

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 782**

51 Int. Cl.:
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/38 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)
A61K 31/45 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03744567 .3**
 96 Fecha de presentación: **10.03.2003**
 97 Número de publicación de la solicitud: **1487431**
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Prevención y/o tratamiento de la enfermedad cardiovascular y/o la insuficiencia cardíaca asociada**

30 Prioridad:
08.03.2002 NZ 51772102
11.03.2002 NZ 51772502
12.03.2002 US 364382 P

73 Titular/es:
PhilERA New Zealand Limited
2 Crummer Road Grey Lynn
Auckland , NZ

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.08.2012

72 Inventor/es:
COOPER, Garth,James,Smith y
BAKER, John Richard

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.08.2012

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

ES 2 386 782 T3

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

DESCRIPCIÓN

Prevención y/o tratamiento de la enfermedad cardiovascular y/o la insuficiencia cardíaca asociada

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a medicamentos para su uso en métodos para prevenir y/o tratar (más adelante "tratar") un mamífero (incluyendo un ser humano) predispuesto a una lesión de tejido por radicales libres mediada por cobre de tejido y/o a una alteración mediada por cobre de repuestas de células madre de tejido normal. La invención tiene aplicación, entre otras cosas, para insuficiencia cardíaca, enfermedad macrovascular, enfermedad microvascular y/o enfermedad de tejidos y/u órganos tóxicos (por ejemplo, hipertensos) (estando tales dolencias tipificadas por insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, infarto de miocardio y enfermedades arteriales y de órganos relacionadas) y a compuestos, formulaciones, usos y métodos relacionados.

Antecedentes

- 15 **[0002]** La presente invención se refiere a medicamentos para su uso en métodos de tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o afección (más adelante "tratar") en un mamífero que incluye, por ejemplo, un ser humano predispuesto a una lesión de tejido por radicales libres con afectación o mediada por cobre de tejido y/o a alteración con afectación o mediada por cobre de repuestas de células madre de tejido normal. La invención tiene aplicación, entre otras cosas, en insuficiencia cardíaca, enfermedad o lesión macrovascular, enfermedad o lesión microvascular y/o enfermedad de tejidos y/u órganos tóxicos (por ejemplo, hipertensivo) (tales dolencias como pueden caracterizarse, por ejemplo, por insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, infarto de miocardio y enfermedades arteriales y de órganos relacionadas) y a compuestos, formulaciones, usos y métodos relacionados.

Antecedentes de la invención

- 25 **[0003]** La siguiente descripción incluye información que puede ser útil en el entendimiento de la presente invención. No es una admisión que cualquiera de la información proporcionada en este documento sea técnica anterior o relevante para las invenciones presentemente descritas o reivindicadas, o que cualquier publicación o documento que sea específicamente o implícitamente aludido sea técnica anterior.

- 30 **[0004]** El documento US 6.147.070 describe uso de quelantes de hierro en métodos de terapia.

- [0005]** Berenshtein y col. MOLECULAR AND CELULAR BIOCHEMISTRY vol. 234/235, 2002, páginas 283-292, describen funciones de ferritina y hierro en el preacondicionamiento isquémico del corazón.

- 35 **[0006]** El documento WO 00/18392 (GLYCOX CORPORATION LIMITED) describe usos de inhibidores de fructosamina oxidasa en el tratamiento de pacientes diabéticos.

- [0007]** SHIMIZU N y col. PEDIATRICS INTERNATIONAL, vol. 41, 1999, páginas 419-422, describen el uso de quelantes de cobre en el tratamiento y la gestión de enfermedad de Wilson.

- 40 **[0008]** JEREMY J Y y col. JOURNAL OF DRUG DEVELOPMENT AND CLINICAL PRACTICE, vol. 7, nº 2, 1995, páginas 119-126, describe ciertos efectos *in vitro* de quelantes de cobre sobre la síntesis de tromboxano A2 de plaquetas y la actividad de lipoxigenasa.

- 45 **[0009]** Por tanto, se entenderá que los mecanismos que subyacen las complicaciones a largo plazo de diabetes, incluyendo enfermedades y afecciones cardíacas asociadas, son complejos y se han estudiado desde hace tiempo sin el descubrimiento de intervenciones terapéuticas claras, seguras y eficaces. Existe la necesidad de tales terapias, que se describen en este documento.

La presente invención

- 50 **[0010]** El corazón es el órgano más susceptible de todos los órganos del cuerpo al envejecimiento prematuro y al estrés oxidativo por radicales libres.

- 55 **[0011]** En nuestros propios estudios (usando el modelo de rata diabética con estreptozotocina (STZ)), encontramos una alta frecuencia de cardiomiopatía por insuficiencia cardíaca y enfermedad macrovascular en animales gravemente diabéticos.

- 60 **[0012]** Creemos, sin desear limitarnos a ese tratamiento con quelantes de cobre específicos y otros agentes (por ejemplo, cinc que evita la absorción de cobre), que la disminución de los valores de cobre (especialmente cuando no conducen a estados de agotamiento de otros metales de transición (por ejemplo, hierro, cinc y manganeso) y a metales esenciales) beneficiará a un número y espectro cada vez más creciente de la población siempre que se excluya por sí mismo un estado de deficiencia de cobre. Nuestra hipótesis a la que no desemos limitarnos es que valores de cobre (y particularmente cobre (II)) no unidos internamente a células están disponibles para mediar junto

con sustancias reductoras disponibles en la generación de radicales libres perjudiciales que tienen una función en tanto lesión de tejido como alteración de la reparación mediada por células madre de tal tejido.

5 **[0013]** A modo de ejemplo, en relación con el tejido de miocardio normal, creemos que la lesión como resultado de la presencia de radicales libres conduce a insuficiencia cardíaca y/o cardiomiopatía y creemos que la presión continuada de tales radicales libres altera la reparación mediada por células madre del miocardio a su estado de salud normal. Con respecto a tal lesión y la alteración de la reparación, proponemos una reducción en los valores de cobre libre disponibles ya que es un enfoque preventivo y/o de tratamiento apropiado.

10 **[0014]** Por referencia a la disponibilidad de valores de cobre en mamíferos (incluyendo seres humanos) pueden identificarse aquellos pacientes mamíferos con un nivel de cobre que es "elevado" más allá del de la población general de tales mamíferos. Referencia en este documento a "elevado" en relación con la presencia de valores de cobre incluirá seres humanos que tienen al menos 10 mcg de cobre libre/dl de suero cuando se mide como se trata por Merck & Co Inc más adelante.

15 **[0015]** Puede hacerse una medida del cobre libre [que es igual al cobre en plasma total menos el cobre unido a ceruloplasmina] usando el procedimiento desvelado en la hoja de datos de Merck & Co Inc (www.merck.com) para las cápsulas SYPRINE® (clorhidrato de trientina) en la que establecen con respecto al uso de clorhidrato de trientina para los excesos de valores de cobre de enfermedad de Wilson:

20 **[0016]** "El índice más fidedigno para monitorizar el tratamiento es la determinación del cobre libre en el suero, que es igual a la diferencia entre el cobre total cuantitativamente determinado y el cobre en ceruloplasmina. Pacientes adecuadamente tratados tendrán normalmente menos de 10 mcg de cobre libre/dl de suero.

25 **[0017]** La terapia puede monitorizarse con un análisis de cobre urinario de 24 horas periódicamente (es decir, cada 6-12 meses). La orina debe recogerse en material de vidrio libre de cobre. Como una dieta baja en cobre debe mantener la absorción de cobre por debajo de un miligramo a día, el paciente probablemente estará en el estado deseado de equilibrio de cobre negativo si en una recogida de orina de 24 horas están presentes 0,5 a 1,0 miligramos de cobre".

30 **[0018]** Nombres alternativos para la trientina incluyen N,N'-bis(2-aminoetil)-1,2-etanodiamina; trietilentetramina; 1,8-diamino-3,6-diazaoctano; 3,6-diazaoctano-1,8-diamina; 1,4,7,10-tetraazadecano; trien; TETA; TECZA y trieno.

35 **[0019]** Nosotros creemos, sin desear estar limitándonos, que esa reducción en el cobre libre disponible tiene un efecto en la prevención de enfermedades macrovasculares, microvasculares y/o tóxicas/metabólicas del tipo ejemplificado en lo sucesivo y en procesos de reparación de tejido. Esto es independientemente del metabolismo de la glucosa del paciente.

40 **[0020]** Nosotros también creemos, de nuevo sin estar limitándonos, que esa acumulación cardiovascular de iones de metales de transición redox-activos es responsable de muchas de las consecuencias adversas en diabetes. Bajo condiciones fisiológicas, la lesión a un órgano diana es detectada por células madre distantes, que migran al sitio de lesión, luego experimentan diferenciación de células madre alternativa; estos acontecimientos promueven la reparación estructural y funcional. Sin embargo, la acumulación de metales de transición redox-activos, particularmente cobre, en tejidos cardíacos o vasculares en sujetos con diabetes va acompañada de una supresión de la regeneración de tejido normal efectuada por la migración de células madre. Niveles de cobre elevados en tejido suprimen estos comportamientos biológicos normales de tales células sin diferenciar. Las afecciones que se producen en el contexto de diabetes o intolerancia a la glucosa, en las que la supresión de repuestas de células madre normales puede producir la alteración de respuestas de tejido normal, incluyen las siguientes:

- 50
1. Insuficiencia cardíaca
 2. Infarto agudo de miocardio
 3. Cicatrización y ulceración
 4. Lesión de tejido producida por infección
 5. Lesión renal diabética
- 55
6. Alteración de la regeneración cardíaca
 7. Alteración de la regeneración vascular
 8. Alteración de la regeneración de órganos dependientes

60 **[0021]** Las afecciones en las que la terapia para reducir los valores de cobre en pacientes diabéticos (es decir, con IG o diabetes mellitus de tipo 2) es responsable de demostrar beneficio incluyen al menos las siguientes:

1. INSUFICIENCIA CARDÍACA EN EL CONTEXTO DE DIABETES

65 **[0022]** Puede producirse una regeneración significativa de tejidos cardíacos en el plazo de algunos días desde el trasplante cardíaco. Un mecanismo probable es la migración de células madre de sitios extracardíacos al corazón,

con posterior diferenciación de tales células en diversas células cardíacas especializadas, que incluyen células vasculares miocárdicas, endoteliales y coronarias. Creemos, sin desear limitarnos, que la acumulación de cobre en tejidos cardíacos es probable que altere gravemente estas respuestas regeneradoras: de ahí una función para terapia intravenosa de corta duración con un quelante de metal de transición de cobre en el tratamiento de
5 insuficiencia cardíaca diabética.

2. INFARTO DE MIOCARDIO EN EL CONTEXTO DE DIABETES.

[0023] El infarto de miocardio va acompañado de proliferación de células en el miocardio ventricular. Si se produce
10 IM en el contexto de diabetes, la presencia de niveles elevados en tejido de metales de transición activos para rédox suprime las repuestas de células madre normales, produciendo alteración de la reparación estructural y funcional de tejidos lesionados. Se ha informado que hasta el 20% de las células en el corazón puede reemplazarse por migración de células madre de sitios extracardíacos, en tan sólo cuatro días después del trasplante cardíaco⁴. Estas observaciones nos sugieren que el tratamiento de IMA en el contexto de diabetes mejorará por la
15 administración de corta duración (si fuera necesario, parenteral), además de por posterior administración prolongada, de quelantes. Proponemos que el mecanismo de la alteración de la función cardíaca en diabetes es probablemente un efecto tóxico de metales de transición acumulados sobre la dinámica de tejidos, produciendo la alteración de la regeneración de tejidos producida a su vez por la supresión de repuestas de células madre normales, que median en la regeneración de tejido fisiológico por migración a tejido lesionado desde sitios externos.
20

3. CICATRIZACIÓN Y ULCERACIÓN EN EL CONTEXTO DE DIABETES

[0024] Los procesos de reparación de tejido normal requieren la intervención de células madre de movilización, que efectúan la reparación, por ejemplo, de las diversas capas de vasos sanguíneos. Creemos, sin desear
25 limitarnos, que una acumulación de metales de transición (particularmente cobre) en tejidos vasculares produce la alteración del comportamiento del tejido característica de diabetes, que incluye alteración de la reparación de heridas tras cirugía o traumatismo, y la tendencia exagerada a ulceración y mala curación de úlceras establecidas. Creemos, sin desear limitarnos, que el tratamiento de diabéticos con quelantes de cobre antes de que se sometan a cirugía, o en el contexto de lesión traumática de tejido, es probablemente beneficioso. Creemos adicionalmente que es
30 probable que la cirugía en diabéticos tuviera un mejor resultado si el exceso de metales de transición se eliminara de vasos sanguíneos antes de la cirugía. Esto puede llevarse a cabo en tanto una base de corta duración (con terapia parenteral) como en una base más prolongada (con terapia oral) antes de la cirugía real.

4. LESIÓN DE TEJIDO BLANDO RESULTANTE DE INFECCIÓN Y QUE SE PRODUCE EN EL CONTEXTO DE 35 DIABETES O INTOLERANCIA A LA GLUCOSA

[0025] Creemos, sin desear limitarnos, que los procesos de reparación de tejido normal tras la infección requieren la intervención de células madre movilizadas, que migran a sitios de lesión de tejido para efectuar la regeneración y reparación de tejido, por ejemplo, de las diversas capas de vasos sanguíneos. De esto resulta que la reparación de
40 tal lesión de tejido será alterada por repuestas de células madre suprimidas, tales como aquellas producidas por la formación de metales de transición activos para rédox (particularmente cobre) en tejidos, por ejemplos, las paredes de los vasos sanguíneos.

5. LESIÓN RENAL QUE SE PRODUCE EN EL CONTEXTO DE DIABETES

[0026] Creemos, sin desear limitarnos, que la alteración de repuestas de células madre en los riñones de diabéticos contribuyen a nefropatía diabética e insuficiencia renal. Creemos, de nuevo sin desear limitarnos, que el
45 tratamiento de diabéticos que tienen insuficiencia renal por administración de un quelante de cobre mejorará la regeneración de órganos restaurando la curación de tejido normal permitiendo que los células madre migren y se diferencien normalmente.
50

[0027] Creemos, de nuevo sin desear limitarnos, que una reducción en los valores de cobre extracelulares es ventajosa incluso en el mamífero no diabético e incluso en un mamífero sin una anomalía en el mecanismo de la glucosa, ya que tales menores niveles conducirán a uno o a ambos de una reducción en la lesión de tejido mediada
55 por cobre y reparación de tejido mejorada por restauración de repuestas de células madre de tejido normal.

6. ALTERACIÓN DE LA REGENERACIÓN CARDÍACA

[0028] Creemos, sin desear limitarnos, que la acumulación de cobre en tejidos cardíacos suprime la regeneración
60 de tejido normal efectuada por la migración de células madre de sitios extracardíacos al corazón, con posterior diferenciación de tales células en diversas células cardíacas especializadas, que incluyen células vasculares miocárdicas, endoteliales y coronarias. Creemos, de nuevo sin desear limitarnos, que una reducción en los valores de cobre extracelulares reducirá o abluionará la alteración de la regeneración de tejido producida por la supresión de repuestas de células madre normales.
65

7. ALTERACIÓN DE LA REGENERACIÓN VASCULAR

[0029] Los procesos de regeneración vascular requieren la intervención de células madre de movilización, que efectúan la reparación de las diversas capas de vasos sanguíneos. Creemos, sin desear limitarnos, que una acumulación de metales de transición (particularmente cobre) en tejidos vasculares produce alteración de la regeneración de tejidos suprimiendo la migración de células madre no diferenciadas y repuestas de células madre de tejido normal. Adicionalmente creemos, de nuevo sin desear limitarnos, que una reducción en los valores de cobre extracelulares es ventajoso porque tales menores niveles conducirán a una reducción en la alteración de la regeneración vascular por restauración de repuestas de células madre de tejido normal.

5

8. ALTERACIÓN DE LA REGENERACIÓN DE ÓRGANOS DEPENDIENTE

[0030] Creemos, sin desear limitarnos, que una acumulación de metales de transición (particularmente cobre) en los tejidos de los órganos dependientes del árbol cardiovascular (por ejemplo retina, riñón, nervios, etc.) produce alteración de la regeneración de tejidos suprimiendo la migración de células madre y así los comportamientos biológicos normales de tales células madre. De esto resulta que una reducción en los valores de cobre extracelulares es ventajosa para reducir o ablacionar la alteración en la regeneración de tejido por restauración de repuestas de células madre de tejido normal.

10

20 Explicación de la invención

[0031] El corazón es el órgano más susceptible de todos los órganos del cuerpo al envejecimiento prematuro y al estrés oxidativo por radicales libres. Se ha confirmado una alta frecuencia de cardiomiopatía por insuficiencia cardíaca y enfermedad macrovascular en animales gravemente diabéticos y también se ha descubierto, como se describe en este documento, que el tratamiento con quelantes de cobre específicos y otros agentes (por ejemplo, cinc que evita la absorción de cobre) que disminuye los valores de cobre y, preferentemente, no conduce a estados de agotamiento de otros metales de transición (por ejemplo, hierro, cinc y manganeso), o metales esenciales, beneficiará a un número y espectro significativo de la población. Preferentemente, el tratamiento va precedido de una determinación de la ausencia de un estado de deficiencia de cobre o valores indeseablemente bajos de cobre. Sin desear limitarnos por ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que los valores de cobre, particularmente, por ejemplo, cobre (II) que no se une internamente dentro de células, están disponibles para mediar junto con sustancias reductoras disponibles en la generación de radicales libres perjudiciales que tienen una función tanto en la lesión de tejido como en la alteración de la reparación mediada por células madre de tal tejido.

25

30

35

[0032] A modo de ejemplo, en relación con el tejido de miocardio normal, se cree que la lesión como resultado de la presencia de radicales libres conduce a insuficiencia cardíaca y/o cardiomiopatía en tanto diabéticos como no diabéticos. También se cree que la presión continuada de tales radicales libres altera la reparación mediada por células madre del miocardio a su estado de salud normal. Con respecto a tal lesión y la alteración de la reparación, la presente invención proporciona una reducción deseada en los valores de cobre libre disponibles como un enfoque preventivo y/o de tratamiento apropiado.

40

[0033] Por referencia a valores de cobre disponibles en mamíferos (incluyendo seres humanos) puede identificarse aquellos pacientes mamíferos con un nivel de cobre que es "elevado" más allá del de la población general de tales mamíferos. Referencia en este documento a "elevado" en relación con la presencia de valores de cobre incluirá seres humanos que tienen al menos aproximadamente 10 mcg de cobre libre/dl de suero cuando se mide como se trata en este documento. Puede hacerse una medida del cobre libre que es igual al cobre en plasma total menos el cobre unido a ceruloplasmina usando diversos procedimientos. Un procedimiento preferido se desvela en la hoja de datos de Merck & Co Inc (www.merck.com) para las cápsulas SYPRINE® (clorhidrato de trientina), un compuesto usado para el tratamiento de enfermedad de Wilson, en el que se realiza un análisis de cobre urinario de 24 horas para determinar el cobre libre en el suero calculando la diferencia entre el cobre total cuantitativamente determinado y el cobre en ceruloplasmina. Nombres alternativos para la trientina incluyen N,N'-bis(2-aminoetil)-1,2-etanodiamina; trietilentetramina; 1,8-diamino-3,6-diazaoctano; 3,6-diazaoctano-1,8-diamina; 1,4,7,10-tetraazadecano; trien; TETA; TECZA y trieno.

45

50

[0034] Sin desear estar limitado por ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que la reducción en el cobre libre disponible ayuda a prevenir enfermedades macrovasculares, microvasculares y/o tóxicas/metabólicas del tipo ejemplificado en lo sucesivo y en procesos de reparación de tejido. Esto es independientemente del metabolismo de la glucosa del paciente y, por tanto, es aplicable del mismo modo a diabéticos y no diabéticos, además de a aquellos con y sin niveles o metabolismo de la glucosa alterados o anormales.

55

60

[0035] También se cree, de nuevo sin desear estar limitado por ninguna teoría o mecanismo particular, que la acumulación cardiovascular de iones de metales de transición activos para rédox es responsable de muchas de las consecuencias adversas y complicaciones a largo plazo en diabetes. Bajo condiciones fisiológicas, la lesión a un órgano diana es detectada por células madre distantes, que migran al sitio de lesión, luego experimentan diferenciación de células madre alternativa. Estos acontecimientos promueven la reparación estructural y funcional.

65

Sin embargo, la acumulación de metales de transición activos para rédox, particularmente cobre, en tejidos cardíacos o vasculares en sujetos con diabetes va acompañada de una supresión de la regeneración de tejido normal efectuada por la migración de células madre. Niveles de cobre elevados en tejido suprimen estos comportamientos biológicos normales de tales células sin diferenciar. Las afecciones que se producen en el contexto de diabetes o intolerancia a la glucosa, por ejemplo, en las que la supresión de repuestas de células madre normales puede producir la alteración de respuestas de tejido normal, incluyen insuficiencia cardíaca, infarto agudo de miocardio, cicatrización y ulceración, lesión de tejido producida por infección, lesión renal diabética, alteración de la regeneración cardíaca, alteración de la regeneración vascular y alteración de la regeneración de órganos dependientes. Las afecciones en las que la terapia para reducir los valores de cobre en pacientes diabéticos (por ejemplo, con IG o diabetes mellitus de tipo 2) demostrarán ser beneficiosas incluyen, por ejemplo, insuficiencia cardíaca en el contexto de diabetes, infarto de miocardio en el contexto de diabetes, cicatrización y ulceración en el contexto de diabetes, lesión de tejido blando resultante de infección y que se produce en el contexto de diabetes o intolerancia a la glucosa, lesión renal que se produce en el contexto de diabetes, alteración de la regeneración cardíaca, alteración de la regeneración vascular y alteración de la regeneración de órganos dependientes.

