

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA.

161
161

Señora

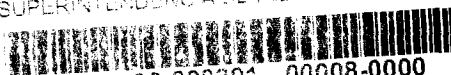
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo Industria y Turismo

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-088391-00008-0000

Fecha: 2007-05-13 14:32:05 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTE/II Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 24

Ref.: Expediente No. **03.088.391**

Solicitud de Patente PCT entrada fase nacional para: **DERIVADOS DE
MERCAPTOACETILAMIDA, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACION Y SU USO**

Solicitante: **SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH-**

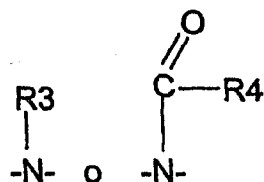
RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

LUIS PATIÑO LEIVA, mayor de edad, identificado y domiciliado como aparece al pie de mi firma, en atención a su oficio No. 5806 Notificado el 11 de mayo de 2007, atentamente me permito dar repuesta al mismo de la siguiente manera:

1. Claridad de la solicitud

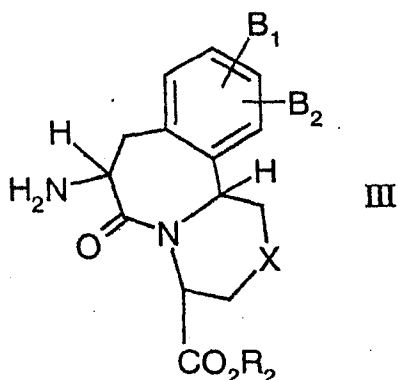
Argumenta su Despacho que las reivindicaciones 14 y 15 no contemplan las condiciones fisicoquímicas para la obtención de los compuestos de interés.

Sobre este punto, quisiera poner de presente que la reivindicación 14 especifica que el proceso se lleva a cabo en presencia de una base. Sin embargo, y con el fin de especificar aún más el proceso se incluyó la frase seleccionado de un carbonato metálico. Igualmente en la reivindicación 15, con el fin de hacerla más clara, se ha incluido que el proceso se lleva a cabo en presencia de un reactivo de acoplamiento así como un solvente aprótico adecuado.

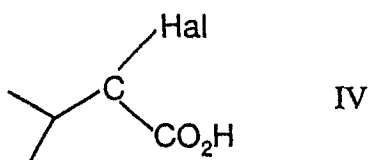


en la que R_3 es hidrógeno, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), arilo o aril-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$), y R_4 es $-\text{CF}_3$, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_{10}$), arilo o aril-(alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$);

B_1 y B_2 son, cada uno independientemente, hidrógeno, hidroxilo u $-\text{OR}_5$, en la que R_5 es alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), arilo o aril-alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) o, en la que, B_1 y B_2 están unidos a átomos de carbono adyacentes, pudiendo tomarse B_1 y B_2 conjuntamente con dichos átomos de carbono adyacentes para formar un anillo de benceno o metilendioxi; que comprende la fase de hacer reaccionar un compuesto de fórmula III



en la que R_2 , X , B_1 y B_2 son tal y como se definieron previamente con un compuesto de fórmula IV



en la que Hal es halógeno.

En presencia de un reactivo de acoplamiento en un solvente aprótico adecuado

176
126

16. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos como se definieron en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Vasopeptidase inhibition prevents nephropathy in Zucker diabetic fatty rats

Stefan Schäfer^{a,*}, Wolfgang Linz^a, Axel Bube^b, Martin Gerl^c, Jochen Huber^a,
Gert Ulrich Kürzel^d, Markus Bleich^a, Hans-Ludwig Schmidts^b,
Andreas E. Busch^a, Hartmut Rütten^a

^aDisease Group Cardiovascular Diseases, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Building H 821, D-65926, Frankfurt am Main, Germany

^bDSE Pathology, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Germany

^cGroup Biomarkers, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Germany

^dDrug Metabolism and Pharmacokinetics, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Germany

Received 20 May 2003; received in revised form 15 July 2003; accepted 31 July 2003

Time for primary review 21 days.

Abstract

Background: Blocking the renin–angiotensin system is an established therapeutic principle in diabetic nephropathy. We investigated whether inhibition of both neutral endopeptidase and ACE (vasopeptidase inhibition) can prevent functional and morphological features of nephropathy in the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat, an animal model of type II diabetes. **Methods:** Homozygous (fa/fa) ZDF rats (each $n=15$) aged 10 weeks were treated with placebo, ramipril (1 mg/kg/day in drinking water), or the vasopeptidase inhibitor AVE7688 (45 mg/kg/day in chow). Metabolic parameters and renal function (metabolic cages) were assessed at baseline (age 10 weeks), and at age 17, 27, and 37 weeks. Twenty heterozygous animals (fa/–) served as lean, nondiabetic controls. At age 37 weeks, the animals were sacrificed and the kidneys analyzed histopathologically. **Results:** Overt diabetes mellitus (blood glucose >20 mmol/l) was established at age 17 weeks in all homozygous ZDF rats. In the placebo group, urinary protein excretion increased progressively from 8 ± 1 (baseline) to 342 ± 56 mg/kg/day (week 37) whereas diabetes and proteinuria were absent in the lean control group. Ramipril tended to reduce albuminuria and morphological damage ($p=ns$) but AVE7688 virtually prevented albuminuria (33 ± 12 mg/kg/day, $p<0.05$ vs. ZDF placebo) and drastically reduced the incidence and severity of glomerulosclerosis and tubulointerstitial damage. **Conclusions:** In ZDF rats, development of diabetes mellitus is accompanied by functional and morphological kidney damage that resembles human diabetic nephropathy. Diabetic nephropathy can be prevented by chronic vasopeptidase inhibition.

