se utilizaron tres tipos celulares diferentes (hepatocitos primarios de rata, células 3T3 (ATCC CL-173) y células HeptG2 (ATCC HB-8065) y la prueba de la sal de tetrazolio (MTT), siguiendo el protocolo descrito en Rodeiro *et al.* 2008. Chem Biol Interact 172:1-10. El ensayo se llevó a cabo sembrando las células en placas de 96 pocillos (25 x 10³ células/pocillo) y tras 24 h se pusieron en contacto con concentraciones crecientes de péptido. Después de 24 h de exposición, los efectos citotóxicos se midieron empleando el test de reducción del MTT. Tras un lavado de las células con tampón PBS (tampón salino fosfato), se adicionaron 100 μ l/pocillo del reactivo MTT y se incubó durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con el mismo tampón. El colorante se extrajo con DMSO y se midió la DO₅₄₀ en un lector de microplacas. El porcentaje de inhibición de la reducción del MTT por medio de la enzima succínico deshidrogenasa se calculó en relación al control sin péptido (100 % de viabilidad). La potencia del péptido para reducir la viabilidad celular se resume en la tabla 5. Aunque había diferencias significativas dependiendo del tipo celular, los valores de IC₅₀ se situaron en el rango milimolar, desde 0.41 \pm 0.07 mM para hepatocitos primarios hasta 1.38 \pm 0.06 mM sobre células HeptG2. Hay que destacar que estas concentraciones citotóxicas fueron 1000 veces superiores a las concentraciones de péptido necesarias para inhibir la actividad ECA.

Tabla 5. Efecto del péptido PIECA 50L sobre la viabilidad de los cultivos celulares. El potencial citotóxico se expresa como IC₅₀, definido como la concentración de péptido capaz de reducir la viabilidad celular en un 50%. Se calculó para cada ensayo por regresión no-lineal de los datos experimentales. Los resultados se expresan como la media \pm SEM para tres repeticiones.

Péptido	IC ₅₀ (mM)		
	Hepatocitos primarios de rata	Células 3T3	Células HeptG2
PIECA 50L (SEQ ID. NO 4)	0.41 \pm 0.07	1.31 \pm 0.13	1.38 \pm 0.06

REIVINDICACIONES

- 5 1. Heptapéptido que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 donde el primer aminoácido es una arginina (R) el segundo aminoácido es una lisina (K), el tercer aminoácido es un triptófano (W), el cuarto aminoácido es una histidina (H) o una leucina (L), el quinto aminoácido es una fenilalanina (F), el sexto aminoácido es una leucina (L) o una histidina (H) y el séptimo aminoácido es un triptófano (W).
2. Heptapéptido según la reivindicación 1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2 donde el aminoácido de la cuarta posición es una histidina (H) y el aminoácido de la sexta posición es una leucina (L).
3. Heptapéptido según la reivindicación 1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 3 donde el aminoácido de la cuarta posición es una leucina (L) y el aminoácido de la sexta posición es una histidina (H).
- 10 4. Heptapéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 cuya esteroisomería es levógira (L).
5. Heptapéptidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 cuya esteroisomería es dextrógira (D).
6. Heptapéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el extremo amino terminal está acetilado y el extremo carboxilo terminal está amidado.
7. Heptapéptido según la reivindicación 6 que consiste en la SEQ ID NO: 4.
- 15 8. Heptapéptido según la reivindicación 6 que consiste en la SEQ ID NO: 5.
9. Polipéptido que comprende el heptapéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el heptapéptido descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
11. *Cassette* de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 10.
- 20 12. Vector recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 10 o el *cassette* de expresión según la reivindicación 11.
13. Célula hospedadora que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 10, o el *cassette* de expresión según la reivindicación 11 o el vector recombinante según la reivindicación 12, donde preferiblemente la célula hospedadora es una célula de mamífero, de insecto, hongo o bacteria.
- 25 14. Proceso para producir el heptapéptido descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 13.
15. Uso del heptapéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la elaboración de una composición farmacéutica.
- 30 16. Uso del heptapéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la elaboración de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión arterial.
17. Composición farmacéutica que comprende el heptapéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
18. Composición farmacéutica según la reivindicación 17, que además comprende al menos un excipiente y/o al menos un vehículo farmacéuticamente aceptables.
- 35 19. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18, donde la composición farmacéutica además comprende al menos otro principio activo.
20. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, donde la composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración por vía oral, parenteral o intradérmica.