15 **[0036]** Con respecto a la insuficiencia cardíaca en el contexto de diabetes, puede producirse una regeneración significativa de tejidos cardíacos en el plazo de algunos días desde el trasplante cardíaco. Un mecanismo probable es la migración de células madre de sitios extracardíacos al corazón, con posterior diferenciación de tales células en diversas células cardíacas especializadas, que incluyen células vasculares miocárdicas, endoteliales y coronarias. Sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que la acumulación de cobre en tejidos cardíacos es probable que altere gravemente estas respuestas regeneradoras, y que haya una función para terapia, que incluye terapia intravenosa de corta duración, con transición de un quelante de cobre en el tratamiento de insuficiencia cardíaca diabética.

25 **[0037]** Con respecto a infarto de miocardio (IM) en el contexto de diabetes, por ejemplo, se entiende que el IM va acompañado de proliferación de células en el miocardio ventricular. Si se produce IM en el contexto de diabetes, la presencia de niveles elevados en tejido de metales de transición activos para rédox suprime las repuestas de células madre normales, produciendo alteración de la reparación estructural y funcional de tejidos lesionados. Se ha informado que hasta el 20% de las células en el corazón puede reemplazarse por migración de células madre de sitios extraventriculares, en tan sólo cuatro días después del trasplante cardíaco. Se cree que el tratamiento de IMA en el contexto de diabetes mejorará por, por ejemplo, la administración de corta duración (si fuera necesario, parenteral), además de por posterior administración prolongada, de quelantes. Sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, también se cree que la alteración de la función cardíaca en diabetes se caracteriza al menos en parte por un efecto tóxico de metales de transición acumulados sobre la dinámica de tejidos, produciendo la alteración de la regeneración de tejidos producida a su vez por la supresión de repuestas de células madre normales, que median en la regeneración de tejido fisiológico por migración a tejido lesionado desde sitios externos.

40 **[0038]** Con respecto a la cicatrización y ulceración en el contexto de diabetes, los procedimientos de reparación de tejido normal requieren la intervención de células madre de movilización, que efectúan, por ejemplo, la reparación de las diversas capas de vasos sanguíneos. Sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que una acumulación de metales de transición (particularmente cobre) en tejidos vasculares produce la alteración del comportamiento del tejido característica de diabetes, por ejemplo, que incluye alteración de la reparación de heridas tras cirugía o traumatismo, y la tendencia exagerada a ulceración y mala curación de úlceras establecidas. Sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que el tratamiento de diabéticos con 45 quelantes de cobre antes de que se sometan a cirugía, por ejemplo, o en el contexto de lesión traumática de tejido, será beneficioso. Se cree adicionalmente que es probable que la cirugía en diabéticos, por ejemplo, tuviera un mejor resultado si el exceso de metales de transición en, por ejemplo, los vasos sanguíneos, se eliminara o se redujera antes de la cirugía. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, en tanto una base de corta duración (con, por ejemplo, terapia parenteral) como en una base más prolongada (con, por ejemplo, terapia oral) antes de la cirugía real.

50 **[0039]** Con respecto a la lesión de tejido blando resultante de infección y que se produce en el contexto de diabetes o intolerancia a la glucosa, por ejemplo, y sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que los procedimientos de reparación de tejido normal tras la infección requieren la intervención de células madre movilizados que migran a sitios de lesión de tejido para efectuar la regeneración y reparación de tejido, por ejemplo, de las diversas capas de vasos sanguíneos, y que la reparación de tal lesión de tejido será alterada por repuestas de células madre suprimidas, tales como aquellas producidas por la formación de metales de transición activos para rédox (particularmente cobre) en tejidos, por ejemplos, las paredes de vasos sanguíneos. El tratamiento con un quelante de cobre u otro agente para eliminar cobre mejorará estas condiciones.

60 **[0040]** Con respecto a la lesión renal que se produce en el contexto de diabetes, de nuevo sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que la alteración de respuestas de células madre en los riñones de diabéticos contribuye a nefropatía diabética e insuficiencia renal. El tratamiento de diabéticos que tienen insuficiencia renal por administración de un quelante de cobre mejorará la regeneración de órganos restaurando la curación de tejido normal permitiendo que los células madre migren y se diferencien normalmente. Además, también se propone que una reducción en los valores de cobre extracelulares es ventajosa en el mamífero no diabético e

incluso en un mamífero sin una anomalía en el mecanismo de la glucosa, ya que tales menores niveles conducirán a uno o a ambos de una reducción en la lesión de tejido mediada por cobre y reparación de tejido mejorada por restauración de repuestas de células madre de tejido normal.

5 **[0041]** Con respecto a la alteración de la regeneración cardíaca, de nuevo sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que la acumulación de cobre en tejidos cardíacos suprime la regeneración de tejido normal efectuada por la migración de células madre de sitios extracardíacos al corazón, con posterior diferenciación de tales células en diversas células cardíacas especializadas, que incluyen células vasculares miocárdicas, endoteliales y coronarias. Una reducción en los valores de cobre extracelulares reducirá o ablacionará
10 la alteración de la regeneración de tejido producida por la supresión de repuestas de células madre normales.

[0042] Con respecto a la alteración de la regeneración vascular, se cree que los procesos de regeneración vascular requieren la intervención de células madre de movilización, que efectúan la reparación de las diversas capas de vasos sanguíneos. Sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que una
15 acumulación de metales de transición (particularmente cobre) en tejidos vasculares produce la alteración de la regeneración de tejidos suprimiendo la migración de células madre no diferenciadas y repuestas de células madre de tejido normal. Una reducción en los valores de cobre extracelulares es ventajosa porque tales menores niveles conducirán a una reducción en la alteración de regeneración vascular por restauración de repuestas de células madre de tejido normal.

20 **[0043]** Con respecto a la alteración de la regeneración de órganos dependientes, se cree, sin desear estar limitado ninguna teoría o mecanismo particular, que una acumulación de metales de transición (particularmente cobre) en los tejidos de los órganos dependientes del árbol cardiovascular (por ejemplo, retina, riñón, nervios, etc.) produce alteración de la regeneración de tejidos suprimiendo la migración de células madre y así los comportamientos
25 biológicos normales de tales células madre. Una reducción en los valores de cobre extracelulares es ventajosa para reducir o ablacionar la alteración en la regeneración de tejido por restauración de repuestas de células madre de tejido normal.

[0044] Es un objeto de la presente invención proporcionar medicamentos que mejoren, prevengan o traten uno
30 cualquiera o más estados de enfermedad del árbol cardiovascular (incluyendo el corazón) y órganos dependientes (por ejemplo, retina, riñón, nervios, etc.) agravados por niveles de valores de cobre libre no intracelulares elevados. Enfermedades del árbol cardiovascular y enfermedades de órganos dependientes incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, cualquiera o más de:
35 trastornos del músculo del corazón (cardiomiopatía o miocarditis) tales como cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía metabólica que incluye cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía inducida por fármacos, cardiomiopatía isquémica y cardiomiopatía hipertensiva;
trastornos ateromatosos de los principales vasos sanguíneos (enfermedad macrovascular) tales como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias poplíteas;
40 trastornos tóxicos, inducidos por fármacos y metabólicos (incluyendo hipertensivos y/o diabéticos) de vasos sanguíneos pequeños (enfermedad microvascular) tales como las arteriolas retinianas, las arteriolas glomerulares, los vasos nerviosos, arteriolas cardíacas y lechos capilares asociados del ojo, el riñón, el corazón y los sistemas nervioso central y periférico; y,
rotura de placas de lesiones ateromatosas de los principales vasos sanguíneos tales como la aorta, las arterias
45 coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias poplíteas.

[0045] La presente invención también se refiere a cualquiera de tales dolencias y a su tratamiento independientemente (a menos que se establezca de otro modo) de cualquier estado diabético y/o de anomalía de la
50 glucosa del paciente mamífero.

[0046] Por consiguiente, dentro de las categorías de enfermedad de pacientes que son útilmente elegidas como diana por los procedimientos de la presente invención se incluyen, por ejemplo, cualquiera o más de la siguiente lista no exhaustiva: cardiomiopatía diabética, síndrome coronario agudo diabético (por ejemplo, infarto de miocardio IM),
55 cardiomiopatía hipertensiva diabética, síndrome coronario agudo asociado a intolerancia a la glucosa (IG), síndrome coronario agudo asociado a glucemia en ayunas (GA), cardiomiopatía hipertensiva asociada a IG, cardiomiopatía hipertensiva asociada a GA, cardiomiopatía isquémica asociada a IG, cardiomiopatía isquémica asociada a GA, cardiomiopatía isquémica asociada a enfermedad cardíaca coronaria (ECO), síndrome coronario agudo no asociado a ninguna anomalía del metabolismo de la glucosa, cardiomiopatía hipertensiva no asociada a ninguna anomalía del
60 metabolismo de la glucosa, cardiomiopatía isquémica no asociada a ninguna anomalía del metabolismo de la glucosa (independientemente de si tal cardiomiopatía isquémica está asociada o no a enfermedad cardíaca coronaria) y cualquiera o más de enfermedad del árbol vascular que incluye, a modo de ejemplo, estados de enfermedad de la aorta, carótida, cerebrovascular, coronaria, renal, retiniana, vasos nerviosos, ilíaca, femoral, poplíteo, árbol arteriolar y lecho capilar. Los pacientes que van a tratarse según las reivindicaciones son sujetos
65 humanos no diabéticos con insuficiencia cardíaca en los que la insuficiencia cardíaca está asociada a niveles

elevados de cobre.

[0047] Sin desear estar limitado a ninguna teoría o mecanismo particular, se cree que en los estados diabéticos anteriormente mencionados o estados anormales del metabolismo de la glucosa las complicaciones diabéticas en las regiones distales del árbol arterial pueden ser mediadas por el régimen de la presente invención mientras que al mismo tiempo mejoran afecciones más proximales.

[0048] Con un paciente no diabético, las complicaciones que se producen de un contenido elevado de valores de cobre en el cuerpo entero puede ser más proximal que distal. Sin embargo, la mediación de y/o la reparación de tal lesión es posible (incluyendo de o a la aorta, carótida, cerebrovascular, coronaria, renal, retiniana, vasos nerviosos, iliaca, femoral, poplítea, árbol arteriolar y lecho capilar) y se cree que mejorará por el régimen de la presente invención.

[0049] Como se usa en este documento, el término “diabético” se refiere a un ser humano u otro mamífero que padece diabetes de tipo 2 o intolerancia a la glucosa (IG), o cualquier otra forma de diabetes o alteración del metabolismo de la glucosa en la que la eliminación de cobre en exceso o no deseado sería de valor para el tratamiento.

[0050] El término “cardiomiopatía” como se usa en este documento y cuando el contexto así lo permita incluye tanto cardiomiopatía como insuficiencia cardíaca asociada.

[0051] Como se usa en este documento, los términos “someter el paciente” o “administrar a” incluyen cualquier modo activo o pasivo de asegurar la presencia *in vivo* del (de los) compuesto(s) activo(s) o metabolito(s) independientemente de si participa una o más dosificaciones al mamífero, paciente o persona. Preferentemente, el modo de administración es oral. Sin embargo, también se contemplan todos los otros modos de administración (particularmente parenteral, por ejemplo, intravenoso, intramuscular, etc.).

[0052] Como se usa en este documento, “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad predeterminada de un agente que logrará o se calcula para que logre una respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica o preventiva o de mejora, por ejemplo, una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que es buscada, por ejemplo, por un investigador, veterinario, doctor médico u otro profesional clínico.

[0053] Por “farmacéuticamente aceptable” se indica, por ejemplo, un vehículo, diluyente o excipiente que es compatible con los otros componentes de formulación y generalmente seguro para administración a un receptor del mismo o que no produce una reacción física adversa no deseada tras la administración.

[0054] Como se usa en este documento, “mamífero” tiene su significado usual e incluye primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos), animales experimentales (por ejemplo, roedores tales como ratones y ratas), animales de granja (tales como vacas, cerdos, ovejas y caballos) y animales domésticos (tales como perros y gatos).

[0055] El término “elevado” tiene el significado previamente expuesto, mientras que el término “normal” con respecto al estado de los valores de cobre de, por ejemplo, un paciente humano significa, adoptando la prueba previamente referida que se ha desvelado por Merck & Co Inc., que es un paciente que tiene menos de 10 mcg de cobre libre/dl de suero.

[0056] Como se usa en este documento “deficiente en cobre” significa que el diagnóstico de deficiencia en cobre se hace normalmente basándose en niveles bajos de cobre en suero (<65 µg/dl) y niveles bajos de ceruloplasmina (<18 mg/dl). Los niveles de cobre en suero pueden elevarse en condiciones de embarazo o estrés ya que la ceruloplasmina es un reactivo de la fase aguda. Como se usa en este documento, los términos “tratamiento” o “tratar” una afección, trastorno y/o una enfermedad en un mamífero significa, cuando el contexto lo permita, (i) prevenir la afección o enfermedad, es decir, prevenir uno o más síntomas clínicos de la enfermedad; (ii) inhibir la afección o enfermedad, es decir, detener el desarrollo o la progresión de uno o más síntomas clínicos; y/o (iii) aliviar la afección o enfermedad, es decir, producir la regresión de uno o más síntomas clínicos.

[0057] Como se usa en este documento, “asociado a” simplemente significa que existen ambas circunstancias y no debe interpretarse que una esté necesariamente causalmente asociada a la otra.

[0058] El término “cobre quelable” incluye cobre en cualquiera de sus formas quelables que incluyen diferentes estados del oxígeno tales como cobre (II). Por consiguiente, el término “valores de cobre” (por ejemplo, elemental, sales, etc.) significa cobre en alguna forma apropiada en el cuerpo disponible para tal quelación (por ejemplo, en tejido extracelular y posiblemente unido a células exteriores y/o colágeno a diferencia de tejido intracelular) y/o que puede ser reducido por otros medios (por ejemplo, administración de cinc).

65

- [0059]** Quelantes de valores de cobre apropiados para la administración a mamífero para el tratamiento de una o más de las afecciones, trastornos y/o enfermedades en este documento incluyen, por ejemplo (cuando corresponda, como una sal tal como, por ejemplo, una sal de calcio y sodio adecuada para prevenir hipocalcemia): trientina (trieno), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminotetraacético (DPTA), tetraclorhidrato de 2,2,2-tetramina (TETA), tetraclorhidrato de 2,3,2-tetramina, D-penicilamina (DPA), 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (Cyclam), 5,7,7',12,14,14'-hexametil-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (Cyclam S), 2,3-dimercaptopropano-1-sulfonato de sodio (DMPS), N-acetilpenicilamina (NAPA), D-penicilamina (PA), desferroxamina, 2,3-dimercaptopropanol (BAL), ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), molibdato de tritio, 3-7-diazanonano-1,9-diamina (BE 6184), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético, 1,4,8,11-tetraazabiciclo[6.6.2]hexadecano, 4,11-bis(N,N,dietil-amidometil)-1,4,8,11-tetraazabiciclo[6.6.2]hexadecano, 4,11-bis(amidoetil)-1,4,8,11-tetraazabiciclo[6.6.2]hexadecano, melatonina, clioquinol, cuprizona, N,N'-dietilditiocarbamato, acetato de cinc, sales de cinc, ácido batocuproindisulfónico, disulfonato de batocuproína, neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina), tetratiomolibdato, trimetazidina, tetraclorhidrato de trietilentetramina, 2,3,2-tetraamina, ácido piridin-2,6-bis(tiocarboxílico) o ditiocarbamato de pirrolidina, tetraetilenpentamina, N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina, 15 tetraclorhidrato de 1,4,7,11-tetraazaundecano, pentaclorhidrato de tetraetilenpentamina, D-penicilamina (DPA), 1,10-ortofenantrolina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 2,2'-bicinconínico, diamsar, 3,4',5-trihidroxiestilbeno (Resveratrol), mercaptodextrano, o-fenantrolina, disulfiram (Antabuse), sar, dietilentriaminapentaacetato de calcio y trisodio (sal de cpd arriba) y metimazol (1-metil-2-tiolimidazol).
- 20 **[0060]** En otro aspecto, uno o más agentes que pueden disminuir el contenido de valores de cobre del paciente, si es un quelante, tiene una afinidad preferencial por valores de cobre con respecto a valores de otros metales traza (tales como hierro, cinc y/o manganeso).
- [0061]** En otro aspecto más, la afinidad preferencial por valores de cobre es de forma que el exceso de cobre del 25 100% al 500% con respecto al de un mamífero sano normal de la especie puede controlarse hasta tales niveles normales o aproximarse a tales niveles normales sin conducir al agotamiento o disminución excesiva en tales otros metales de transición como hierro, cinc y/o manganeso. Es particularmente deseable no inducir enfermedades de tales deficiencias de metales de transición, por ejemplo, anemia. El quelante de valores de cobre según las reivindicaciones es trientina.
- 30 **[0062]** La administración de cualquier quelante de cobre (por ejemplo, trientina) puede ser mediante una variedad de vías que incluyen parenteral y oral. Con tales agentes, una tasa de dosis para administración por vía oral puede ser aproximadamente 10 veces la de para administración parenteral. Esto vencerá cualquier biodisponibilidad reducida. Con trientina, una dosis parenteral adecuada es aproximadamente 120 mg/día en el hombre.
- 35 **[0063]** Por consiguiente, si el quelante es clorhidrato de trientina (e independientemente de excipientes, diluyentes, soportes y vehículos), por ejemplo, la dosificación o dosificaciones en un paciente humano, si es parenteral, es para proporcionar aproximadamente 120 mg/día y, si es oral, aproximadamente 1200 mg/día.
- 40 **[0064]** Adicionalmente, el agente que puede reducir los valores de cobre es una sal de cinc (preferentemente como una disolución acuosa aromatizada) o tritiomolibdato (también un quelante). Sales de cinc adecuadas incluyen, por ejemplo: acetato de cinc; cloruro de cinc; sulfato de cinc; sales de cinc de productos intermedios del ciclo del ácido cítrico tales como citrato, isocitrato, cetoglutarato, succinato, malato; y gluconato de cinc. Con los quelantes citados en este documento, y sales de cinc adecuadas que incluyen aquellas citadas en este documento, es posible 45 disminuir selectivamente los valores de cobre en el cuerpo como un conjunto (sin alcanzar estados de agotamiento para otros metales de transición) aún cuando se cree que hay poca disminución en los valores de cobre en el tejido intracelular. Se cree que la disminución es principalmente extracelular (por ejemplo, intersticio, sobre el exterior de células y/o sobre colágeno).
- 50 **[0065]** En un aspecto, la presente invención como se reivindica es el uso de un agente eficaz para reducir el contenido de valores de cobre en un sujeto humano, comprendiendo dicho agente trientina, para la preparación de un medicamento para tratar insuficiencia cardíaca en un sujeto humano no diabético, donde la insuficiencia cardíaca en el sujeto no diabético está asociada a niveles de cobre elevados.
- 55 **[0066]** En otro aspecto, la presente invención como se reivindica es un agente eficaz para reducir el contenido de valores de cobre en un sujeto humano, comprendiendo dicho agente trientina, para su uso en un método para tratar la insuficiencia cardíaca en un sujeto humano no diabético, donde la insuficiencia cardíaca en el sujeto no diabético está asociada a niveles de cobre elevados.
- 60 **[0067]** El clorhidrato de trientina puede administrarse a dosificaciones o una dosificación para proporcionar, si es parenteral, al menos aproximadamente 120 mg/día en un paciente humano y, si es oral, al menos aproximadamente 1200 mg/día en un paciente humano
- [0068]** Se cree que la mejora de la reparación de tejido se produce a partir de una restauración de, o restauración 65 sustancial, de repuestas de células madre de tejido normal, aunque no hay intención de ligarse a este mecanismo.