© 2003 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Zucker diabetic fatty rat; Diabetic nephropathy; Angiotensin-converting enzyme inhibitor; Vasopeptidase inhibitor

1. Introduction

Diabetic nephropathy is a disabling disease caused by longstanding diabetes mellitus, leading to progressive impairment of renal function and, ultimately, end-stage renal failure. Along with the dramatically increasing incidence of diabetes mellitus, the proportion of diabetics among patients with chronic renal failure is increasing, and type II diabetes has become the leading cause of end-stage renal disease in most industrialized countries [1]. While treatment of diabetic nephropathy has recently been studied successfully in

the clinical setting, leading to novel therapeutic options [2–5], preclinical data on diabetic kidney disease are sparse. Particularly, animal models of type II diabetes have not been well characterized with regard to renal complications, a fact which has limited the preclinical evaluation of potentially beneficial novel compounds.

ACE inhibitors are well documented for their ability to delay diabetic nephropathy [2,6]. With the development of novel vasopeptidase inhibitors, it has been proposed that inhibition of neutral endopeptidase in addition to ACE may yield an increased benefit in chronic renal failure [7]. However, the experimental data have so far been equivocal. The vasopeptidase inhibitor omapatrilat has demonstrated superior nephroprotection over sole ACE inhibition in a subtotal rat nephrectomy model in one study [8], but not in another [9]. In addition, omapatrilat improved endothelial

* Corresponding author. Tel.: +49-69-3051-3391; fax: +49-69-3051-6394.

E-mail address: stefan.schaefer@aventis.com (S. Schäfer).

178, 17

function more than the ACE inhibitor captopril in renal arteries of salt-sensitive hypertensive rats [10].

In the present study, we tested whether early and chronic treatment with the vasopeptidase inhibitor AVE7688 in comparison to ramipril, an established angiotensin enzyme inhibitor, can prevent diabetic nephropathy. As the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat is frequently used in metabolic studies, we used this rat strain to characterize the effect of our interventions on functional and morphological features of nephropathy in this model of obesity-related, insulin-resistant type II diabetes.

2. Methods

2.1. *In vitro* characterization

AVE7688 (7-[[[(2*S*)-2-(acetylthio)-1-oxo-3-methylpropyl]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12*b*-octahydro-6-oxo-, (4*S*,7*S*,12*bR*)-pyrido[2,1-*a*][2]benzazepin-4-carboxy-acid) is an acetylthio compound, which *in vivo* is rapidly deacetylated to its biologically active thiol analogue, M108048. For the *in vitro* assay, therefore, the major active metabolite M108048 was used. ACE was measured as previously described [11] by measuring the production of [³H]hippuric acid from [³H]hippuryl-glycyl-glycine (HGG) in endothelial cells isolated from the human umbilical vein (HUVEC). Confluent HUVEC in culture plates were pre-incubated for 30 min at 37 °C under a 5% CO₂ air atmosphere in a buffer containing 50 mmol/l HEPES/Tris (pH 7.5) and 100 mmol/l NaCl in the absence (control) or presence of 1 μmol/l captopril (background) or M108048. Thereafter, 0.125 μCi of the substrate [³H]hippuryl-glycyl-glycine was added into each well and the mixture incubated in the same conditions for a further 5-h period, at the end of which the supernatant of each well was transferred into tubes containing 1 ml of 0.1 M HCl. After addition of 1 ml of ethyl acetate, the tubes were centrifuged at 3000 × *g* for 10 min at 4 °C. The supernatants were transferred into vials containing 4 ml of a scintillation cocktail (Formula 989, Packard) and radioactivity corresponding to [³H]hippuric acid was counted in a scintillation counter (LS series, Beckman).

The effect of M108048 on NEP was quantified [12] by measuring the formation of Dansyl-D-Ala-Gly from Dansyl-D-Ala-Gly-Phe(*p*NO₂)-Gly (DAGNPG) using an enzyme isolated from the rat kidney. M108048, the reference compound (thiorphan), or water (for stimulated control) was pre-incubated for 10 min at 37 °C in a buffer containing 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4) and the enzyme (1.8 μg) or buffer (for basal control). Thereafter, the substrate DAGNPG was added at 50 μmol/l final and the mixture incubated for 30 min at 37 °C. The fluorescence intensity corresponding to Dansyl-D-Ala-Gly produced was measured with a fluorimeter (Ultra, Tecan). The standard inhibitory reference compound was thiorphan, which was tested in each experiment at several

concentrations to obtain an inhibition curve from which its IC₅₀ value was calculated.

In addition, the affinity for various receptors of both AVE7688 and its metabolite, M108048, was measured by assessing displacement of radiolabeled ligands by scintillation counter (Cerep, Celle L'Evescault, France). No biologically relevant binding (less than 25% binding at 10 μmol/l) was observed for all receptors tested, including the α₁, β₁, angiotensin AT₁, bradykinin B₂, dopamine D₁ and D₂, muscarinic M₂, histamine H₁ and H₂, and serotonin 5-HT_{2A} receptors (details not shown).

2.2. Animals

Male Zucker diabetic fatty rats (ZDF/Gmi – fa/fa) and their heterozygous (ZDF/Gmi – +/fa) lean littermates were purchased from Charles River Germany (Sulzfeld, Germany) and housed in our local LASW facilities in Frankfurt-Hoechst. The animals were housed individually in standard cages and received a standard chow diet (standard diet #1320, Altromin, Lage, Germany) and tap water *ad libitum*. All animal experiments were performed in accordance with current Aventis Laboratory Animal Science and Welfare (LASW) guidelines and the German law for the protection of animals.