FIG. 1 A

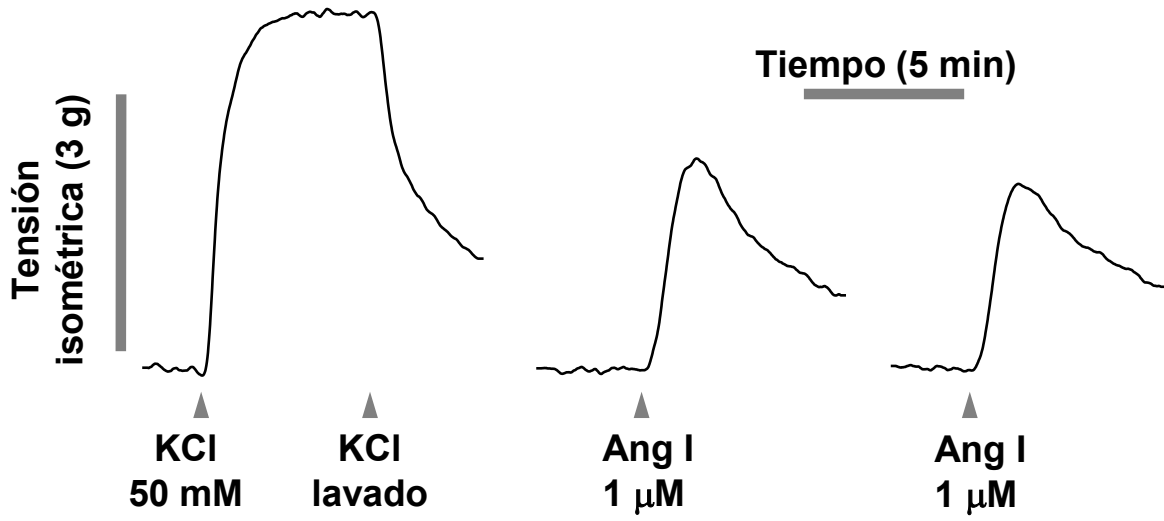


FIG. 1 B

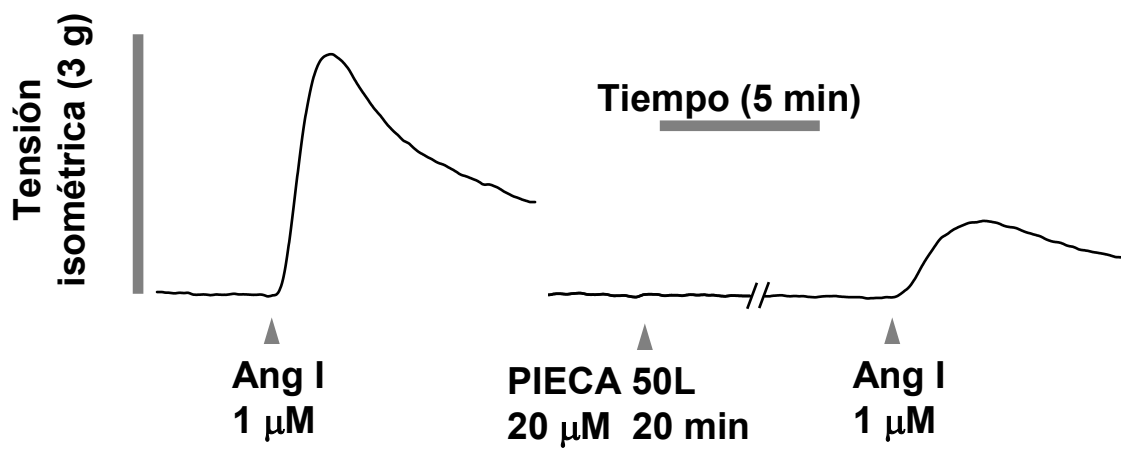


FIG. 2

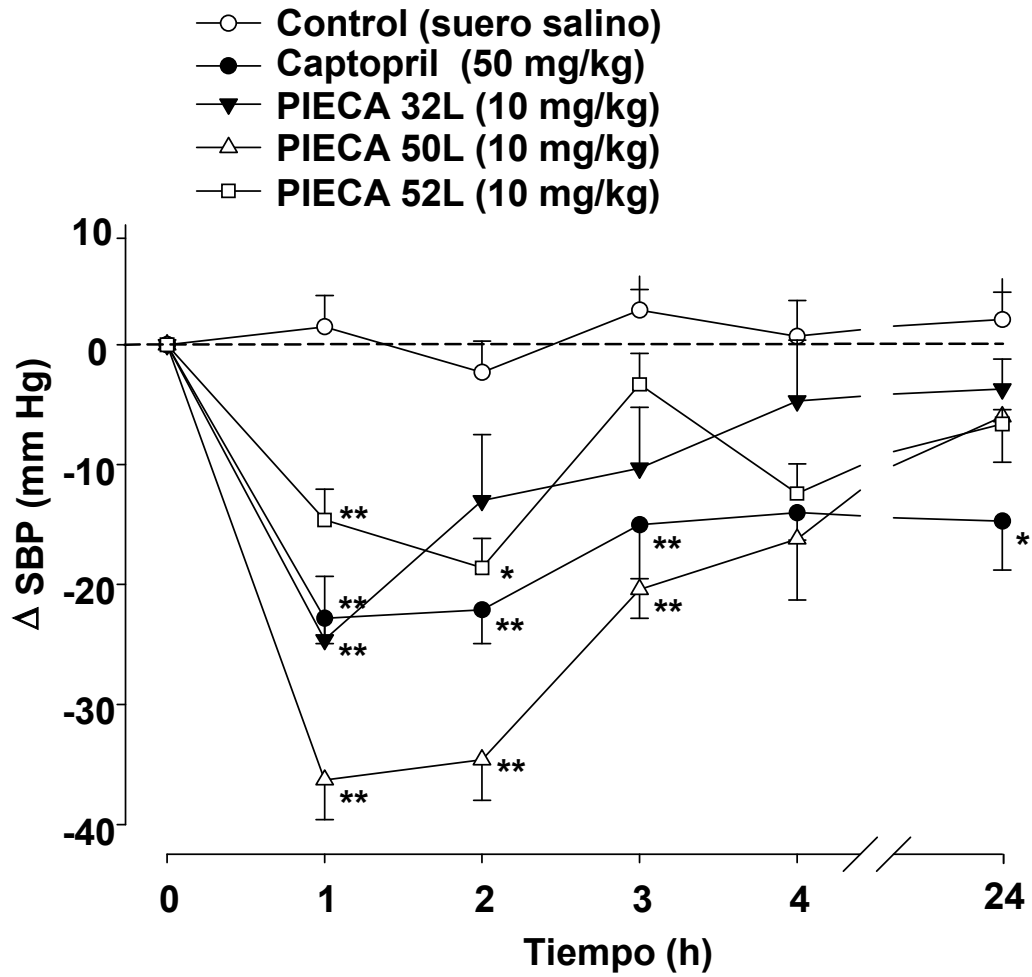


FIG. 3 A

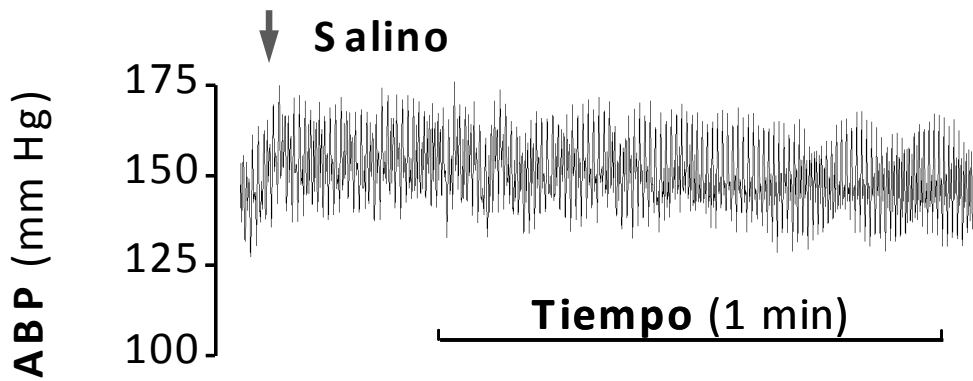


FIG. 3 B

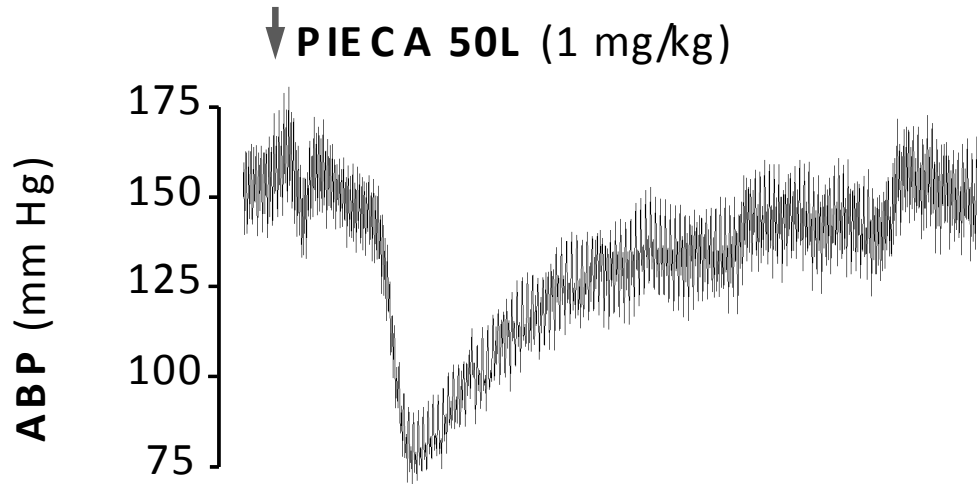
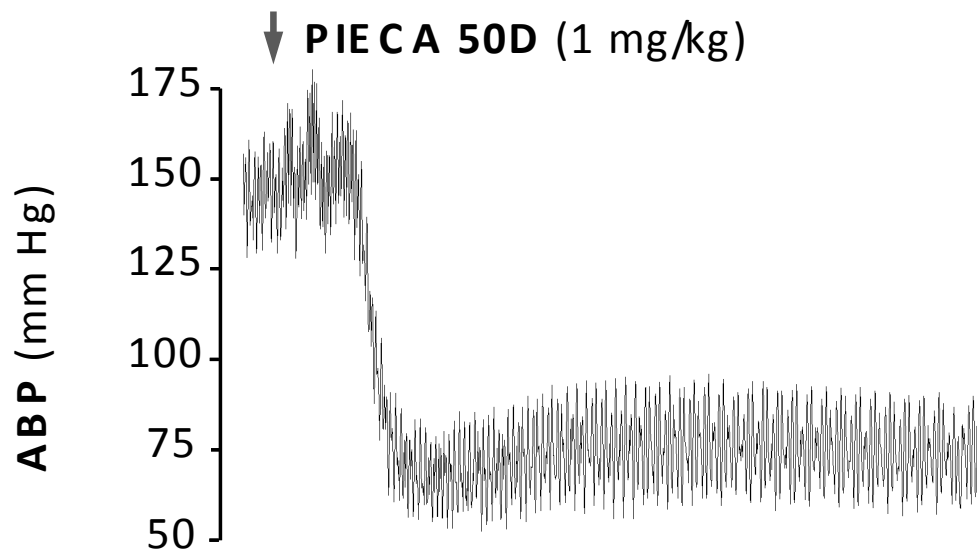


FIG. 3 C





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130150

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.02.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2191516 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01.09.2003, péptidos PAF32 y PAF34.	1-20
A	ES 2320057 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 18.05.2009, todo el documento, especialmente SEQ ID n°s 1 y 2.	1-20
A	CHEUNG, H.S. et al. "Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 25.01.1980. Vol. 255, N°. 2, páginas 401 - 407; todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
31.08.2012

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K7/06 (2006.01)

A61K38/08 (2006.01)

A61K38/55 (2006.01)

A61P9/12 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en los heptapéptidos RKWHFLW Y RKWLFHW y su uso para tratar la hipertensión.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2191516 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS)	01.09.2003