- [0069]** El agente puede comprender adicionalmente una sal de cinc (sales de cinc).
- [0070]** Preferentemente, el uso implica excipientes, diluyentes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 5 **[0071]** La invención también es una unidad de dosificación resultante del uso.
- [0072]** El uso puede implicar evaluar o monitorizar continua o periódicamente el estado de cobre del paciente.
- 10 **[0073]** La determinación del estado de cobre pueden ser por referencia a valores de cobre extracelulares.
- [0074]** La disminución del contenido de valores de cobre del paciente puede ser, pero no es necesariamente, de un estado elevado que sea el típico del estado de valores de cobre de un paciente humano que padece diabetes mellitus de tipo 2 u otra enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo, al de un no enfermo.
- 15 **[0075]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar niveles de glucosa.
- [0076]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar glucemia posprandial.
- 20 **[0077]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar la función renal.
- [0078]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar hipertensión.
- [0079]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar resistencia a insulina.
- 25 **[0080]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar intolerancia a la glucosa.
- [0081]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar obesidad.
- 30 **[0082]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar alcoholismo.
- [0083]** El uso puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar una anomalía en el mecanismo de la glucosa del paciente.
- 35 **[0084]** El uso también puede incluir la etapa de diagnosticar y/o evaluar o monitorizar lesión macrovascular, microvascular, tóxica y/o metabólica en el paciente.
- [0085]** El uso puede incluir una etapa adicional o etapas de evaluar o monitorizar los valores de cobre del paciente antes de, simultáneamente con y/o posteriormente a que el paciente sea sometido a o se le administre el (los)
- 40 agente(s).
- [0086]** El quelante tiene una afinidad preferencial por valores de cobre con respecto a valores de otros metales traza (tales como hierro, cinc y/o manganeso). La afinidad preferencial por valores de cobre es de forma que el exceso de cobre de aproximadamente el 100% a aproximadamente el 500% con respecto al de un mamífero sano
- 45 normal de la especie pueda controlarse hasta tales niveles normales o aproximarse a tales niveles normales sin conducir al agotamiento o disminución excesiva en hierro, cinc y/o manganeso. Con el quelante citado en este documento y las sales de cinc adecuadas es posible disminuir selectivamente los valores de cobre en el cuerpo como un todo aún cuando se cree que hay poca disminución en los valores de cobre en el tejido intracelular. Sin ligarse a este mecanismo, se cree que la disminución es principalmente extracelular (por ejemplo, intersticial, sobre el
- 50 exterior de células y/o sobre colágeno).
- [0087]** En cualquiera de los procedimientos anteriores lo siguiente ocurre o está implicado (uno cualquiera, algunos o todos). El quelante de cobre en el mamífero está sustancialmente sin una capacidad para generar radicales libres en cantidades significativas y, por tanto, en el mamífero a el régimen de dosificación que va a
- 55 administrarse no quelará cobre hasta un estado de agotamiento en el mamífero. La administración es un régimen de dosificación inferior a la que para un paciente que padece sobrecarga de cobre clásica tendría el efecto de disminuir los niveles de cobre de ese paciente a normales. La administración es un régimen de dosificación (si depende o no de la(s) unidad(es) de dosificación y/o frecuencia) que no reduce o no reducirá un paciente de niveles de cobre normales a un estado de deficiencia. La pauta puede ser conjuntamente (seriada, simultánea o de otro modo) con
- 60 una pauta para antagonizar la fructosamina oxidasa. La(s) unidad(es) de dosificación es (son) la(s) unidad(es) de dosificación de una pauta que disminuye en cobre. La pauta puede ejecutarse conjuntamente con cualquiera de las pautas desveladas en el documento WO 00/18392. El uso implica diluyentes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición es para su uso en un método citado, sugerido o identificado en este documento.
- 65 **[0088]** La presente invención también proporciona una unidad de dosificación resultante de o para cualquier uso

tal.

[0089] Con un paciente no diabético, las complicaciones que se producen a partir de un contenido de valores de cobre elevado del cuerpo completo son más proximales que distales, pero sin embargo la mediación de y/o la reparación de tal lesión es posible (incluyendo de o a la aorta, carótida, cerebrovascular, coronaria, renal, retiniana, vasos nerviosos, ilíaca, femoral, poplítea, árbol arteriolar y lecho capilar). Creemos que se mejoran por la pauta de la presente invención.

[0090] Como se usa en este documento, el término “comprende”, si no está asociado a “incluye”, significa tiene, es o incluye.

[0091] Como se usa en este documento, el término “y/o” significa tanto “y” como “o”.

[0092] Como se usa en este documento, la adición de “(s)” como parte de una palabra engloba tanto el singular como el plural de esa palabra.

[0093] Como se usa en este documento, el término “diabético” se refiere a un ser humano u otro mamífero que padece diabetes de tipo II o intolerancia a la glucosa (IG).

[0094] El término “cardiomiopatía” como se usa en este documento y cuando el contexto así lo permita incluye tanto cardiomiopatía como insuficiencia cardíaca asociada.

[0095] Como se usa en este documento, los términos “someter el paciente” o “administrar a” incluyen cualquier modo activo o pasivo de asegurar la presencia *in vivo* del (de los) compuesto(s) activo(s) o metabolito(s) independientemente de si participa una o más de la dosificación al mamífero, paciente o persona. Preferentemente, el modo de administración es oral, aunque también se contemplan otros modos (particularmente parenteral, por ejemplo, intravenoso, intramuscular, etc.).

[0096] Como se usa en este documento, “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad predeterminada de un agente calculado para lograr un efecto terapéutico deseado.

[0097] Como se usa en este documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo que no produce una reacción física adversa tras la administración y uno en o a partir del cual un agente terapéutico es suficientemente llevado o puede dejar que se administre una cantidad terapéuticamente eficaz.

[0098] Como se usa en este documento, “mamífero” tiene su significado usual e incluye primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos), animales experimentales (por ejemplo, roedores tales como ratones y ratas), animales de granja (tales como vacas, cerdos, ovejas y caballos) y animales domésticos (tales como perros y gatos).

[0099] El término “elevado” tiene el significado previamente definido, mientras que el término “normal” con respecto al estado de los valores de cobre de, por ejemplo, un paciente humano significa, adoptando la prueba previamente referida que se ha desvelado por Merck & Co Inc., que es un paciente que tiene menos de 10 mcg de cobre libre/dl de suero.

[0100] Como se usa en este documento “deficiente en cobre” significa que el diagnóstico de deficiencia en cobre se hace normalmente basándose en niveles bajos de cobre en suero (<65 µg/dl) y niveles bajos de ceruloplasmina (<18 mg/dl). Los niveles de cobre en suero pueden elevarse en condiciones de embarazo o estrés ya que la ceruloplasmina es un reactivo de la fase aguda.

[0101] Como se usa en este documento, los términos “tratamiento” o “tratar” una afección y/o una enfermedad en un mamífero significa, cuando el contexto lo permita,

- (i) prevenir la afección o enfermedad, es decir, evitar cualquier síntoma clínico de la enfermedad;
- (ii) inhibir la afección o enfermedad, es decir, detener el desarrollo o la progresión de síntomas clínicos; y/o
- (iii) aliviar la afección o enfermedad, es decir, producir la regresión de síntomas clínicos.

[0102] Como se usa en este documento, “asociado a” simplemente significa que existen ambas circunstancias y no debe interpretarse que una esté necesariamente causalmente asociada a la otra.

[0103] El término “cobre quelable” incluye cobre en cualquiera de sus formas quelables que incluyen diferentes estados del oxígeno tales como cobre (II). Por consiguiente, el término “valores de cobre” [por ejemplo, podría ser elemental, sales, etc.] significa cobre en alguna forma apropiada en el cuerpo disponible para tal quelación (es decir, en tejido extracelular [por ejemplo, posiblemente unido a células exteriores y/o colágeno a diferencia de tejido intracelular]) y/o que puede ser reducido por otros medios (por ejemplo, administración de cinc).

- [0104]** El agente que puede disminuir el contenido de valores de cobre del paciente tiene una afinidad preferencial por valores de cobre con respecto a valores de otros metales traza (tales como hierro, cinc y/o manganeso). Preferentemente, la afinidad preferencial por valores de cobre es de forma que el exceso de cobre del 100% al 500% con respecto al de un mamífero sano normal de la especie pueda controlarse hasta tales niveles normales o aproximarse a tales niveles normales sin conducir al agotamiento o disminución excesiva en tales otros metales de transición como hierro, cinc y/o manganeso. Es particularmente importante no inducir enfermedades de tales deficiencias de metales de transición, por ejemplo, anemia.
- 10 **[0105]** La administración del quelante de cobre (trientina) puede ser mediante una variedad de vías que incluyen parenteral y oral. Con tal agente, una tasa de dosis para administración por vía oral es aproximadamente 10 veces la de para administración parenteral debido a la baja biodisponibilidad del fármaco. Con trientina, una dosis parenteral adecuada es aproximadamente 120 mg/día en el hombre.
- 15 **[0106]** Por consiguiente, si el quelante es clorhidrato de trientina (e independientemente de excipientes, diluyentes, soportes y vehículos), la dosificación o dosificaciones en un paciente humano, si es parenteral, es para proporcionar aproximadamente 120 mg/día y, si es oral, aproximadamente 1200 mg/día.
- [0107]** Adicionalmente, el agente que puede reducir los valores de cobre es una sal de cinc (preferentemente como una disolución acuosa aromatizada) o tritiomolibdato (también un quelante). Sales de cinc adecuadas incluyen
- acetato de cinc
 - cloruro de cinc
 - sulfato de cinc
- 25 • sales de cinc de productos intermedios del ciclo del ácido cítrico; tales como citrato, isocitrato, cetoglutarato, succinato, malato
- gluconato de cinc
- [0108]** Con el quelante citado en este documento y las sales de cinc adecuadas es posible disminuir selectivamente los valores de cobre en el cuerpo como un todo (creemos que sin alcanzar estados de agotamiento para otros metales de transición) aún cuando nosotros creemos que hay poca disminución en los valores de cobre en el tejido intracelular, es decir, la disminución es principalmente extracelular (por ejemplo, intersticios, sobre el exterior de células y/o sobre colágeno).
- 35 **[0109]** La presente invención se describirá ahora con referencia a uno cualquiera o más de los siguientes dibujos en los que
- la **Figura 1** es un diagrama que muestra lo que nosotros creemos que son las rutas tratadas por la presente invención,
- 40 la **Figura 2** es nuestra hipótesis de los mecanismos implicados aplicables a cardiomiopatía y enfermedad macrovascular en un paciente con diabetes de tipo II o intolerancia a la glucosa, mostrando una hipótesis tal dependencia de una posible generación de fructosamina oxidasa/superóxido dismutasa de un precursor en una reacción catalizada por cobre (la reacción de Haber-Weiss) que genera los radicales libres perjudiciales,
- 45 la **Figura 3** es la metodología para un paciente humano sospechoso de cardiomiopatía bajo la presente invención,
- la **Figura 4** es un diagrama similar al de la Figura 3, pero esta vez con respecto a un paciente sospechoso de enfermedad macrovascular,
- la **Figura 5** es un diagrama que muestra el peso corporal de los animales que cambia con el periodo de tiempo del experimento,
- 50 la **Figura 6** muestra los niveles de glucosa de los animales que cambia con el periodo de tiempo del experimento,
- la **Figura 7** es un diagrama que muestra la entrada cardíaca,
- la **Figura 8** es un diagrama que muestra el flujo coronario,
- la **Figura 9** es un diagrama que muestra el flujo coronario normalizado al peso cardíaco final,
- 55 la **Figura 10** es un diagrama que muestra el flujo aórtico,
- la **Figura 11** es un diagrama que muestra la tasa máxima de cambio positivo en el desarrollo de la presión en el ventrículo con cada ciclo cardíaco (contracción),
- la **Figura 12** es un diagrama que muestra la tasa máxima de disminución en la presión en el ventrículo con cada ciclo cardíaco (relajación),
- 60 la **Figura 13** muestra el porcentaje de corazones de supervivencia funcional en cada poscarga,
- la **Figura 14** muestra en un diagrama cómo el corazón extraído se unió al aparato modificado,
- la **Figura 15** muestra en un diagrama el corazón representado en la Figura 14 en más detalle (figura adaptada de Grupp I y col., Am J Physiol (1993) 34: H1401 - 1410),
- la **Figura 16** muestra la secreción de orina en animales diabéticos y no diabéticos en respuesta a dosis

crecientes de trientina o volumen equivalente de solución salina, donde la secreción de orina en animales diabéticos y no diabéticos en respuesta a dosis crecientes de trientina (abajo; 0,1, 1,0, 10, 100 mg·kg⁻¹ en 75 µl de solución salina seguidos de 125 µl de lavado de solución salina inyectado en el momento mostrado por la flecha) o un volumen equivalente de solución salina (arriba), y cada punto representa un periodo de recogida de orina de 15 min (véase Métodos para los detalles); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 17** muestra la secreción de orina en animales diabéticos y no diabéticos que reciben dosis crecientes de trientina o un volumen equivalente de solución salina, donde la secreción de orina en ratas diabéticas (arriba) y no diabéticas (abajo) que reciben dosis crecientes de trientina (0,1, 1,0, 10, 100 mg·kg⁻¹ en 75 µl de solución salina seguidos de 125 µl de lavado de solución salina inyectado en el momento mostrado por la flecha) o un volumen equivalente de solución salina, y cada punto representa un periodo de recogida de orina de 15 min (véase Métodos para los detalles); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 18** muestra la secreción de cobre en la orina de animales diabéticos y no diabéticos que reciben dosis crecientes de trientina o un volumen equivalente de solución salina, donde la secreción de cobre en orina de ratas diabéticas (arriba) y no diabéticas (abajo) que reciben dosis crecientes de trientina (0,1, 1,0, 10, 100 mg·kg⁻¹ en 75 µl de solución salina seguidos de 125 µl de lavado de solución salina inyectado en el momento mostrado por la flecha) o un volumen equivalente de solución salina, y cada punto representa un periodo de recogida de orina de 15 min (véase Métodos para los detalles); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 19** muestra la misma información en la Figura 18 con presentación de la secreción de cobre urinario por gramo de peso corporal, donde la secreción de cobre urinario por gramo de peso corporal en animales diabéticos y no diabéticos en respuesta a dosis crecientes de trientina (abajo; 0,1, 1,0, 10, 100 mg·kg⁻¹ en 75 µl de solución salina seguidos de 125 µl de lavado de solución salina inyectado en el momento mostrado por la flecha) o un volumen equivalente de solución salina (arriba), y cada punto representa un periodo de recogida de orina de 15 min (véase Métodos para los detalles); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 20** muestra la cantidad total de cobre secretado en animales diabéticos y no diabéticos a los que se les administró solución salina o fármaco, donde la secreción de cobre urinario total (µmol) en animales no diabéticos a los que se les administró solución salina (barra negra, n = 7) o trientina (barra sombreada, n = 7) y en animales diabéticos a los que se les administró solución salina (barra gris, n = 7) o trientina (barra blanca, n = 7); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 21** muestra la cantidad total de cobre secretado por gramo de peso corporal en animales que reciben trientina o solución salina, donde la secreción de cobre urinario total por gramo de peso corporal (µmol·g de PC⁻¹) en animales que reciben trientina (no diabéticos: barra sombreada, n = 7; diabéticos: barra blanca, n = 7) o solución salina (no diabéticos: barra negra, n = 7; diabéticos: barra gris, n = 7); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 22** muestra la secreción de hierro en orina de animales diabéticos y no diabéticos que reciben dosis crecientes de trientina o un volumen equivalente de solución salina, donde la secreción de hierro en orina de ratas diabéticas (arriba) y no diabéticas (abajo) que reciben dosis crecientes de trientina (0,1, 1,0, 10, 100 mg·kg⁻¹ en 75 µl de solución salina seguidos de 125 µl de lavado de solución salina inyectado en el momento mostrado por la flecha) o un volumen equivalente de solución salina, y cada punto representa un periodo de recogida de orina de 15 min (véase Métodos para los detalles); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 23** muestra la secreción de hierro urinario por gramo de peso corporal en animales diabéticos y no diabéticos que reciben trientina o solución salina, donde la secreción de hierro urinario por gramo de peso corporal en animales diabéticos y no diabéticos en respuesta a dosis crecientes de trientina (abajo; 0,1, 1,0, 10, 100 mg·kg⁻¹ en 75 µl de solución salina seguidos de 125 µl de lavado de solución salina inyectado en el momento mostrado por la flecha) o un volumen equivalente de solución salina (arriba), y cada punto representa un periodo de recogida de orina de 15 min (véase Métodos para los detalles); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 24** muestra la secreción de hierro urinario total en animales diabéticos y no diabéticos a los que se les administró solución salina o fármaco, donde la secreción de hierro urinario total (µmol) en animales no diabéticos a los que se les administró solución salina (barra negra, n = 7) o trientina (barra sombreada, n = 7) y en animales diabéticos a los que se les administró solución salina (barra gris, n = 7) o trientina (barra blanca, n = 7); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* < 0,05),

la **Figura 25** muestra la secreción de hierro urinario total por gramo de peso corporal en animales que reciben trientina o solución salina, donde la secreción de hierro urinario total por gramo de peso corporal (µmol·g de PC⁻¹) en animales que reciben trientina (no diabéticos: barra sombreada, n = 7; diabéticos: barra blanca, n = 7) o solución salina (no diabéticos: barra negra, n = 7; diabéticos: barra gris, n = 7); las barras de error muestran EEM y los valores de *P* se establecen si son significativos (*P* ≤ 0,05),

la **Figura 26** es una tabla que compara la secreción de cobre y de hierro en los animales que reciben trientina o solución salina, que es un análisis estadístico usando un modelo lineal mixto.

INTRODUCCIÓN a los resultados

[0110] El aumento de cobre en tejido participa en mecanismos que conducen a lesión nerviosa diabética. Por tanto, nosotros planteamos como hipótesis que la acumulación en tejido de metales traza podría desempeñar una función en los mecanismos de lesión diabética en otros tejidos. Las pruebas histológicas de estudios anteriores nuestros mostraron que 6 meses de tratamiento con trientina parece proteger los corazones de ratas Wistar diabéticas del desarrollo de lesión diabética (cardiomiopatía) como se juzga por la histología. En este estudio, investigamos las dosis de trientina requeridas para secretar cobre y hierro en la orina, y también cualquier posible diferencia entre la secreción de estos metales en animales diabéticos y no diabéticos.

10

AIM

[0111]

- 15 1. Para comparar los perfiles de secreción de cobre y hierro en la orina de ratas normales y diabéticas después de administración intravenosa a corto plazo de dosis crecientes de trientina.
2. Para determinar que la administración intravenosa a corto plazo de trientina no tiene efectos secundarios cardiovasculares adversos agudos.

20 MÉTODOS

[0112] Todos los métodos usados en este estudio fueron aprobados por el Comité de ética animal de la Universidad de Auckland y fueron según el Acta de protección animal y reglamentaciones de Nueva Zelanda.

25 Inducción de diabetes.

[0113] Ratas Wistar macho ($n = 28$, $303 \pm 2,9$ g) se dividieron aleatoriamente en grupos diabéticos y no diabéticos. Tras la inducción de anestesia (5% de halotano y $2 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ de O_2), los animales en el grupo diabético recibieron una dosis intravenosa única de estreptozotocina (STZ, $55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal, Sigma; St. Louis, MO) en 0,5 ml de solución salina administrada por la vena de la cola. Los animales no diabéticos recibieron un volumen equivalente de solución salina. Tras la inyección, tanto las ratas diabéticas como no diabéticas se alojaron en parejas iguales y se les proporcionó acceso a pienso de rata normal (gránulos de la dieta 86; New Zealand Stock Feeds, Auckland, NZ) y agua desionizada a voluntad. La glucosa en sangre y el peso corporal se midieron en el día 3 tras la inyección de STZ/solución salina y luego semanalmente durante todo el estudio. La diabetes se identificó por polidipsia, poliuria y hiperglucemia ($> 11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, Advantage II, Roche Diagnostics, NZ Ltd).

35

Procedimiento experimental.

[0114] Seis a siete semanas (media = 44 ± 1 días) después de la administración de STZ, los animales se sometieron a un protocolo experimental tanto de control como de fármaco. Todos los animales ayunaron durante la noche antes de la cirugía, pero continuaron teniendo acceso a voluntad a agua desionizada. La inducción y el mantenimiento de la anestesia quirúrgica fue por 3 - 5% de halotano y $2 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ de O_2 . La arteria y vena femoral se canularon con un transductor de tensión arterial en estado sólido (Mikrotip™ 1.4F, Millar Instruments, Texas, EE.UU.) y un catéter de PE 50 cargado de solución salina, respectivamente. Los uréteres se expusieron mediante una incisión abdominal de la línea media, se canularon usando catéteres de polietileno (diámetro externo 0,9 mm, diámetro interno 0,5 mm) y la herida se cerró por sutura. La tráquea se canuló y el animal se ventiló a 70-80 ventilaciones- min^{-1} con aire complementado con O_2 (Pressure Controlled Ventilator, Kent Scientific, Connecticut, EE.UU.). La frecuencia respiratoria y la presión espiratoria final (10-15 cm de H_2O) se ajustaron para mantener el CO_2 espiratorio final a 35-40 mm de Hg (monitor de CO_2 SC-300, Pryon Corporation, Wisconsin, EE.UU.). La temperatura corporal se mantuvo a 37°C durante toda la cirugía y el experimento por una almohadilla calefactora. La pérdida de fluido estimada se sustituyó con administración intravenosa de $154 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de disolución de NaCl a una tasa de $5 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

50

[0115] Tras la cirugía y un periodo de estabilización de 20 min, el protocolo experimental se empezó. La trientina se administró intravenosamente durante 60 s en dosis constantes de concentración creciente (0,1, 1,0, 10 y $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en 75 μl de solución salina seguidos de 125 μl de lavado de solución salina). Los animales de control recibieron un volumen equivalente de solución salina. La orina se recogió en 15 alícuotas principales durante todo el experimento en tubos Eppendorf de polietileno previamente pesados. Al final del experimento se tomó una muestra de sangre terminal por punción cardíaca y el suero separado se guardó a -80°C hasta el futuro análisis. Los corazones se extirparon por una toracotomía medio-esternal rápida y se procesaron como se describe más adelante.

60

Adquisición de datos.