2.3. Pharmacokinetics

ZDF rats weighing approximately 380 g (*n* = 4) received AVE7688, 10 mg/kg (dissolved in hydroxyethyl cellulose), per gavage. After 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h, the animals were anaesthetized lightly (3.5 vol.% isoflurane in 34:66 (v/v) N₂O/O₂) and blood was collected from retro-orbital plexus for determination of plasma levels. The vials were gently shaken and centrifuged for 15 min at 3000 × *g* at 4 °C within 10 min after sample collection. Two milliliters plasma for each was subsequently transferred into polypropylen vials containing 200 μl of 3 N hydrochloric acid cooled at 0 °C. After mixing, the samples were frozen in a dry ice/ethanol bath and stored at –20 °C. Time between blood collection and freezing did not exceed 45 min. As AVE7688 is rapidly metabolized to M108048, only this compound was determined. Samples were analyzed by LC-MS/MS with or without pretreatment with dithiothreitol for cleavage of disulfide bonds followed by extraction, in order to determine total and free plasma concentrations of M108048, respectively. After analysis of the samples, peak plasma concentrations, exposure (area under the curve, AUC), and half-life of M108048 were determined (WIN-NONLIN, Version 3.3, Pharsight, USA).

2.4. Effect on ACE activity

In order to assess the *in vivo* effectivity of AVE7688, plasma ACE activity was determined in ZDF rats weighing approximately 380 g at baseline (*n* = 8) and 2 and 8 h,

respectively, after a single dose of AVE7688, 10 mg/kg p.o. ($n=4$). In a separate set of experiments, plasma ACE activity was determined in ZDF rats after 10 weeks of chronic oral dosing (each $n=10$) of either AVE7688 (45 mg/kg/day in chow) or ramipril (1 mg/kg/day in drinking water).

2.5. Nephropathy study

After the baseline metabolic and renal functional characterization, the ZDF rats were randomly assigned to either of three groups (each $n=15$) at the end of their 10th week of age: The placebo group (ZDF Plac) did not receive specific treatment. Another group (ZDF Rami) received ramipril (1 mg/kg/day) in the drinking water. This dose was chosen because it normalizes blood pressure [13,14] and effectively inhibits plasma and tissue activity of ACE in the spontaneously hypertensive rat [15]. The concentration of ramipril in the drinking water was adjusted to the daily consumption as determined regularly throughout the treatment period (cf. Table 1). The third group (ZDF AVE) received AVE7688 in standard chow, at a concentration of 450 mg/kg. Taking into account an average daily food intake of 40 g/day/rat (cf. Table 1), a dose of approximately 45 mg/kg/day was achieved. The dose of AVE7688 was chosen based on data in the spontaneous hypertensive rat model. In that study, AVE7688 (450 mg/kg chow) had normalized blood pressure, depressed plasma ACE activity, and improved survival to a similar extent as ramipril (1 mg/kg/day in drinking water) [14]. Twenty heterozygous, lean rats (LEAN) received standard chow and served as nondiabetic controls.

At age 22 weeks, four animals of each group were sacrificed for an interim histopathological analysis.

2.6. Metabolism and renal function

Metabolic characterization was performed by collecting urine over 24 h in metabolic cages and by drawing blood samples from the retro-orbital plexus under light anaesthesia (3.5 vol.% isoflurane in 34:66 (v/v) N_2O/O_2) at age 10, 17, 27, and 37 weeks. Food and water intake were monitored frequently.

2.7. Laboratory studies

Glucose (in whole blood) and creatinine (in serum and urine) were quantified with standard kits (Roche Diagnostics) using a Hitachi 912 E analyzer. Urinary albumin was

Table 1
Effect of M108048 and reference compounds on ACE and neutral endopeptidase 24.11 (NEP)

Test compound	ACE IC_{50} (nmol/l)	NEP IC_{50} (nmol/l)
M108048	0.052	5.0
Captopril	0.50	n.d.
Thiorphan	n.d.	0.63

Table 2
Time course of fundamental metabolic parameters

Group	Age, weeks			
	10	17	27	37
<i>Body weight, g</i>				
LEAN	264 $\pm$ 5*	351 $\pm$ 5*	432 $\pm$ 7	464 $\pm$ 9*
ZDF Plac	335 $\pm$ 5	401 $\pm$ 10	412 $\pm$ 12	394 $\pm$ 10
ZDF Rami	328 $\pm$ 8	415 $\pm$ 12	404 $\pm$ 13	384 $\pm$ 9
ZDF AVE	331 $\pm$ 8	423 $\pm$ 14	426 $\pm$ 22	406 $\pm$ 15
<i>Food intake, g/d</i>				
LEAN	12 $\pm$ 1*	22 $\pm$ 1*	15 $\pm$ 1*	19 $\pm$ 1*
ZDF Plac	16 $\pm$ 2	39 $\pm$ 4	38 $\pm$ 2	42 $\pm$ 4
ZDF Rami	10 $\pm$ 1*	38 $\pm$ 2	36 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3
ZDF AVE	13 $\pm$ 2	33 $\pm$ 2	36 $\pm$ 3	50 $\pm$ 3
<i>Water intake, ml/day</i>				
LEAN	15 $\pm$ 1*	30 $\pm$ 4*	15 $\pm$ 1*	18 $\pm$ 1*
ZDF Plac	31 $\pm$ 5	147 $\pm$ 10	143 $\pm$ 9	146 $\pm$ 15
ZDF Rami	17 $\pm$ 4	133 $\pm$ 14	132 $\pm$ 12	166 $\pm$ 13
ZDF AVE	25 $\pm$ 7	94 $\pm$ 13*	140 $\pm$ 16	201 $\pm$ 12*

Values are means $\pm$ S.E.M. $n=15$ (ZDF groups), $n=20$ (LEAN).

* $p < 0.05$ vs. ZDF Plac.

quantified using a fluorescence dye binding assay (Mikro-flural, Progen Biotechnik, Heidelberg, Germany).