D02	ES 2320057 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS)	18.05.2009
D03	CHEUNG, H.S. et al. "Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 25.01.1980. Vol. 255, N°. 2, páginas 401 - 407.	

El documento D01, describe por primera vez los hexapéptidos PAF32 de secuencia RKWHFW y PAF34 de secuencia RKWLFW y su uso como agentes antifúngicos.

El documento D02, describe el uso de los hexapéptidos descritos en el documento D01, como agentes antihipertensivos.

El documento D03, estudia la importancia de la naturaleza de los aminoácidos próximos al COOH terminal, en los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina ACE.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD

Reivindicaciones 1-20

Los heptapéptidos de la invención, no han sido descritos previamente en el estado de la técnica; por tanto, las reivindicaciones 1-20 cumplen el requisito de novedad de acuerdo al Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-20.

Los heptapéptidos de la invención son similares en su estructura a los hexapéptidos 32 y 34 descritos como antifúngicos en el documento D01 y como antihipertensivos en el documento D02. Se obtendrían intercalando en el P32 una leucina y en el P34 una histidina entre los dos aminoácidos carboxilo terminales. El documento D03, analiza la importancia de la naturaleza de los aminoácidos de la zona carboxilo terminal en los inhibidores peptídicos de la enzima convertidora de angiotensina. En el segundo párrafo de la página 406, se menciona que se ha comprobado que la presencia de un aminoácido aromático en la antepenúltima posición, aumenta la unión del inhibidor a la enzima. También se menciona a continuación, que un triptófano en el carboxilo terminal es muy efectivo cuando el segundo aminoácido es G, V, I, A o R. Estas dos situaciones se producen en los péptidos de la invención, pero no se ha analizado en el documento D03, la situación que se produce en los péptidos de la invención, que tienen L y H respectivamente en la posición siguiente al triptófano. Estos nuevos heptapéptidos presentan una capacidad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, muy superior a la de los hexapéptidos 32 y 34 (ver figura 2 de la descripción), por lo que se considera que suponen un avance inventivo importante respecto a lo previamente conocido en el estado de la técnica. Las reivindicaciones 1-20, tienen actividad inventiva y por tanto, cumplen el requisito del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.