[0116] La tensión arterial media (TAM), frecuencia cardíaca (FC, derivada de la forma de la onda de TAM), saturación de oxígeno (oxímetro de pulso Nonin 8600V, Nonin Medical Inc., Minnesota, EE.UU.) y la temperatura

65

corporal central se monitorizaron todos continuamente durante todo el experimento usando un módulo de adquisición de datos PowerLab/16s (AD Instruments, Australia). Las señales calibradas se mostraron en la pantalla y se guardaron en disco como promedios de 2 s de cada variable.

5 **Análisis de orina y tejido.**

[0117] *Instrumentación:* Un espectrofotómetro de absorción atómica modelo 3100 de Perkin Elmer (PE) equipado con un horno de grafito PE HGA-600 e inyector automático de horno PE AS-60 se usó para las determinaciones de Cu y Fe en orina. Se empleó corrección del ruido con deuterio. Se usó una lámpara de cátodo hueco de Cu o Fe (Perkin Elmer Corporation) y se operó tanto a 10 W (Cu) como a 15 W (Fe). La línea atómica de 324,8 nm se usó para Cu y la línea atómica de 248,3 nm para Fe. La anchura de la ranura para tanto Cu como Fe fue 0,7 nm. Para todos los análisis se usaron tubos de grafito pirolíticamente recubiertos. El volumen de inyección fue 20 µl. A continuación se muestra un programa de temperatura del horno de grafito típico.

15 **[0118]** Programa de temperatura de GF-AAS

<i>Procedimiento</i>	<i>Temp/°C</i>	<i>Rampa/s</i>	<i>Mantenimiento/s</i>	<i>Flujo int. / ml min⁻¹</i>
Secado	90	1	5	300
	120	60	5	300
Pre-tratamiento	1250*	20	10	300
	20	1	10	300
Atomización - Cu / Fe	2300 / 2500	1	8	0
Post-tratamiento	2600	1	5	300

* Se usó una temperatura de pre-tratamiento de 1050°C para los análisis de digestión de tejido

[0119] También se determinaron Cu, Fe y Zn en digestos de tejido en Hill Laboratories (Hamilton, Nueva Zelanda) usando un DRC ICP-EM tanto de PE Sciex Elan-6000 como de PE Sciex Elan-6100. Los parámetros de operación se resumen en la siguiente tabla.

[0120] Parámetros de operación instrumentales para ICP-EM

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
<i>Plasma inductivamente acoplado</i>	
Potencia de radiofrecuencia	1500 W
Velocidad de flujo del gas de plasma de argón	15 l·min ⁻¹
Velocidad de flujo del gas auxiliar de argón	1,2 l·min ⁻¹
Velocidad de flujo del gas nebulizador de argón	0,89 l·min ⁻¹
<i>Interfase</i>	
Cono del inyector y diámetro del orificio	Ni / 1,1 mm
Cono del separador y diámetro del orificio	Ni / 0,9 mm
<i>Parámetros de adquisición de datos</i>	
Modo de barrido	Espera de pico
Tiempo de muestreo (Fe)	30 ms (Cu, Zn) / 100 ms
Barridos / duplicados	20
Duplicados	3
Tasa de captación de muestras	1 ml·min ⁻¹

25

[0121] *Reactivos:* Todos los reactivos usados fueron de la mayor pureza disponible y al menos de calidad analítica. Las disoluciones de trabajo patrón de GF-AAS de Cu y Fe se prepararon por dilución escalonada de 1000 mg·l⁻¹ (disoluciones patrón Spectrosol; BDH). El agua se purificó por un sistema de agua ultra-pura Millipore Milli-Q a una resistividad de 18 MΩ. El material de referencia patrón 1577b Hígado bovino se obtuvo del Instituto nacional de patrones y tecnología y se usó para evaluar la eficiencia de la digestión de tejido. Los resultados obtenidos se informan a continuación.

[0122] Resultados de GF-AAS y ICP-EM para NIST SRM 1577b hígado bovino*

<i>Elemento</i>	<i>Valor certificado</i>	<i>GF-AAS</i>	<i>ICP-EM</i>
Cu	160 ± 8	142 ± 12	164 ± 12
Fe	194 ± 15	192 ± 21	166 ± 14
Zn	127 ± 16	-	155 ± 42

* Medido en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de material seca.

Pretratamiento de muestras.

5

[0123] Orina: La orina se recogió en microtubos de ensayo de 1,5 ml previamente pesados (Eppendorf). Después de volver a pesarse, los especímenes de orina se centrifugaron y el sobrenadante se diluyó 25:1 con 0,02 M de 69% de HNO_3 de calidad Aristar. La muestra se almacenó a 4°C antes del análisis de GF-AAS. Si fue necesario guardar una muestra durante un periodo superior a 2 semanas, se congeló y se mantuvo a -20°C.

10

[0124] Corazón: Tras extraerse del animal, el corazón se limpió de tejido en exceso, se aclaró en tampón para eliminar la sangre en exceso, se secó con material absorbente y se registró un peso ventricular en húmedo. Usando instrumentos de titanio, un segmento del músculo ventricular izquierdo se diseccionó y se colocó en un tubo de poliestireno de 5,0 ml previamente pesado. La muestra se liofilizó durante la noche a peso constante antes de añadir 0,45 ml de 69% de HNO_3 de calidad Aristar. El tubo de muestra se calentó en un baño de agua a 65°C durante 60 minutos. La muestra se llevó a 4,5 ml con H_2O Milli-Q. La disolución resultante se diluyó 2:1 con el fin de reducir la concentración de HNO_3 por debajo de la máxima permitida para el análisis de ICP-EM. Suero: Muestras de sangre terminales se centrifugaron y el suero se trató y se guardó según la orina hasta el análisis. Del contenido de metales traza de suero de la muestra de sangre terminal y orina recogida durante la hora final del experimento se calculó la eliminación renal usando la siguiente ecuación:

20

Eliminación renal de metal traza ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) =

$$\frac{\text{Concentración de metal en orina } (\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}) * \text{tasa de flujo de orina } (\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1})}{\text{Concentración de metal en suero } (\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1})}$$

25 *Análisis estadístico.*

[0125] Todos los valores se expresan como media \pm EEM y los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. La prueba de la t de Student para datos independientes se usó inicialmente para probar diferencias de peso y de glucosa entre los grupos diabéticos y de control. Para la comparación de respuestas durante la exposición a fármaco, los análisis estadísticos se realizaron usando análisis de la varianza (Statistica for Windows v.6.1, SAS Institute Inc., California, EE.UU.). El posterior análisis estadístico se realizó usando un modelo mixto de diseño ANOVA de medidas repetidas.

30

Análisis estadístico usando un modelo lineal mixto

35

[0126] Los datos para cada nivel de dosis se analizaron usando un modelo lineal mixto (PROC MIXED; SAS, versión 8). El modelo incluyó *diabetes*, *fármaco* y su interacción como efectos fijos, *tiempo* como una medida repetida y *ratas* como sujetos en el conjunto de datos. La independencia completa se asume a través de los sujetos. El modelo completo se ajustó a cada conjunto de datos usando un método de estimación de probabilidad máxima (REML) que se ajusta a modelos lineales mixtos (es decir, modelos de efectos fijos y al azar). Un modelo mixto es una generalización del modelo lineal convencional, siendo la generalización la que puede analizar datos generados a partir de varias fuentes de variación en lugar de solo una. Se usó un nivel de significancia de 0,05 para todas las pruebas.

40

45 RESULTADOS

Efectos de STZ sobre la glucosa en sangre y el peso corporal (Tabla 1)

[0127] La glucosa en sangre aumentó a $25 \pm 2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ tres días tras la inyección de STZ. A pesar de una mayor ingesta de alimentos diaria, los animales diabéticos perdieron peso mientras que los animales no diabéticos continuaron ganando peso durante los 44 días siguientes a la inyección de STZ/solución salina. En el día del experimento, los niveles de glucosa en sangre fueron 24 ± 1 y $5 \pm 0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ y el peso corporal 264 ± 7 g y 434 ± 9 g para animales diabéticos y no diabéticos, respectivamente.

50

Tabla 1. Glucosa en sangre, peso corporal y consumo de alimentos en animales diabéticos frente a no diabéticos.

	Diabéticos	No diabéticos
Peso corporal antes de STZ/solución salina	303 ± 3 g	303 ± 3 g
Glucosa en sangre 3 días tras STZ/solución salina	*25 ± 2 mmol·l ⁻¹	5 ± 0,2 mmol·l ⁻¹
Consumo de alimentos diario	*58 ± 1 g	28 ± 1 g
Glucosa en sangre en el día experimental	*24 ± 1 mmol·l ⁻¹	5 ± 0,2 mmol·l ⁻¹
Peso corporal en el día experimental	*264 ± 7 g	434 ± 9 g
Animales diabéticos n = 14, animales no diabéticos n = 14. Valores mostrados como media ± EEM. Asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0,05$).		

5 Variables cardiovasculares durante la infusión

[0128] Los niveles de referencia de TAM durante el periodo de control antes de la infusión no fueron significativamente diferentes entre animales no diabéticos y diabéticos (99 ± 4 mm de Hg). La FC fue significativamente menor en animales diabéticos que en no diabéticos (287 ± 11 y 364 ± 9 lpm, respectivamente, $P < 0,001$). La infusión de trientina o solución salina no tuvo efecto sobre estas variables, excepto a la mayor dosis a la que TAM disminuyó un máximo de 19 ± 4 mm de Hg durante 2 min tras la administración y volvió a niveles previos a la dosis en el plazo de 10 min. La temperatura corporal y la saturación de oxígeno permanecieron estables en todos los animales durante todo el experimento.

15 Secreción de orina

[0129] Los animales diabéticos secretaron coherentemente significativamente más orina que los animales no diabéticos, excepto en respuesta a la mayor dosis de fármaco ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) o volumen equivalente de solución salina (Fig. 16). La administración de $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de dosis de trientina también aumentó la secreción de orina en animales no diabéticos a superior a la de animales no diabéticos que recibieron el volumen equivalente de solución salina (Fig. 17). Este efecto no se observó en animales diabéticos.

Secreción urinaria de Cu y Fe

[0130] El análisis de las curvas de respuesta a dosis muestra que, a todas las dosis, los animales diabéticos y no diabéticos que recibieron fármaco secretaron más Cu que los animales que recibieron un volumen equivalente de solución salina (Fig. 18). Para proporcionar alguna corrección a los efectos de menor crecimiento corporal total de los animales diabéticos y, por tanto, para permitir la comparación más apropiada entre animales diabéticos y no diabéticos, las tasas de secreción de oligoelementos también se calcularon por gramo de peso corporal. La Figura 19 muestra que los animales diabéticos tuvieron secreción de cobre significativamente mayor por gramo de peso corporal en respuesta a cada dosis de fármaco que los animales no diabéticos. El mismo patrón se observó en respuesta a solución salina, sin embargo el efecto no fue siempre significativo.

[0131] El cobre secretado total con respecto a toda la duración del experimento fue significativamente elevado en animales tanto no diabéticos como diabéticos a los que se les administró trientina en comparación con sus controles de solución salina respectivos (Fig. 20). Los animales diabéticos que recibieron fármaco también secretaron más cobre total por gramo de peso corporal que los animales no diabéticos que recibieron fármaco. La misma tendencia significativa se observó en respuesta a administración de solución salina (Fig. 21).

[0132] En comparación, la secreción de hierro en animales tanto diabéticos como no diabéticos que recibieron trientina no fue mayor que en animales que recibieron un volumen equivalente de solución salina (Fig. 22). El análisis por gramo de peso corporal muestra que animales diabéticos que recibieron solución salina secretan significativamente más hierro que animales no diabéticos; sin embargo, esta tendencia no fue evidente entre animales diabéticos y no diabéticos que recibieron trientina (Fig. 23). La secreción de hierro total en animales tanto diabéticos como no diabéticos que recibieron fármaco no fue diferente de la de animales que recibieron solución salina (Fig 24). De acuerdo con el análisis de curvas de respuesta a dosis, la secreción de hierro total por gramo de peso corporal fue significativamente mayor en animales diabéticos que recibieron solución salina que en animales no diabéticos, pero esta diferencia no se observó en respuesta a trientina (Fig 25).

50 Contenido de suero y eliminación renal de Cu y Fe (Tabla 2)

[0133] Aunque no hubo diferencia significativa en el contenido de cobre en suero, hubo un aumento significativo en la eliminación renal de cobre en animales diabéticos que recibieron fármaco en comparación con animales diabéticos que recibieron solución salina. El mismo patrón se observó en animales no diabéticos, aunque la tendencia no fue estadísticamente significativa ($P = 0,056$). No hubo efecto de fármaco o estado (diabético frente a no diabético) sobre el contenido de suero o eliminación renal de hierro.

Tabla 2. Contenido de suero y eliminación renal de Cu y Fe en animales diabéticos y no diabéticos que recibieron fármaco o solución salina.

	1.1.a.a.1 Diabéticos		1.1.a.a.2 No diabéticos	
	<i>trientina n = 6</i>	<i>Solución salina n = 7</i>	<i>trientina n = 4</i>	<i>Solución salina n = 7</i>
Cu en suero ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1} \times 10^{-4}$)	7,56 \pm 0,06	9,07 \pm 1,74	7,11 \pm 0,41	7,56 \pm 0,62
Fe en suero ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1} \times 10^{-4}$)	35,7 \pm 7,98	63,2 \pm 16,4	33,6 \pm 1,62	31,4 \pm 8,17
Eliminación renal de Cu ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	*28,5 \pm 4,8	1,66 \pm 0,82	19,9 \pm 6,4	0,58 \pm 0,28
Eliminación renal de Fe ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,25 \pm 0,07	0,38 \pm 0,15	0,46 \pm 0,22	0,11 \pm 0,03

[0134] Valores mostrados como media \pm EEM. El asterisco indica una significativa diferencia ($P < 0,05$) entre animales diabéticos que recibieron trientina y animales diabéticos que recibieron un volumen equivalente de solución salina.

Contenido de metal de tejido cardíaco (Tabla 3).

10 [0135] Los pesos de corazones húmedo en animales diabéticos fueron significativamente inferiores a los de en animales no diabéticos, mientras que aumentaron las relaciones de corazón/peso corporal. El tejido cardíaco también se analizó para contenido de Cu y Fe. No hubo diferencia significativa en el contenido de cobre entre animales diabéticos y no diabéticos que recibieron solución salina o trientina. El contenido de hierro de los animales no diabéticos a los que se les administró solución salina fue significativamente mayor que el de los animales
15 diabéticos a los que se les administró solución salina.

Tabla 3: Peso del corazón, relaciones de peso del corazón/peso corporal y contenido de metales traza de tejido de corazón en animales diabéticos frente a no diabéticos.

	Diabéticos	No diabéticos
Peso de corazones húmedos	*0,78 \pm 0,02 g	1,00 \pm 0,02 g
Peso de corazón/peso corporal	*2,93 \pm 0,05 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	2,30 \pm 0,03 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
Contenido de Cu $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido seco		
Tratado con trientina	24,7 \pm 1,5	27,1 \pm 1,0
Tratado con solución salina	213 \pm 0,9	27,2 \pm 0,7
Contenido de Fe $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido seco		
Tratado con trientina	186 \pm 46	235 \pm 39
Tratado con solución salina	†180 \pm 35	274 \pm 30

Animales diabéticos: n = 14; animales no diabéticos: n = 14. Valores mostrados como media \pm EEM. El asterisco indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre animales diabéticos y no diabéticos. † indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre animales diabéticos y no diabéticos que recibieron solución salina.

20 **1.1.a.a.2.1 Resultados de la aplicación de un modelo lineal mixto al análisis experimental (Figura 27).**
Cobre

[0136] Ratas diabéticas secretaron niveles de cobre significativamente mayores que ratas no diabéticas a través de todos los niveles de dosis. La secreción de cobre de referencia también fue significativamente mayor en ratas
25 diabéticas en comparación con ratas no diabéticas. El fármaco en comparación con solución salina produjo una secreción de cobre significativamente mayor a todos los niveles de dosis. No hubo diferencia en los niveles de secreción de cobre de referencia entre los grupos de fármaco y de solución salina. El efecto de interacción para el modelo fue significativo a niveles de dosis de 1,0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y por encima. La presencia de un término de interacción significativa significa que la influencia de un efecto varía con el nivel del otro efecto. Por tanto, las consecuencias de
30 una interacción significativa entre los factores de diabetes y de fármaco es la secreción de cobre elevada por encima de los efectos aditivos predichos de estos dos factores.

Hierro

35 [0137] Ratas diabéticas en el grupo de solución salina sólo secretaron niveles de hierro significativamente mayores a todos los niveles de dosis. Esto hizo que todos los factores en el modelo fueran significativos a través de todos los niveles de dosis.

RESUMEN

40

[0138] El efecto a corto plazo de la administración de trientina intravenosa sobre el sistema cardiovascular y la secreción urinaria de cobre y hierro se estudió en ratas anestesiadas, diabéticas (6 semanas de diabetes, inducida

por estreptozotocina) y no diabéticas. Los animales se asignaron a uno de los cuatro grupos: diabético + trientina, diabético + solución salina, no diabético + trientina, no diabético + solución salina. El fármaco, o un volumen equivalente de solución salina, se administró cada hora en dosis de concentración creciente (0,1, 1,0, 10, 100 mg·kg⁻¹) y la orina se recogió durante todo el experimento en alícuotas de 15 min. Se tomó una muestra de sangre terminal y se recogió tejido cardíaco.

[0139] El análisis de muestras de orina mostró los siguientes puntos principales:

- A todas las dosis de fármaco, los animales diabéticos y no diabéticos que recibieron fármaco secretaron más Cu (µmol) que los animales que recibieron un volumen equivalente de solución salina.
- 10 • Cuando se analizaron por gramo de peso corporal, los animales diabéticos secretaron significativamente más cobre (µmol·g de PC⁻¹) a cada dosis de trientina que los animales no diabéticos. El mismo patrón se observó en respuesta a solución salina, pero el efecto no fue significativo a cualquier dosis.
- En la mayoría de las dosis, en animales diabéticos la secreción de hierro (µmol) fue mayor en animales a los que se les administró solución salina que en aquellos a los que se les administró fármaco. En animales no diabéticos
- 15 • El análisis por gramo de peso corporal no muestra diferencia entre la secreción de hierro en animales no diabéticos y diabéticos que recibieron trientina. Los animales diabéticos que recibieron solución salina secretan más hierro por gramo de peso corporal que los animales no diabéticos que recibieron solución salina.
- El análisis de tejido de corazón no mostró diferencia significativa en el contenido de cobre total entre animales
- 20 • Los cálculos de eliminación renal mostraron un aumento significativo en la eliminación de cobre en animales diabéticos que recibieron trientina en comparación con animales diabéticos que recibieron solución salina. La misma tendencia se observó en animales no diabéticos, pero el efecto no fue significativo. No hubo efecto de trientina sobre la eliminación renal de hierro.

25

[0140] En resumen, no se observaron efectos cardiovasculares adversos después de la administración aguda de trientina. El tratamiento con trientina aumenta eficazmente la secreción de cobre en animales tanto diabéticos como no diabéticos. La secreción de cobre en orina tras la administración de trientina es mayor por gramo de peso corporal en animales diabéticos que en no diabéticos. La secreción de hierro no aumentó por tratamiento con

30

LA EFICACIA DE TRIENTINA PARA RESTAURAR LA FUNCIÓN CARDÍACA EN RATAS DIABÉTICAS POR STZ

Introducción

35

[0141] El aumento de cobre en tejido participa en mecanismos que conducen a lesión nerviosa diabética. Por tanto, planteamos como hipótesis que la acumulación en tejido de metales traza podría desempeñar una función en los mecanismos de lesión diabética en otros tejidos. Las pruebas histológicas de estudios anteriores nuestros mostraron que 6 meses de tratamiento con trientina parece proteger los corazones de ratas Wistar diabéticas del

40

desarrollo de lesión diabética (cardiomiopatía diabética) como se juzga por la histología. Sin embargo, era desconocido si esta mejora histológica se traduce en una mejora en la función cardíaca, un hallazgo que prestaría más soporte al uso de terapia con trientina en aplicaciones clínicas.

Objetivo

45

[0142] El objetivo de este estudio fue usar un modelo de corazón de roedor en funcionamiento aislado para comparar la función cardíaca en ratas tratadas con trientina y no tratadas, diabéticas por STZ y normales.

Métodos

50

Animales

[0143] Los animales usados en estos experimentos recibieron cuidados que cumplieron los "Principios del cuidado de animales de laboratorio" (Sociedad nacional de investigación médica) y el estudio fue aprobado por el comité de

55

ética animal de la Universidad de Auckland.

[0144] Ratas Wistar albinas macho que pesaban 330-430 g se asignaron a cuatro grupos experimentales del siguiente modo:

Grupos experimentales**[0145]**

Grupo	Código	N	Tratamiento
Grupo A	STZ	8	Diabetes durante 13 semanas
Grupo B	STZ/D7	8	Diabetes durante 13 semanas (semana de terapia con fármaco 7-13)
Grupo C	Referencia	9	Controles no diabéticos
Grupo D	Referencia/D7	11	Controles no diabéticos (semana de terapia con fármaco 7-13)

STZ = Estreptozotocina

D7 = tratamiento con trientina durante 7 semanas consecutivas comenzando 6 semanas después del inicio del experimento.

5

[0146] La diabetes se indujo por estreptozotocina intravenosa (STZ; Sigma; St. Louis, MO). A todas las ratas se les administró un anestésico de inhalación corta (inducción: 5% de halotano y 2 l/min de oxígeno, mantenido en 2% de halotano y 2 l/min de oxígeno). Aquellas ratas asignadas a estar en los dos grupos diabéticos recibieron luego una única dosis en bolo intravenoso de STZ (57 mg/kg de peso corporal) en 0,5 ml de 0,9% de solución salina administrada por una vena de la cola. Los animales de referencia no diabéticos recibieron un volumen equivalente de 0,9% de solución salina sola. Las ratas diabéticas y no diabéticas se alojaron en parejas iguales y se les proporcionó acceso libre a pienso de rata normal (gránulos de la dieta 86; New Zealand Stock Feeds, Auckland, NZ) y agua desionizada a voluntad. Cada jaula tuvo dos botellas de agua en ella para garantizar igual acceso a agua o fármaco para cada animal. Los animales se alojaron a 21 grados y 60% de humedad en jaulas para ratas convencionales con un suelo de serrín que se cambió diariamente. La glucosa en sangre se midió en muestras de sangre capilar de la punta de la cola (Advantage II, Roche Diagnostics, NZ Ltd). El muestreo se realizó en todos los grupos a la misma hora del día. La glucosa en sangre y el peso corporal se midieron en el día 3 tras la inyección de STZ o solución salina y luego semanalmente durante todo el estudio. La diabetes se confirmó por la presencia de polidipsia, poliuria y hiperglucemia ($>11 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

20

[0147] En el grupo diabético tratado con fármaco, la trientina se preparó en el agua potable para cada jaula a una concentración de 50 mg/l. Cada animal consumió aproximadamente 260 ml de agua por día una vez se estableció la diabetes, dando una dosis de fármaco total por animal por día de $\square 13 \text{ mg}$. El agua potable que contenía trientina se administró continuamente desde el inicio de la semana 7 hasta que el animal se sacrificó al final de la semana 13. En el caso del grupo no diabético Referencia/D7 que bebió menos agua por día que los animales diabéticos, la concentración de fármaco en su agua potable se ajustó cada semana de manera que consumiera aproximadamente la misma dosis que el grupo STZ/D7 correspondiente. Los estudios preliminares nuestros e informes independientes (Rodríguez B y col., Diabetes (1988) 37(10):1358-64) han mostrado que estos animales diabéticos tienen cardiomiopatía establecida en el momento en el que comienza la administración del fármaco a este grupo.

30

[0148] El último día del experimento, los animales se anestesiaron (5% de halotano y 2 l·min⁻¹ de O₂) y se administró heparina (500 UI·kg⁻¹) (Weddel Pharmaceutical Ltd., Londres) intravenosamente por la vena de la cola. Entonces se tomó una muestra de sangre de 2 ml de la vena cava inferior y el corazón se extirpó rápidamente y se sumergió en tampón bicarbonato de Krebs-Henseleit frío en hielo para detener la actividad contráctil. Entonces, los corazones se colocaron sobre el aparato de corazones en funcionamiento perfundidos aislados.

35

Perfusión

[0149] La raíz aórtica del corazón se ligó inmediatamente a la cánula aórtica del aparato de perfusión. Se estableció la perfusión retrógrada (Langendorff) a una presión hidrostática de 100 cm de H₂O y a 37°C y continuó durante 5 min mientras que se completó la canulación de la aurícula izquierda por la vena. Entonces, la preparación de no funcionamiento (Langendorff) se convirtió en el modelo de corazón en funcionamiento por cambio del suministro de tampón de perfundido de la aorta a la aurícula izquierda a una presión de llenado de 10 cm de H₂O. El ventrículo izquierdo se expulsó espontáneamente en la cánula aórtica contra una presión hidrostática (poscarga) de 76 cm de H₂O (55,9 mm de Hg). El tampón de perfusión fue tampón bicarbonato de Krebs-Henseleit (mM: KCl 4,7, CaCl₂ 2,3, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 1,2, NaCl 118, y NaHCO₃ 25), pH 7,4 que contiene glucosa 11 mM y se gaseó continuamente con 95% de O₂:5% de CO₂. El tampón también se filtró continuamente en línea (inicial 8 μm , siguiendo filtros de acetato de celulosa de 0,4 μm ; Sartorius, Alemania). La temperatura de todo el aparato de perfusión se mantuvo por camisas de agua y la temperatura del tampón se monitorizó continuamente y se ajustó para mantener los corazones a 37°C durante toda la perfusión.

50

Monitorización y electroestimulación cardíaca de la tensión

[0150] Una cánula intravenosa de plástico 24g modificada (Becton Dickson, Utah, EE.UU.) se insertó en el ventrículo izquierdo por el vértice del corazón usando la aguja introductora normal. Esta cánula se unió

55

posteriormente a un transductor de presión piezoeléctrico SP844 (AD Instruments, Australia) para monitorizar continuamente la presión ventricular izquierda. La presión aórtica se monitorizó continuamente mediante un brazo lateral de la cánula aórtica con un transductor de presión (modelo P23XL de Statham, Gould Inc., CA, EE.UU.). El corazón fue electroestimulado (Digitimer Ltd, Heredfordshire, Inglaterra) a una tasa de 300 lpm por medio de 5 electrodos unidos a la cánula de la vena aórtica y pulmonar usando voltajes supraumbrales con pulsos de 5 ms de duración del generador de onda cuadrada.

Mediciones de flujo aórtico

10 [0151] Se registró el flujo aórtico por un caudalímetro en línea (Transonic T206, Ithaca, NY, EE.UU.) y el flujo coronario se midió por recogida de 30 s controlada del efluente de la vena coronaria en cada etapa de momento de tiempo del protocolo.

Aparato de corazón en funcionamiento

15 [0152] Este aparato de corazón en funcionamiento fue una variante del originariamente descrito por Neely JR y col., (1967) Am J Physiol, 212: 804 - 14. Nuestro aparato modificado permitió mediciones de la función cardíaca a diferentes presiones de precarga (Figura 14 y Figura 15). Esto se logró construyendo el aparato de manera que la altura del flujo de entrada del tampón que viene al corazón pudiera alterarse mediante una serie de etapas 20 graduadas de un modo reproducible.

[0153] Como en el caso de la precarga, el tubo del flujo de salida de la aorta también podría aumentarse en altura para proporcionar una serie de presiones de poscarga definidas. Las alturas de poscarga se han convertido en mm de Hg para la presentación en los resultados de acuerdo con la convención publicada.

25

Recogida de datos

[0154] Se recogieron todos los datos de los transductores de presión y sonda de flujo (máquina de adquisición de datos Powerlab 16s; AD Instruments, Australia). Las funciones de procesamiento de datos de este dispositivo se 30 usaron para calcular la primera derivada de las dos ondas de presión (ventricular y aórtica). Los datos de la función cardíaca final disponibles comprendieron:

Entrada cardíaca*; flujo aórtico; flujo coronario; presión ventricular/aórtica izquierda pico desarrollada; tasa máxima de desarrollo de la presión ventricular (+dP/dt)**; tasa máxima de relajación de la presión ventricular (-dP/dt)**; tasa máxima del desarrollo de la presión aórtica (+dP/dt aórtica); tasa máxima de relajación aórtica (-dP/dt aórtica).

35 [*La entrada cardíaca (CO) es la cantidad de tampón bombeado por unidad de tiempo por el corazón y comprende tampón que es bombeado fuera de la aorta, además del tampón bombeado a los vasos coronarios. Esto es un indicador global de la función cardíaca.

** +dP/dt es la tasa de cambio de la presión ventricular (o aórtica) y establece una buena correlación con la fuerza de la contracción del ventrículo (contractilidad). Puede usarse para comparar capacidades de contractilidad de 40 diferentes corazones a la misma precarga (Textbook of Medical Physiology, Ed. A. Guyton. Saunders company 1986). -dP/dt es una medición aceptada de la tasa de relajación del ventrículo].

Protocolo

45 [0155] El experimento se dividió en dos partes, la primera con 'poscarga fija' y 'precarga variable' la segunda, que inmediatamente siguió a la primera, con 'precarga fija' y 'poscarga variable'.

I) Poscarga fija y precarga variable

50 [0156] Después de completarse la canulación inicial, el corazón se dejó inicialmente que se equilibrara durante 6 min a 10 cm de H₂O de presión de llenado auricular y 76 cm de H₂O de poscarga. Durante este periodo, la cánula del transductor de la presión ventricular izquierda se insertó y se puso en marcha la unidad de electroestimulación. Una vez fue estable el corazón, la presión de llenado auricular se redujo entonces a 5 cm de H₂O de agua y luego aumentó progresivamente en la etapa de 2,5 cm de H₂O durante una serie de 7 etapas a un máximo de 20 cm de 55 H₂O. La precarga se mantuvo a cada presión de llenado durante 2 min, tiempo durante el cual pudo observarse que la traza de presión se estabilizaba y se midió el flujo coronario. Al completarse el experimento de precarga variable, la porción de poscarga variable del experimento comenzó inmediatamente.

II) Precarga fija y poscarga variable

60

[0157] Durante esta parte del experimento, la presión de llenado (precarga) se fijó a 10 cm de H₂O y la poscarga aumentó entonces de 76 cm de H₂O (55,9 mm de Hg) en la etapa de 8 cm de H₂O (5,88 mm de Hg); de nuevo cada etapa fue de 2 min de duración. La altura máxima (poscarga) a la que cada corazón individual se expuso por último lugar se determinó tanto por realización de la altura de poscarga disponible máxima de 145 cm de H₂O (106,66 mm 65 de Hg) como la altura a la que el flujo aórtico medido fue de 0 ml/min. En la última situación se consideró que el

corazón “había fallado funcionalmente”. Para garantizar que este fallo fue de hecho funcional y no debido a otra causa (por ejemplo, lesión isquémica o valvular permanente), entonces todos los corazones se devolvieron a las condiciones de perfusión iniciales (precarga 10 cm de H₂O; poscarga 75 cm de H₂O) durante 4 minutos para confirmar que la función de bombeo podría restaurarse.

5

[0158] Al final de este periodo, los corazones se pararon con una infusión retrógrada de 4 ml de KCl frío (24 mM). Entonces, los restos auriculares y vasculares se escindieron, el corazón se secó con material absorbente y se pesó. Se hizo una incisión en los ventrículos a mitad de camino entre el vértice y el surco atrioventricular. Entonces, las mediciones del espesor de la pared ventricular se hicieron usando un micro-compás calibrador (Absolute Digimatic,

10 Mitutoyo Corp, Japón).

Análisis

[0159] Los datos de Powerlab se extrajeron promediando intervalos de 1 min de la parte estable de la traza electrónica generada a partir de cada etapa en el protocolo. Entonces, los resultados de cada grupo se combinaron y se analizaron para diferencias entre los grupos para los diversos parámetros de la función cardíaca (entrada cardíaca, +/-dP/dt ventricular izquierda).

[0160] Las diferencias entre observaciones repetidas a diferentes condiciones de precarga se exploraron y se contrastaron entre el grupo de estudio usando un enfoque de modelos mixtos para medidas repetidas (SAS v8.1, SAS Institute Inc, Cary NC). Los datos al azar ausentes se entraron usando un enfoque de probabilidad máxima. Se examinaron adicionalmente la media significativa y los efectos de interacción usando el procedimiento de Tukey para mantener una tasa de error del 5% por emparejamiento para las pruebas a posteriori. Todas las pruebas fueron bilaterales. El análisis de supervivencia se hizo usando Proc Lifetest (SAS V82). Se usó un análisis unilateral de la varianza para probar la diferencia entre grupos en diversos parámetros de peso. Se usaron pruebas de Tukey para comparar cada grupo entre sí.

Resultados

30 Animales

[0161] Al final del experimento, los animales diabéticos fueron aproximadamente el 50% más pequeños que sus normales de la misma edad correspondientes. Los pesos de los animales al final del periodo experimental se encuentran en la Tabla 4.

35

Tabla 4. Pesos corporales de los animales iniciales y finales (media ± DE)

	Número (n)	Tratamiento	Peso inicial (g)		Peso final (g)	
Grupo A	8	STZ	361 ± 12	}*	221 ± 27	}
Grupo B	8	STZ/D7	401 ± 33		290 ± 56	
Grupo C	9	Referencia	361 ± 16		574 ± 50	
Grupo D	11	Referencia/D7	357 ± 7		563 ± 17	

*P < 0,05

40 **[0162]** Una gráfica del porcentaje de cambio en peso para cada grupo experimental se encuentra en la Figura 5, en la que la flecha indica el inicio del tratamiento con trientina.

Estado diabético

45 **[0163]** Los valores de glucosa en sangre para los cuatro grupos de ratas se presentan en la Figura 6. Generalmente, la presencia de diabetes se estableció y se confirmó en el plazo de 3-5 días desde la inyección de STZ. El grupo de control de Referencia y Referencia/D7 permaneció normoglucémico durante todo el experimento. El tratamiento con el fármaco no se diferenció en el perfil de glucosa en sangre (p=ns) en ningún grupo tratado en comparación con su grupo de comparación sin tratar apropiado respectivo.

50

Pesos del corazón

[0164] Las mediciones finales del peso del corazón y el espesor de la pared ventricular se presentan en la Tabla 5. Hubo una pequeña mejora, pero significativa, en la relación de “corazón : peso corporal” con el tratamiento en los animales diabéticos. Hubo una tendencia hacia una relación de “espesor de la pared ventricular:peso corporal” mejorada en diabéticos tratados en comparación con no tratados, pero esto no alcanzó la significancia.

55

Tabla 5 Pesos finales del corazón (g) y por g de peso corporal (PC) del animal (media ± DE)

Grupo	Peso del corazón (g)	Peso del corazón (g) / PC (g)	Espesor de la pared ventricular izquierda (mm)	Espesor de la pared ventricular izquierda por PC (mm)/(g)
Referencia	1,58 ±	0,0028 ± 0,0002 [§]	3,89 ± 0,38 [§]	0,0068 ±
STZ/D7	0,13 [§]	0,0041 ± 0,0005	3,79 ± 0,52	0,0009 [§]
STZ	1,18 ± 0,24	0,0047 ± 0,0004	3,31 ± 0,39	0,0127 ± 0,0027
Referencia/D7	1,03 ± 0,17	0,0028 ± 0,0001 [§]	4,03 ± 0,1 [§]	0,0152 ± 0,0026
	1,58 ±			0,0072 ±
	0,05 [§]			0,0003 [§]

*P < 0,05

§ = significativo con los grupos de STZ y STZ/D7 p< 0,05

5

Resultados de la parte I

[0165] Las siguientes gráficas de las Figuras 7 a 12 representan los parámetros de rendimiento cardíaco de los animales mientras que se someten a presión de llenado auricular creciente (5-20 cm de H₂O, precarga) con una poscarga constante de 75 cm de H₂O (55,9 mm de Hg). Todos los resultados son media ± eem. En cada gráfica, por claridad, a menos que se establezca de otro modo, sólo se muestran las diferencias significativas relacionadas con STZ/D7 los otros grupos: * indica p<0,05 para STZ frente a STZ/D7, # p<0,05 para STZ/D7 frente a Referencia 7. A menos que se establezca, STZ/D7 frente a Referencia o Referencia/D7 no fue significativo. La entrada cardíaca (Figura 7) es la suma al flujo aórtico (Figura 10) y el flujo coronario como se muestra en la Figura 8. Como los corazones de control y grupos experimentales tienen pesos finales significativamente diferentes, el flujo coronario también se presenta (Figura 9) como el flujo normalizado al peso del corazón [Obsérvese que el flujo coronario es generalmente proporcional a la masa de músculo cardíaco y, por tanto, al peso cardíaco].

[0166] La primera derivada de la curva de presión da la tasa de cambio en el desarrollo de la presión en el ventrículo con cada ciclo cardíaco y el valor de la tasa positiva máxima de cambio (+dP/dt) se representa en la Figura 11. La tasa máxima de relajación correspondiente (-dP/dt) está en la Figura 12. Resultados similares que muestran la mejora en la función cardíaca se encontraron a partir de los datos derivados de la cánula de presión aórtica (resultados no mostrados).

25 **Resultados de la parte II**

[0167] La capacidad de los corazones para sobrellevar el trabajo de poscarga adicional se evaluó en condiciones para precarga constante y poscarga creciente. La representación de la supervivencia funcional, es decir, el número restante de corazones en cada poscarga que todavía tuvo una entrada aórtica superior a 0 ml/min, se encuentra en la Figura 13 y la Tabla 6.

Tabla 6. Supervivencia cardíaca en cada presión de poscarga

Poscarga (mm de Hg)	Número supervivientes (flujo aórtico >0 ml/min)				Porcentaje de en funcionamiento en cada poscarga			
	STZ	STZ/D7	Referencia	Referencia/D7	STZ	STZ/D7	Referencia	Referencia/D7
5,9	8	8	9	11	100%	100%	100%	100%
1,8	8	8	9	11	100%	100%	100%	100%
67,7	8	8	9	11	100%	100%	100%	100%
71,4	6	8	9	11	75%	100%	100%	100%
77,2	5	8	9	11	63%	100%	100%	100%
83,1	4	7	9	11	50%	88%	100%	100%
88,3	3	7	9	11	38%	88%	100%	100%
94,9	1	5	9	11	13%	62,5%	100%	100%
100,8	0	3	9	11	0%	37%	100%	100%
106,7	0	1	9	9	0%	13%	100%	82%

Resumen

35

[0168]

- El Tratamiento con trientina no tuvo efecto obvio sobre las concentraciones de glucosa en sangre en los dos grupos diabéticos (como era de esperar).
- Hubo una mejora pequeña, pero significativa, en la relación de (peso del corazón) / (peso corporal) en el grupo diabético tratado con trientina en comparación con la del grupo diabético sin tratamiento.

40

- Cuando la precarga aumentó con la poscarga mantenida constante, la entrada cardíaca fue restaurada a los valores de Referencia. Tanto los flujos coronarios aórticos como absolutos mejoraron en el grupo tratado con fármaco.
- Los indicadores para contracción y relajación ventricular mejoraron ambos significativamente en el grupo tratado con fármaco en comparación con valores equivalentes en el grupo diabético sin tratar. La mejora restauró la función a tal grado que no hubo diferencia significativa entre los grupos tratados con fármaco y de control Referencia.
- Las medidas del transductor aórtico del cambio de presión también mostraron función mejorada en el grupo diabético tratado con fármaco en comparación con el diabético sin tratar (datos no mostrados).
- 10 □ Cuando la poscarga aumentó en presencia de precarga constante, se observó que la capacidad del corazón para funcionar a mayores poscargas fue enormemente mejorada en el grupo diabético tratado con fármaco en comparación con el grupo diabético sin tratar. Cuando □50% de los corazones diabéticos sin tratar había fallado, □90% de los corazones diabéticos tratados con trientina estaban todavía en funcionamiento.
- 15 □ En comparación con los corazones diabéticos sin tratar, la respuesta de los corazones diabéticos tratados con fármaco mostró mejoras significativas en varias variables: entrada cardíaca, flujo aórtico, flujo coronario, además de contracción ventricular e índices de relajación mejorados. El tratamiento con fármaco de animales normales no tuvo efectos adversos sobre el rendimiento cardíaco.

Conclusión:

20

[0169] Estos datos preliminares sugieren que el tratamiento de ratas diabéticas por STZ con trientina mejora espectacularmente varias medidas de la función cardíaca.

Conclusiones:

25

[0170] La administración de trientina oral durante 7 semanas a ratas Wistar con diabetes previamente establecida de 6 semanas de duración produjo una mejora global en la función cardíaca. Esta mejora se demostró por la mejora de la función contráctil (+dP/dT) y una reducción en la rigidez ventricular (-dP/dT). También mejoró sustancialmente la capacidad global del corazón diabético tratado con trientina para tolerar la poscarga creciente.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente eficaz para reducir el contenido de valores de cobre en un sujeto humano, comprendiendo dicho agente trientina, para la preparación de un medicamento para tratar la insuficiencia cardíaca en un sujeto humano no diabético, donde la insuficiencia cardíaca en el sujeto no diabético está asociada a niveles de cobre elevados.
2. El uso de la reivindicación 1, donde los niveles elevados de cobre son niveles de cobre (II).
3. El uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la trientina es clorhidrato de trientina y donde el clorhidrato de trientina es para administración a dosificaciones o una dosificación para proporcionar, si es parenteral, 120 mg/día en el sujeto humano y, si es oral, 1200 mg/día en el sujeto humano.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente es para administración por vía oral.
5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el agente es para administración parenteral.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente comprende además una o más sales de cinc.
7. El uso de la reivindicación 6, donde la sal de cinc se selecciona del grupo que consiste en acetato de cinc, cloruro de cinc y sulfato de cinc, citrato de cinc, isocitrato de cinc, cetogluterato de cinc, succinato de cinc, malato de cinc y gluconato de cinc.
8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el estado de los valores de cobre del sujeto se ha determinado antes del tratamiento y el medicamento es para administración si el contenido de valores de cobre del sujeto es elevado.
9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medicamento es para administración a un sujeto cuyo estado de los valores de cobre está siendo monitorizado.
10. El uso de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, donde el estado de los valores de cobre es el estado de los valores de cobre (II).
11. Un agente eficaz para reducir el contenido de valores de cobre en un sujeto humano, comprendiendo dicho agente trientina, para su uso en un método para tratar la insuficiencia cardíaca en un sujeto humano no diabético, donde la insuficiencia cardíaca en el sujeto no diabético está asociada a niveles elevados de cobre.
12. El agente para su uso en un método según la reivindicación 11, donde los niveles elevados de cobre son niveles de cobre (II).
13. El agente para su uso en un método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, donde la trientina es clorhidrato de trientina y donde el clorhidrato de trientina es para administración a dosificaciones o una dosificación para proporcionar, si es parenteral, 120 mg/día en el sujeto humano y, si es oral, 1200 mg/día en el sujeto humano.
14. El agente para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el agente es para administración por vía oral.
15. El agente para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el agente es para administración parenteral.
16. El agente para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde el agente comprende además una o más sales de cinc.
17. El agente para su uso en un método según la reivindicación 16, donde la sal de cinc se selecciona del grupo que consiste en acetato de cinc, cloruro de cinc y sulfato de cinc, citrato de cinc, isocitrato de cinc, cetogluterato de cinc, succinato de cinc, malato de cinc y gluconato de cinc.
18. El agente para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, donde el método comprende además determinar el estado de los valores de cobre del sujeto antes del tratamiento y donde el agente se administra si el contenido de valores de cobre del sujeto es elevado.
19. El agente para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, donde el método comprende además monitorizar el estado de los valores de cobre del sujeto.

20. El agente para su uso en un método según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, donde el estado de los valores de cobre (II) se evalúa y/o se monitoriza.

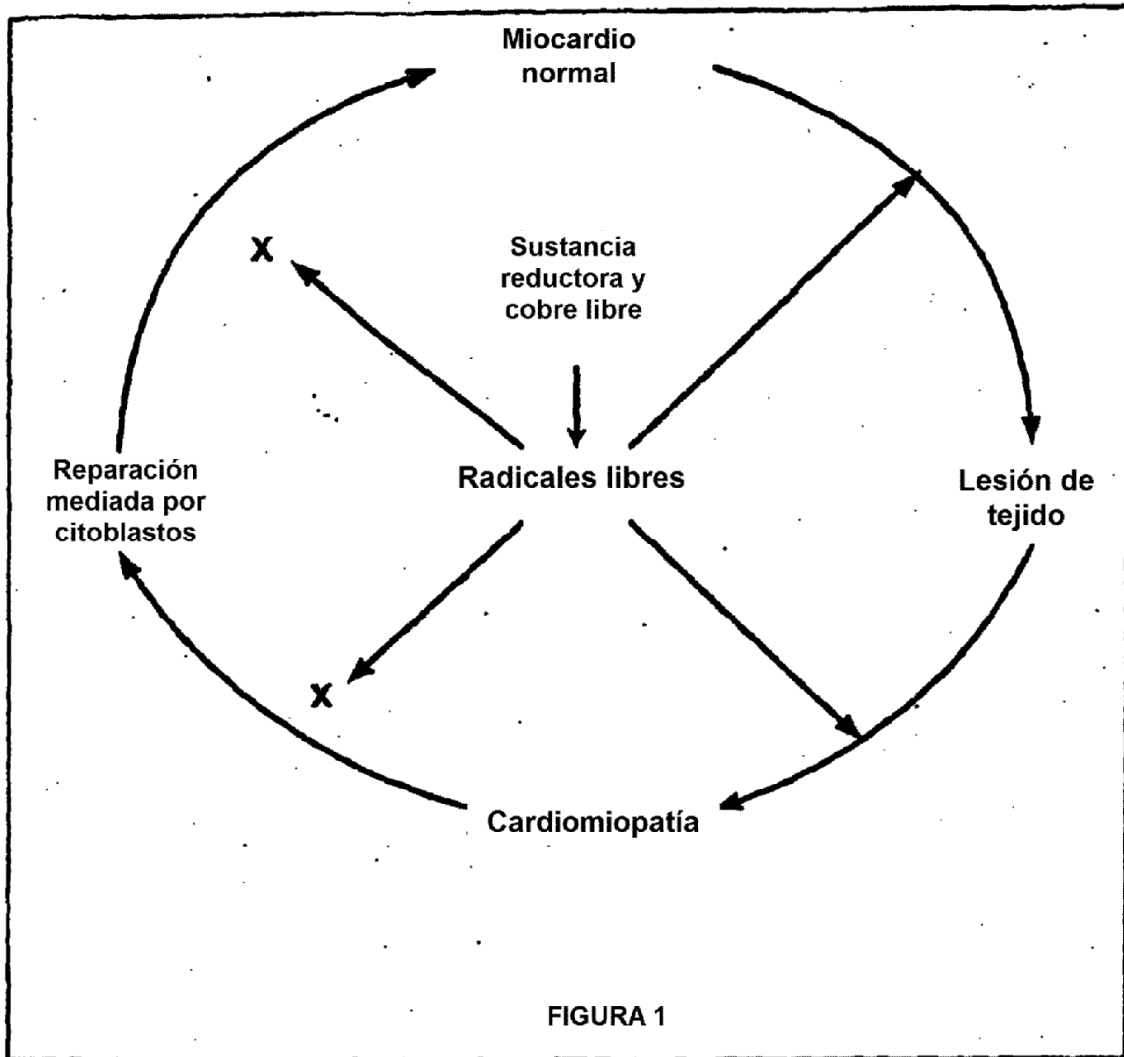
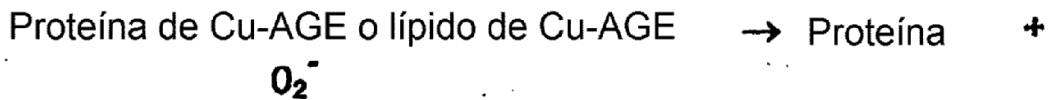
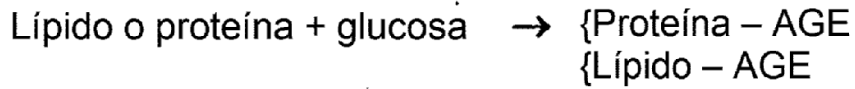


FIGURA 1

Hipótesis

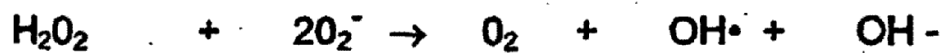
1. Ión del producto de glicoxidación (formación de AGE*)



2. Superóxido dismutasa



3. Reacción de Haber-Weiss (catalizador de sal de cobre)



*AGE = producto final de la glicación avanzada

FIGURA 2

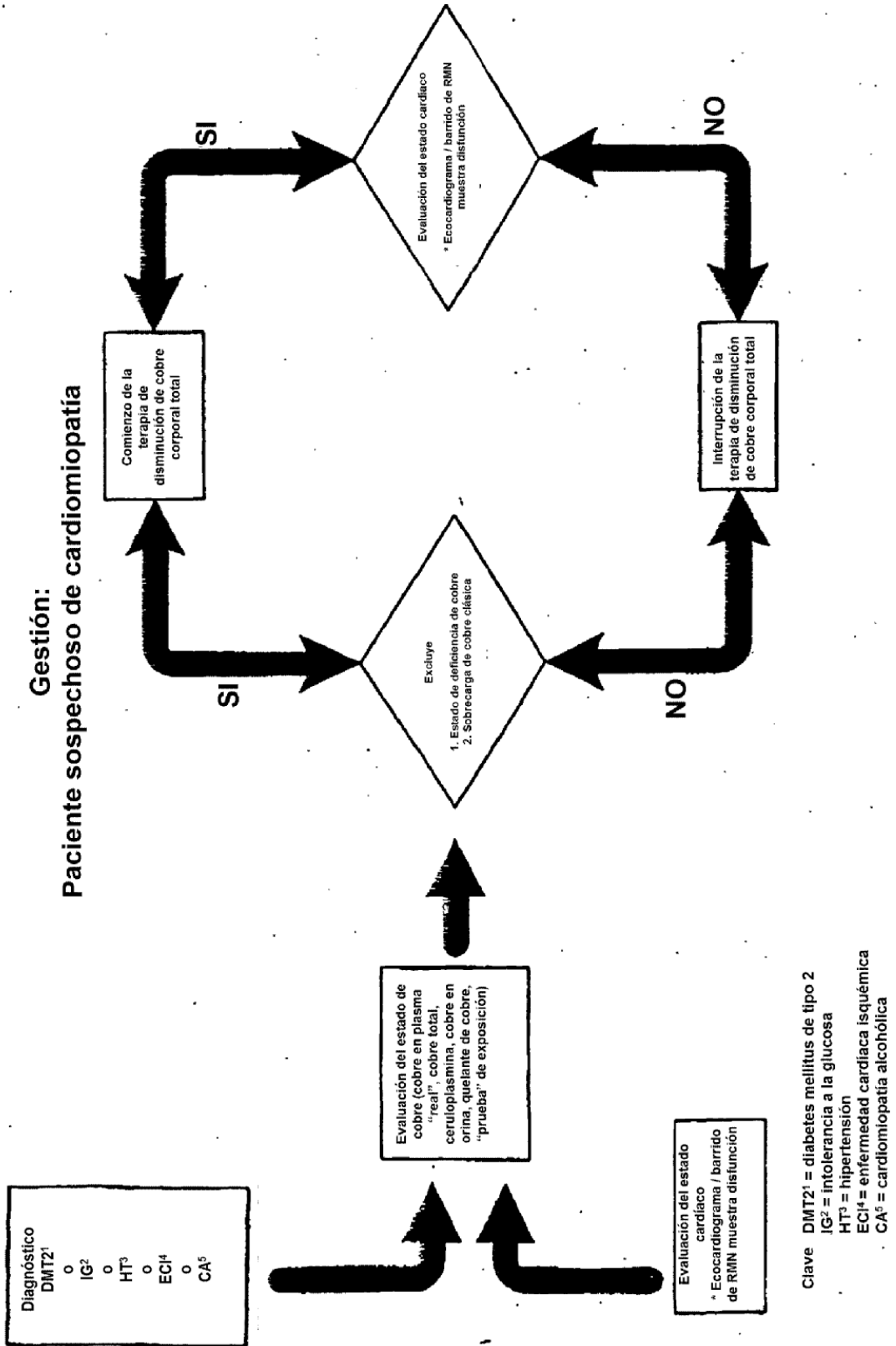


FIGURA 3

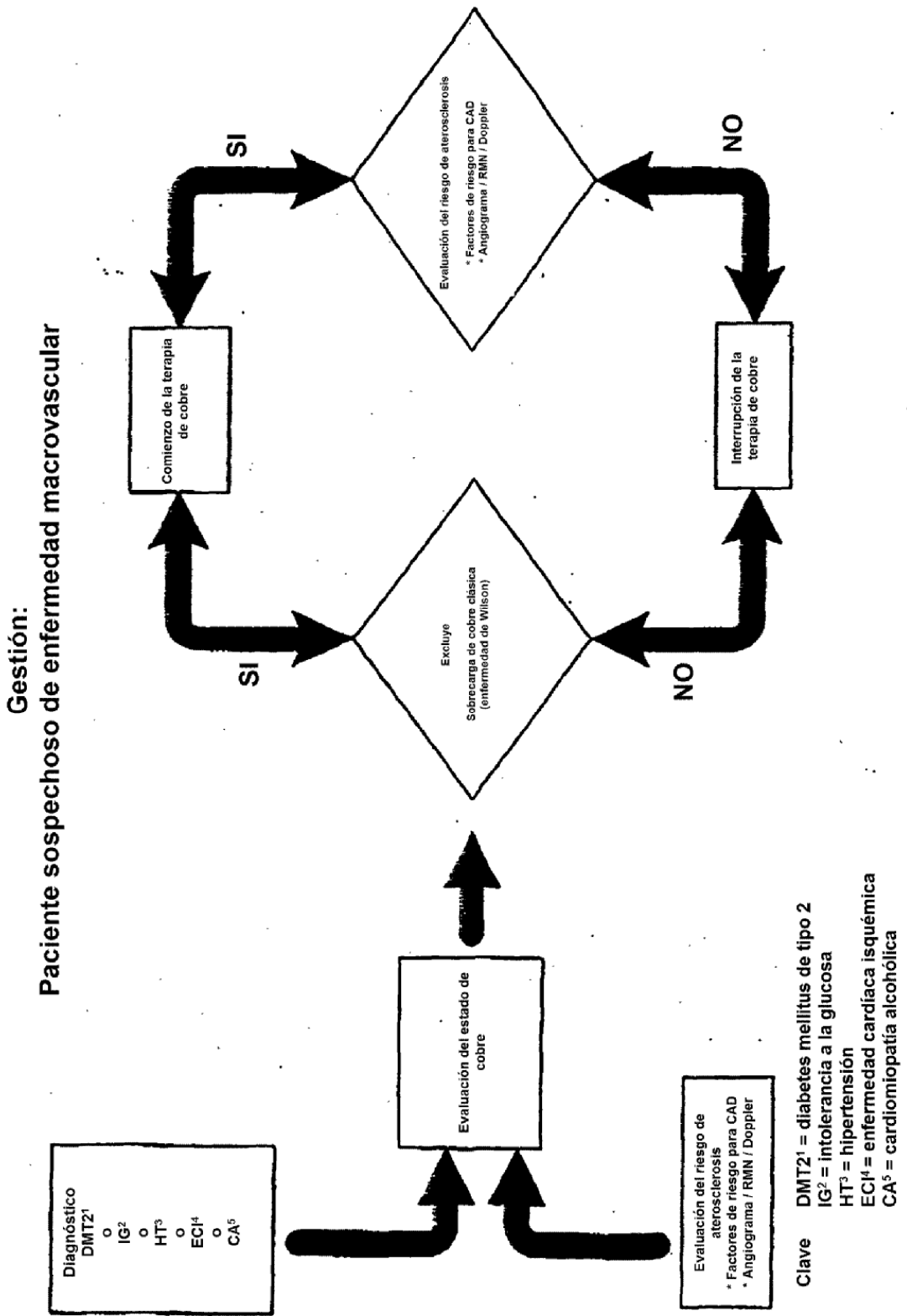


FIGURA 4

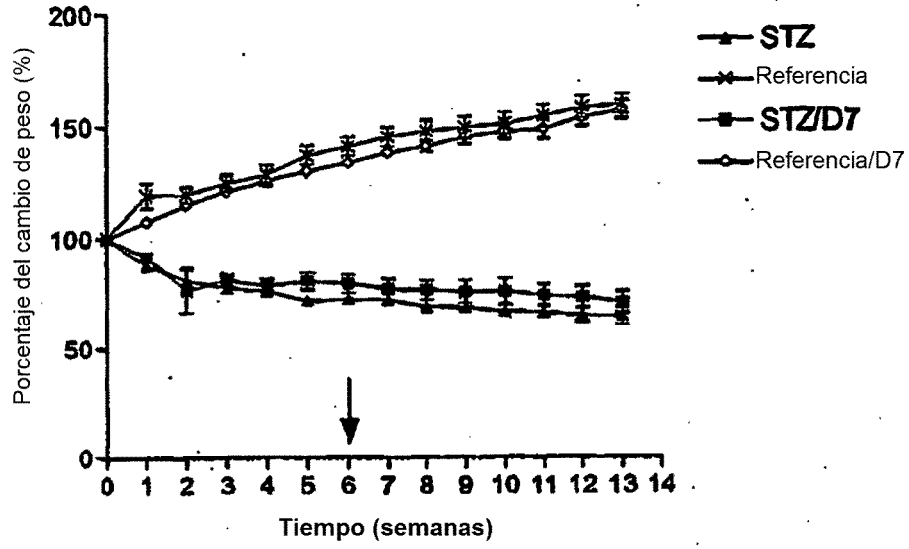


FIGURA 5

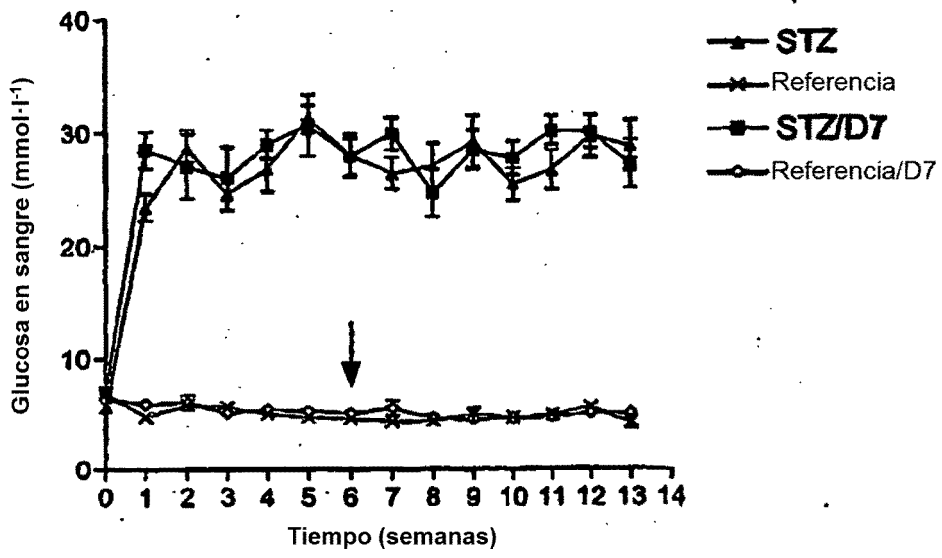
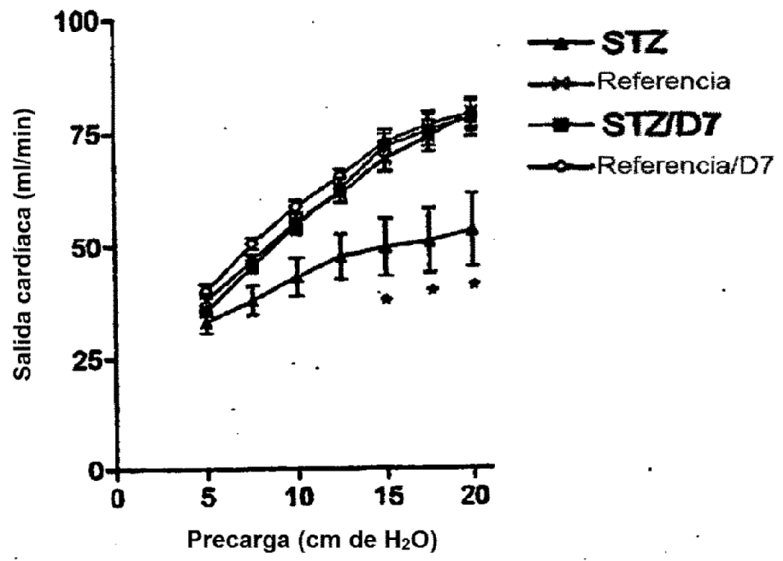
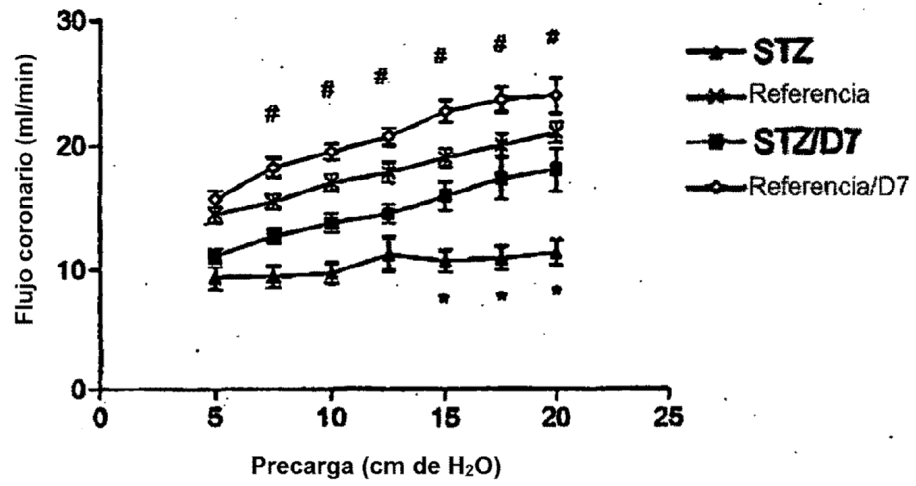


FIGURA 6



*p<0,05: STZ frente a STZ/D7

FIGURA 7



*p<0,05: STZ frente a STZ/D7, *p<0,05: STZ/D7 frente a Referencia/D7

FIGURA 8

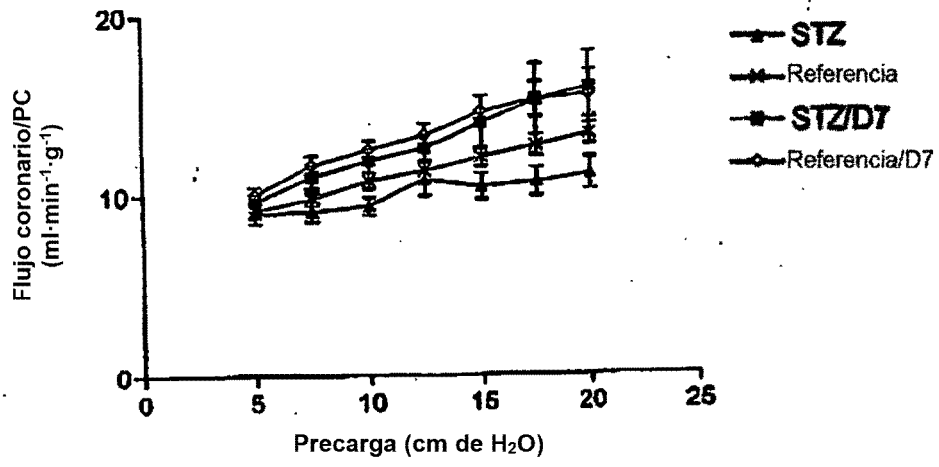
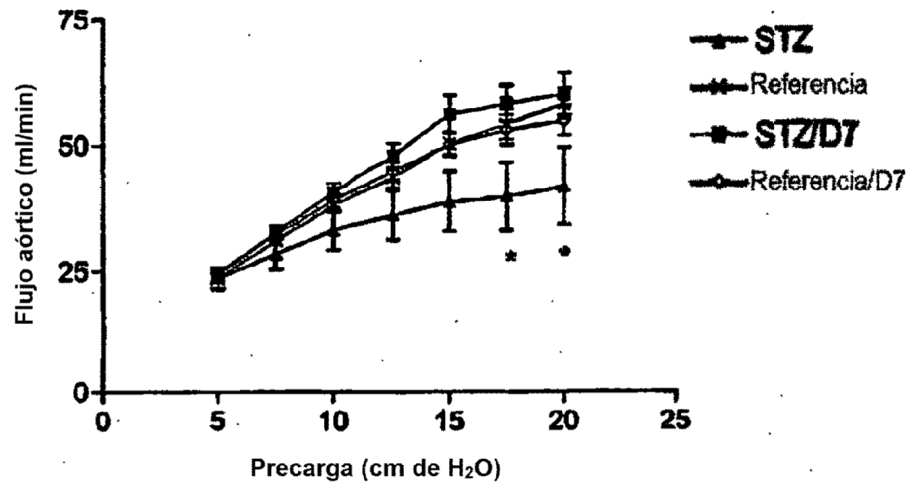
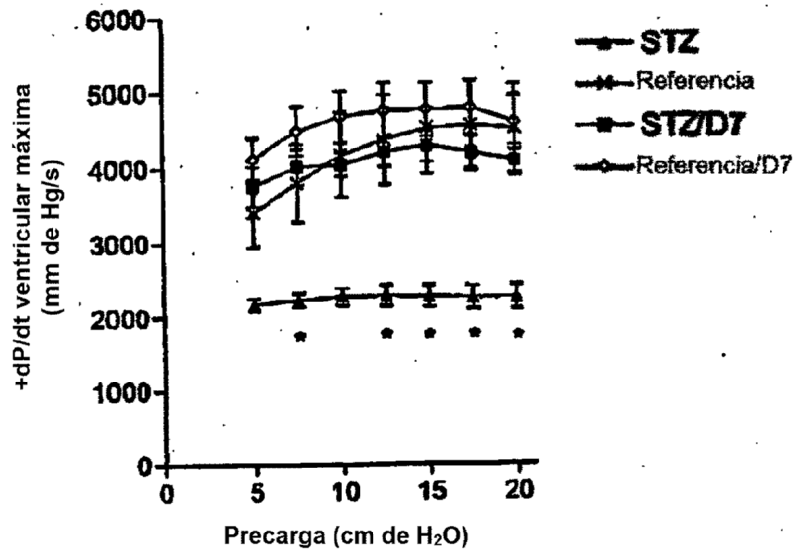


FIGURA 9



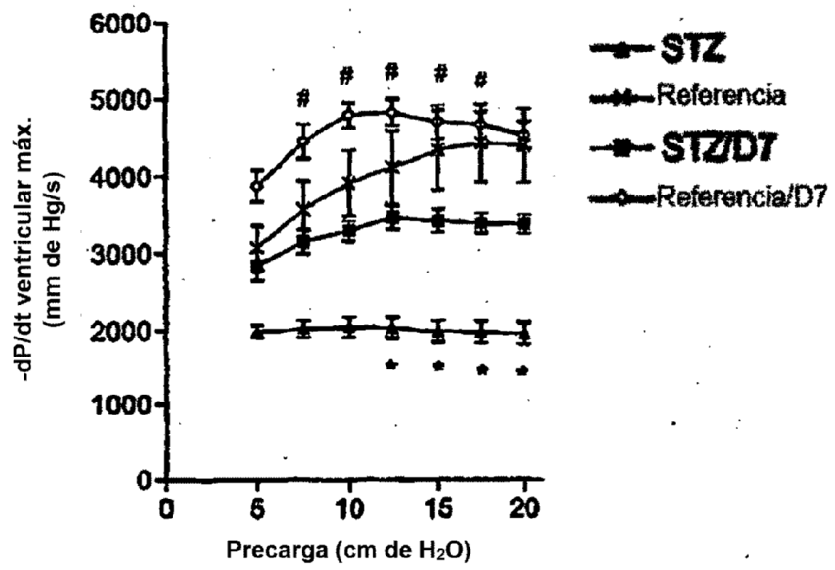
*p<0,05: STZ frente a STZ/D7

FIGURA 10



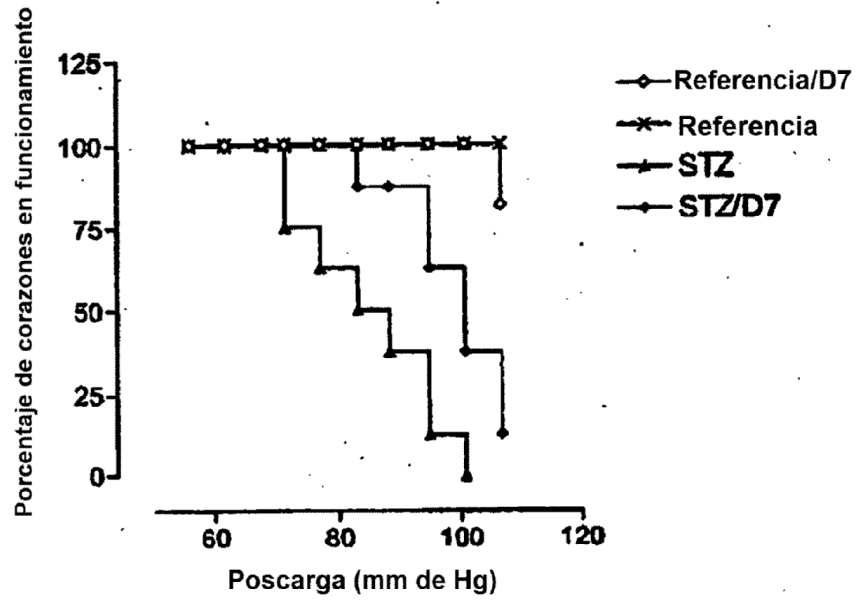
*p<0,05: STZ frente a STZ/D7

FIGURA 11



*p<0,05: STZ frente a STZ/D7, # p<0,05: STZ/D7 frente a Referencia/D7

FIGURA 12



Wilcoxon $p < 0,05$ para STZ frente a STZ/D7

FIGURA 13

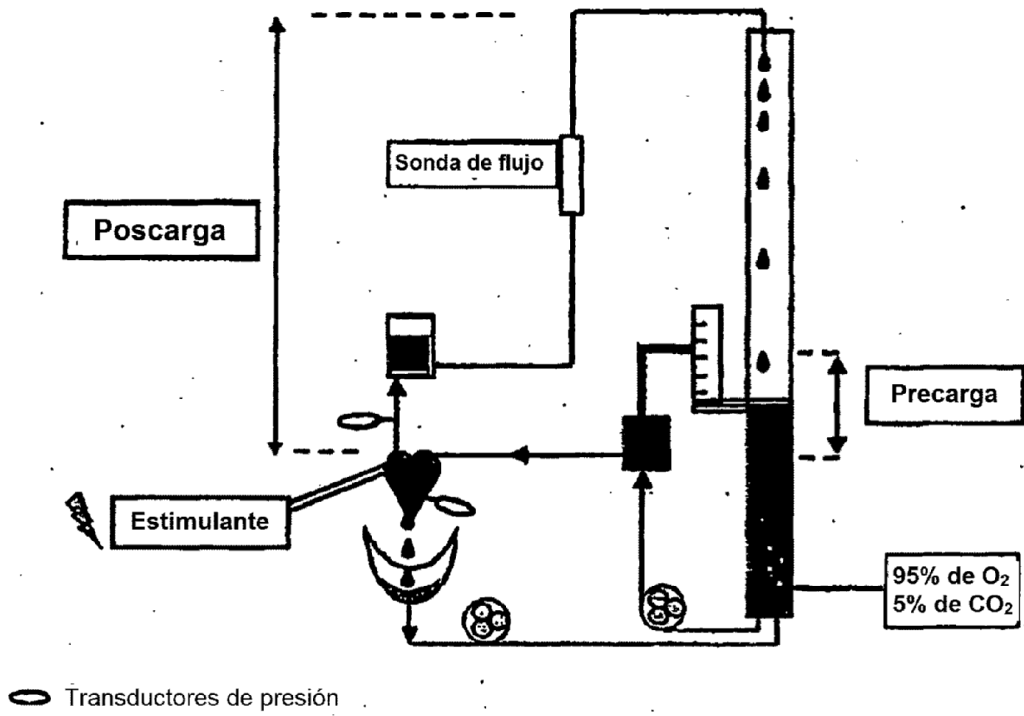


FIGURA 14

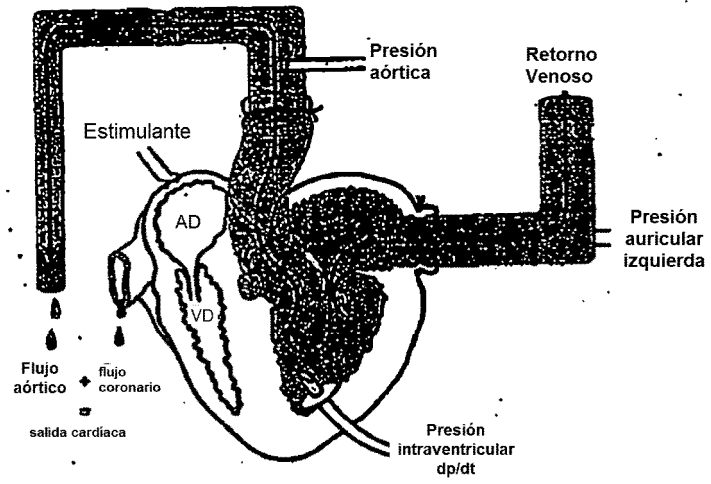


FIGURA 15

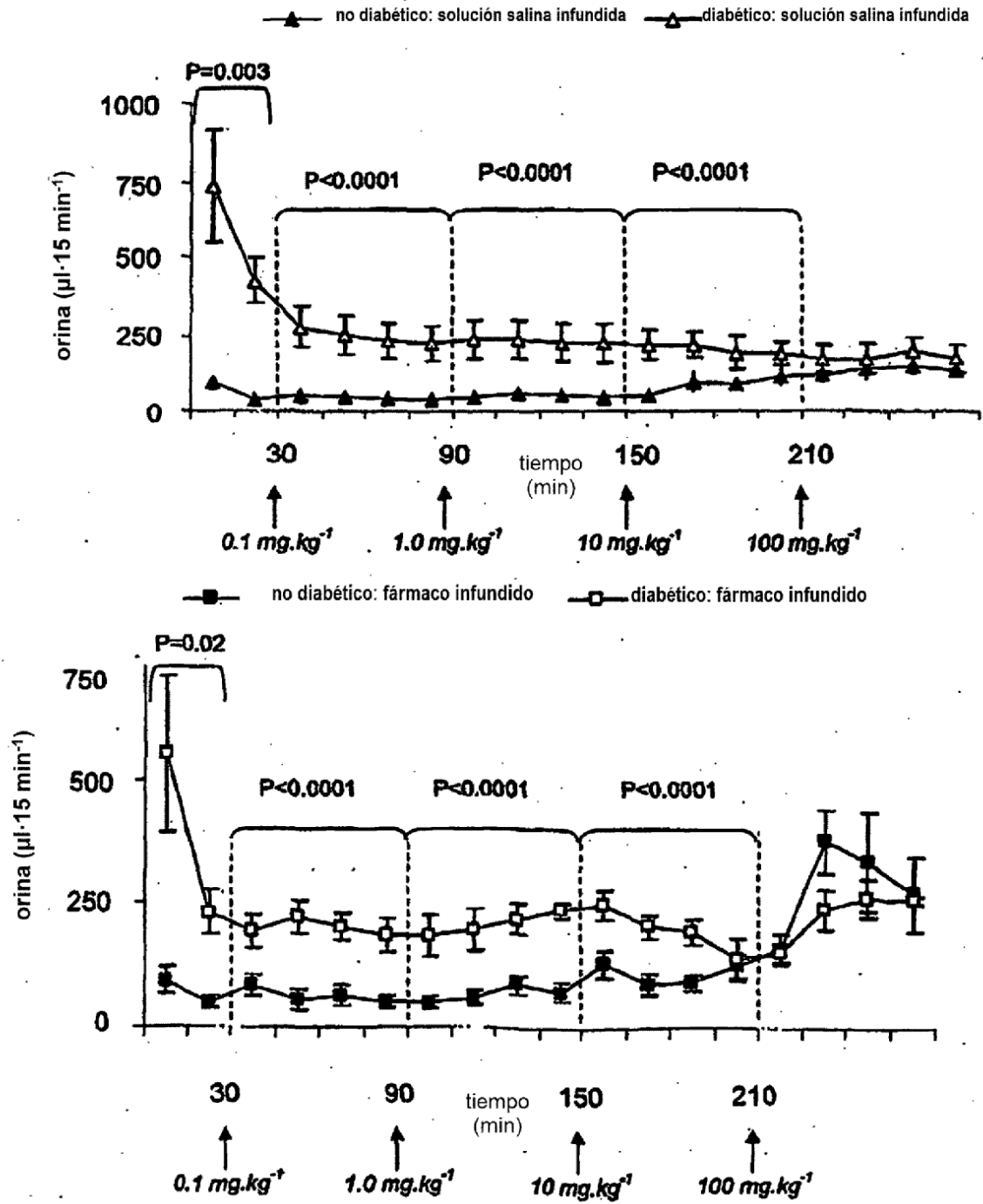


FIGURA 16

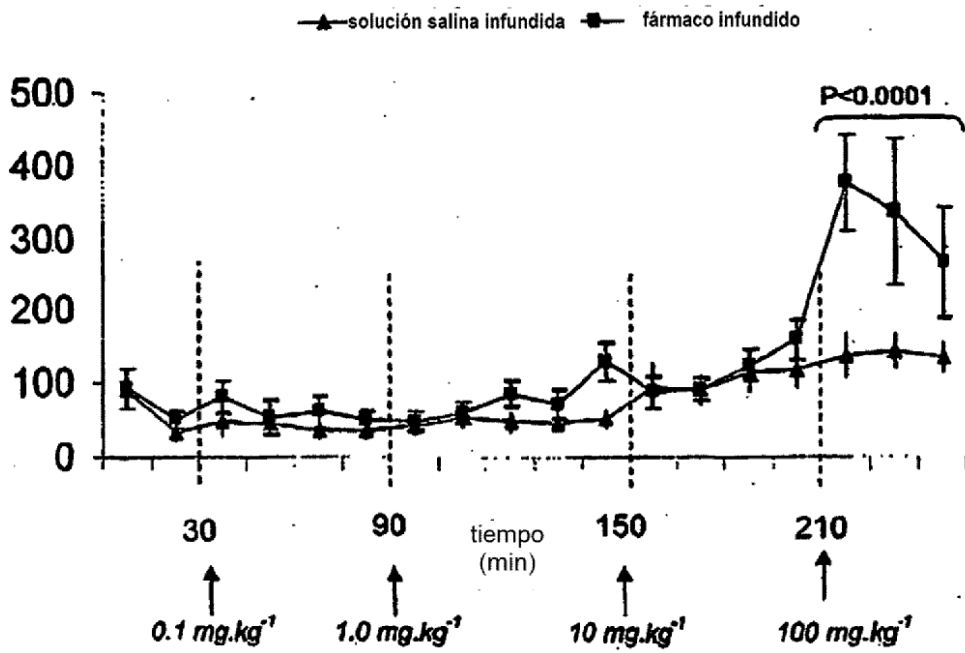
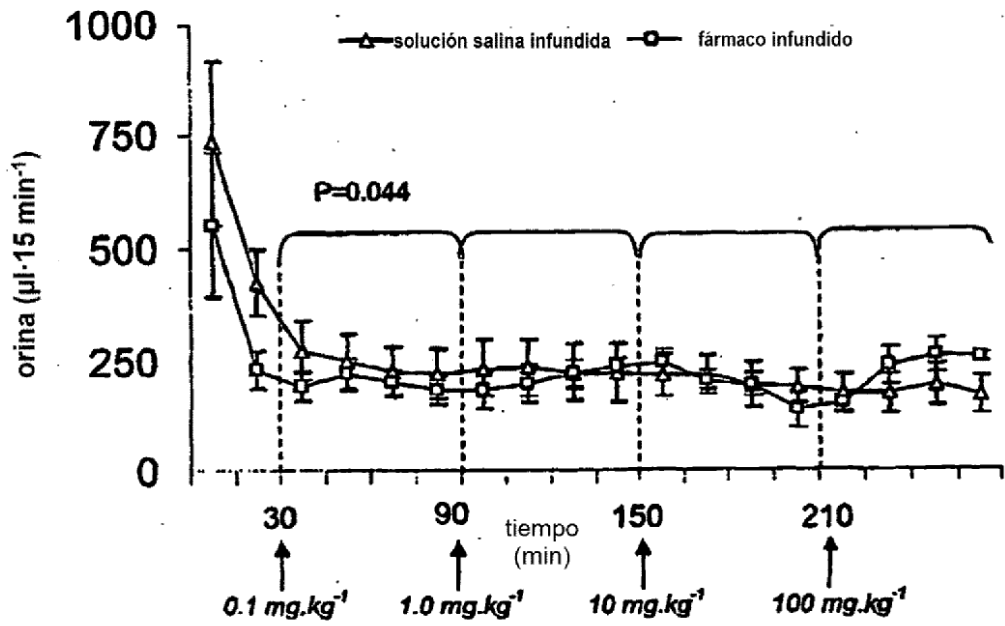


FIGURA 17

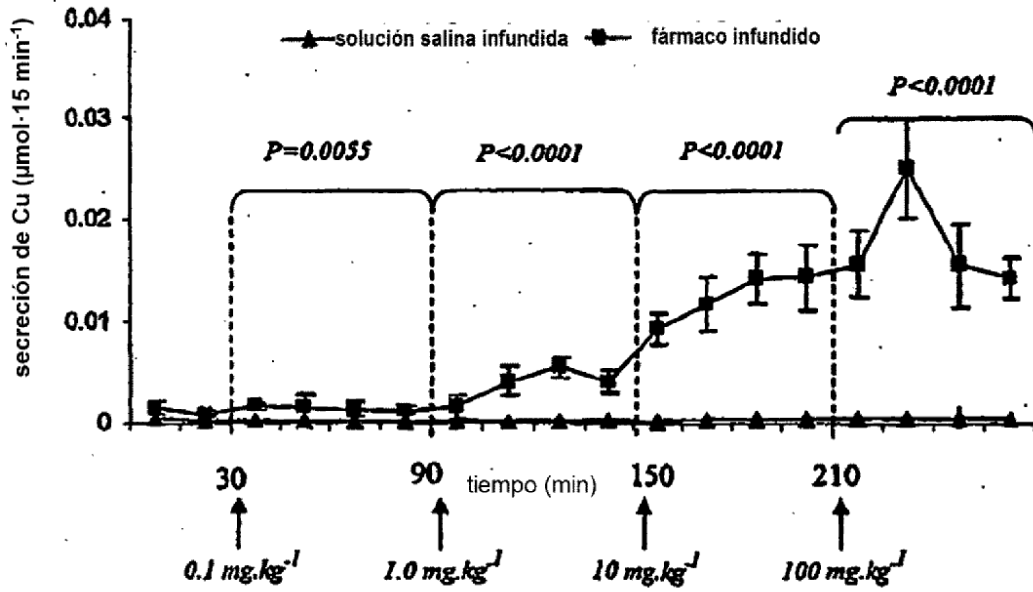
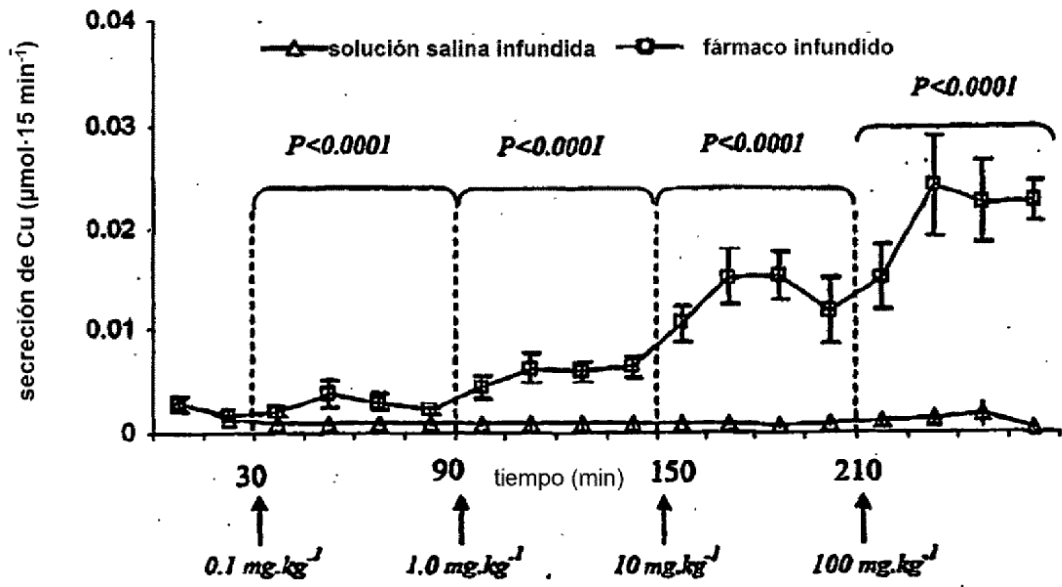