The activity of ACE was measured in the plasma using a spectrophotometric assay. Hydrolysis of the tripeptide *N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-phenylalanine-glycyl-glycine (FAPPG) into furylacryloyl-phenylalanine and glycyl-glycine is catalyzed by ACE. The activity of the enzyme was determined by measuring the decrease in absorption at $\lambda=340$ nm (Hitachi type 912 automatic analyzer) in comparison to known standards.

2.8. Terminal haemodynamic measurements

At age 37 weeks, after the final metabolic and renal functional measurements had been performed, the rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p., $n=8-10$ per group). Heart rate, left ventricular pressure and its derivative dP/dt were then measured using a catheter-tip micromanometer (Millar Instruments, Houston, TX). After completion of the measurements, the animals were killed by quick excision of the hearts and kidneys under ongoing deep anaesthesia.

2.9. Pathology

After removal, the kidneys were weighed and thereafter fixed in 10% buffered formalin. Tissues were processed by routine procedures. The specimens were stained with hematoxylin-eosin and periodic acid Schiff. A longitudinal section of one kidney per animal was examined of 12, 6, 9, and 8 animals per group of LEAN, ZDF Plac, ZDF Rami, and ZDF AVE rats, respectively. Absolute incidences of renal lesions were recorded and the extent of lesions was assessed semiquantitatively. Damage to individual glomeruli

Table 3
Time course of laboratory parameters

Group	Age, weeks			
	10	17	27	37
<i>Blood glucose, mmol/l</i>				
LEAN	7.3 ± 0.1*	8.0 ± 0.3*	7.2 ± 0.2*	15.5 ± 1.0*
ZDF Plac	11.9 ± 1.7	29.7 ± 1.3	32.5 ± 1.0	44.9 ± 1.3
ZDF Rami	11.7 ± 1.5	27.3 ± 1.7	32.8 ± 1.1	40.9 ± 1.4*
ZDF AVE	10.7 ± 1.5	21.1 ± 2.8*	36.0 ± 1.9	45.3 ± 2.0
<i>Serum creatinine clearance, ml/min/kg</i>				
LEAN	6.0 ± 0.2	4.9 ± 0.4	6.7 ± 0.1*	4.5 ± 0.2
ZDF Plac	5.4 ± 0.3	4.0 ± 0.4	7.6 ± 0.2	4.5 ± 0.3
ZDF Rami	5.5 ± 0.3	5.0 ± 0.3	6.9 ± 0.2*	5.5 ± 0.3*
ZDF AVE	4.5 ± 0.3	4.7 ± 0.3	6.8 ± 0.3*	4.5 ± 0.2
<i>Urinary albumin/creatinine ratio, mg/mmol</i>				
LEAN	13 ± 1*	10 ± 1*	6 ± 1*	7 ± 1*
ZDF Plac	55 ± 11	405 ± 90	976 ± 215	1543 ± 247
ZDF Rami	37 ± 4	207 ± 55	694 ± 154	1078 ± 224
ZDF AVE	49 ± 7	14 ± 1*	45 ± 5*	153 ± 53*

Values are means ± S.E.M. *n* = 15 (ZDF groups), *n* = 20 (LEAN).

**p* < 0.05 vs. ZDF Plac.

and the distribution of the damaged glomeruli were combined in a grading scheme of glomerulosclerosis according to the following definitions: grade 1 (minimal): single glomeruli affected, thickening of the mesangium; grade 2 (mild): multiple glomeruli affected, thickening of the mesangium; grade 3 (moderate): many glomeruli affected, segmental or nodular thickening of the mesangium and single glomeruli displaying synechia with Bowman's capsule or complete sclerosis; grade 4 (marked): majority of glomeruli affected, many glomeruli with synechia with Bowman's capsule or complete sclerosis, and presence of glomeruli with segmental or nodular thickening of the mesangium; grade 5 (severe): general sclerosis of glomeruli

in all areas. A similar semiquantitative scheme was applied to assess tubulointerstitial damage.

2.10. Statistics

Differences were tested for significance for all groups against ZDF Plac by an unpaired two-sided *t*-test, corrected for multiple testing by the Bonferroni method. The incidences of tubular atrophy and glomerulosclerosis were tested by Fisher's Exact test. Data are given as means ± S.E.M. A *p* value of less than 5% was considered significant.

3. Results

3.1. In vitro assay

The inhibitory effect of M108048 on ACE and NEP was quantified using in vitro assays. Table 1 shows the concentration of M108.048 and reference compounds that inhibit 50% (IC₅₀) of ACE and NEP.

3.2. Pharmacokinetics

Peak plasma concentration of total M108048 was 201 ng/ml, measured at the first time point, i.e., 1 h after gavage. Area under the data curve (0–24 h) amounted to 1136 ng h/ml. Total M108048 was eliminated from plasma following a first-order kinetic with a terminal half-life of 12 h. In comparison, free M108048 was found at levels one order of magnitude lower (peak level 16.7 ng/ml).

3.3. ACE activity

Plasma ACE activity was 101 ± 2 U/l at baseline. After single dosing (10 mg/kg), plasma ACE activity was de-

