

CASTELLANOS & Co.

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

233 233
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-088391- -00013-0000

Fecha: 2009-08-06 14:11:23 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 15

Señora

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo Industria y Turismo

E.

S.

D.

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 pié de mi firma, en atención a su oficio No. 5152 notificado el 8 de mayo de 2009.

1. Consideraciones iniciales

1.1. Datos comparativos

Con relación a los datos comparativos, argumenta el señor examinador que "aunque el solicitante conocía el estado del arte más cercano sol hasta el momento en que esta Dependencia objeta por falta de altura inventiva aporta los datos de ensayos experimentales relacionados con la superioridad biológica de los compuestos reivindicados y el efecto superior con respecto a los compuestos divulgados por la publicación en comento".

234 23A

CASTELLANOS & Co.

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Los ensayos experimentales aportados al expediente a lo largo del presente trámite, específicamente en las repuestas al examen de fondo, deben ser aceptados por su Despacho siguiendo las enseñanzas del Manual Andino de Patentes¹ que establece lo siguiente:

"Ante una objeción por falta de nivel inventivo, el solicitante puede aportar pruebas para apoyar ese nivel en forma de argumentos o documentos, por ejemplo, para demostrar que había un prejuicio técnico que llevaba a la persona versada en la materia en sentido contrario a la invención, o bien, mediante ensayos especialmente comparativos para demostrar la presencia de un efecto técnico inesperado o ventaja de la invención, respecto del estado de la técnica más cercano"

Por otra parte, esta práctica de rechazar los datos experimentales o comparativos para sustentar el nivel inventivo de una invención no es una práctica general de su Despacho. De hecho, he presentado distintitos asuntos donde datos experimentales así como datos comparativos han sido aceptados por su Despacho con el fin de sustentar el nivel inventivo de tal manera que no es claro en que se basa el señor examinador para no aceptar los mismos.

En este orden de ideas, solicito al señor examinador aceptar los ensayos experimentales aportados durante el presente trámite que demuestran el nivel inventivo de los compuestos reivindicados.

1.2. Diseño experimental y estudios estadísticos

Argumenta el señor examinador que "los resultados in vitro no forman parte de un estudio serio que se hubiesen incorporado a la solicitud en el momento de la presentación de la solicitud, tampoco señalan el número de muestras tomadas y el diseño experimental que soporta la obtención de dichos resultados, además

235 239

CASTELLANOS & Co.

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

obvian la identificación del reactivo biológico y del estudio estadístico utilizado, por lo cual, los datos de inhibición no tienen asidero en un estudio experimental estadísticamente representativo que de cuenta de los resultados inesperados..."

En cuanto a esta objeción, nuestro apoderado expresa su total asombro y desacuerdo toda vez que en ninguna oficina de patentes a nivel mundial se ha elevado tal objeción. Es más, ni en la Decisión 486 ni en el Manual Andino de Patentes se hace mención a la presentación de diseños experimentales o tratamiento estadístico de los ensayos experimentales y todos los demás aspectos expresados por el señor examinador.

Sobre este punto, pongo de presente a su Despacho que los datos y resultados presentados durante el presente trámite han sido aportados por el solicitante, en este caso, **SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GmbH** y como tal el señor examinador debe partir de la buena fe² del solicitante en cuanto a la validez, asidero estadístico, etc, de los mismos. Es más, el principio de la buena fe se encuentra consagrado en la Constitución Política de Colombia en su artículo 83 el cual establece:

"Artículo 83: Las actuaciones de los particulares y de las autoridades públicas deberán ceñirse a los postulados de la buena fe, la cual se presumirá en todas las gestiones que aquellos adelanten ante éstas"

Habiendo aclarado los anteriores puntos, procederé a demostrar el sustento descriptivo y el nivel inventivo de los compuestos acá reivindicados:

2. Sustento descriptivo

Argumenta nuevamente el señor examinador que "no existe mención alguna al arte previo o a los problemas relacionados con la actividad de las enzimas como parte del fundamente técnico, tampoco se desarrolla el esquema problema solución"

237 238

CASTELLANOS & Co.

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Igualmente, en el aparte de la descripción de la técnica se menciona que los compuestos de la presente invención han mejorado sorprendentemente las propiedades de ADME sobre los compuestos ejemplificados en el estado de la técnica de tal manera que si se señalan las ventajas con respecto a la tecnología anterior y si hay divulgación suficiente de la invención.

Por otra parte, en el aparte síntesis química y parte experimental se encuentra descrita al forma como se pueden obtener los compuestos descritos en la invención de tal manera que una persona versada en la materia puede llegar a ejecutar la invención teniendo como base la información suministrada en la invención.

En este orden de ideas, es claro que la presente invención cumple con el requisito de sustento descriptivo del artículo 28 de la Decisión 486.

3. Nivel inventivo

Como se ha venido argumentando a lo largo del presente trámite, la selección de la cadena lateral isopropilo es la característica principal de los compuestos acá reivindicados. Esta característica es abarcada por las definiciones generales de D1 y D2 pero de ninguna manera se encuentra específicamente revelada en dichos documentos. Es más, el capítulo reivindicatorio de la presente invención ha sido limitado a unos pocos compuestos que presentan dicha característica.

Argumenta el señor examinador que "los datos permiten concluir que los compuestos de los antecedentes D1, en especial, MDL 100173 y D2 (ejemplo 148) son superiores al compuesto de referencia reclamado MDL108048 toda vez que requieren menor dosificación para inhibir el 50 % de las moléculas de la enzima convertidora de angiotensina. Igual situación ocurre con la inhibición del péptido vasoactivo que en el caso de los compuestos con estructura lineal o alquílica requieren de 5nM mientras que en el caso del MDL 100173 y BS39-002a apenas requieren una dosis de 1nM y 0.59 nM

CASTELLANOS & Co.

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

238 238

Sobre este punto, pongo de presente al señor examinador en el presente caso el valor de concentración inhibitoria no es decisivo. Dicho valor se indicó en la respuesta anterior con el fin de demostrar que los compuestos de la presente invención son buenos inhibidores de ECA y NEP.

Como se ha explicado a lo largo del presente trámite en relación 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 (ver valores de concentración inhibitoria CI_{50}). Así mismo, el análisis de los datos de V_m y K_m sugieren que el compuesto MDL 108048 es un inhibidor no competitivo de NEP.

Ahora bien, 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 disminuida tendencia *in vivo* de excretar albúmina por parte del compuesto MDL 107688 se basa en la inhibición no competitiva de NEP lo cual resulta en la capacidad de prevenir la nefropatía en pacientes diabéticos. Este mecanismo de acción diferente no podía de ninguna manera predecirse y da como resultado una elevada actividad de los compuestos de la presente solicitud. Este hallazgo puede confirmarlo el señor examinador en el artículo adjunto *Schafer et al, Cardiovascular Research 2003,60, 447-454.*

CASTELLANOS & Co.

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

239 231

Sobre este punto, quiero poner de presente a su Despacho que según el Manual Andino de Patentes, uno de los indicios de la presencia de nivel inventivo es el carácter inesperado del resultado³. En este caso, el diferente mecanismo de acción ya descrito de los compuestos acá reivindicados, debe considerarse como evidencia del nivel inventivo del compuesto de la presente invención.

En consecuencia, solicito al señor examinador conceder el privilegio de patente a la presente invención toda vez que las objeciones planteadas por su Despacho han sido superadas.

Anexos

- *Schafer et al, Cardiovascular Research 2003,60, 447-454.*

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

Calle 94A # 7A-09

Teléfonos: 6107420

DE 449 2000

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 ($p = \text{ns}$) 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).

241 241

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*b**R*)-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 spontaneously 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 2

Time course of fundamental metabolic parameters

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

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

* $p<0.05$ vs. ZDF Plac.

quantified using a fluorescence dye binding assay (Mikroflural, 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-phenylalanyl-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 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 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/nmol</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-

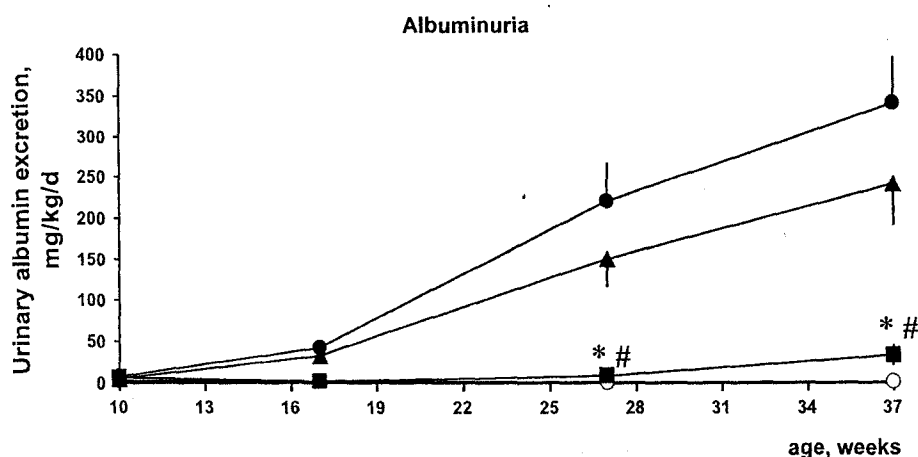


Fig. 1. Time course of albuminuria in ZDF rats. There is a progressive increase in urinary protein excretion in placebo animals (black circles), whereas there is virtually no albuminuria in heterozygous, lean animal (open circles). Albuminuria tended to be reduced in ZDF Rami (triangles) but was almost 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.

increased 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

General metabolic and laboratory data over the time course from 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

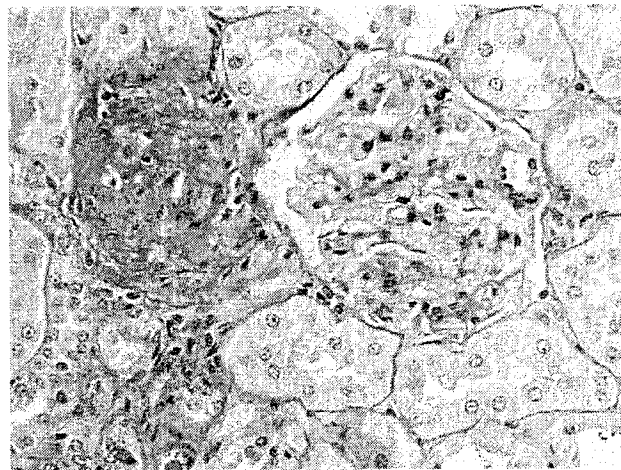
In the interim analysis at age 22 weeks, there were no consistent pathological findings in the ZDF Plac kidneys.

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.

Armani–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 Armani–Ebstein cells. Atrophic tubuli (lower left) are outlined by a thickened basement membrane. Cells are small, nuclei are crowded and cytoplasm is scant. Armani–Ebstein cells (central right) are characterized by large size and clear appearance, containing hardly any remnants of PAS positive material. Objective: × 20.

Armanni–Ebstein lesions were regularly noted in all groups except LEAN. Glomerulosclerosis, varying from minimal to marked severity, was present in all ZDF Plac animals and in none of the LEAN controls. The sclerotic alterations within the glomerulum were characterized by collapse of capillaries and by focal, segmental, or nodular hyaline thickening of mesangium culminating in synechia and complete sclerosis. The lesions resembled those observed typically in human diabetic nephropathy. A typical example is presented in Fig. 2A. Tubulointerstitial lesions were generally mild in severity. Tubular atrophy (Fig. 2B) was present in all ZDF Plac animals and in none of the LEAN controls.

The incidences of glomerulosclerosis and tubular atrophy were reduced significantly in ZDF AVE to 13% (1/8) and 25% (2/8), respectively, compared to 100% (6/6) in ZDF Plac. The severity of glomerulosclerosis in the one animal affected in the ZDF AVE group was grade 1 (minimal damage). In ZDF Rami, the incidence of glomerulosclerosis was reduced to 67% (6/9), which was statistically not significant. The severity of glomerular and tubulointerstitial damage was similar in ZDF Plac and ZDF Rami kidneys.

Fig. 3 summarizes the semiquantitative scores of moderate glomerulosclerosis (A) or tubular atrophy (B). Glomerulosclerosis and tubular atrophy tended to be reduced by ramipril (not significantly). In ZDF AVE, both glomerulosclerosis and tubular atrophy were markedly reduced (each $p < 0.05$).

4. Discussion

The present study shows that in ZDF rats, progressive nephropathy develops in parallel with diabetes mellitus, beginning at around age 10 to 17 weeks. Significant renal damage can be demonstrated both functionally and morphologically, thus resembling human diabetic nephropathy. Vasoepitidase inhibition can effectively prevent kidney damage in this animal model of type II diabetes.

4.1. Nephropathy in the ZDF rat

Diabetic nephropathy is a typical complication of long-standing diabetes mellitus, leading to progressive functional impairment and, ultimately, terminal renal failure. Considering the worldwide increasing incidence of diabetes mellitus, novel therapies for the prevention and treatment of diabetic nephropathy are urgently needed. Recently, landmark clinical trials investigating ACE inhibitors and angiotensin receptor blockers have demonstrated renal protection in patients with diabetes [2–5,16]. Interestingly, the profiling of these compounds in diabetic nephropathy was started long after these substances had entered the market in different indications. A reason for this delay may be that a commonly accepted animal model for type II diabetic nephropathy has not been available. Kidney damage has been described in streptozotocin-treated rodents, but this model is hypo-insulinaemic, thus reflecting more type I diabetes, which accounts for a relatively small proportion of all cases of diabetes. It seemed therefore worthwhile to characterize renal function and morphology in a model of non-insulin-dependent diabetes. The ZDF rat, which is frequently used in studies related to obesity and insulin resistance, is such a model. Our data show that along with the metabolic changes occurring over time in these rats, the nephropathy that develops functionally and morphologically resembles human diabetic nephropathy. In a previous study, the suitability of the Zucker rat has been questioned because of predominant pelvic dilation which precluded histopathologic analysis of diabetes related damage, such as glomerular damage [17,18]. In the present study, a moderate degree of pelvic dilation was noted, but nevertheless it was possible to assess glomerular and tubular morphology in all animals. We assume that the different substrains account for the differences in pelvic dilation observed by Vora et al. [18] and in our study (Drt/fa vs. fa/fa).

Progressive albuminuria, focal glomerulosclerosis, and tubular atrophy are common features in ZDF rat as well as in human diabetic nephropathy. It may therefore be justified to conclude that this animal model is suitable for preclinical evaluation of novel pharmacological compounds in human diabetic nephropathy. It should be noted, however, that the massive proteinuria in ZDF rat occurs in the absence of a decrease in glomerular filtration rate. While the extent of damaged glomeruli and tubuli can be severe, the absolute number of affected nephrons is obviously not sufficient to

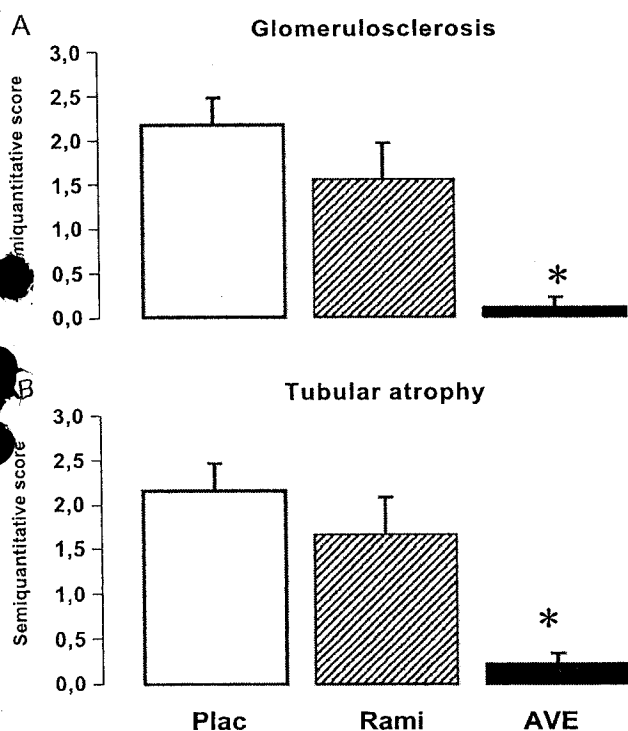


Fig. 3. Histopathological scores of glomerulosclerosis (A) and tubular atrophy (B) in the different treatment groups. While ramipril tended to reduce glomerulosclerosis and tubular atrophy (n.s.), AVE7688 practically prevented both morphological features of kidney damage.

2467
246

produce a measurable impairment of renal filtration, at least until age 37 weeks. Thus, the ZDF rat resembles more the earlier stages of human diabetic nephropathy, which is characterized by an increase (rather than decrease) of creatinine clearance.

4.2. Effects of ACE and neutral endopeptidase inhibition in the ZDF rat

Data from the present study show that early intervention in the renin–angiotensin system can prevent the functional and morphological features of nephropathy in an animal model of type II diabetes. It is interesting to note that nephroprotection was unrelated to haemodynamic effects. While left ventricular contractility seems to be generally reduced in the obese animals as compared to their lean littermates, there were no relevant effects on heart rate, left ventricular contractility, or myocardial relaxation by chronic treatment with AVE7688 (cf. Table 4). Although the anaesthesia may have diminished potential differences between groups, the absence of a blood pressure effect in the ramipril and AVE7688 groups is not unexpected, because the ZDF rat is not a hypertensive animal model.

In addition to the absence of systemic haemodynamic effects, chronic treatment with AVE7688 had no effect on blood glucose levels after the first 7 weeks of treatment. This is an important finding, as it illustrates that the anti-albuminuric effect of AVE7688 is independent of, and probably additive to, control of blood pressure and glucose levels. Nephroprotection by AVE7688 in the ZDF rat likely represents a specific effect related to inhibition of the renin–angiotensin system and neutral endopeptidase locally in the kidney. The basic pharmacological characteristics of AVE7688 and its major metabolite, M108048, suggest that at the dose chosen in the present experiments, unspecific effects are unlikely.

The ACE inhibitor ramipril has proven clinical efficacy in diabetic and in nondiabetic nephropathy, independent of systemic blood pressure [2,19]. Interestingly, the relative increase in albuminuria produced by ramipril in the present study (approximately 30%), albeit statistically not significant, is in the same range as that seen with ACE inhibition and angiotensin receptor blockade in recent clinical trials [16,20]. Data from previous studies indicate that chronic kidney damage may be ameliorated by improved intrarenal haemodynamics and/or reduced renal angiotensin II (for review, see Ref. [21]). In a rat double transgenic model overexpressing human renin and angiotensinogen, nephropathy is characterized by marked glomerulosclerosis and progressive albuminuria [22] illustrating the importance of the renin–angiotensin system in the pathogenesis of kidney related end organ damage. Based on theoretical considerations, the vasopeptidase inhibitors have been postulated to exert a more potent nephroprotection, because the bradykinin degradation is more effectively prevented, and tissue concentrations of the natriuretic peptides are increased.

Indeed, the vasopeptidase inhibitor omapatrilat was superior to enalapril with regard to long-term nephroprotection in a subtotal nephrectomy model [8] and superior to captopril with regard to endothelial function in a salt-sensitive hypertensive rat model [10]. In another study, though, both the ACE inhibitor fosinopril and the vasopeptidase inhibitor omapatrilat were equally effective in a nephrectomy model [9]. The present study is the first to demonstrate a superior effect of vasopeptidase over ACE inhibition in diabetic nephropathy at doses that are equally effective in controlling blood pressure, decreasing plasma ACE activity, preventing target organ damage, and prolonging survival in spontaneously hypertensive rats [14]. It has to be kept in mind, however, that the optimally effective doses in diabetic nephropathy may differ from those in hypertensive target organ damage. It remains therefore to be determined if higher doses of ramipril can exert a nephroprotection similar to AVE7688.

4.3. Summary

We have shown that the obese, insulin-resistant Zucker diabetic fatty rat can serve as a useful animal model of type II diabetic nephropathy. Nephropathy is characterized by a progressive albuminuria beginning between age 10 and 17 weeks, and by corresponding morphological alterations at age 37 weeks. The ZDF rat thus represents a feasible model for the preclinical study of therapeutic interventions in diabetic nephropathy. Simultaneous inhibition of both ACE and neutral endopeptidase with the vasopeptidase inhibitor AVE7688 can almost completely prevent diabetic nephropathy.

Acknowledgements

The authors wish to thank Gerald Fischer for excellent technical support and Reiner Uhl for expert statistical advice and Dietmar Schmidt for the pharmacokinetic determinations. The present study is part of the “Cardiovascular and Renal Endpoints in Diabetes (CARED)” preclinical study program.

References

- [1] Ismail N, Becker B, Strzelczyk P, Ritz E. Renal disease and hypertension in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1999; 55:1–28.
- [2] Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *Lancet* 2000;355:253–259.
- [3] Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861–869.
- [4] Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR et al. Renoprotective effect of

247 247

- the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001;345:851–860.
- [5] Viberti G, Wheeldon NM. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect. *Circulation* 2002;106:672–678.
 - [6] Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993;329:1456–1462.
 - [7] Molinaro G, Rouleau JL, Adam A. Vasoepitidase inhibitors: a new class of dual zinc metallopeptidase inhibitors for cardiorenal therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:131–141.
 - [8] Taal MW, Nenov VD, Wong W et al. Vasoepitidase inhibition affords greater renoprotection than angiotensin-converting enzyme inhibition alone. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2051–2059.
 - [9] Cao Z, Burrell LM, Tikkanen I, Bonnet F, Cooper ME, Gilbert RE. Vasoepitidase inhibition attenuates the progression of renal injury in subtotal nephrectomized rats. *Kidney Int* 2001;60:715–721.
 - [10] Quaschnig T, d'Uscio LV, Shaw S, Grone HJ, Ruschitzka F, Lüscher TF. Vasoepitidase inhibition restores renovascular endothelial dysfunction in salt-induced hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2280–2287.
 - [11] Hoorn CM, Roth RA. Monocrotaline pyrrole-induced changes in angiotensin-converting enzyme activity of cultured pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1993;110:597–602.
 - [12] Florentin D, Sassi A, Roques BP. A highly sensitive fluorometric assay for “enkephalinase,” a neutral metalloendopeptidase that releases tyrosine–glycine–glycine from enkephalins. *Anal Biochem* 1984;141:62–69.
 - [13] Linz W, Jessen T, Becker RH, Schölkens BA, Wiemer G. Long-term ACE inhibition doubles lifespan of hypertensive rats. *Circulation* 1997;96:3164–3172.
 - [14] Schäfer S, Linz W, Afkam F et al. Treatment of hypertensive nephropathy by the novel vasoepitidase inhibitor AVE7688: nephroprotection beyond ACE inhibition alone. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(Suppl. 4):601.
 - [15] Unger T, Mattfeldt T, Lamberty V et al. Effect of early onset angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial capillaries. *Hypertension* 1992;20:478–482.
 - [16] Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Amer P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001;345:870–878.
 - [17] Janssen U, Phillips AO, Floege J. Rodent models of nephropathy associated with type II diabetes. *J Nephrol* 1999;12:159–172.
 - [18] Vora JP, Zimsen SM, Houghton DC, Anderson S. Evolution of metabolic and renal changes in the ZDF/Drt – fa rat model of type II diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:113–117.
 - [19] Agodoa LY, Appel L, Bakris GL et al. Effect of ramipril vs. amlodipine on renal outcomes in hypertensive nephrosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285:2719–2728.
 - [20] Nakao N, Yoshimura A, Morita H, Takada M, Kayano T, Ideura T. Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease (CO-OPERATE): a randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361:117–124.
 - [21] Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001;44:1957–1972.
 - [22] Luft FC, Mervaala E, Muller DN et al. Hypertension-induced end-organ damage: a new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999;33:212–218.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Radicación No. 03 88391

Clasificación Internacional (IPC): A 61 K ³¹/₅₅

Concepto Técnico No. 2837

Como resultado del examen definitivo, realizado con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

- 1.1 Descripción: Folios: 31 a 55
- 1.2 Reivindicaciones: Folios: 56 a 61
Folios: 171 a 176 Memorial de 13/08/2007
Folios: 207 a 210 Memorial de 13/02/2008
- 1.3 Datos PCT: Solicitud Internacional: PCT/EP02/03668
Capítulo II
Fecha Sol. Internacional: 03/04/2002
Publicación Internacional: WO02/083671
Fecha Pub. Internacional: 24/10/2002
Fecha Inicio Fase Nacional: 12/11/2003
Fecha Sol. Nacional: 03/10/2003
- 1.4 Prioridad: US60/283,305 de 12/04/2001
GB0119305.1 de 08/08/2001
- 1.5 Respuesta del solicitante: Folios: 161 a 176 Memorial de 13/08/2007
Folios: 195 a 211 Memorial de 13/02/2008
Folios: 233 a 247 Memorial de 06/08/2009

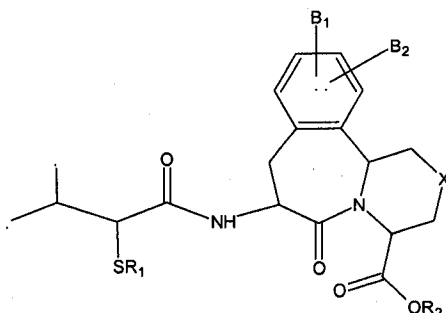
2. Objeto de la invención

Título de la solicitud

Derivados de mercaptoacetilamida, procedimiento para su preparación y su uso.

Reivindicaciones

Reivindicaciones 1 a 6: Se reivindica un compuesto de la fórmula (I):



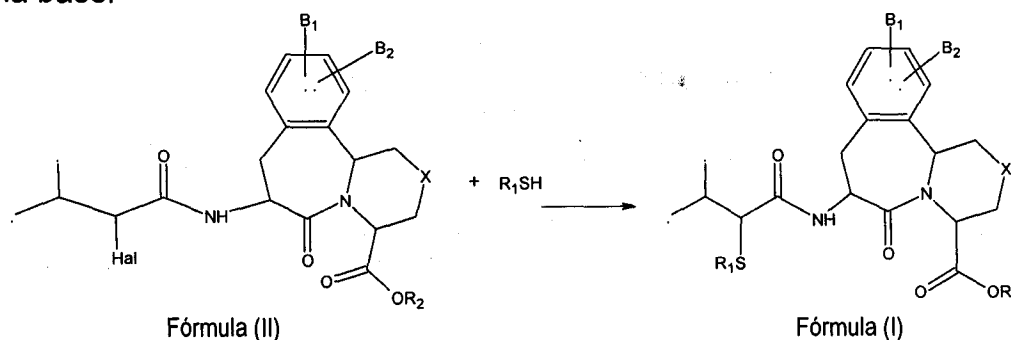
En particular se reclama protección para los compuestos:

Éster difenilmetílico de 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

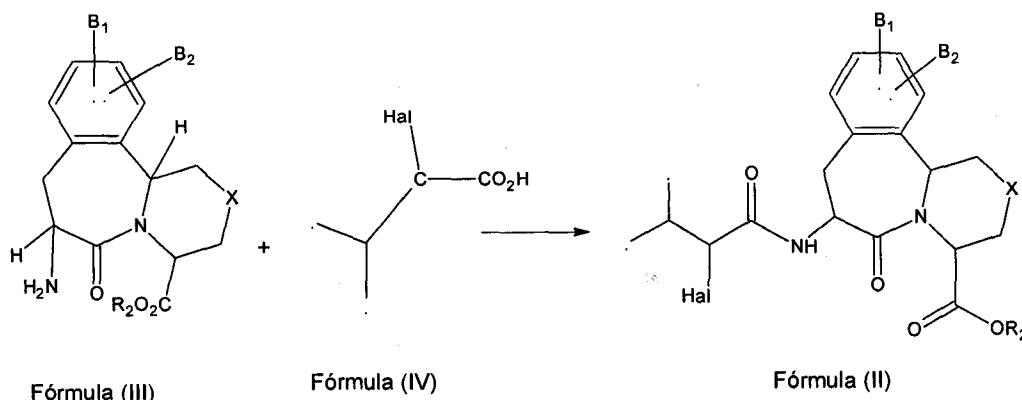
Éster difenilmetílico de ácido [4S-[4 α ,7 α (S),12b β]]-7-[[2(S)-acetiltio-3-metil-1-oxobutil]amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxo-pirido[2,1a][2]benzazepina-4-carboxílico

Entre otros...

Reivindicaciones 7 y 8: Se reivindica un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) que comprende la fase de hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula R₁SH en presencia de una base.



Además se reivindica el procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) que consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III) con un compuesto de fórmula (IV), en presencia de un reactivo de acoplamiento.



Reivindicación 9: Se reivindica una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos como se definieron en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Sustento Descriptivo

La presente invención hace referencia a compuestos que poseen tanto actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina como actividad inhibidora de la endopeptidasa neutra y a métodos para preparar dichos compuestos.

La enzima convertidora de angiotensina ECA es una peptidil peptidasa que cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II. La angiotensina II es un vasoconstrictor que estimula también la secreción de aldosterona por la

corteza adrenal. La inhibición de la ECA evita entonces tanto la conversión de angiotensina I en angiotensina II como el metabolismo de la bradiquinina. La endopeptidasa neutra EPN es una enzima responsable del metabolismo del péptido natriurético atrial (PNA). La inhibición de la EPN produce concentraciones del péptido incrementadas lo cual conduce al a natriuresis, diuresis y reducciones del volumen intravascular, el retorno venoso y la presión sanguínea.

Consecuentemente la invención proporciona compuestos capaces de inhibir la actividad endógena de las enzimas, no obstante no existe mención alguna al arte previo o a los problemas relacionados con la actividad de las enzimas como parte del fundamento técnico, tampoco se desarrolla el esquema problema solución.

- Una vez catalogada la invención ésta se clasificó en la sección: **A 61 K^{31/55}** de la **Clasificación Internacional de Patentes**.

3. Determinación del Estado de la Técnica:

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 12/04/2001, se procedió a efectuar la búsqueda de documentos relacionados en el estado de la técnica con fecha de publicación anterior a ésta.

N°	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	US5430145	"Mercaptoacetylamine derivatives useful as inhibitors of enkephalinase and ace"	04/07/1995
D2	EP0671172	"Aminoacid derivative"	13/09/1995

Anterioridades D1 y D2 en los folios 139 a 151 y 212 a 214.

4. Respuesta los argumentos del solicitante:

- Mediante memorial de fecha 06/08/2009 el señor solicitante argumenta lo siguiente: *"Los ensayos experimentales aportados al expediente a lo largo del presente trámite, específicamente en las respuesta al examen de fondo, deben ser aceptados por su Despacho"*.

Al respecto es preciso señalar que mediante requerimiento técnico de fondo No. 1244 de 08/05/2009 esta Superintendencia evaluó objetivamente los resultados de ensayos experimentales aportados por el señor solicitante, por lo que este argumento no es procedente. Para corroborar este hecho se remite al señor solicitante al contenido del requerimiento técnico y en particular a los folios 226 a 231 en donde se estudia el efecto técnico atribuido a los compuestos reivindicados, mediante un análisis de las consideraciones que plantea el señor solicitante.

- Y continúa señalando el señor solicitante: *"Esta práctica de rechazar los datos experimentales comparativos para sustentar el nivel inventivo de una invención no es una práctica general de su Despacho. De hecho, he presentado distintos asuntos donde datos experimentales así como datos comparativos han sido aceptados por su Despacho con el fin de sustentar el nivel inventivo de tal manera que no es claro en que se basa el señor"*

Nuevamente, se remite al señor solicitante al contenido del requerimiento técnico No. 1244 de 08/05/2009, toda vez que esta Superintendencia no ha inadmitido los datos aportados, por el contrario, ha realizado un análisis detallado de la información aportada, aún cuando las conclusiones señaladas por el señor solicitante son contrarias a los fundamentos técnicos de las pruebas de inhibición competitiva e IC₅₀ y no se relacionan con las pruebas *in vivo* descritas en la divulgación aportada.

En cuanto al argumento del señor solicitante, es preciso señalar que en ningún momento esta Superintendencia ha dudado de la procedencia de los datos aportados, por el contrario, lo que ha indicado es la interpretación equivocada de los datos y la falta de información sobre el diseño experimental que le permite llegar a estas conclusiones.

En el ámbito científico parte del soporte técnico que fundamenta los resultados tienen que ver con el diseño experimental utilizado para llegar a ciertas conclusiones y dado que el señor solicitante realiza un análisis equivocado de los resultados, sin que exista fundamento técnico para ello, lo que hay que analizar es precisamente en que punto de su diseño experimental se encuentran los errores de interpretación, situación ésta que no tiene nada que ver con juicios de valor sobre la buena fe del señor solicitante, sino con el rigor y asidero científico de los resultados y conclusiones obtenidas. Al parecer el señor solicitante olvida que la información aportada se basa en desarrollos técnicos que responden a una lógica experimental, la que al parecer no ha sido tomada en cuenta, cuando en sus memoriales concluye aspectos de su invención que son diametralmente contrarios a los fundamentos técnicos de interpretación para las pruebas de IC₅₀ e inhibición competitiva y no competitiva que él mismo aporta en las tablas 1, 2 y 3 de los folios 200 y 201.

Como se le indicó en la respuesta a sus argumentaciones –requerimiento No. 1244 de 08/05/2009 – las conclusiones sobre efecto técnico son apresuradas y no responden a una técnica experimental para la interpretación de los datos, ya que el compuesto que presenta la concentración más alta en los ensayos de IC₅₀ no es el más efectivo, por el contrario, la efectividad en esta prueba es inversamente proporcional a la concentración requerida, por lo que será más efectivo aquel compuesto que con menor concentración presenta el mismo efecto técnico. Y es en razón a estos errores de interpretación que esta Superintendencia se permitió señalar que faltaba el asidero y fundamentación técnica. Adicionalmente, para llegar a estas conclusiones es necesario realizar varias pruebas y ensayos, sobre los cuales tampoco tuvo conocimiento esta Superintendencia, a fin de poder hallar los errores de interpretación antes mencionados.

Por otra parte, los datos aportados corresponden a ensayos *in vitro* (ver tablas 1, 2 y 3 de los folios 200 y 201) que no se relacionan con los ensayos *in vivo* descritos por el solicitante en el folio 54 de la memoria descriptiva de la solicitud.

Con los ensayos *in vivo* el señor solicitante ^{quiere}pretende medir el incremento del gasto cardíaco, la reducción en la presión diastólica terminal ventricular izquierda y el incremento en el flujo coronario causado por la administración de las sustancias MDL 100240 y MDL 107688, con el fin de analizar la actividad intrínseca de las sustancias y concluye que sólo se requiere la mitad de la dosis del compuesto MDL 707 688 con respecto a la dosis requerida para MDL 100240 (compuesto reivindicado) para lograr el mismo efecto técnico, por lo que aporta la figura 1 del folio 211.

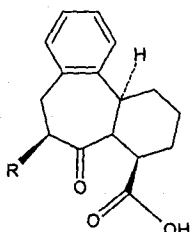
Por su parte, los datos aportados por el solicitante mediante el memorial de respuesta de 13/02/2008 corresponde a ensayos *in vivo*, a partir de los cuales

presenta datos de tasa máxima de la reacción química (V_m) y afinidad del sustrato por la enzima (K_m) los que permiten cuantificar la inhibición de las enzimas ECA y NEP. Estos datos aparecen sin la información correspondiente a la fundamentación técnica de los datos aportados, la referencia al diseño experimental, la identificación del número de muestras valoradas y el estadístico de prueba que permitió obtener la información sobre las diferencia en el mecanismo de acción y en particular, sobre la superioridad biológica de los compuestos, basada precisamente en los resultados de las pruebas de IC_{50} y en la inhibición no competitiva de la enzima y del péptido vasoactivo.

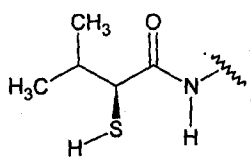
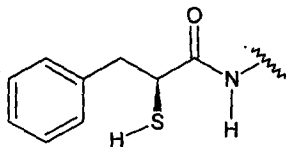
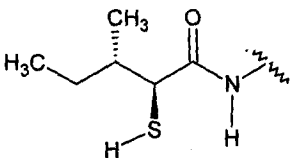
Por las razones expuestas esta Superintendencia argumentó que no existe relación entre los ensayos *in vivo* divulgados en la memoria descriptiva y aquellos aportados por el solicitante, sin embargo, procedió a valorar objetiva y técnicamente la información aportada por el solicitante, para tal efecto señaló que la fundamentación básica sobre la inhibición competitiva y no competitiva indicaba que si la inhibición podía vencerse o superarse mediante incrementos en la concentración del agonista (en este caso de la enzima o sustrato), al final lo que se lograba era un efecto máximo superable, caso en el cual, el señor solicitante estaba frente a un caso particular de antagonismo competitivo. Mientras que para el caso de un antagonista no competitivo lo que se encontraba era una interacción irreversible del antagonista con el sitio activo, hecho este que evitaba la unión del agonista al receptor, por lo que cualquier a cualquier concentración que se administrara el compuesto siempre se produce un efecto máximo sobre el receptor, sin que la presencia del sustrato normal incidiera de manera negativa en su efecto¹.

De esta manera, al considerar los resultados que obtiene el solicitante con el compuesto de su interés MDL108048 (antagonista no competitivo de NEP) junto a la inhibición que presentan los compuestos del estado del arte MDL 100173 y BS39-002a revelados por los antecedentes US5430145 y EP0671172 respectivamente, los que presentan actividad como inhibidores no competitivos (ver tabla 3), no es claro: i) ¿cuál es el mecanismo de acción diferente?, ya que los tres compuestos son inhibidores no competitivos, y si la tasa máxima de reacción química con el blanco (V_m) y la afinidad del sustrato por la enzima (K_m) varía en función del aumento en la concentración del compuesto que inhibe o la sustancia evaluada, con los datos de la Tabla 1 lo que se comprueba y corrobora es la mayor eficacia de los compuestos del estado del arte MDL100173 y de BS39-002a, ya que con menor concentración se alcanza el nivel esperado de IC_{50} sobre la enzima ECA y NEP. Así las cosas, existe evidencia de una mayor efectividad de los compuestos revelados por el antecedente con respecto al compuesto reivindicado, por lo que surge el segundo interrogante: ii) ¿cuál es el nuevo fundamento científico para afirmar que a mayor IC_{50} , mayor efectividad farmacológica de las moléculas administradas?

Del contenido de la tabla del folio 168 de la solicitud se verifica lo señalado por esta Superintendencia, por lo que a continuación se transcribe:



¹ Goodman & Gilman. Traducción de José Rafael Blengio Pinto. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Volumen I. Tema: Cuantificación de las interacciones fármaco receptor y la respuesta producida.

Compuesto número	R	Inhibición de hACE IC ₅₀ (nM)	Inhibición de NEP IC ₅₀ (nM)
MDL 108048 (reivindicado)		0.052	5.0
MDL 100173 (D1)		0.039	1.0
BS39-002a (D2)		0.029	0.59

En consecuencia, son evidentes los errores de interpretación en los que ha incurrido el señor solicitante, razón por la cual, esta Superintendencia continúa interrogándose sobre el asidero y fundamento científico que le permite concluir al señor solicitante, desvirtuando los fundamentos técnicos sobre los cuales se soportan las pruebas de inhibición no competitiva e IC₅₀.

- El señor solicitante argumenta lo siguiente: "Ni en la Decisión 486 (...) se hace mención a la presentación de diseños experimentales o tratamiento estadístico de los ensayos experimentales y todos los demás aspectos expresados por el señor examinador."

Sobre este punto, pongo de presente a su Despacho que los datos y resultados presentados durante el presente trámite han sido aportados por el solicitante, en este caso, SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GmbH y como tal el señor examinador debe partir del a buena fe del solicitante en cuanto a la validez, asidero estadístico, etc, de los mismos".

Esta Dependencia quiere ser enfática en señalar que el señor solicitante no procuró responder los interrogantes sobre efecto técnico y superioridad biológica atribuida a los compuestos formulados en el requerimiento técnico de fondo No. 1244 de 13/02/2008, y con sus afirmaciones pretende desestimar las conclusiones a las que ha llegado este Despacho argumentando sobre aparentes incertidumbres entorno a la buena fe de su representado, cuando en realidad esta Superintendencia nunca ha dudado de ello, simplemente se han indicado errores de interpretación sobre datos científicos aportados por el señor solicitante mediante memorial de fecha 13/08/2007 y 13/02/2008.

Al respecto es preciso recordar que en el trámite de la solicitud existe una etapa de comparación estructural y actividad en la que se evalúa el efecto técnico, mediante el análisis de altura inventiva basado en la aproximación problema solución. En esta etapa se analiza el sustento técnico de las conclusiones y de los datos aportados con el fin de determinar si la diferencia estructural señalada por el solicitante es la causa del salto cualitativo en la regla técnica en términos de actividad farmacológica, y este análisis no implica un juicio de valor sobre aspectos éticos o morales del proceder del señor solicitante, por el contrario, implica un análisis objetivo de la información y de las conclusiones señaladas, el que se fundamenta exclusivamente

en los aspectos teóricos de las ciencias farmacéuticas y en particular, en los resultados de las pruebas de inhibición competitiva y no competitiva e IC₅₀.

- Con respecto a los argumentos de altura inventiva el señor solicitante señala lo siguiente: *"Pongo de presente al señor examinador en el presente caso que el valor de concentración inhibitoria no es decisivo. Dicho valor se indicó en la respuesta anterior con el fin de demostrar que los compuestos de la presente invención son buenos inhibidores de ECA y NEP"*.

Al respecto es preciso señalar que el señor solicitante contradice lo afirmado en su memorial de 13/02/2008, toda vez que en el folio 202 claramente solicita a esta Despacho tener en cuenta los nuevos datos y ejemplos comparativos aportados ya que con ellos se demostraba la superioridad biológica de los compuestos reivindicados. No obstante, ahora en la respuesta allegada mediante memorial de 06/08/2009 señala que estos valores no son decisivos, pero continúa afirmando que los compuestos de la invención son buenos inhibidores sin que logre desvirtuar lo señalado por esta Superintendencia acerca de la derivación evidente de este efecto técnico a partir de las enseñanzas del estado de la técnica.

- Co relación a los datos de inhibición no competitiva el señor solicitante argumenta: *"los compuestos MDL100173 y BS39-002a presentan inhibición no competitiva o mezclada; sin embargo, el compuesto MDL108048 (compuesto de la presente solicitud) presenta una inhibición cualitativamente diferente e inesperada. Es así como el compuesto MDL108048 es un inhibidor débil de NEP si se compara con los compuestos MDL100173 o BS39-002a"*.

(...) Debido a que la endopeptidasa neutral presenta una elevada prevalencia en el hígado se puede deducir que la disminuida tendencia in vivo de excretar albúmina por parte del compuesto MDL107688 se basa en la inhibición no competitiva de NEP lo cual resulta en la capacidad para prevenir la nefropatía en paciente diabéticos"

El compuesto MDL107688 reivindicado en la solicitud y que presenta un grupo -R tipo acetilo se clasifica como inhibidor competitivo² de NEP según el señor solicitante (ver folios 198 y 202 párrafo 6), situación que evidencia una desventaja con respecto a los antecedentes, ya que esta clase de moléculas disminuyen su eficacia o actividad intrínseca por incremento en la concentración del compuesto agonista o sustrato endógeno, es decir, por incremento en la concentración del péptido vasoactivo. Sin embargo, ahora en la respuesta de 06/08/2009 señala que es un inhibidor no competitivo, situación que contradice lo originalmente señalado ante este Despacho.

² Inhibición competitiva:

En la inhibición competitiva, el sustrato y el inhibidor no se pueden unir a la misma enzima al mismo tiempo, como se muestra en la figura de la derecha. Esto generalmente ocurre cuando el inhibidor tiene afinidad por el sitio activo de una enzima en el que también se une el sustrato; el sustrato y el inhibidor compiten para el acceso al sitio activo de la enzima. Este tipo de inhibición se puede superar con concentraciones suficientemente altas del sustrato, es decir, dejando fuera de competición al inhibidor. Los inhibidores competitivos son a menudo similares en estructura al sustrato verdadero, de hecho, el **inhibidor competitivo**, es una sustancia similar en estructura al sustrato, con quien compete por el sitio activo de la enzima.

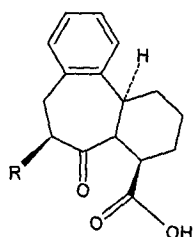
Inhibición no competitiva:

La inhibición no competitiva es una forma de inhibición mixta donde la unión del inhibidor con la enzima reduce su actividad pero no afecta la unión con el sustrato. Como resultado, el grado de inhibición depende solamente de la concentración de inhibidor.

259

Así, si el compuesto MDL107688 es un inhibidor competitivo técnicamente los compuestos del estado del arte serían superiores al compuesto de referencia toda vez que su actividad antagonista es no competitiva (ver tabla 3 del folio 201), y esta situación es debida a que el grupo tio no se encuentra sustituido en ellos (ver la estructura de los compuestos MDL100173 revelado en D1 y BS39-002a revelado en D2), mientras que el antagonismo del compuesto MDL107688 depende de la concentración del péptido vasoactivo o sustrato endógeno y su grupo tio se encuentra protegido por un grupo acetilo.

Ahora bien, la diferencia en actividad no se deriva de la presencia o ausencia de un grupo arilo, sino de la sustitución sobre el grupo tio, tal y como a continuación se demuestra:



MDL 108048 reivindicado, R es:	MDL107688 reivindicado, R es:	MDL100173 de D1, R es:	BS39-002a de D2, R es:
Inhibidor no competitivo	Inhibidor competitivo de NEP	Inhibidor no competitivo o mixto	Inhibidor no competitivo o mixto

Claramente se evidencia que las diferencias entre ellos estriban en que el compuesto MDL 100173 de D1 presenta un grupo arilo y el grupo tio no se sustituye, mientras que con respecto a BS39-002a la diferencia estriba en que este compuesto tiene un grupo alquilo adicional al número de átomos que presenta la cadena del compuesto reivindicado, sin embargo, tanto el compuesto revelado en D1 como en D2 son inhibidores no competitivos, mientras que aquel que presenta un grupo acetilo como sustituyente de grupo tio es un agente del que no se tiene certeza acerca de la inhibición que ejerce sobre el receptor, al que originalmente se le había señalado como inhibidor no competitivo y ahora se le denomina inhibidor competitivo.

Así, la diferencia en el comportamiento no estriba en el grupo arilo como equivocadamente lo ha señalado el señor solicitante en su memorial de respuesta fecha 13/02/2008 y tampoco hay evidencia de que sea inhibidor no competitivo como lo señaló en su respuesta de 06/08/2009. La diferencia en su comportamiento biológico estriba en la sustitución del átomo de -H sobre el grupo sulfhidrilo, tan es así que el mismo compuesto MDL108048 reivindicado, que presenta el grupo sulfhidrilo libre también se identifica como inhibidor no competitivo según el contenido de las tablas 2 y 3 del folio 201, por lo que señalar que su inhibición es diferente e inesperada contradice lo señalado inicialmente en el folio 201 y no encuentra asidero técnico en los datos allegados ante este Despacho.

Por otra parte, con respecto al compuesto MDL 108048 evaluado en el estudio que...

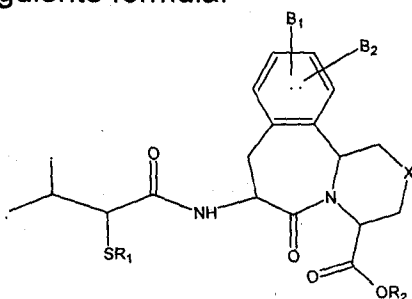
ECA 5.0 y 0.052, allí reportados, continúan siendo superiores a los reportados para los compuestos del estado del arte MDL100173 y BS39-002a en la tabla 1 del folio 200, por lo que es clara la superioridad biológica de los compuestos del estado del arte.

5. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D. 486)

5.1 Nivel Inventivo (artículo 18 D. 486)

- **Se reivindica:**

Un compuesto de la fórmula (I), que presentan actividad inhibidora frente a la Enzima Convertidora de angiotensina (ECA) y la endopeptidasa neutra (NEP), caracterizado porque presenta la siguiente fórmula:



Donde:

R_1 es -H o acetilo

R_2 es hidrogeno o difenilmetilo

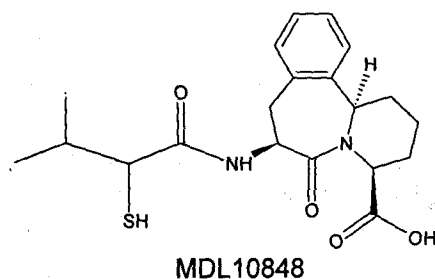
X es $-(CH_2)_n$ en donde n es 1

B_1 y B_2 son -H

En particular se reclama protección para las especies químicas:

Éster difenilmetílico de 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,

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,

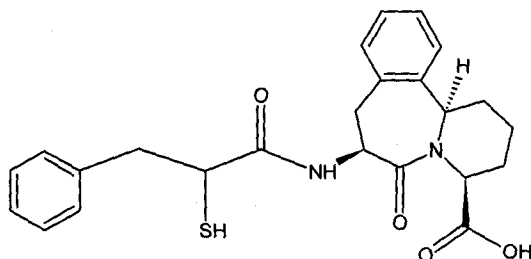


- **El estado del arte relacionado con la invención presenta los siguientes documentos:**

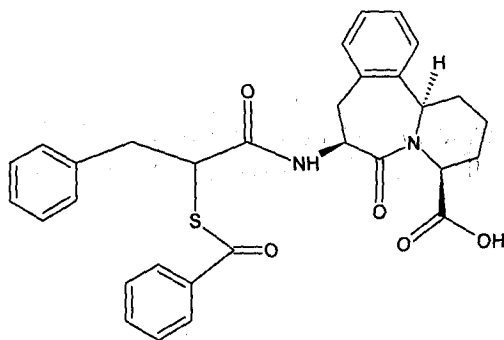
Anterioridad D1:

El documento **D1** revela la estructura de las siguientes sustancias:

Ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-7-[(1-oxo-2(R)-tio-3-fenilpropil)amino]-1,2,3,4,6,7,8,12-b-octahidro-6-oxopirido[2,1-a][2]benzazepina-4-carboxílico **MDL 100173** (Ver ejemplo 3)

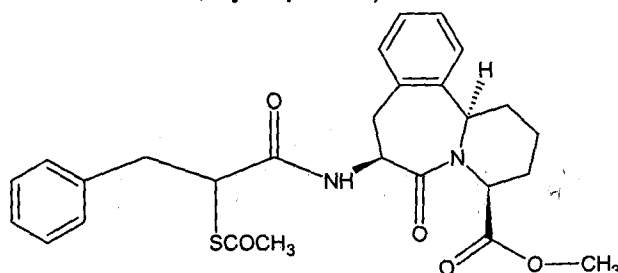


Ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-7-[(1-oxo-2(R)-benzoiltio-3-fenilpropil)amino]-1,2,3,4,6,7,8,12-b-octahidro-6-oxopirido[2,1-a][2]benzazepina-4-carboxílico (Ver columna 18)



Éster bencílico del ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-7-[(1-oxo-2(R)-benzoiltio-3-fenilpropil)amino]-1,2,3,4,6,7,8,12-b-octahidro-6-oxopirido[2,1-a][2]benzazepina-4-carboxílico (Ver columna 18)

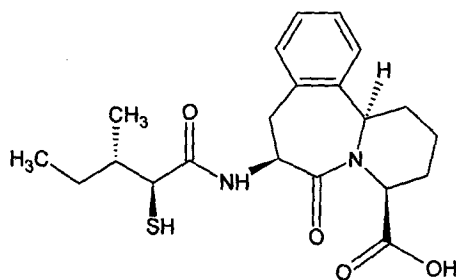
Éster metílico del ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-7-[(S)-(1-oxo-2(R)-acetiltio-3-fenilpropil)amino]-1,2,3,4,6,7,8,12-b-octahidro-6-oxopirido[2,1-a][2]benzazepina-3(R)-carboxílico (Ver columna 31, ejemplo 31)



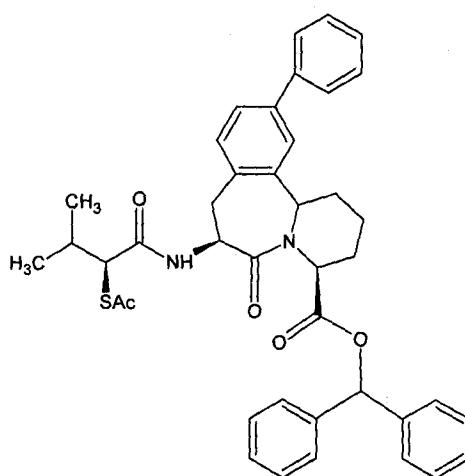
Anterioridad D2:

El documento **D2** revela en su ejemplo 148 la denominación IUPAC de los siguientes compuestos:

Ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-7-[(2S,3S)-3-metil-1-oxo-2-tiopentil]amino]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidropirido[2,1-a][2]benzazepina-4-carboxílico **BS39-002^a** (Ver folio 151 antes 150)

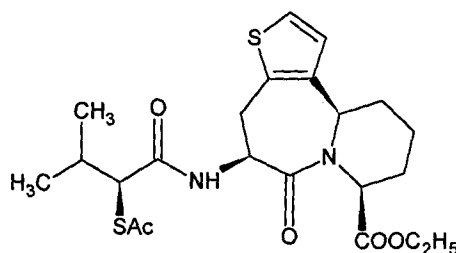
Ejemplo 148 Anterioridad **D2**

Y además, presenta el anillo anular de pirido[2,1-a][2]benzazepin-6-ona en el ejemplo E-8, E-10 que incluyen la formación de éster de difenilmetileno y grupos acetilo como sustituyentes del grupo tio.



Ejemplo E-8

E incluso presenta estructuras analógicas del núcleo central que reemplazan con efectividad el anillo de fenilo por un anillo de tienilo e incorporan en la posición 4 un grupo acetilo para formar el correspondiente éster.

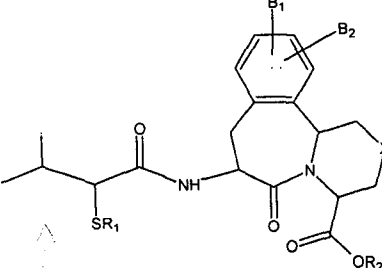
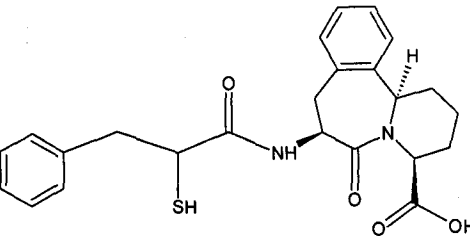
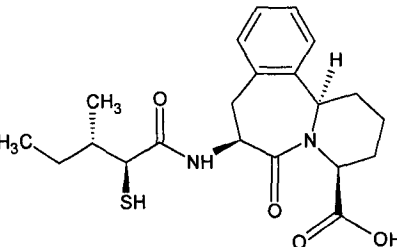
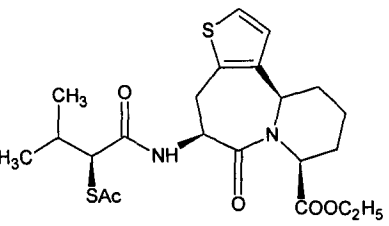
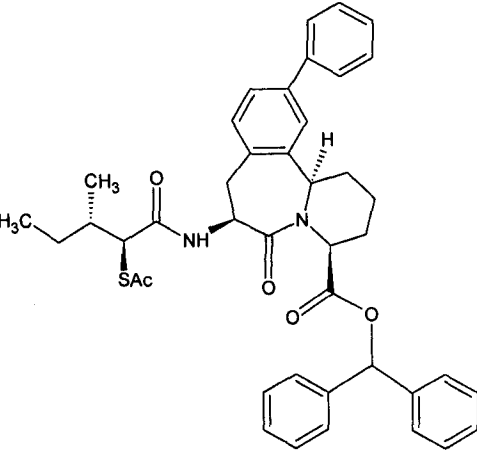


Ejemplo B-4

Evaluación de Elementos Característicos y diferencias técnicas:

Al efectuar la comparación de los elementos y características técnicas de la materia presentada en el pliego reivindicatorio de fecha 13/02/2008 – folios 207 a 210, fue posible establecer que la diferencia con respecto al contenido de las publicaciones **D1** y **D2** estriba en la longitud de la cadena del grupo alquil-tio que sustituye la posición 7 del anillo de pirido[2,1-a][2]benzazepin-6-ona, tal y como se interpreta al analizar el contenido de la Tabla I.

Tabla 1. Comparación de elementos técnicos.

Materia reivindicada	Anterioridad D1	Anterioridad D2
 R₁ puede ser un átomo de H o un grupo acetilo R₂ puede ser un átomo de H o difenilmetilo X es -(CH₂)_n en la que n es 1. B₁ y B₂ son -H Dentro de los ejemplos más representativos de la invención se encuentran: Éster difenilmetílico de ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-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 Éster difenilmetílico de ácido [4S-[4α,7α(S),12bβ]]-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	Ejemplo 3  Ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-7-[(1-oxo-2(R)-tio-3-fenilpropil)amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidro-6-oxopirido[2,1-a][2]benzazepina-4-carboxílico Ejemplo 63 Difenil metil éster del ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-7-[(1-oxo-2(S)-acetiltio-3-fenilpropil)amino]-1,2,3,4,6,7,8,12b-hexahidro-6-oxo-1H-[1,4]-N⁴-trifluoroacetil-azazino[3,4-a][2]benzazepina-4-carboxílico	Ejemplo 148  Ácido [4S-[4α,7α(R*),12bβ]]-7-[[2(S,3S)-3-metil-1-oxo-2-tiopentil]amino]-6-oxo-1,2,3,4,6,7,8,12b-octahidropirido[2,1-a][2]benzazepina-4-carboxílico Ejemplo B-4. Con grupo acetil-tio  Ejemplo E-8. Éster difenil-metílico 

Con respecto al antecedente **D1** la diferencia estriba en que el grupo que sustituye la posición 7 del anillo de pirido[2,1-a][2]benzazepin-6-ona presenta un grupo arilo en su extremo izquierdo, mientras que los compuestos reivindicados no incluyen la sustitución arílica y la reemplazan por un grupo isobutilo sustituido a su vez por un grupo tio.

Con respecto al ejemplo 148 que presenta el antecedente **D2** es evidente que la única diferencia entre ellos estriba en la incorporación de un átomo adicional en la cadena alquílica de tio benzamida que sustituye la posición 7 del anillo de pirido[2,1-

Del problema técnico objetivo:

La solicitud presenta compuestos con actividad dual sobre la enzima convertidora de angiotensina y la enzima endopeptidasa neutra y se presentan como alternativa terapéutica para el tratamiento de patologías asociadas a la disfuncionalidad de las enzimas angiotensina y endopeptidasa, tal es el caso de la hipertensión arterial causada por disfuncionalidad en el metabolismo del sodio.

El solicitante indica en el folio 32 de la memoria descriptiva que la materia reivindicada corresponde a ciertos compuestos específicos cubiertos por la memoria descriptiva genérica de la patente norteamericana US5430155, es decir, corresponde a una selección de estructuras reveladas por el antecedente identificado como **D1**.

Sobre este aspecto particular de la invención es preciso indicar que si bien existen diferencias con respecto al estado del arte, las cuales no permiten concluir en estricto sentido que la materia corresponde a una selección, si existe evidencia clara y contundente dentro de los documentos **D1** y **D2** que le permite concluir a un conocedor de las ciencias farmacéuticas sobre la falta de altura inventiva de los compuestos específicos reivindicados, toda vez que sus características químicas, funcionales y estructurales se derivan de las enseñanzas reveladas por las publicaciones en comento.

Dadas las diferencias estructurales mínimas entre los compuestos reivindicados y los revelados por el estado del arte es posible afirmar que existe derivación evidente del estado de la técnica y por consiguiente no puede considerarse que el diseño y desarrollo de los compuestos reclamados comportó actividad inventiva tal que amerite la protección por patente de invención.

Una persona versada en la materia sabría que la característica esencial del núcleo corresponde al anillo más complejo de pirido[2,1a][2]benzazepin-6-ona homologado en estructuras como la azazino[3,4-a][2]benzazepina que se revela en el documento **D1**, el que se encuentra sustituido por un grupo éster para formar el éster difenil-metilico del ácido carboxílico. Así, al combinar las enseñanzas del documento **D1** con las enseñanzas reveladas en la publicación **D2** se subsanan las diferencias que presenta tanto el primero como el segundo documento, en especial porque el ejemplo 148 del antecedente **D2** no revela la formación de ésteres en la posición 4 del anillo anular.