FIGURA 18

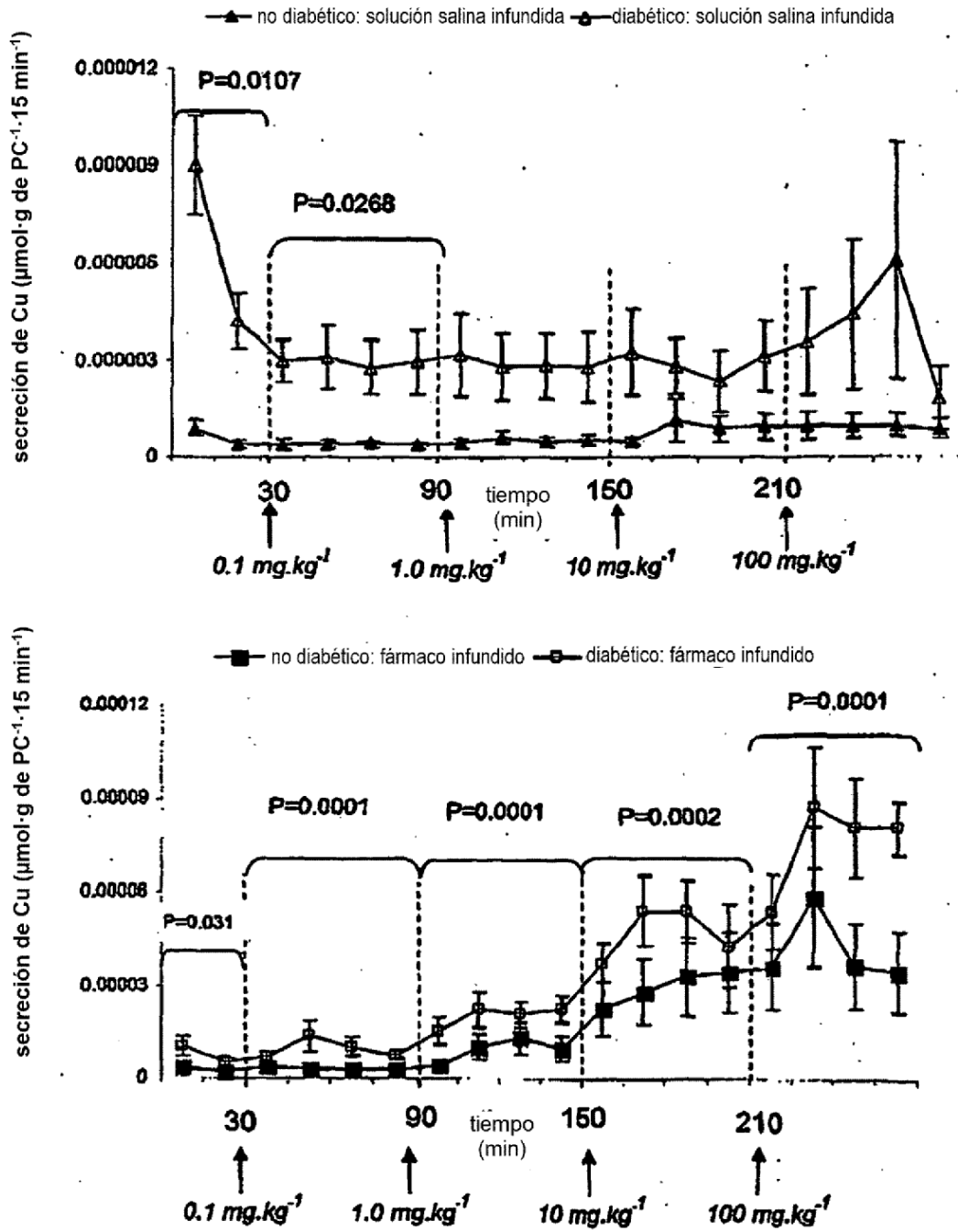


FIGURA 19

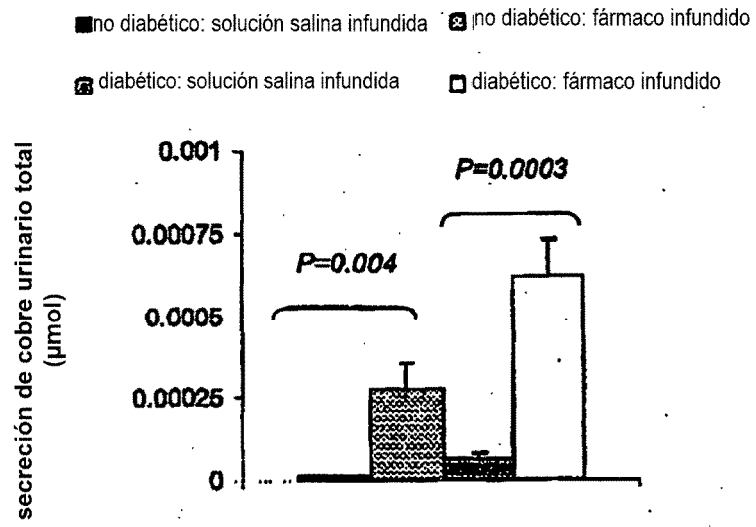


FIGURA 20

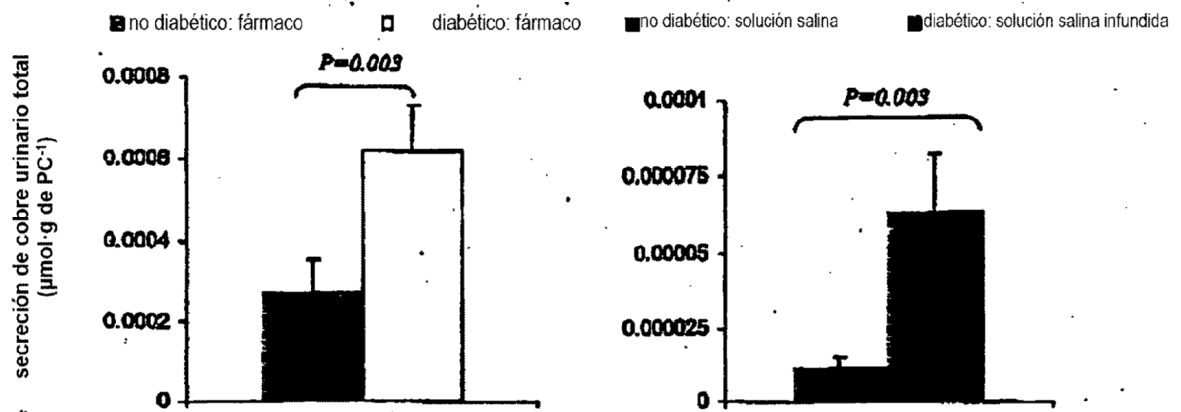


FIGURA 21

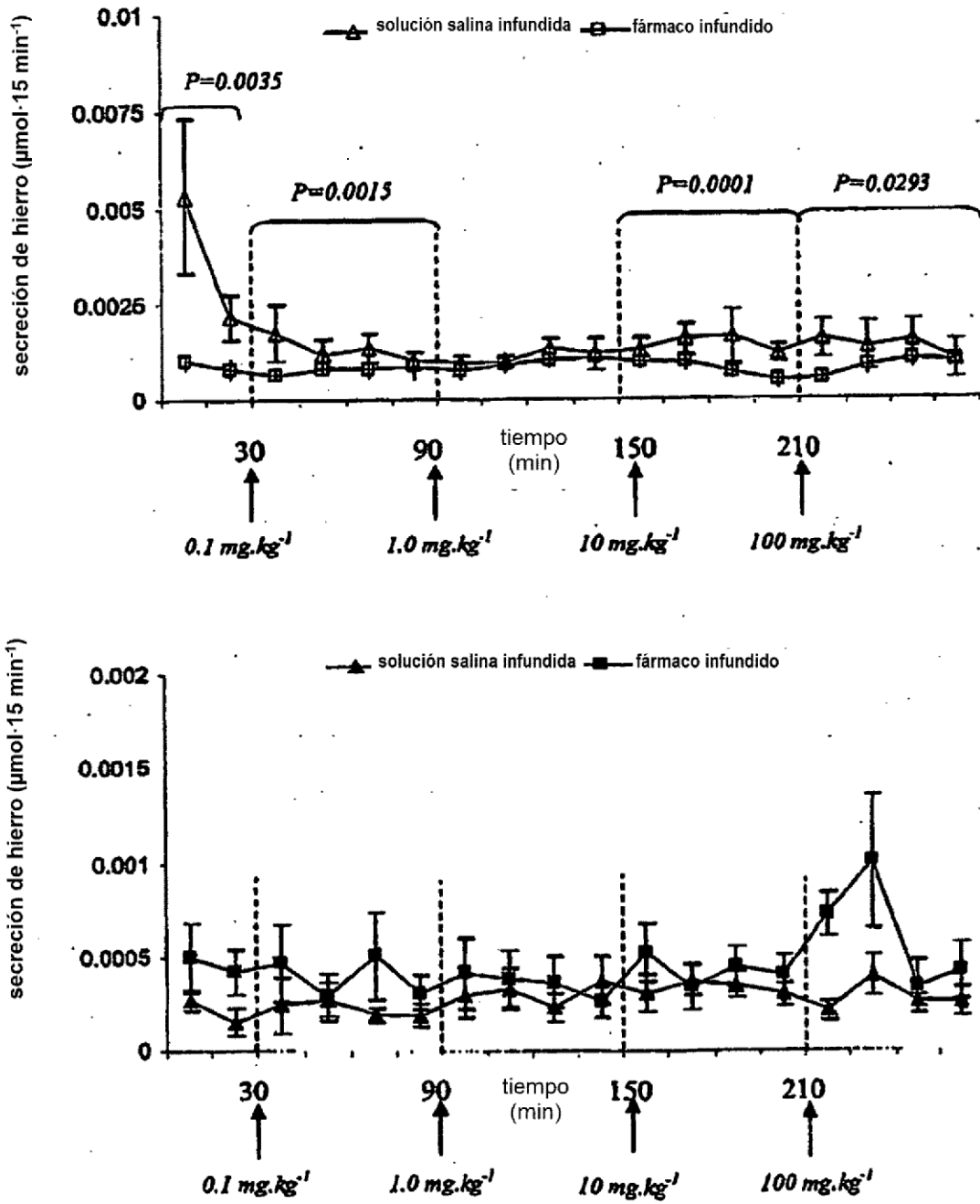


FIGURA 22

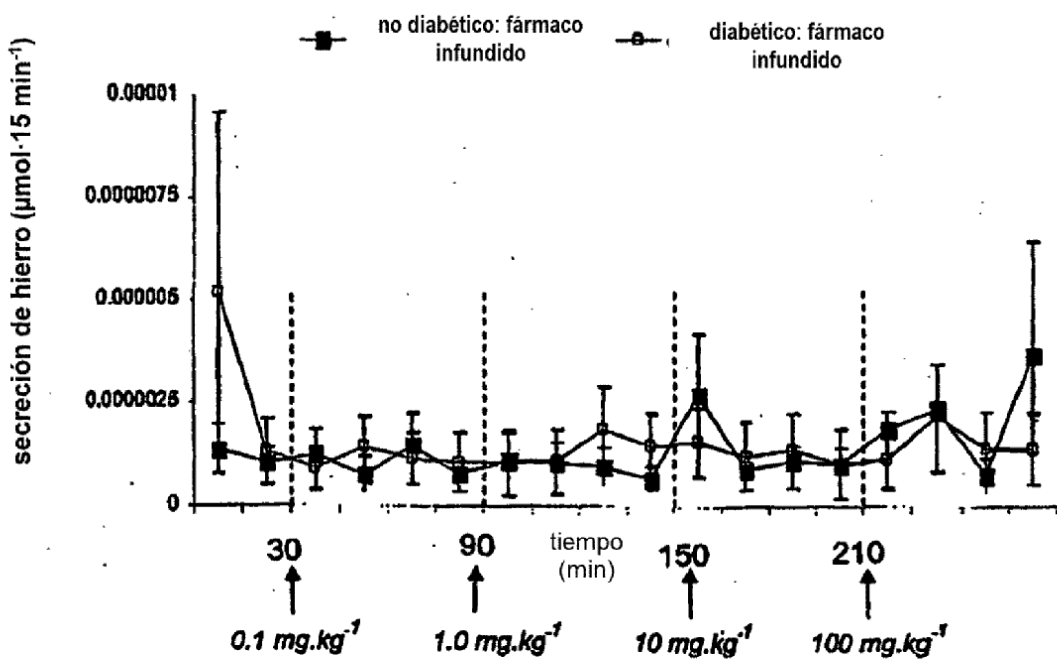
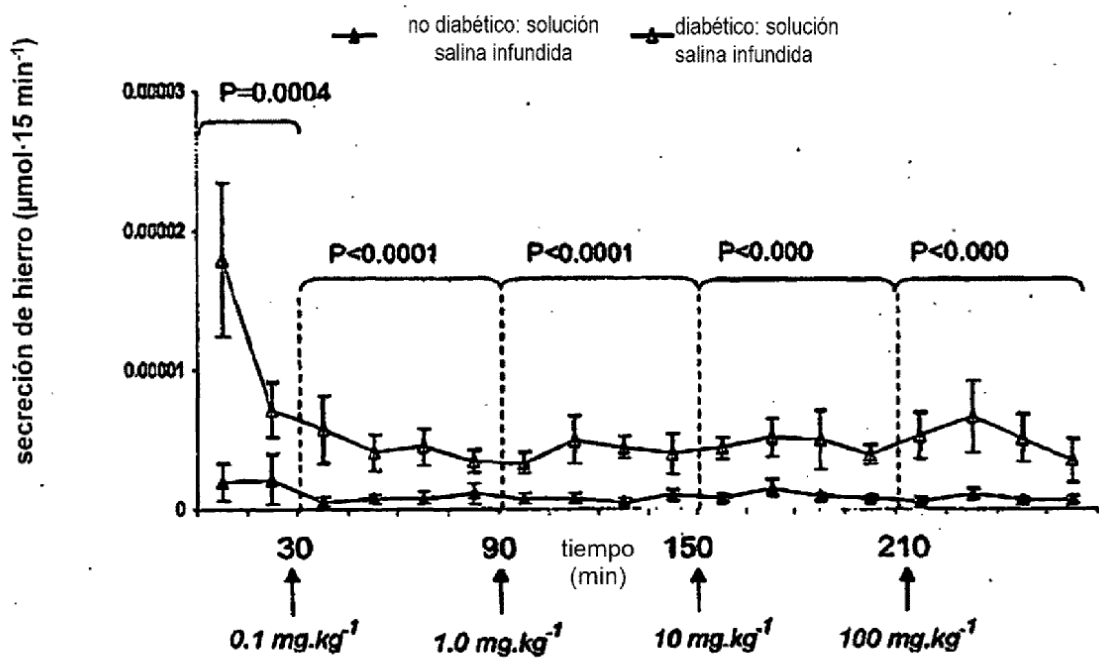


FIGURA 23

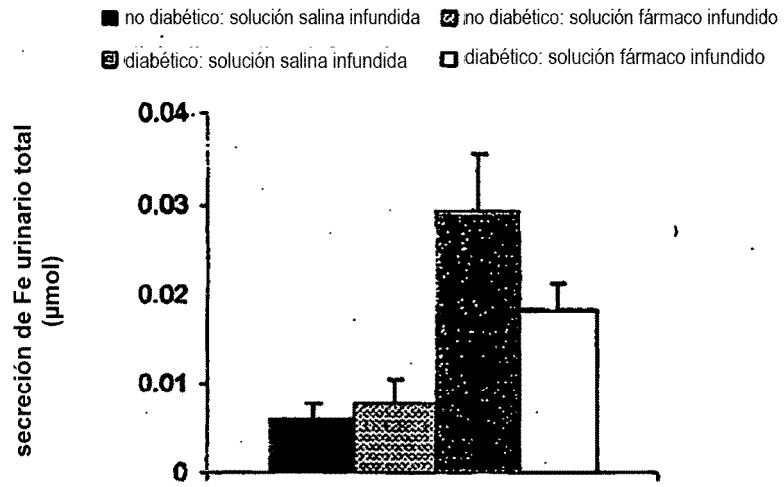


FIGURA 24

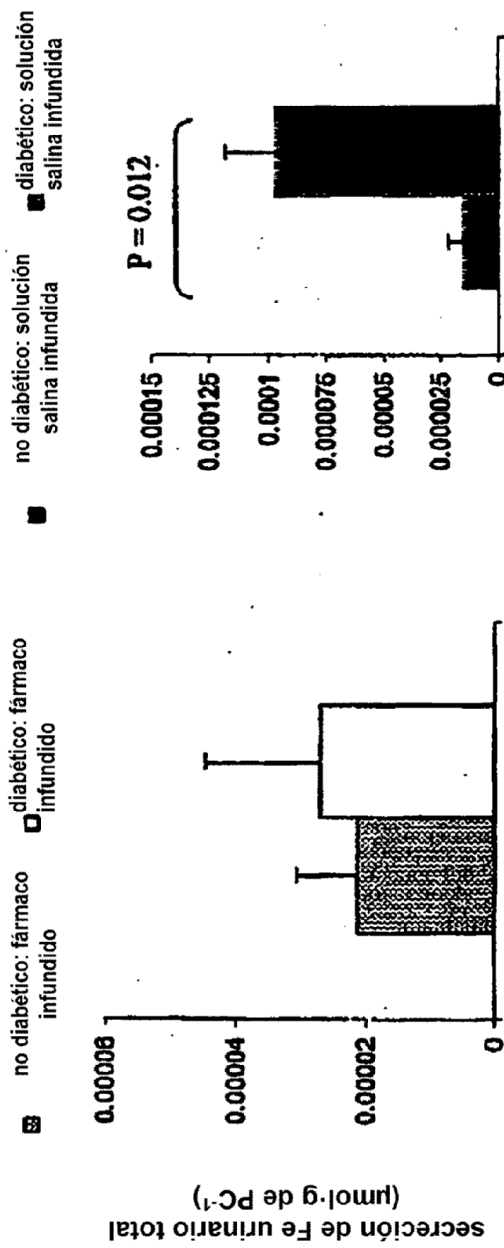


FIGURA 25

Secreción de Cu		Nivel de dosis			
Efectos del modelo mixto	Referencia	0.1 mg.kg ⁻¹	1.0 mg.kg ⁻¹	10 mg.kg ⁻¹	100 mg.kg ⁻¹
Diabetes	$F_{1,24} = 19.52$	$F_{1,24} = 19.82$	$F_{1,24} = 21.92$	$F_{1,24} = 9.93$	$F_{1,24} = 17.82$
(ratas normales/diabéticas)	$P = 0.0002$	$P = 0.0002$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0003$
Fármaco	$F_{1,24} = 1.73$	$F_{1,24} = 24.94$	$F_{1,24} = 78.36$	$F_{1,24} = 135.36$	$F_{1,24} = 162.17$
(fármaco/solución salina)	NS	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
Interacción	$F_{1,24} = 0.16$	$F_{1,24} = 3.58$	$F_{1,24} = 7.16$	$F_{1,24} = 6.02$	$F_{1,24} = 12.49$
	NS	NS	$P < 0.0192$	$P < 0.0219$	$P < 0.0017$
Tiempo de muestreo (medida repetida)	t_1, t_2	t_1, t_2, b, t_1	t_1, t_2, b, t_1	t_1, t_2, t_2	t_1, t_2, t_2
Secreción de Fe		Nivel de dosis			
Efectos del modelo mixto	Referencia	0.1 mg.kg ⁻¹	1.0 mg.kg ⁻¹	10 mg.kg ⁻¹	100 mg.kg ⁻¹
Diabetes	$F_{1,23} = 12.87$	$F_{1,23} = 15.82$	$F_{1,23} = 22.68$	$F_{1,23} = 14.93$	$F_{1,23} = 7.35$
(ratas normales/diabéticas)	$P = 0.0016$	$P = 0.0006$	$P < 0.0001$	$P = 0.0007$	$P = 0.0122$
Fármaco	$F_{1,23} = 8.6$	$F_{1,23} = 7.89$	$F_{1,23} = 12.23$	$F_{1,23} = 10.91$	$F_{1,23} = 2.47$
(fármaco/solución salina)	$P = 0.0079$	$P = 0.01$	$P < 0.0019$	$P = 0.003$	$P = 0.1282$
Interacción	$F_{1,23} = 12.10$	$F_{1,23} = 15.08$	$F_{1,23} = 14.07$	$F_{1,23} = 17.72$	$F_{1,23} = 16.78$
	$P = 0.002$	$P = 0.0008$	$P = 0.001$	$P = 0.0003$	$P = 0.0004$
Tiempo de muestreo (medida repetida)	t_1, t_2	t_1, t_2, b, t_1	t_1, t_2, b, t_1	t_1, t_2, b, t_1	t_1, t_2, b, t_1

FIGURA 26