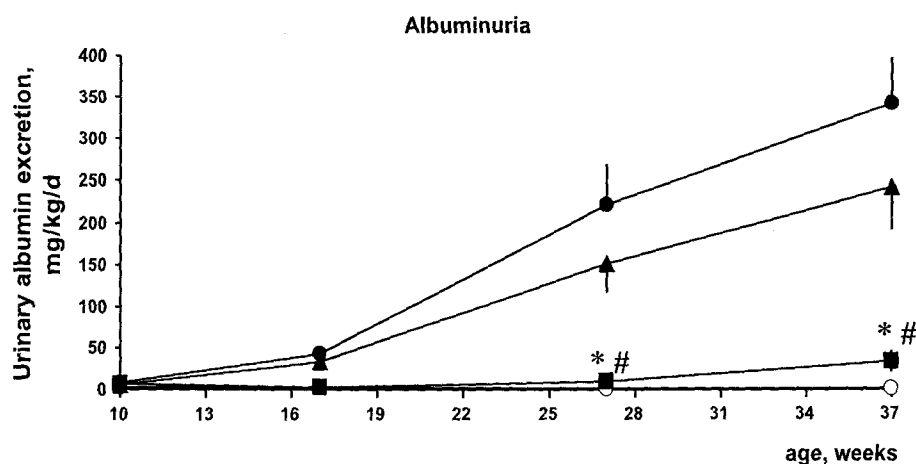


Fig. 1. Time course of albuminuria in ZDF rats. There is a progressive increase in urinary protein excretion in placebo animals (black circles), whereas there is virtually no albuminuria in heterozygous, lean animal (open circles). Albuminuria tended to be reduced in ZDF Rami (triangles) but was almost completely prevented in ZDF AVE (squares). **p* < 0.05 vs. ZDF Plac; #*p* < 0.05 vs. ZDF Rami.

Table 4
Haemodynamic parameters at age 37 weeks

Group	Parameter unit			
	Heart rate (1/min)	LVSP (mm Hg)	LVdP/dt _{max} (mm Hg/s)	LVdP/dt _{min} (mm Hg/s)
LEAN	294 ± 11*	111 ± 6	6037 ± 485	5932 ± 504*
ZDF Plac	232 ± 14	103 ± 8	5123 ± 454	4383 ± 390
ZDF Rami	198 ± 14	101 ± 7	4949 ± 438	3858 ± 394
ZDF AVE	222 ± 14	100 ± 3	5162 ± 89	4388 ± 253

Values are means ± S.E.M. *n* = 8–10.

LVSP, left ventricular systolic pressure.

**p* < 0.05 vs. ZDF Plac.

creased to 7 ± 1 and 14 ± 1 U/l after 2 and 8 h, respectively. After 10 weeks of chronic oral dosing, plasma ACE activity was depressed to 10 ± 3 and 8 ± 1 U/l in the AVE7688 and ramipril groups, respectively.

3.4. Metabolic data

Basal metabolic and laboratory data over the time course from age 10 weeks to 37 weeks are given for each group in Tables 2 and 3. Obese animals developed progressive diabetes mellitus, as manifested by progressively increased water intake and blood glucose levels over time. There were no systematic effects of creatinine clearance in all groups except for a trend towards increased creatinine clearance at 27 weeks, which disappeared by week 37. Of note, creatinine clearance was not relevantly reduced in the ZDF groups compared to the LEAN groups.

Excretion of urinary albumin increased progressively in ZDF Plac rats, while that in LEAN was negligible. Chronic treatment with ramipril tended to decrease albuminuria over time, e.g., by 30% at 37 weeks, *p* = 0.20 vs. ZDF Plac. Treatment with AVE7688 practically prevented albuminuria at all time points. This anti-albuminuric effect in ZDF AVE was significantly greater than in ZDF Rami (*p* < 0.05). These results were similar whether the urinary albumin/creatinine ratio (Table 3) or daily albumin excretion (Fig. 1) was taken as a measure of albuminuria.

3.5. Haemodynamics

Haemodynamic parameters at age 37 weeks are summarized in Table 4. Lean animals had a higher heart rate, and left ventricular dP/dt_{min} than their diabetic littermates. Peak systolic pressure and left ventricular dP/dt_{max} tended to be higher in LEAN as compared to ZDF Plac. There were no significant haemodynamic differences between ZDF Plac and either ZDF Rami or ZDF AVE. In particular, left ventricular peak systolic pressure was not altered by any treatment.

3.6. Pathology

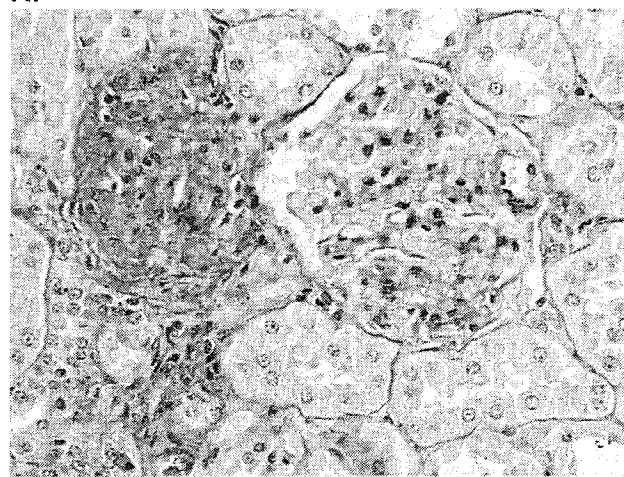
In the interim analysis at age 22 weeks, there were no consistent pathological findings in the ZDF Plac kidneys.

Armanni–Ebstein cells were noted in 50% of the homozygous animals, and there was no glomerulosclerosis.

In the final analysis, at age 37 weeks, kidneys weighed 0.26 ± 0.01 g/100 g body weight in the LEAN group. In the ZDF animals, the kidney weight was considerably higher, but without differences between treatment groups (ZDF Plac: 0.45 ± 0.02 ; ZDF Rami: 0.43 ± 0.04 ; ZDF AVE: 0.43 ± 0.07 g/100 g body weight). A moderate pelvic dilation was noted in about 50% of the animals in all groups including LEAN, but this did not impair determination of specific damage to glomerular or tubular structures.