Por otra parte, la incorporación de un grupo fenilo o de un grupo alquilo dentro de la cadena que sustituye la posición 7 del anillo de de pirido[2,1a][2]benzazepin-6-ona no parece conferir un efecto técnico inesperado, dado que las publicaciones claramente indican la actividad farmacológica de los compuestos y coinciden en el hecho de que se trata de sustancias con actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y de péptidos vasoactivos (ver abstract del documento **D1**) y como quedó demostrado, este hecho no es la causa de una diferencia en la inhibición de la endopeptidasa neutra NEP, toda vez que con o sin su presencia se presenta una inhibición no competitiva o mixta (ver folios 200 y 201)

Del efecto técnico atribuido:

Como se indicó en la oportunidad anterior, los resultados de la inhibición *in vitro* no forman parte de un estudio serio que se hubiese incorporado a la solicitud en el momento de la presentación de la solicitud, tampoco señalan el número de muestras y el diseño experimental que soporta la obtención de dichos resultados;

además, obvian la identificación del reactivo biológico y del estudio estadístico utilizado, razón por la cual, los datos de inhibición no tienen asidero en un estudio experimental estadísticamente representativo que de cuenta de los resultados inesperados que ahora, con motivo del requerimiento técnico, se hacen palpables y visibles y se ponen bajo consideración del examinador, cuando realmente desde el folio 32 del pliego descriptivo el solicitante ya ha venido indicando que los compuestos reclamados se encuentran revelados por el estado del arte y corresponden a una selección o divulgación específica de compuestos genéricos contemplados en el documento D1.

Por otra parte, los principios básicos de la farmacia química contemplan la posibilidad de que existan series bioisósteras en virtud de la permanencia de un núcleo básico o anular. Estos principios señalan que mediante la incorporación de grupos adicionales sobre una molécula es posible modificar parámetros como solubilidad. No obstante, los compuestos modificados conservan tanto la actividad como el comportamiento farmacodinámico³, es así como se ha llegado a identificar la equivalencia biológica de compuestos que presentan grupos o átomos con forma o tamaño similar, aún cuando no sean isoelectrónicos, por ejemplo: como cuando las estructuras abiertas imitan otras estructuras anulares o cíclicas o en los casos en los que la actividad depende exclusivamente de la distribución de cargas y efectos polares, por lo que es posible intercambiar grupos cíclicos por otros acíclicos, como es el caso particular del ejemplo B-4 del antecedente D2, el cual elimina el anillo de fenilo por un anillo de tienilo pero conserva la actividad dado que la estructura resultante es isoelectrónica con respecto al anillo de pirido[2,1a][2]benzazepin-6-ona, pero además esta estructura del ejemplo B-4 incluye la sustitución de tipo acetilo sobre el grupo carboxilo de la posición 4.

Estos principios son aplicables al caso particular, ya que la incorporación de un grupo fenilo en el extremo izquierdo de la molécula lo que genera es la disminución en la IC₅₀⁴, es decir, cuando se administra el compuesto MDL 100173 se reduce la

³ Moreira Lima Lidia, Barreiro Eliezer. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. Current Medicinal Chemistry. 2005, 12 23-49. Páginas 215 a 218.
Avendaño C.: Introducción a la Química Farmacéutica. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. 2001, 2ª edición

⁴ FUNCTIONAL ANTAGONIST ASSAY IC₅₀

The IC₅₀ is a measure of the effectiveness of a compound in inhibiting biological or biochemical function. Often, the compound in question is a drug candidate. This quantitative measure indicates how much of a particular drug or other substance (inhibitor) is needed to inhibit a given biological process (or component of a process, i.e. an enzyme, cell, cell receptor or microorganism) by half. In other words, it is the half maximal (50%) inhibitory concentration (IC) of a substance (50% IC, or IC₅₀). It is commonly used as a measure of antagonist drug potency in pharmacological research. Sometimes, it is also converted to the pIC₅₀ scale (-log IC₅₀), in which higher values indicate exponentially greater potency. According to the FDA, IC₅₀ represents the concentration of a drug that is required for 50% inhibition "in vitro". IC₅₀ versus EC₅₀ it is comparable to an EC₅₀ for agonist drugs. EC₅₀ also represents the plasma concentration required for obtaining 50% of a maximum effect "in vivo".

The IC₅₀ of a drug can be determined constructing a dose-response curve and examining the effect of different concentrations of antagonist on reversing agonist activity. IC₅₀ values can be calculated for a given antagonist by determining the concentration needed to inhibit half of the maximum biological response of the agonist.

IC₅₀ values are dependent on conditions under which they are measured. In general, the higher the concentration of inhibitor, the more will agonist activity be lowered. IC₅₀ value increases as enzyme concentration increases. Furthermore depending on the type of inhibition other factors may influence IC₅₀ value; for ATP dependent enzymes IC₅₀ value has an interdependency with concentration of ATP, especially so if inhibition is all of it competitive. IC₅₀ values can be used to compare the potency of two antagonists.

cantidad de dosis requerida para inhibir a la mitad el máximo de las moléculas causantes de la respuesta biológica. Así, se reduce la dosis necesaria para inhibir la enzima ECAh porque el IC₅₀ del compuesto MDL100173 (revelado en D1) es 0.039 mientras que el IC₅₀ de MDL108048 (uno de los compuestos reivindicados) es 0.052, de acuerdo con la Tabla 1 de la respuesta allegada a esta dependencia (ver folio 200). Estos resultados resultan razonables, dada la mayor lipofilicidad de las estructuras que presentan grupos arilo sobre aquellas que presentan estructuras alquílicas y son clara evidencia de la superioridad biológica de los compuestos que anteceden el grupo de sustancias reivindicadas (documentos D1 y D2).

Los datos permiten concluir que los compuestos de los antecedentes D1, en especial, MDL 100173 y D2 (Ejemplo 148) son superiores al compuesto de referencia reclamado MDL108048, toda vez que requieren menor dosificación para inhibir el 50% de las moléculas de la enzima convertidora de angiotensina. Igual situación ocurre con la inhibición del péptido vasoactivo que en el caso de los compuestos con estructural lineal o alquílica requieren de 5nM, mientras que en el caso del MDL100173 y BS39-002a apenas requieren dosis de 1nM y 0.59nM respectivamente.

Adicionalmente, la información suministrada en el folio 54 del capítulo descriptivo señala que los compuestos de fórmula (I) presentan actividad hipotensora intensiva de larga duración y adicionalmente, en pacientes con insuficiencia cardíaca los compuestos incrementan el gasto cardíaco, reducen la presión diastólica terminal ventricular izquierda e incrementan el flujo coronario.

Sin embargo, de acuerdo con la farmacodinamia de las moléculas que presentan grupos amido y posibilidad para formar derivados biorreversibles, como es el caso del grupo anular reivindicado debido a la presencia del grupo en la posición 7, es factible que el compuesto se someta a la acción de amidasas capaces de cortar el enlace de interés para el solicitante, y dado que una de las formas preferidas para la administración de los compuestos constituye el sistema de entrega oral, cabría preguntarse ¿cómo se obtienen los datos de respuesta biológica si la acción de las enzimas modifica de por sí la farmacodinamia de los compuestos?, los cuales son objeto de metabolización por parte de las enzimas proteolíticas o peptidasas presentes en el epitelio intestinal.

Esta situación no le permite a las moléculas permanecer incólumes dentro del sistema digestivo y por otro lado, esta Dependencia continúa preguntándose con fundamento en qué pruebas se establece la diferencia en el mecanismo de acción, porque con la información suministrada en el soporte descriptivo no es posible concluir este hecho y mucho menos vincular la información relacionada en las tablas 2 y 3 obtenida mediante pruebas *in vitro*, las cuales fueron allegadas con motivo de

IC50 is not a direct indicator of affinity although the two can be related at least for competitive agonists and antagonists by the Cheng-Prusoff eqtn.

$$K_i = IC_{50} / [1 + ([S]/K_m)]$$

Where K_i is the binding affinity of the inhibitor, IC_{50} is the functional strength of the inhibitor, $[S]$ is substrate concentration and K_m is the affinity of the substrate for the enzyme. Whereas the IC_{50} value for a compound may vary between experiments depending on radioligand concentration, the K_i is an absolute value. K_i is the inhibition constant for a drug; the concentration of competing ligand in a competition assay which would occupy 50% of the receptors if no radioligand were present.

los requerimientos técnicos de fondo, con aquéllas que presenta el solicitante en el folio 54 realizadas *in vivo* y sobre un grupo de pacientes con insuficiencia cardíaca, de las que además no se tiene noticia sobre la clase de ensayo experimental, la forma de administración de los compuestos y el diseño experimental que permitió concluir la diferencia en el mecanismo de acción de moléculas que sólo difieren de las reveladas por el estado del arte en el número de carbonos en la cadena lateral.

En consecuencia, para esta Dependencia es evidente la falta de sustento y divulgación técnica suficiente que permita concluir, con base en resultados experimentales, la superioridad biológica de compuestos tan cercanos a los del estado del arte, los que además se relacionan estructural, química y funcionalmente con el conjunto de enseñanzas divulgadas por los antecedentes **D1** y **D2**, razón por la cual, se reitera la falta de altura inventiva de la materia reclamada.

En consecuencia y por todo lo expuesto anteriormente, se recomienda **NEGAR** el privilegio solicitado para las reivindicaciones 1 a 9 de los folios 207 a 210.

Bogotá, D.C. 08/09/2009.

CONCEPTO TÉCNICO No. 2837	EXAMINADOR TÉCNICO Código No. 202044
---------------------------	---