Armanni–Ebstein cells, large clear tubular cells which sometimes contained remnants of PAS positive material, indicative of persistent diabetes and resembling human

A:



B:

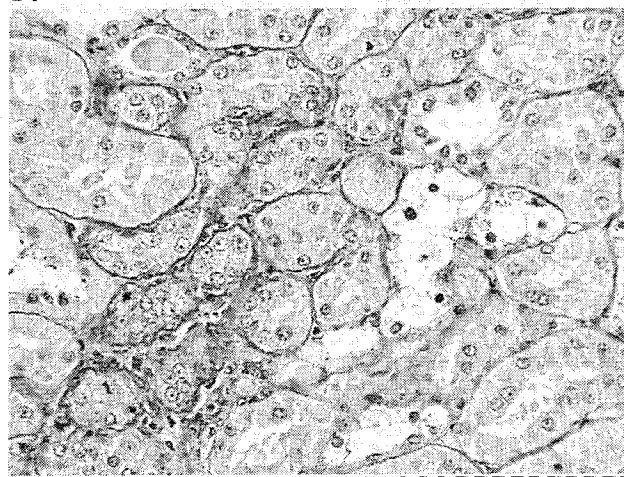


Fig. 2. Histopathological features of nephropathy in ZDF rats. (A) Glomerulosclerosis. A sclerotic glomerulum (left) and a normally appearing glomerulum (right) in close vicinity. (B) Tubular atrophy and Armanni–Ebstein cells. Atrophic tubuli (lower left) are outlined by a thickened basement membrane. Cells are small, nuclei are crowded and cytoplasm is scant. Armanni–Ebstein cells (central right) are characterized by large size and clear appearance, containing hardly any remnants of PAS positive material. Objective: $\times 20$.

162
162

2. Excepciones de Patentabilidad

Con el fin de superar esta objeción, las reivindicaciones 16, 17, 18 y 20 dirigidas a proteger el método de tratamiento han sido eliminadas del capítulo reivindicatorio.

3. Novedad

En cuanto a la novedad, argumenta su despacho que existe identidad entre las características esenciales de la fórmula I de la presente solicitud y el ejemplo citado por la anterioridad D2.

Con el fin de superar la objeción por novedad, informo a su Despacho que en dicho ejemplo el anillo fenilo unido al sistema cíclico no se encuentra dentro de las definiciones de B1/B2 del compuesto de fórmula (I) reivindicado en la presente solicitud. Por lo tanto, la reivindicación 1 es novedosa en vista del compuesto revelado en la anterioridad D2.

4. Nivel Inventivo

Con el fin de demostrar el nivel inventivo de los compuestos reivindicados en la presente solicitud, me refiero al compuesto del ejemplo 148 del documento D2 con el grupo sustituyente iso-butilo como el compuesto más cercano. Dicho grupo también se muestra como el sustituyente preferido en los compuestos de dicha solicitud de patente (ver página 8 de D2 o la reivindicación 22 de D2 y reivindicaciones dependientes que muestran dicho grupo isobutilo como la característica esencial de la invención. Así mismo, dicho grupo se revela en muchos de los numerosos ejemplos de la solicitud. Por lo tanto, D2 enseña a una persona versada en la materia el uso de un grupo iso-butilo y por lo tanto aleja a una persona versada en la materia de escoger el grupo iso-propilo reivindicado en la presente solicitud. En consecuencia, los compuestos de la presente invención no son obvios para una persona versada en la materia en vista de los compuestos de la anterioridad.

Por otro lado, el compuesto más cercano con respecto al documento D1 USP 5 430 145 es el compuesto MDL 100240 donde R₂ es -CH₂-fenilo. Nada en el documento D1 le indica a una persona versada en la materia de seleccionar el grupo isopropilo. Es más, la superioridad de los compuestos de la presente solicitud se demuestra en la Figura 1 con el compuesto MDL107688 (R₂ en D1 es iso propilo) donde se muestra una elevada reducción de la presión arterial sobre el compuesto MDL 100240.

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA.

163, 163

Ahora bien, con el fin de demostrar dicha superioridad, a continuación presento los ensayos comparativos llevados a cabo con los compuestos de la presente solicitud y los compuestos de los documentos D1 y D2.

MDL 108048: Formula IC de la presente solicitud

MDL 100173: El principio activo de MDL100240 en D1

BS39-0029a: Ejemplo 148 de D2

En primer lugar, los compuestos MDL 108048; MDL 100173 y BS39 0029a son tiolos libres y por lo tanto, los mismos son comparables entre si. El compuesto de la presente solicitud MDL 10848 (R₁=H) corresponde al compuesto MDL 107688 (R₁=acetilo) tal como se describe en la figura 1 de la presente solicitud.

Los compuestos mencionados se han evaluado con respecto a la inhibición in vitro de la enzima convertidora de angiotensina humana (hACE) y endopeptidasa neutral (NEP) (ver tabla adjunta). Es evidente observar a partir de los resultados obtenidos que la inhibición en ambos casos (enzima convertidora de angiotensina humana (hACE) y endopeptidasa neutral (NEP)) es mayor si se compara con los compuestos de los documentos D1 y D2 lo cual hace evidente el nivel inventivo de los compuestos acá reivindicados. Ahora bien, si tenemos en cuenta que la inhibición de la endopeptidasa neutral resulta en un elevadas concentraciones de péptido natriuretico lo cual a su vez conlleva a efectos como diuresis, disminución de volumen intravascular, retorno venoso entre otros, es claro entonces que los compuestos de la presente solicitud muestran una elevada reducción de la presión arterial.

Igualmente sucede con la inhibición de la enzima convertidor a de angiotensina la cual evita la conversión de angiotensina I en angiotensina II (sustancia vasoconstrictora potente) resultando en disminución de angiotensina II circulante, aldosterona, disminución de la resistencia periférica lo cual conlleva evidentemente a una reducción en la presión arterial.

Con respecto a la actividad inhibitoria de hACE, los compuestos MDL 108048, MDL 100173 y BS39002a presentan potencia inhibitoria de hACE similar y cada compuesto presenta inhibición no competitiva o mezclada de actividad de ACE basado en el análisis de los datos de V_m y K_m.

Con respecto a la actividad inhibitoria de NEP, los compuestos MDL 100173 y BS-39-002a presentan inhibición no competitiva o mezclada; sin embargo, el compuesto MDL 108048 (compuesto de la presente solicitud) presenta una inhibición cualitativamente diferente e inesperada. Es así como el compuesto MDL 108048 (compuesto de la presente solicitud) es un inhibidor débil de NEP si se compara con los compuestos MDL 100173 o BS39-002a. Así mismo, el análisis de los datos de Vm y Km sugieren que el compuesto MDL 108048 es un inhibidor no competitivo de NEP. Por lo tanto, debido a este diferente mecanismo de acción, el compuesto MDL 108048 de la presente solicitud es capaz de generar un nivel bajo de inhibición de NEP de larga duración ya que se une a un sitio diferente al del sustrato (agonista) y como tal, no puede ser desplazado por el sustrato (agonista).

Debido a que la endopeptidasa neutral presenta una elevada prevalencia en el hígado se puede deducir que la tendencia disminuida de excretar albúmina por parte del compuesto MDL 107688 se basa en la inhibición competitiva de NEP lo cual resulta en la capacidad de prevenir la neuropatía en pacientes diabéticos (ver Schafer et al, Cardiovascular Research 2003,60, 447-454). Es así como dicho mecanismo de acción se refleja en la actividad superior de los compuestos de la presente solicitud haciendo la presente solicitud inventiva sobre el arte previo.

En conclusión, los compuestos reivindicados no son obvios para una persona versada en la materia ya que presentan propiedades mejoradas así como sorprendentes sobre los compuestos revelados en el estado de la técnica.

En conclusión, dada la evidente superioridad de los compuestos reivindicados en la presente solicitud, solicito a su Despacho que se otorgue el privilegio de patente a la presente invención.

5. Anexos:

- 5.1. Formulario de modificaciones
- 5.2. Recibo de pago
- 5.3. Nuevo capítulo reivindicatorio (16 reivindicaciones)

**G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA.**

165
165

5.4. Tablas de resultados

5.5. Artículo Schafer *et al*, Cardiovascular Research

De la Señora Jefe,



Luis Patiño Leyva

C.C. No. 2.930.616 de Bogotá

T.P.A. No. 2698 del C. Sup. de la Judicatura

Carrera 11A No. 94-76 Oficina 308 Santa Fe de Bogotá

Teléfonos: 6161948

P20081 (55126)

13 AGO. 2007

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material

☒ Modificación a una solicitud

②

SOLICITANTE

Nombre: **SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH**

Dirección: Bruningstrasse 50

Nacionalidad o Domicilio: Frankfurt am main
Alemania

Lugar de Constitución: Alemania

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **LUIS PATIÑO LEYVA**

Dirección: Carrera 11A No. 94-76 Oficina 308

Teléfono: 616 19 48 Fax: 616 39 76

E-mail: gustavo hollmann@etb.net.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 2.930.616

TPA 2698

④

Número de Expediente:

03.088.391

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo pliego reivindicatorio con 16 reivindicaciones sobre el cual solicito se efectúe el examen de patentabilidad de la solicitud.

⑥

Comprobante de pago No.

07-63,658

Fecha

8 de agosto de 2007

⑦

Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa.

☐ Poderes si fuere el caso, junto con la sustitución de los mismos a mi favor.

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

☒ Nuevo capítulo reivindicatorio

⑧

NOMBRE

LUIS PATIÑO LEIVA

FIRMA



CC 2.930.616 de Bogotá - TPA 2698 CSJ

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 63,658
FECHA : AGOSTO 8 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
GUSTAVO HOLLMANN	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	66409888	08/08/2007	495,000.00

***** CONCEPTO *****

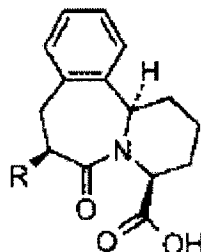
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	99,000.00
		TOTAL :	\$ 99,000.00

SON: NOVENTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Inhibición *In-Vitro* de enzima convertidora de angiotensina (ACE) y endopeptidasa neutral (NEP).



Compuesto Numero	R	Inhibición de hACE IC 50 (nM)	Inhibición de NEP IC50 (nM)
MDL 108048 (Formula IC) Compuesto de la Presente solicitud		<u>0.052</u>	<u>5.0</u>
MDL 100173 (USP 5430145) Col. 74, Tabla 1) ⁰¹		0.039	1.0
BS39-002a ⁰² (ejemplo 148 de EP 0671172)		0.029	0.59

Adicionalmente, el tipo de inhibición de los compuestos evaluados se determinó de acuerdo a los respectivos valores V_m y K_m .

169
169

ACE:

Compuesto	Concentración	Vm (A.U.)	Km (A.U.)	Tipo de inhibición
BS39-002 ^a	0 3x10 ⁻¹² M 3x10 ⁻¹¹ M 3x10 ⁻¹⁰ M	1.00E +05 -1.50E+02 -3.33E+04 -1.43E+03	2.00E+04 -2.90E-06 -3.33E-05 -1.00E-05	Vm y Km varían en presencia del incremento de la concentración del compuesto inhibitorio: competencia no competitiva o mezclada
MDL108048	0 3x10 ⁻¹² M 3x10 ⁻¹¹ M 3x10 ⁻¹⁰ M	1.00E-05 -2.00E-04 1.25E+05 -5.00+02	2.00E-04 -1.00E-05 1.25E+04 -1.00E-06	Vm y Km varían en presencia de del incremento de la concentración del compuesto inhibitorio: competencia no mezclada o competitiva
MD100173	0 3x10 ⁻¹² M 3x10 ⁻¹¹ M 3x10 ⁻⁹ M	1.00E+05 1.67E+04 3.33E+04 1.72E+02	2.00E+04 1.67E-05 3.33E-05 1.72E-06	Vm y Km varían en presencia del incremento de la concentración del compuesto evaluado: competencia no competitiva o mezclada

NEP

Compuesto	Concentración	Vm (A.U.)	Km (A.U.)	Tipo de inhibición
BS39-002 ^a	0 1x10 ⁻¹⁰ M 5x10 ⁻¹¹ M 1x10 ⁻⁹ M	161.29 158.73 126.58 19.68	1.13E-05 9.52E-06 2.53E-05 1.97E-07	Vm y Km varían en presencia del incremento de la concentración del compuesto inhibitorio: competencia no competitiva o mezclada
MDL108048	0 3x10 ⁻¹⁰ M 3x10 ⁻⁹ M	161.29 135.13 102.04	1.13E-05 1.08E-05 1.02E-05	Vm y Km varían en presencia de del incremento de la

120/170

	$3 \times 10^{-8} \text{M}$	12.95	7.77×10^{-5}	concentración del compuesto inhibitorio: <u>competencia no competitiva</u>
MD100173	0 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ $3 \times 10^{-10} \text{M}$ $3 \times 10^{-9} \text{M}$	1.00×10^5 1.67×10^4 3.33×10^4 1.72×10^2	2.00×10^4 1.67×10^{-5} 3.33×10^{-5} 1.72×10^{-6}	V_m y K_m varían en presencia del incremento de la concentración del compuesto evaluado: competencia no competitiva o mezclada

Definiciones:

Inhibición Competitiva: El agonista (sustrato) (bradiquinina en el ensayo de inhibición de péptido atrial natriuretico en el ensayo de inhibición de NEP) y antagonista (compuesto inhibidor) compiten por la enzima (hACE o NEP) se unen al sitio y no hay formación de complejo enzima-agonista-antagonista (enzima-sustrato-inhibidor). El valor V_m es constante y solo K_m cambia cuando la concentración de antagonista se eleva.

Inhibición Incompetitiva: elevadas concentraciones del agonista (sustrato) (bradiquinina en el ensayo de inhibición de hACE y NEP) son capaces de desplazar el compuesto antagonista de la enzima perdiéndose el efecto inhibitorio del antagonista. A medida que la concentración del antagonista se eleva K_m y V_m cambian de manera proporcional

Inhibición No-competitiva: elevadas concentraciones de agonista (sustrato) (bradiquinina en el ensayo de inhibición de hACE o NEP) no son capaces de desplazar el compuesto antagonista del sitio de unión de la enzima. Esto significa que no hay influencia en el complejo de unión inhibidor/enzima. Independientemente de la concentración del agonista aún existe una acción completa del antagonista sobre la enzima. A medida que la concentración del antagonista se eleva, K_m es constante y V_m cambia. La unión de la enzima y el agonista (sustrato) no tiene influencia sobre la unión del antagonista (inhibidor) y la enzima.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:

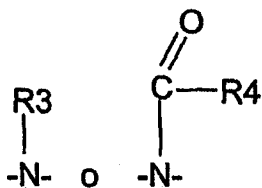


en la que,

R₁ es hidrógeno, -CH₂OC(O)C(CH₃)₃, o un grupo acilo;

R₂ es hidrógeno, -CH₂O-C(O)C(CH₃)₃, un alquilo (C₁-C₄), arilo, aril-alquilo (C₁-C₄) o difenilmetilo;

X es $-(CH_2)_n$, en la que n es un entero 0 o 1, -S-, -O-,



en la que R₃ es hidrógeno, un alquilo (C₁-C₄), arilo o aril-(alquilo C₁-C₄), y R₄ es -CF₃, alquilo (C₁-C₁₀), arilo o aril-(alquilo C₁-C₄);

B₁ y B₂ son, cada uno independientemente, hidrógeno, hidroxilo u -OR₅, en la que R₅ es alquilo (C₁-C₄), arilo o aril-(alquilo C₁-C₄) o, en la que, B₁ y B₂ están unidos a átomos de carbono adyacentes, pudiendo tomarse B₁ y B₂ conjuntamente con dichos átomos de carbono adyacentes para formar un anillo de benceno o metilendioxi;
o sus sales farmacéuticamente aceptables o sus estereoisómeros.

2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que B₁ y B₂ son hidrógeno.

172
172

3. El compuesto según la reivindicación 2, en el que X es $-(CH_2)_n$ y n es 1.
4. El compuesto según la reivindicación 3, en el que R_1 es acetilo o hidrógeno.
5. El compuesto según la reivindicación 4, en el que el compuesto es éster difenilmetílico del ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[2(R)-acetiltio-3-metil-1-oxobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico.
6. El compuesto según la reivindicación 4, en el que el compuesto es éster difenilmetílico de ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[2(S)-acetiltio-3-metil-1-oxobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico.
7. El compuesto según la reivindicación 4, en el que el compuesto es éster difenilmetílico del ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[3-metil-1-oxo-2(R)-tiobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico.
8. El compuesto según la reivindicación 4, en el que el compuesto es éster difenilmetílico del ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[3-metil-1-oxo-2(S)-tiobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico.
9. El compuesto según la reivindicación 4, en el que R_2 es hidrógeno.
10. El compuesto según la reivindicación 9, en el que el compuesto es ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[2(R)-acetiltio-3-metil-1-oxobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico.
11. El compuesto según la reivindicación 9, en el que el compuesto es ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[2(S)-acetiltio-3-metil-1-oxobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico.
12. El compuesto según la reivindicación 9, en el que el compuesto es ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[3-metil-1-oxo-2(R)-tiobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico.
13. El compuesto según la reivindicación 9, en el que el compuesto es ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[3-metil-1-oxo-2(S)-tiobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico.