

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 921**

51 Int. Cl.:

A61K 31/593 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10771300 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2490695**

54 Título: **Método para prevenir la diabetes tipo 1**

30 Prioridad:

21.10.2009 US 253665 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.01.2014

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
614 Walnut Street
Madison, WI 53705, US**

72 Inventor/es:

**DELUCA, HECTOR F.;
NEHRING, JAMIE;
RUDOLPH, EHREN N. y
PLUM, LORI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 437 921 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

Método para prevenir la diabetes tipo 1

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de EE.UU. nº 61/253.665, presentada el 21 de octubre de 2009.

Declaración relativa al interés del gobierno

No aplicable.

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a compuestos de vitamina D útiles para prevenir la diabetes tipo 1 y también divulga tecnología relativa a la divulgada en las Solicitudes de Patente de EE.UU. Publicadas nº US 2006/0079490 (pendiente) y 2006/0003973 (abandonada).

Antecedentes de la invención

15 La diabetes mellitus es un trastorno metabólico que se produce en aproximadamente un cuatro por ciento de los seres humanos. Existen dos tipos de diabetes; la forma no insulino dependiente o "del adulto" (tipo 2) y la forma insulino dependiente o "juvenil" (tipo 1). Clínicamente, la mayoría de los diabéticos tipo 2 son obesos, con manifestaciones de síntomas clínicos de la enfermedad que habitualmente aparecen en pacientes de más de 40 años. En contraste, los diabéticos tipo 1 habitualmente no tienen sobrepeso con relación a su edad y altura y típicamente exhiben una aparición rápida de la enfermedad a una edad temprana, a menudo antes de los 30 años.

20 Un tercio de los pacientes con diabetes sufren diabetes tipo 1 (Foster et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, Capítulo 114, pp. 661-678, 10ª Ed., McGraw-Hill, Nueva York). La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune en la que resulta un estado de hiperglucemia de la destrucción mediada por células T de células β que secretan insulina en los islotes pancreáticos de Langerhans (Eisenbarth et al., 1986, New Engl. J. Med. 314: 1360-1368). La enfermedad se manifiesta como una serie de anomalías metabólicas inducidas por hormonas que finalmente conducen a complicaciones graves, a largo plazo y debilitantes que implican a varios sistemas orgánicos incluyendo los ojos, los riñones, los nervios y los vasos sanguíneos. Patológicamente, la enfermedad se caracteriza por lesiones de las membranas basales, demostrables bajo microscopía electrónica.

25 Los diabéticos tipo 1 muestran característicamente insulina en plasma muy baja o no medible con glucagón elevado. Independientemente de cuál sea la etiología exacta, la mayoría de los paciente tipo 1 tienen anticuerpos en circulación dirigidos contra sus propias células pancreáticas, incluyendo anticuerpos contra insulina, contra el citoplasma de células insulares de Langerhans y contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa. Una respuesta inmunitaria dirigida específicamente contra las células β (células productoras de insulina) conduce a la diabetes tipo 1.

30 Regímenes terapéuticos actuales para la diabetes tipo 1 incluyen modificaciones de la dieta para minimizar la hiperglucemia resultante de la falta de insulina natural, que a su vez es el resultado de las células β dañadas. La dieta también se modifica con respecto a la administración de insulina para contrarrestar los efectos hipoglucémicos de la hormona. Cualquiera que sea la forma de tratamiento, la administración parenteral de insulina se requiere para todos los diabéticos tipo 1, de ahí el término diabetes "insulino dependiente".

35 Debido a que la diabetes tipo 1 se manifiesta habitualmente en adolescentes y debido a que el aporte subcutáneo de insulina requiere una estricta autorregulación, el cumplimiento terapéutico es a menudo un problema grave. Para el médico, es difícil regular precisamente las cantidades de insulina necesarias en un momento dado del día del paciente. Por otra parte, es casi imposible regular los niveles de glucosa en sangre en pacientes diabéticos con insulina parenteral hasta el punto hasta el que se regula la glucosa en sangre en individuos normales.

40 Así, en las primeras fases del tratamiento de la diabetes tipo 1, los pacientes a menudo tienen hiperglucemias o hipoglucemias debido a que no se conocen la cronología exacta de las inyecciones de insulina y los niveles de insulina necesarios. A medida que el tratamiento avanza, el médico y, de forma más importante, el paciente se ajustan a los hábitos diarios, pero siempre existe el riesgo de cetoacidosis o hipoglucemia.

45 La patogénesis de la diabetes tipo 1 no se entiende completamente, aunque están disponibles diversos modelos animales para su estudio. Estos incluyen el ratón BB (Nakbookda et al., 1978, Diabetologic 14: 199-207) y el ratón NOD (diabético no obeso, por sus siglas en inglés) en los que la diabetes se desarrolla espontáneamente (Prochazka et al., 1987, Science 237:286). Estos ratones, especialmente las hembras, son genéticamente sensibles a la diabetes. De forma similar a la afección humana, el ratón NOD exhibe hiperglucemia, poliuria, polidipsia, glucosuria, insulinitis y una dependencia de insulina exógena para vivir (Tochino et al., 1987, Crit. Rev. Immunol. 8:49-81). Tales características han hecho del ratón NOD un modelo murino excelente y ampliamente aceptado de la diabetes tipo 1 humana.

La vitamina D es un regulador conocido y potente del metabolismo del calcio y el fósforo. La forma biológicamente activa de la vitamina D, $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 , y su análogo en la serie de los ergocalciferoles, $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_2 , son reguladores muy eficaces de la homeostasis del calcio en animales y seres humanos (Ostrem et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2610). Se han preparado y probado muchos análogos estructurales de estos metabolitos, incluyendo 1α -hidroxivitamina D_3 y 1α -hidroxivitamina D_2 , que tienen cada uno diversas cadenas laterales homologadas y sus análogos fluorados. Algunos compuestos exhibían diferenciación celular y actividad de regulación del calcio separadas. La fisiología y las acciones moleculares de la vitamina D y sus diversos análogos y metabolitos se analizan en Jones et al., 1998, *Physiol. Rev.* 78:1193-1231 y DeLuca, 2004, *Am J Clin Nutr* 80 (supl.):1689S-1696S.

Otra clase de análogos de la vitamina D, los compuestos de 19-nor-vitamina D, se caracteriza por la sustitución del grupo metileno exocíclico del anillo A (carbono 19) por dos átomos de hidrógeno. La prueba biológica de los 19-nor-análogos (p. ej., $1\alpha, 25$ -dihidroxi-19-nor-vitamina D_3) demostraba un perfil de actividad selectivo que tiene una gran potencia para inducir la diferenciación celular así como una actividad movilizadora del calcio muy baja. Se han presentado dos métodos sintéticos (Perlman et al., 1990, *Tetrahedron Lett.* 31:1823; Perlman et al., 1991, *Tetrahedron Lett.* 32:7663, y DeLuca et al., Pat. EE.UU. n° 5.086.191).

La Pat. EE.UU. n° 4.666.634 de Miyamoto et al. describe los análogos hidroxilado y alcoxilado en 2β de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 como fármacos potenciales para la osteoporosis y como agentes antitumorales. (Véase además Okano et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:1444). También se han presentado otros análogos del anillo A con grupos hidroxialquilo y fluoroalquilo sustituidos en 2 de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (Miyamoto et al., 1993, *Chem. Pharm. Bull.* 41:1111; Nishii et al., 1993, *Osteoporosis Int. Suppl.* 1:190; Posner et al., 1994, *J. Org. Chem.* 59:7855; y Posner et al., 1995, *J. Org. Chem.* 60:4617).

También se han sintetizado y presentado análogos sustituidos en 2 de $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-nor-vitamina D_3 , que son compuestos sustituidos en la posición 2 con grupos hidroxilo o alcoxi (DeLuca et al., Pat. EE.UU. n° 5.536.713). Los sitios de unión en los receptores de vitamina D pueden alojar diferentes sustituyentes en el C-2 en estos análogos de 19-nor-vitamina D.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona nuevos métodos para prevenir la diabetes tipo 1 en un sujeto con riesgo de desarrollar diabetes tipo 1. Específicamente, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de 2α -metil-19-nor-20(S)- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (2AMD) o 2-metilen-19-nor-20(S)- $1,25$ -dihidroxitamina D_3 (2MD), en los que se previene el desarrollo de la diabetes tipo 1 en el sujeto sin inducir hipercalcemia en el sujeto.

En una realización ejemplar, la 2α -metil-19-nor-20(S)- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 o la 2-metilen-19-nor-20(S)- $1,25$ -dihidroxitamina D_3 se formula en una forma de dosificación oral, tópica, transdérmica, parenteral, de inyección o de infusión.

En otra realización ejemplar, la cantidad terapéuticamente eficaz de 2AMD varía de aproximadamente 100 pg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 pg/kg de peso corporal al día, mientras que la cantidad terapéuticamente eficaz de 2MD varía de aproximadamente 0,1 ng/kg de peso corporal al día a aproximadamente 5 ng/kg de peso corporal al día.

Otras características de la presente invención se harán evidentes después de una revisión de la memoria descriptiva, las reivindicaciones y los dibujos.

Breve descripción de los dibujos de las realizaciones ejemplares

La FIG. 1 es un gráfico de barras que muestra una comparación entre la incidencia de diabetes en ratones NOD alimentados con dieta 5015 a los 200 días tratados con 50 ng de $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D_3 (también denominada en la presente memoria $1,25D_3$ y $1,25(OH)_2D_3$), 200 pg de 2α -metil-19-nor-20(S)- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (denominada en la presente memoria 2AMD), 300 pg de 2AMD, así como sin tratamiento, en donde los datos demuestran que el tratamiento con 2AMD provocaba una incidencia de diabetes reducida estadísticamente significativa. Ratones NOD hembra se alimentaron ad libitum con las dietas indicadas durante 200 días. Había 24 ratones por grupo y se muestra la dosis diaria de análogo proporcionada en la dieta.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra una comparación de niveles de calcio sérico en los ratones NOD descritos en la FIG. 1 a lo largo de 30 semanas cuando se tratan con 50 ng de $1,25D_3$, 200 pg de 2AMD y 300 pg de 2AMD, en donde los datos demuestran que el tratamiento con 2AMD no provocaba un incremento estadísticamente significativo en el calcio sérico.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra una comparación del peso de los animales a lo largo de 200 días en los ratones descritos en la FIG. 1 cuando se tratan con 50 ng de $1,25D_3$, 200 pg de 2AMD y 300 pg de 2AMD, en donde los datos demuestran que el tratamiento con 2AMD no provocaba un cambio estadísticamente significativo en el peso corporal.

La FIG. 4 es un gráfico que muestra una comparación entre la incidencia de diabetes en ratones NOD alimentados con la dieta 11 con y sin la dosis diaria indicada de análogos de vitamina D durante 200 a los 200 días tratados con 50 ng de $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D_3 (también denominada en la presente memoria $1,25D_3$ y $1,25(OH)_2D_3$), 400 ng de 1α -hidroxi-2-metilen-19-nor-homopregnacalciferol (denominado en la presente memoria 2MP) y 0,5 ng de 2-metilen-19-nor-20(S)- $1,25$ -dihidroxitamina D_3 (denominada en la presente memoria 2MD), así como sin tratamiento, en donde los datos demuestran que el tratamiento con 2MD provocaba una incidencia de diabetes reducida estadísticamente significativa. Había 24 ratones hembra por grupo.

La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra una comparación del peso de los animales a lo largo de 200 días de los ratones descritos en la FIG. 4 cuando se tratan con 50 ng de $1,25D_3$, 400 ng de 2MP y 0,5 ng de 2MD, en donde los datos demuestran que el tratamiento con 2MD no provocaba un cambio estadísticamente significativo en el peso corporal.

La FIG. 6 es un gráfico de barras que muestra una comparación de los niveles de calcio sérico en los ratones NOD descritos en la FIG. 4 a lo largo de 30 semanas cuando se tratan con 50 ng de $1,25D_3$, 400 ng de 2MP y 0,5 ng de 2MD, en donde los datos demuestran que el tratamiento con 2MD no provocaba un incremento estadísticamente significativo en el calcio sérico.

Descripción detallada de las realizaciones ejemplares

I. En general

En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, los términos "que incluye" y "que comprende" son términos no limitados y debe interpretarse que significan "que incluye, pero no limitado a...". Estos términos abarcan los términos más restrictivos "que consiste esencialmente en" y "que consiste en".

Según se utilizan en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una", "uno", y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Asimismo, los términos "un/una" (o "uno"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden utilizar intercambiablymente en la presente memoria. También se ha de apuntar que los términos "que comprende", "que incluye", "caracterizado por" y "que tiene" se pueden utilizar intercambiablymente.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados que son entendidos comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las publicaciones y patentes mencionadas específicamente en la presente memoria se incorporan mediante referencia en su totalidad con todos los propósitos incluyendo describir y divulgar los productos químicos, instrumentos, análisis estadísticos y metodologías que se presenten en las publicaciones que podrían utilizarse en relación con la invención. Todas las referencias citadas en esta memoria descriptiva se han de tomar como indicativas del nivel de experiencia en la técnica. Nada en la presente memoria se ha de considerar un reconocimiento de que la invención no esté autorizada para anticipar tal divulgación en virtud de la técnica anterior.

II. La invención

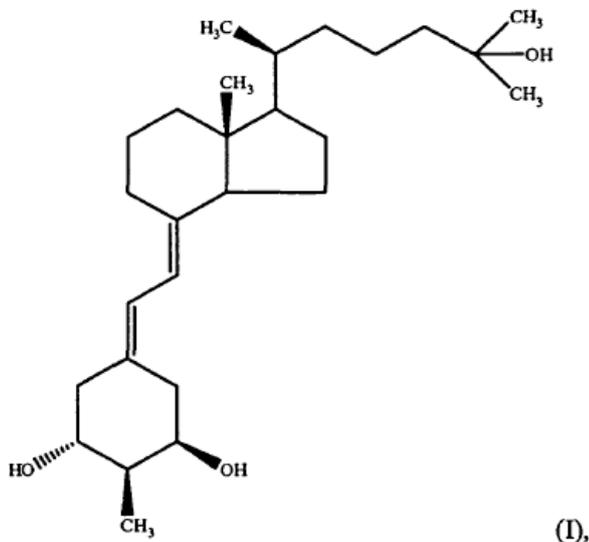
La presente invención proporciona nuevos métodos para prevenir la diabetes tipo 1 en un sujeto con riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de 2α -metil-19-nor-20(S)- $1,25$ -dihidroxitamina D_3 (2AMD) o 2-metilen-19-nor-20(S)- $1,25$ -dihidroxitamina D_3 (2MD) para prevenir la diabetes tipo 1 sin inducir hipercalcemia en el sujeto. Específicamente, la presente invención demuestra que la 2α -metil-19-nor-20(S)- $1,25$ -dihidroxitamina D_3 (2AMD) y la 2-metilen-19-nor-20(S)- $1,25$ -dihidroxitamina D_3 (2MD) son capaces de prevenir el desarrollo de diabetes tipo 1 en un sujeto sin elevar el calcio sérico (en un grado estadísticamente significativo).

Previamente, este laboratorio demostró que 50 microgramos al día de $1,25(OH)_2D_3$ prevenían completamente la diabetes tipo 1 en el ratón NOD (Zella et al., 2003, Arch. Biochem. Biophys. 417:77-80). Sin embargo, una hipercalcemia intensa siempre acompañaba a esta actividad. La hipercalcemia (niveles incrementados de calcio en la sangre) puede dar como resultado problemas físicos graves, incluyendo la muerte. Claramente, la utilización de $1,25(OH)_2D_3$ obviamente no es posible debido a la hipercalcemia resultante. Según esto, existe una necesidad de compuestos que prevengan la diabetes tipo 1 pero que no eleven el calcio sérico.

Se ha sintetizado y probado un análogo caracterizado por la presencia de un sustituyente metilo en C-2. Tales análogos se caracterizan por la configuración no natural del grupo metilo C-20 (p. ej., 2α -metil-19-nor-20(S)- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3). El grupo metilo o el metileno relativamente pequeño en C-2 puede no interferir con la unión al receptor de vitamina D. Estudios mecánicos moleculares realizados sobre las 1α -hidroxi-2-metilen-19-nor-vitaminas modélicas indican que tal modificación molecular no cambia sustancialmente la conformación del anillo A de ciclohexanodiol. Introducir el grupo metileno en 2 en la cadena principal carbonada de la 19-nor-vitamina D cambia el carácter de sus hidroxilos del anillo A 1α y 3β . Ambos hidroxilos son alílicos para el grupo metileno exocíclico similar al grupo hidroxilo 1α (crucial para la actividad biológica) en la molécula de la hormona natural, $1\alpha,25(OH)_2D_3$.

En una realización, la invención proporciona un método para prevenir la diabetes tipo 1 en un sujeto con riesgo de

desarrollar diabetes tipo 1 que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de 2 α -metil-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (2AMD) que tiene la estructura:

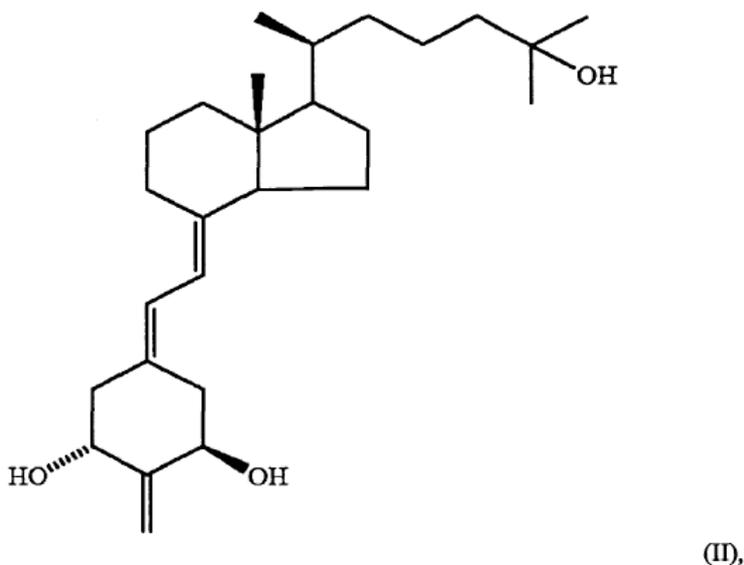


sin incrementar los niveles de calcio sérico del sujeto.

- 5 En una realización, el método de la presente invención previene el desarrollo de diabetes tipo 1 en un sujeto previniendo la destrucción de las células insulares.

La síntesis global del compuesto I se ilustra y describe adicionalmente en la Pat. EE.UU. n° 5.945.410 titulada "2-Alkyl-19-Nor-Vitamin D Compounds".

- 10 En otra realización, la invención proporciona un método para prevenir la diabetes tipo 1 en un sujeto con riesgo de desarrollar diabetes tipo 1 que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de 2-metilen-19-nor-20(S)-1,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) que tiene la estructura (II):



sin inducir hipercalcemia en el sujeto.

- 15 La síntesis global del compuesto II se ilustra y se describe más completamente en la Pat. EE.UU. n° 5.843.928, expedida el 1 de diciembre de 1998 y titulada "2-Alkylidene-19-Nor-Vitamin D Compounds". La actividad biológica de 2MD se presenta en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° Ser. 09/616.164, presentada el 14 de julio de 2000.

En una realización, el método de la presente invención previene el desarrollo de diabetes tipo 1 en un sujeto previniendo la destrucción de las células insulares.

Por "prevenir" se entiende un impedimento de un síntoma clínico indicativo de diabetes. Tal impedimento incluye, por ejemplo, el mantenimiento de niveles normales de glucosa en sangre en un sujeto con riesgo de desarrollar diabetes antes del desarrollo de síntomas evidentes de la enfermedad o antes del diagnóstico de la enfermedad. Por lo tanto, el término "prevenir" incluye el tratamiento profiláctico de sujetos para protegerlos de la presencia de la diabetes. Prevenir la diabetes en un sujeto también pretende incluir inhibir o detener el desarrollo de la enfermedad. Inhibir o detener el desarrollo de la enfermedad incluye, por ejemplo, inhibir o detener la presencia de un metabolismo anormal de la glucosa tal como el fallo para transferir glucosa del plasma a las células. Por lo tanto, una prevención eficaz de la diabetes incluiría el mantenimiento de la homeostasis de glucosa debida a la expresión de insulina regulada por glucosa en un individuo predispuesto al estado diabético, por ejemplo, un sujeto obeso o un sujeto con una historia familiar de diabetes. Inhibir o detener el desarrollo de la enfermedad también incluye, por ejemplo, inhibir o detener el avance de uno o más estados patológicos o complicaciones crónicas asociadas con la diabetes.

Por "sujeto" se entiende mamíferos y no mamíferos. "Mamíferos" significa cualquier miembro de la clase Mammalia incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como vacas, caballos, ovejas, cabras y cerdos; animales domésticos tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratas, ratones y cobayas; y similares. Ejemplos de no mamíferos incluyen, pero no se limitan a, aves y similares. El término "sujeto" no indica una edad o un sexo particulares.

Por "con riesgo" de diabetes tipo 1 se entiende a) sujetos que tienen un pariente sanguíneo con diabetes tipo 1; b) sujetos positivos a autoanticuerpos sin diabetes tipo 1 evidente (incluyendo autoanticuerpos citoplásmicos contra células insulares, anticuerpos contra insulina y autoanticuerpos contra ácido glutámico descarboxilasa); c) sujetos con histocompatibilidad (HLA) tipo DR3, DQ o DR4DQW8; y/o d) individuos con anomalías de la glucosa tales como una pérdida de secreción de insulina de primera fase o durante pruebas de tolerancia a la glucosa. Se considera generalmente que la aparición de al menos dos anticuerpos contra insulina o una proteína relacionada en la sangre es predictiva de diabetes tipo 1. Por ejemplo, hay una incidencia de 80% de diabetes tipo 1 en pacientes que tienen al menos 2 o 3 de estos anticuerpos. Estos anticuerpos señalan el comienzo de la insulinitis (inflamación de las células insulares). Los anticuerpos también pueden señalar la invasión por células que destruyen los islotes.

Por "diabetes tipo 1" se entiende la diabetes caracterizada como un nivel de glucosa en sangre en ayunas mayor que o igual a aproximadamente 140 mg/dl o como un nivel de glucosa plasmática mayor que o igual a aproximadamente 200 mg/dl según se ensaya aproximadamente 2 horas después de la administración oral de una carga de glucosa de aproximadamente 75 g. El término "diabetes" también está destinado a incluir los sujetos con hiperglucemia, incluyendo hiperglucemia crónica y tolerancia deteriorada a la glucosa. Niveles de glucosa plasmática en sujetos hiperglucémicos incluyen, por ejemplo, concentraciones de glucosa mayores de los normales según se determina mediante indicadores diagnósticos fiables. Tales sujetos hiperglucémicos tienen riesgo o están predispuestos a desarrollar síntomas clínicos evidentes de diabetes mellitus.

Por "administrar" se entiende cualquier medio para introducir un compuesto en el cuerpo, preferiblemente en la circulación sistémica, según se describe con más detalle posteriormente. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, oral, bucal, sublingual, pulmonar, transdérmica, transmucosa, así como inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa e intramuscular.

Por "terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para tratar una enfermedad, sea suficiente para llevar a cabo tal tratamiento de la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, el estado de enfermedad que se trate, la gravedad de la enfermedad tratada, la edad y la salud relativa del sujeto, la vía y la forma de administración, el juicio del profesional médico o veterinario responsable y otros factores.

45 Dosificación.

En una realización, los compuestos 2AMD y 2MD son individualmente los ingredientes farmacéuticos activos (API, por sus siglas en inglés) de esta invención. Los API se pueden formular en una forma de dosificación farmacéutica oral como una solución en disolventes inocuos, una emulsión, suspensión o dispersión en disolventes o portadores adecuados. Los API también se pueden formular en diversas formas de dosificación oral, tales como píldoras, comprimidos o cápsulas que utilizan portadores sólidos farmacéuticos adecuados. Tales formulaciones farmacéuticas también pueden contener otros ingredientes inactivos, excipientes, tales como estabilizantes, antioxidantes, aglutinantes, agentes colorantes, emulsionantes y/o agentes modificadores del sabor aprobados por la USP (Farmacopea de EE.UU., por sus siglas en inglés) adecuados, que se denominan ingredientes farmacéuticos inactivos aprobados por la USP.

55 Los API se pueden administrar oralmente, tópicamente, parenteralmente o transdérmicamente o mediante inhalación. Los compuestos se pueden administrar mediante inyección o infusión intravenosa utilizando soluciones estériles adecuadas. Las formas de dosificación tópicas pueden ser cremas, pomadas, parches o vehículos similares adecuados para formas de dosificación transdérmicas y tópicas.

Dosis en el intervalo de 0,5 mg a 10 mg al día de los API se pueden utilizar para la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 1 según la presente invención. En una realización, se administra 2AMD al sujeto en dosis que varían de 100 pg a 500 pg por kilogramo de peso corporal. En otras realizaciones, se administra 2AMD al sujeto en dosis que varían de 200-300 pg/kg de peso corporal. En otras realizaciones, se administra 2MD al sujeto en dosis que varían de aproximadamente 0,1-5 ng/kg de peso corporal, mientras que en otras realizaciones, se administra 2MD en dosis que varían de aproximadamente 0,3-0,7 ng/kg de peso corporal o 0,5 ng/kg de peso corporal. Tales dosis y regímenes de dosificación se pueden ajustar para adaptarse a la gravedad o la progresión de la enfermedad, la predisposición/el riesgo/la sensibilidad del paciente y otros criterios conocidos.

Los sistemas portadores orales farmacéuticamente adecuados (también denominados sistemas de aporte de fármacos, que son una tecnología moderna, distribuidos con o como parte de un producto farmacológico que permite la liberación uniforme o la orientación de fármacos al cuerpo) incluyen preferiblemente ingredientes inactivos aprobados por la FDA y/o aprobados por la USP. Bajo 21 CFR 210,3(b)(8), un ingrediente inactivo es cualquier componente de un producto farmacológico diferente del ingrediente activo. Según 21 CFR 210,3(b)(7), un ingrediente activo es cualquier componente de un producto farmacológico destinado a proporcionar una actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, la cura, la mitigación, el tratamiento o la prevención de una enfermedad, o para afectar a la estructura o cualquier función del cuerpo de seres humanos u otros animales. Los ingredientes activos incluyen los componentes del producto que pueden sufrir un cambio químico durante la fabricación del producto farmacéutico y estar presentes en el producto farmacéutico en una forma modificada destinada a proporcionar la actividad o el efecto específicos. Según se utiliza en la presente memoria, un estuche ("kit") (también denominado una forma de dosificación) es un conjunto envasado de material relacionado.

Administración.

Según se utiliza en la presente memoria, la forma de dosificación oral incluye cápsulas, una forma de dosificación oral sólida que consiste en una envuelta y un relleno, en donde la envuelta está compuesta por una sola cubierta sellada, o dos mitades que se ajustan entre sí y que a veces se sellan con una banda, y en donde las envueltas de la cápsula pueden estar hechas de gelatina, almidón o celulosa, u otros materiales adecuados, pueden ser blandas o duras, y están rellenas de ingredientes sólidos o líquidos que se pueden verter o exprimir. La forma de dosificación oral también puede ser una cápsula o pellas revestidas, en las que el fármaco está encerrado en un depósito o "envuelta" soluble bien duro o bien blando hecho de una forma de gelatina adecuada. El propio fármaco puede estar en forma de gránulos a los que se han aplicado cantidades variables de revestimiento o en una cápsula revestida de liberación prolongada, en la que el fármaco está encerrado en un depósito o "envuelta" soluble bien duro o bien blando hecho de una forma de gelatina adecuada. Adicionalmente, la cápsula puede estar cubierta en un revestimiento diseñado que libera un fármaco o fármacos de tal modo que permita al menos una reducción en la frecuencia de dosificación en comparación con la de ese fármaco o fármacos presentados como una forma de dosificación convencional.

La forma de dosificación oral puede ser además una cápsula de liberación retardada, en la que el fármaco está encerrado dentro de un depósito soluble bien duro o bien blando hecho de una forma de gelatina adecuada, y que libera un fármaco (o fármacos) en un momento diferente a inmediatamente después de la administración, en donde los artículos revestidos entéricamente son formas de dosificación de liberación retardada. También son útiles pellas de cápsula de liberación retardada, en las que el fármaco está encerrado dentro de un depósito o "envuelta" soluble bien duro o bien blando hecho de una forma de gelatina adecuada. En estos casos, el propio fármaco está en la forma de gránulos a los que se ha aplicado un revestimiento entérico, retardando así la liberación del fármaco hasta su paso a los intestinos. También son útiles una cápsula de liberación prolongada y una cápsula de liberación prolongada revestida con película.

Adicionalmente, la cápsula está cubierta en un revestimiento pelicular diseñado, y que libera un fármaco o fármacos de tal modo que se permita al menos una reducción en la frecuencia de dosificación en comparación con ese fármaco o fármacos presentados como una forma de dosificación convencional, una cápsula revestida con gelatina (una forma de dosificación sólida en la que el fármaco está encerrado dentro de un depósito soluble bien duro o bien blando hecho de una forma de gelatina adecuada; a través de un procedimiento de aplicación de una banda, la cápsula se reviste con capas adicionales de gelatina a fin de formar una selladura completa), una cápsula rellena de líquido (una forma de dosificación sólida en la que el fármaco está encerrado en una envuelta de gelatina soluble que se plastifica mediante la adición de un poliol, tal como sorbitol o glicerina, y por lo tanto es de una consistencia algo más espesa que la de una cápsula de gelatina dura).

Típicamente, los ingredientes activos se disuelven o suspenden en un vehículo líquido, un gránulo (una partícula o grano pequeño), una pella (una pequeña masa sólida estéril que consiste en un fármaco altamente purificado, con o sin excipientes, elaborada mediante la formación de gránulos, o mediante compresión y moldeo), pellas revestidas de liberación prolongada (una forma de dosificación sólida en la que el propio fármaco está en la forma de gránulos a los que se han aplicado cantidades variables de revestimiento, y que libera un fármaco o fármacos de tal modo que se permita una reducción en la frecuencia de dosificación en comparación con ese fármaco o fármacos presentados como una forma de dosificación convencional).

Otras formas incluyen píldoras (una pequeña forma de dosificación sólida redonda que contiene un agente medicinal

destinado a la administración oral), un polvo (una mezcla íntima de fármacos y/o productos químicos secos finamente divididos que pueden estar destinados a uso interno o externo), un elixir (un líquido hidroalcohólico transparente edulcorado de sabor agradable que contiene agentes medicinales disueltos; está destinado al uso oral), una goma de mascar (un material plástico insoluble edulcorado y aromatizado de diversas conformaciones que cuando se mastica libera una sustancia farmacológica en la cavidad oral), un jarabe (una solución oral que contiene altas concentraciones de sacarosa u otros azúcares; el término también se ha utilizado para incluir cualquier otra forma de dosificación líquida preparada en un vehículo dulce y viscoso, incluyendo suspensiones orales), un comprimido (una forma de dosificación sólida que contiene sustancias medicinales con o sin diluyentes adecuados), un comprimido masticable (una forma de dosificación sólida que contiene sustancias medicinales con o sin diluyentes adecuados que está destinada a ser mascada, produciendo un residuo de sabor agradable en la cavidad que se traga fácilmente y no deja un regusto amargo o desagradable), un comprimido revestido o un comprimido de liberación retardada, un comprimido dispersable, un comprimido efervescente, un comprimido de liberación prolongada, un comprimido revestido con película, o un comprimido de liberación prolongada revestido con película donde el comprimido se formula de tal modo que haga disponible el medicamento contenido a lo largo de un período de tiempo prolongado después de la ingestión.

En otras formas, se puede proporcionar un comprimido para solución, un comprimido para suspensión, un comprimido de múltiples capas, un comprimido de múltiples capas de liberación prolongada, donde el comprimido se formula de tal modo que permita al menos una reducción en la frecuencia de dosificación en comparación con ese fármaco presentado como una forma de dosificación convencional. También son adecuados un comprimido que se desintegra oralmente, un comprimido de liberación retardada que se desintegra oralmente, un comprimido soluble, un comprimido osmótico revestido con azúcar y similares.

La composición de la forma de dosificación oral contiene un ingrediente farmacéutico activo y uno o más ingredientes farmacéuticos inactivos tales como diluyentes, solubilizantes, alcoholes, aglutinantes, polímeros de liberación controlada, polímeros entéricos, desintegrantes, excipientes, colorantes, saborizantes, edulcorantes, antioxidantes, conservantes, pigmentos, aditivos, cargas, agentes de suspensión, tensioactivos (p. ej., aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos) y similares. Diversos ingredientes inactivos tópicos aprobados por la FDA se encuentran en "The Inactive Ingredients Database" de la FDA que contiene ingredientes inactivos específicamente destinados como tales por el fabricante, en donde los ingredientes inactivos también se pueden considerar ingredientes activos bajo ciertas circunstancias, según la definición de un ingrediente activo dada en 21 CFR 210,3(b)(7). El alcohol es un buen ejemplo de un ingrediente que se puede considerar bien activo o bien inactivo dependiendo de la formulación del producto.

Según se utiliza en la presente memoria, las formas de dosificación inyectables y de infusión incluyen, pero no se limitan a, un producto inyectable liposómico, que bien consiste en o bien forma liposomas (una vesícula de bicapa lipídica compuesta habitualmente por fosfolípidos que se utiliza para encapsular una sustancia farmacológica activa). También es adecuada una inyección, que incluye una preparación estéril destinada al uso parenteral; existen cinco clases distintas de inyecciones según se define por la USP. También son adecuadas una emulsión para inyección, que incluye una emulsión que consiste en una preparación estéril libre de pirógenos destinada a ser administrada parenteralmente o un complejo lipídico para inyección.

Otras formas incluyen un polvo para una solución para inyección, que es una preparación estéril destinada a la reconstitución para formar una solución para uso parenteral; un polvo para una suspensión para inyección, que es una preparación estéril destinada a la reconstitución para formar una suspensión para uso parenteral; un polvo liofilizado para una suspensión liposómica para inyección, que es una preparación estéril secada por congelación destinada a la reconstitución para uso parenteral que se ha formulado de un modo que permite que se formen liposomas (una vesícula de bicapa lipídica compuesta habitualmente por fosfolípidos que se utiliza para encapsular una sustancia farmacológica activa, bien dentro de una bicapa lipídica o bien en un espacio acuoso) durante la reconstitución; un polvo liofilizado para una solución para inyección, que es una forma de dosificación destinada a la solución preparada mediante liofilización ("secado por congelación"), un procedimiento que implica la retirada de agua de los productos en el estado congelado a presiones extremadamente bajas.

Esto está destinado a la adición posterior de un líquido para crear una solución que se adapta en todos los aspectos a los requisitos para las inyecciones; un polvo liofilizado para suspensión que es una preparación líquida, destinada a uso parenteral, que contiene sólidos suspendidos en un medio fluido adecuado y se adapta en todos los aspectos a los requisitos para las suspensiones estériles; los agentes medicinales destinados a la suspensión se preparan mediante liofilización ("secado por congelación"), un procedimiento que implica la retirada de agua de los productos en el estado congelado a presiones extremadamente bajas; una solución para inyección que es una preparación líquida que contiene una o más sustancias farmacológicas disueltas en un disolvente adecuado o una mezcla de disolventes mutuamente miscibles que es adecuada para inyección; una solución concentrada para inyección que es una preparación estéril para uso parenteral que, al añadir disolventes adecuados, da una solución que se adapta en todos los aspectos a los requisitos para las inyecciones.

Una suspensión para inyección comprende una preparación líquida, adecuada para inyección, que consiste en partículas sólidas dispersadas a fondo en una fase líquida en la que las partículas no son solubles, que puede consistir además en una fase oleosa dispersada a fondo en una fase acuosa, o viceversa. Una suspensión

- liposómica para inyección comprende una preparación líquida, adecuada para inyección, que consiste en una fase oleosa dispersada a fondo en una fase acuosa de tal modo que se formen liposomas (una vesícula de bicapa lipídica compuesta habitualmente por fosfolípidos que se utiliza para encapsular una sustancia farmacológica activa, bien dentro de una bicapa lipídica o bien en un espacio acuoso). Una suspensión para inyección tratada con ultrasonidos
- 5 comprende una preparación líquida, adecuada para inyección, que consiste en partículas sólidas dispersadas a fondo en una fase líquida en la que las partículas no son solubles. Además, el producto se trata con ultrasonidos mientras se burbujea un gas a través de la suspensión, y esto da como resultado la formación de microsferas por las partículas sólidas.
- 10 El sistema portador parenteral incluye uno o más excipientes farmacéuticamente adecuados, tales como disolventes y codisolventes, agentes solubilizantes, agentes humectantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, agentes emulsionantes, agentes quelantes, tampones, ajustadores del pH, antioxidantes, agentes reductores, conservantes antimicrobianos, agentes volumétricos, protectores, ajustadores de la tonicidad y aditivos especiales. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación oleosa o acuosa estéril del ingrediente activo que preferiblemente es isotónica con la sangre del receptor.
- 15 Según se utiliza en la presente memoria, formas de dosificación por inhalación incluyen, pero no se limitan a, un aerosol, que es un producto que está envasado bajo presión y contiene ingredientes terapéuticamente activos que se liberan al activar un sistema de válvula apropiado destinado a la aplicación tópica a la piel así como a la aplicación local en la nariz (aerosoles nasales), la boca (aerosoles linguales y sublinguales) o los pulmones (aerosoles de inhalación); un aerosol de espuma, que es una forma de dosificación que contiene uno o más
- 20 ingredientes activos, tensioactivos, líquidos acuosos o no acuosos y los propelentes, en donde si el propelente está en la fase interna (discontinua) (es decir, del tipo de aceite en agua), se descarga una espuma estable, y si el propelente está en la fase externa (continua) (es decir, del tipo de agua en aceite), se descarga una pulverización o una espuma de ruptura rápida; un aerosol medido, que es una forma de dosificación presurizada que consiste en válvulas de dosis medida que permiten el aporte de una cantidad uniforme de pulverización con cada activación; un aerosol de polvo, que es un producto que está envasado bajo presión y contiene ingredientes terapéuticamente
- 25 activos, en forma de polvo, que se liberan al activar un sistema de válvula apropiado; y una pulverización de aerosol, que es un producto de aerosol que utiliza un gas comprimido como un propelente para proporcionar la fuerza necesaria para expeler el producto como una pulverización húmeda y que es aplicable a soluciones de agentes medicinales en disolventes acuosos.
- 30 Según se utiliza en la presente memoria, una forma de dosificación transdérmica incluye, pero no se limita a, un parche, que es un sistema de aporte de fármacos que contiene a menudo un soporte adhesivo que se aplica habitualmente a una zona externa del cuerpo, en donde los ingredientes bien se difunden pasivamente desde o bien se transportan activamente desde alguna porción del parche, y en donde, dependiendo del parche, los ingredientes se aportan bien a la superficie externa del cuerpo o bien dentro del cuerpo; y otros tipos diversos de parches
- 35 transdérmicos tales como de matriz, reserva y otros conocidos en la técnica.
- Según se utiliza en la presente memoria, la forma de dosificación tópica incluye diversas formas de dosificación conocidas en la técnica tales como lociones (una forma de dosificación líquida en emulsión, en donde esta forma de dosificación es generalmente para aplicación externa a la piel), una loción aumentada (una forma de dosificación de loción que potencia el aporte de fármaco, en donde el aumento no se refiere a la concentración del fármaco en la
- 40 forma de dosificación), geles (una forma de dosificación semisólida que contiene un agente gelificante para proporcionar solidez a una solución o una dispersión coloidal, en donde el gel puede contener partículas suspendidas) y pomadas (una forma de dosificación semisólida, que contiene habitualmente <20% de agua y materias volátiles y >50% de hidrocarburos, ceras o polioles como el vehículo, en donde esta forma de dosificación es generalmente para aplicación externa a la piel o las membranas mucosas).
- 45 Una pomada aumentada (una forma de dosificación de pomada que potencia el aporte de fármaco, en donde el aumento no se refiere a la concentración del fármaco en la forma de dosificación), cremas (una forma de dosificación semisólida en emulsión, que contiene habitualmente > 20% de agua y materias volátiles y/o < 50% de hidrocarburos, ceras o polioles también se puede utilizar como el vehículo, en donde esta forma de dosificación es generalmente para aplicación externa a la piel o las membranas mucosas). También son adecuados una crema
- 50 aumentada (una forma de dosificación en crema que potencia el aporte de fármaco, en donde el aumento no se refiere a la concentración del fármaco en la forma de dosificación), emulsiones (una forma de dosificación que consiste en un sistema bifásico comprendido por al menos dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales está dispersado como gotículas, fase interna o dispersada, dentro de otro líquido, fase externa o continua, generalmente estabilizado con uno o más agentes emulsionantes, en donde emulsión se utiliza como un término de forma de dosificación a menos que sea aplicable un término más específico, p. ej. crema, loción, pomada), suspensiones (una
- 55 forma de dosificación líquida que contiene partículas sólidas dispersadas en un vehículo líquido), una suspensión de liberación prolongada, pastas (una forma de dosificación semisólida, que contiene una gran proporción, 20 - 50%, de sólidos finamente dispersados en un vehículo graso, en donde esta forma de dosificación es generalmente para aplicación externa a la piel o las membranas mucosas), soluciones (una forma de dosificación líquida homogénea transparente que contiene una o más sustancias químicas disueltas en un disolvente o una mezcla de disolventes mutuamente miscibles), y polvos.
- 60

A menudo se utilizan champús (una forma de dosificación de loción que tiene un jabón o detergente que habitualmente se utiliza para lavar el cabello y el cuero cabelludo) como un vehículo para agentes dermatológicos. Por ejemplo, a menudo se utilizan suspensiones de champú (un jabón o detergente líquido que contiene una o más sustancias sólidas insolubles dispersadas en un vehículo líquido que se utiliza a menudo para lavar el cabello y el

5 cuero cabelludo y se utiliza a menudo como un vehículo para agentes dermatológicos). También son adecuados espumas de aerosol (es decir, una forma de dosificación que contiene uno o más ingredientes activos, tensioactivos, líquidos acuosos o no acuosos y los propelentes; si el propelente esta en la fase discontinua interna, es decir, del tipo de aceite en agua, se descarga una espuma estable, y si el propelente está en la fase continua externa, es decir, del tipo de agua en aceite, se descarga una pulverización o una espuma de ruptura rápida), pulverizaciones

10 (un líquido muy dividido, por ejemplo por un chorro de aire o vapor de agua), una pulverización medida (una forma de dosificación no presurizada que consiste en válvulas que permiten suministrar una cantidad especificada de pulverización con cada activación) y una pulverización de suspensión (una preparación líquida que contiene partículas sólidas dispersadas en un vehículo líquido y en la forma de gotículas gruesas o como sólidos finamente divididos para ser aplicados localmente, lo más habitualmente al tracto nasofaríngeo, o tópicamente a la piel).

15 También son adecuadas las jaleas (una clase de geles, que son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones constituidas bien por pequeñas partículas inorgánicas o bien por grandes moléculas orgánicas interpenetradas por un líquido - en los que la matriz coherente estructural contiene una gran proporción de líquido, habitualmente agua) y las películas (una capa o revestimiento delgado), incluyendo una película de liberación prolongada (un sistema de aporte de fármacos en la forma de una película que libera el fármaco a lo largo de un período prolongado de tal modo que se mantengan los niveles de fármaco constantes en la sangre o el tejido

20 elegido) y una película soluble (una capa o revestimiento delgado que es susceptible de ser disuelto cuando entra en contacto con un líquido).

También son adecuadas las esponjas (un material absorbente entrelazado poroso que contiene un fármaco, que se utiliza típicamente para aplicar o introducir medicación, o para limpieza, y en donde una esponja habitualmente

25 retiene su conformación), torundas (un pequeño trozo de material absorbente relativamente plano que contiene un fármaco, en donde una torunda también puede estar unida a un extremo de un palito, y en donde una torunda se utiliza típicamente para aplicar una medicación o para limpieza).

También son adecuados los parches (un sistema de aporte de fármacos que a menudo contiene un soporte adhesivo que habitualmente se aplica a una zona externa del cuerpo, en donde sus ingredientes bien se difunden pasivamente desde o bien se transportan activamente desde alguna porción del parche, en donde, dependiendo del parche, los ingredientes se aportan bien a la superficie externa del cuerpo o bien al cuerpo, y en donde un parche a veces es sinónimo de los términos 'película de liberación prolongada' y 'sistema'), un parche de liberación

30 prolongada (un sistema de aporte de fármacos en la forma de un parche que libera el fármaco de tal modo que permita una reducción en la frecuencia de dosificación en comparación con ese fármaco presentado como una forma de dosificación convencional, p. ej., una solución o una forma de dosificación sólida convencional de liberación

35 de fármaco inmediata), un parche de liberación prolongada controlado electrónicamente (un sistema de aporte de fármacos en la forma de un parche que está controlado por una corriente eléctrica que libera el fármaco de tal modo que permita una reducción en la frecuencia de dosificación en comparación con ese fármaco presentado como una forma de dosificación convencional, p. ej., una solución o una forma de dosificación sólida convencional de liberación

40 de fármaco inmediata), y similares. Las diversas formas de dosificación tópicas también se pueden formular como liberación inmediata, liberación controlada, liberación sostenida o similares.

La composición de la forma de dosificación tópica contiene un ingrediente farmacéutico activo y uno o más ingredientes farmacéuticos inactivos tales como excipientes, colorantes, pigmentos, aditivos, cargas, emolientes, tensioactivos (p. ej., aniónicos, catiónicos, anfóteros o no iónicos), potenciadores de la penetración (p. ej., alcoholes, alcoholes grasos, ácidos grasos, ésteres de ácido graso y polioles) y similares. Diversos ingredientes inactivos

45 tópicos aprobados por la FDA se encuentran en "The Inactive Ingredients Database" de la FDA que contiene ingredientes inactivos destinados específicamente como tales por el fabricante, en donde los ingredientes inactivos también se pueden considerar ingredientes activos bajo ciertas circunstancias, según la definición de un ingrediente activo dada en 21 CFR 210,3(b)(7). El alcohol es un buen ejemplo de un ingrediente que se puede considerar bien

50 activo o bien inactivo dependiendo de la formulación del producto.

Aunque se divulgan múltiples realizaciones, otras realizaciones adicionales de la presente invención se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada. Como será evidente, la invención es capaz de modificaciones en diversos aspectos obvios, todo sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención. Según esto, la descripción detallada de los nuevos métodos de la presente invención se ha de

55 considerar de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

Ejemplos

Por supuesto, los siguientes ejemplos se ofrecen solamente con propósitos ilustrativos, y no están destinados a limitar de ningún modo el alcance de la presente invención. En efecto, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria se harán evidentes para los expertos en la técnica a

60 partir de la descripción precedente y los siguientes ejemplos y están dentro del alcance de las reivindicaciones

adjuntas.

Ejemplo 1: Estudio de la prevención de diabetes tipo 1 con 2AMD.

En este ejemplo, los inventores muestran el efecto de 2AMD sobre la prevención del desarrollo de diabetes tipo 1 en ratones NOD.

5 Dieta. Parejas reproductoras se alimentaron con LabDiet™ Mouse Diet 5010 ad libitum (PMI Nutrition International, St. Louis, MO). Ratones experimentales se alimentaron con la forma de alimento LabDiet™ Mouse Diet 5K52 (PMI Nutrition International, St. Louis, MO). Las crías hembra se destetaron a las tres semanas y se les administró inmediatamente la dieta 5010. A las ocho semanas de edad, a los ratones se les administró 1 de 4 dietas experimentales: 1) pienso estándar, 2) 5010 + 50 ng de 1,25(OH)₂D₃ o 3) 5010 + 200 pg y 4) 5010 + 300 pg de 2AMD. En las dietas/tratamientos que contenían 1,25(OH)₂D₃ o 2AMD, la hormona se añadió a aceite Wesson® al 1% y se mezcló en la dieta. Las dietas se administraron en copas para alimento en 3,5 g de alimento/ratón/día y se reemplazaron 3 veces a la semana.

15 Evaluación del estado diabético. Todos los ratones experimentales se pesaban semanalmente y se realizaba semanalmente un urianálisis empezando a las 10 semanas de edad -- se utilizaron Diastix® (Bayer, Elkhart, IN) para determinar los niveles de glucosa. Si una lectura de Diastix® estaba por encima de 1.000 mg/dl, los ratones se sangraban desde el maxilar después de un ayuno de 4 horas. La sangre entera se centrifugó para obtener suero. La concentración de glucosa en suero se midió utilizando un ensayo enzimático-colorimétrico (Glucose Liquicolor®, Stanbio Laboratory, Boerne, TX) seguido por análisis espectrofotométrico. Los animales que tenían dos análisis de glucosa en ayunas por encima de 300 mg/dl se diagnosticaron como diabéticos y se sacrificaron a través de asfixia con CO₂.

20 Análisis de calcio sérico. Se extrajo sangre del maxilar de cada ratón semanalmente desde las 8 semanas hasta los 200 días de edad. El suero se separó mediante centrifugación y se diluyó 1:40 en una solución de LaCl₂ al 0,1%. La concentración de calcio se determinó mediante espectrometría de absorción atómica (Spectrometer 3110®, Perkin Elmer, Norwalk, CT).

25 Resultados. La incidencia de la diabetes tipo 1 en el grupo de 5010 era 64% (7/11). Los ratones NOD alimentados con 50 ng de 1,25(OH)₂D₃ en la dieta 5010 al día estaban completamente protegidos contra T1DM. Sin embargo, los valores de calcio sérico eran elevados con 12 mg/dl. Los ratones NOD alimentados con dos dosis de 200 pg y 300 pg de 2AMD daban como resultado una incidencia de la enfermedad de 8% (1/12) sin hipercalcemia. El peso no era alterado por 2AMD, mientras que 1,25(OH)₂D₃ disminuía el peso del ratón (probablemente debido a la hipercalcemia).

30 Ejemplo 2: Estudio de la prevención de diabetes tipo 1 con 2MD.

En este ejemplo, los inventores muestran el efecto de 2MD sobre la prevención del desarrollo de diabetes tipo 1 en ratones NOD.

35 Dieta. Parejas reproductoras se mantuvieron con LabDiet Mouse Diet 5015 (PMI Nutrition International, St. Louis, MO) que contenía 0,8% de calcio y 3,3 UI de vitamina D₃/g de dieta. Las crías hembra se destetaron a las tres semanas y se les administró inmediatamente dieta purificada (Suda et al., 1974, J. Nutr. 100: 1049-1052). A las ocho semanas de edad, a los ratones se les suministró 1 de 4 dietas experimentales: dieta 11 solo o dieta 11 + 50 ng de 1,25(OH)₂D₃, dieta 11 más 400 ng de 2MP o dieta 11 + 500 pg de 2MD. Todas las dietas purificadas se complementaron con aceite vegetal que contenía vitaminas A, E, D y K solubles en grasa (Suda et al., 1970, J. Nutr. 100: 1049-1052 [dieta 11]). En las dietas que contenían 1,25(OH)₂D₃, 2MP o 2MD, los compuestos se añadieron a aceite Wesson® al 1% y se mezclaron en la dieta purificada. Las dietas se administraron en forma de agar (Hayes et al., 1987, J. Nutr. 117:857-865) en 3,5 g de alimento/ratón/día y se reemplazaron 3 veces a la semana.

45 Evaluación del estado diabético. Todos los ratones experimentales se pesaban semanalmente y se realizaba semanalmente un urianálisis empezando a las 10 semanas de edad -- se utilizaron Diastix® (Bayer, Elkhart, IN) para determinar los niveles de glucosa. Si una lectura de Diastix® estaba por encima de 1.000 mg/dl, los ratones se sangraban desde el maxilar después de un ayuno de cuatro horas. La sangre entera se centrifugó para obtener suero. La concentración de glucosa en suero se midió utilizando un ensayo enzimático-colorimétrico (Glucose Liquicolor®, Stanbio Laboratory, Boerne, TX) seguido por análisis espectrofotométrico. Los animales que tenían dos análisis de glucosa en ayunas por encima de 300 mg/dl se diagnosticaron como diabéticos y se sacrificaron a través de asfixia con CO₂.

50 Análisis del calcio sérico. Se extrajo sangre del maxilar de cada ratón a las 6, 8, 9, 14,3, 15,3 y 28,6 semanas de edad. El suero se separó mediante centrifugación y se diluyó 1:40 en una solución de LaCl₂ al 0,1%. La concentración de calcio se determinó mediante espectrometría de absorción atómica (Spectrometer 3110®, Perkin Elmer, Norwalk, CT).

55 Resultados. Como se esperaba, los ratones NOD de control que recibían la dieta 11 mostraban una incidencia del 30% de diabetes. Ni siquiera a 400 ng, la 2MP proporcionaba protección contra la diabetes, mientras que 50 ng/día

de 1,25(OH)₂D₃ y 0,5 ng/día de 2MD (Figura 4) prevenían la diabetes. Todos los animales crecían igualmente bien independientemente del compuesto de vitamina D específico. Se encontró hipercalcemia en los ratones a los que se les daba 1,25(OH)₂D₃, mientras que se encontró un aumento moderado del calcio en aquellos a los que se les daban 0,5 ng de 2MD y 400 ng de 2MP (Tabla 2 y Figura 6).

5

Tabla 1. Incidencia de diabetes tipo 1.

Tratamiento	Incidencia
Dieta 11 (n=24)	29,2%
50 ng de 1,25 (n=24)	4,2%
400 ng de 2MP (n=12)	33,0%
0,5 ng de 2MD (n=12)	0,0

Tabla 2. Niveles de calcio sérico.

Pesos					Calcio				
Edad (Semanas)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 8	Grupo 10	Edad (semanas)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 8	Grupo 10
	Purificado	50 ng 1,25	0,5 ng 2MD	400 ng 2MP		Purificado	50 ng 1,25	0,5 ng 2MD	400 ng 2MP
3	12,92	12,46	13,33	13,60	6	9,80	12,15	11,42	11,57
6	21,75	20,46	21,87	22,03	8	9,58	12,32	11,45	11,57
8	23,20	22,52	23,78	23,74	9	9,38	12,67	11,55	11,55
9	24,10	23,63	24,94	24,63	14,3	9,52	12,82	11,52	11,62
14,3	27,28	25,02	27,85	26,30	15,3	9,80	12,35	11,33	11,77
15,3	27,55	25,06	27,82	26,81	28,6	9,58	12,75	11,37	11,66
28,6	30,39	25,85	29,51	27,64					
Desviación estándar (peso)					Desviación estándar (calcio)				
3	1,96	1,72	2,11	2,22	3	na	na	na	na
6	2,15	1,27	1,40	2,20	6	0,36	0,53	0,40	0,39
8	2,68	1,62	1,74	2,15	8	0,23	0,81	0,45	0,65
9	2,56	1,97	2,01	2,10	9	0,52	0,76	0,44	0,48
14,3	2,46	2,19	1,92	2,12	14,3	1,01	0,96	0,38	0,62
15,3	2,40	2,17	2,20	1,85	15,3	0,23	1,73	0,36	0,58
28,6	3,28	1,97	2,81	1,96	28,6	0,27	0,77	0,45	0,34
EEM (peso)					EEM (calcio)				
3	0,565	0,497	0,609	0,641	6	0,104	0,152	0,114	0,113
6	0,620	0,367	0,405	0,635	8	0,067	0,234	0,131	0,188
8	0,774	0,468	0,502	0,621	9	0,150	0,221	0,126	0,139
9	0,740	0,567	0,580	0,607	14,3	0,292	0,276	0,109	0,179
14,3	0,710	0,633	0,554	0,611	15,3	0,065	0,499	0,102	0,167
15,3	0,692	0,626	0,634	0,533	28,6	0,078	0,222	0,130	0,098
28,6	0,947	0,569	0,810	0,566					

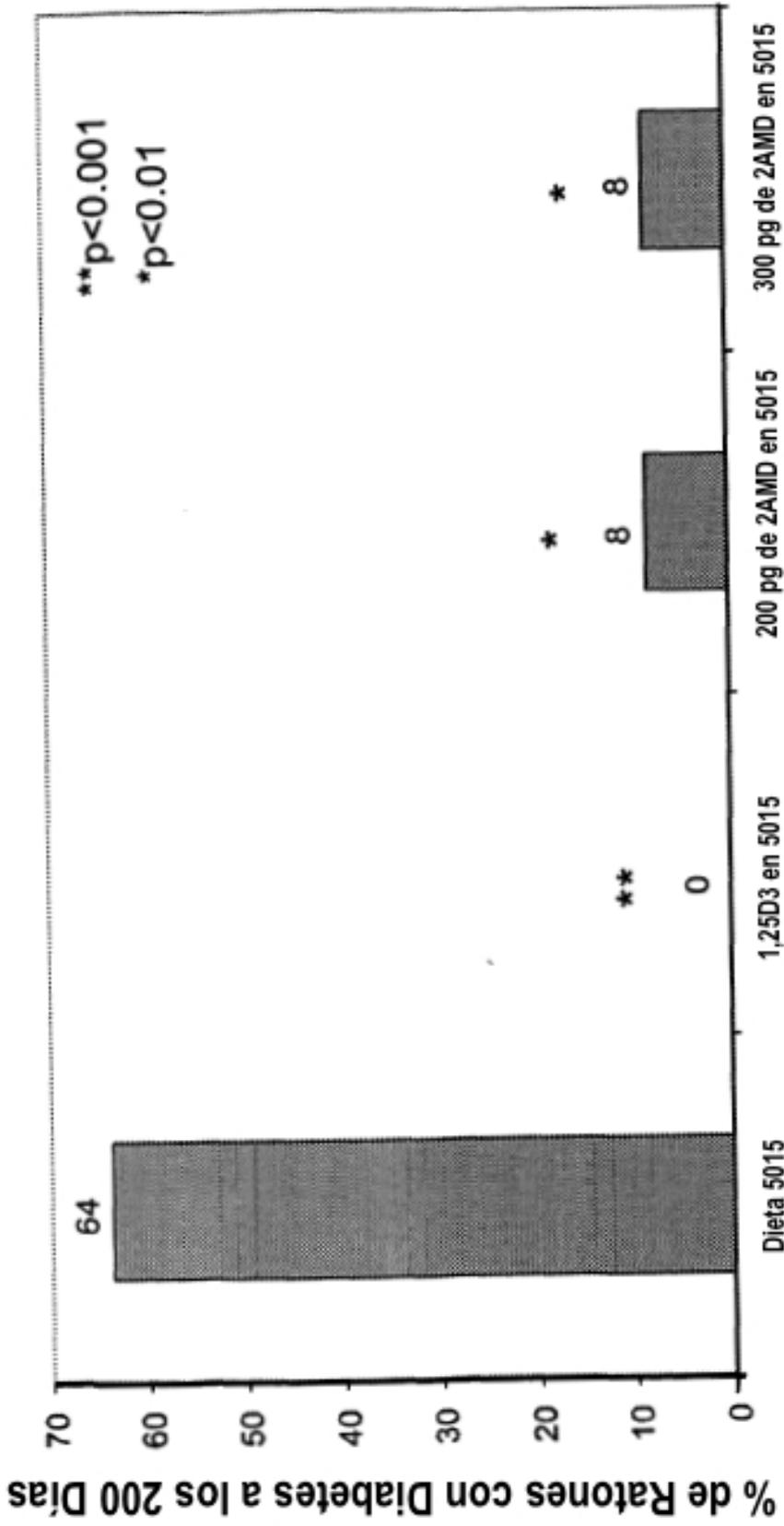
n = 12 para todos los grupos

Se debe apreciar que la descripción anterior, las figuras adjuntas y sus descripciones pretenden ser ilustrativas y no

5 limitativas de esta invención. Muchos temas y variaciones de esta invención serán sugeridos para un experto en esta técnica, a la luz de la divulgación. Todos estos temas y variaciones están dentro de su propósito. Por ejemplo, aunque esta invención se ha descrito junto con las diversas realizaciones ejemplares esbozadas anteriormente, diversas alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales, ya sean conocidos o que se prevean o puedan preverse actualmente, pueden resultar evidentes para los que tengan una experiencia normal en la técnica. Se pueden realizar diversos cambios sin apartarse del alcance de la invención. Por lo tanto, la invención está destinada a abarcar todas las alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales de estas realizaciones ejemplares desarrollados posteriormente.

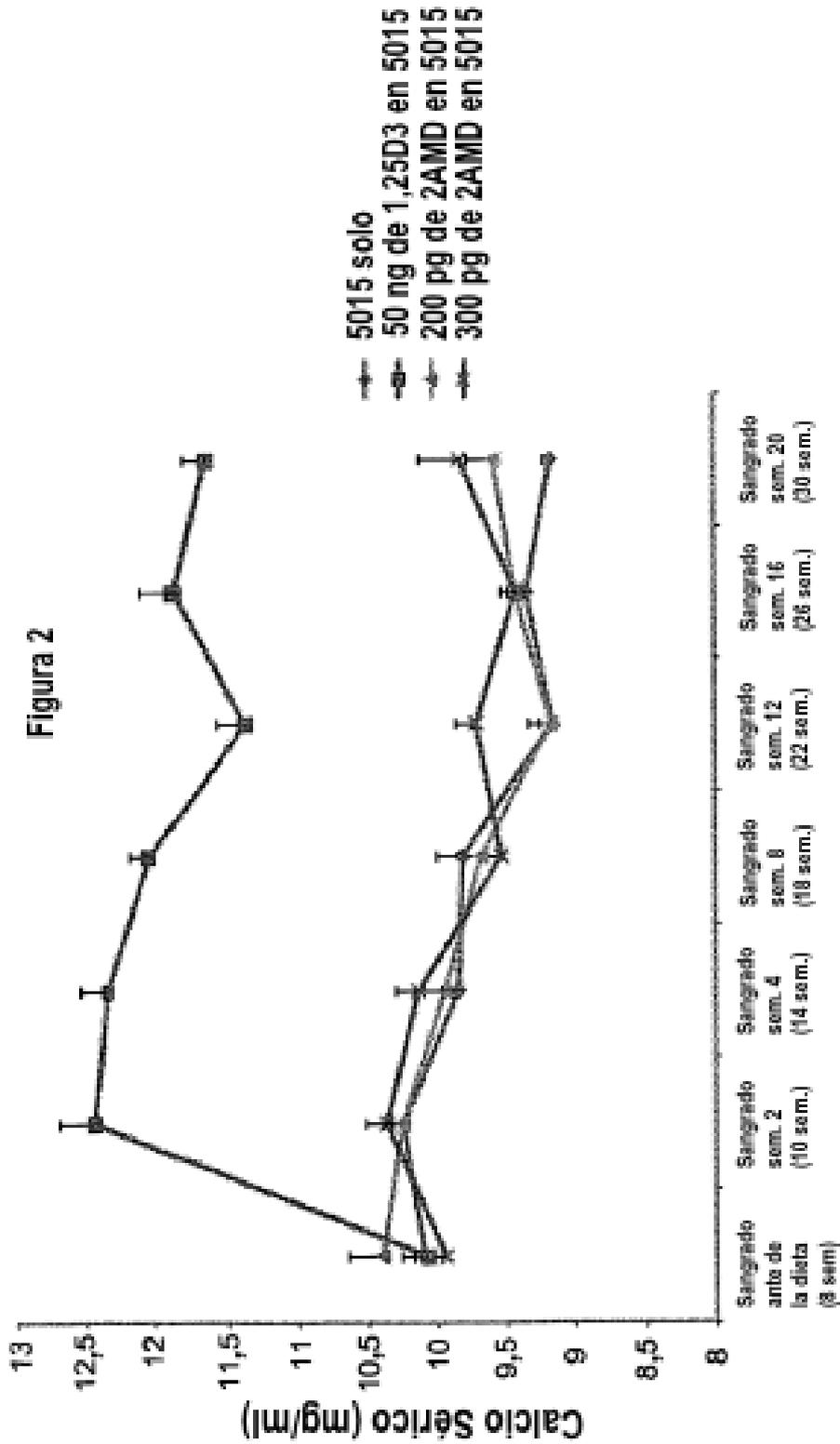
REIVINDICACIONES

1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que es 2 α -metil-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ para la utilización en la prevención de la diabetes tipo 1 en un sujeto con riesgo de desarrollar diabetes tipo 1, en donde se previene el desarrollo de la diabetes tipo 1 en el sujeto sin inducir hipercalcemia en el sujeto.
- 5 2. El compuesto para la utilización según la reivindicación 1, en el que la 2 α -metil-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ se formula en una forma de dosificación oral, tópica, transdérmica, parenteral, de inyección o de infusión.
3. El compuesto para la utilización según la reivindicación 1, en el que cantidad terapéuticamente eficaz varía de 100 pg/día a 500 pg/día.
- 10 4. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que es 2-metilen-19-nor-20(S)-1,25-dihidroxitamina D₃ para la utilización en la prevención de la diabetes tipo 1 en un sujeto con riesgo de desarrollar diabetes tipo 1, en donde se previene el desarrollo de la diabetes tipo 1 en el sujeto sin inducir hipercalcemia en el sujeto.
5. El compuesto para la utilización según la reivindicación 4, en el que la 2-metilen-19-nor-20(S)-1,25-dihidroxitamina D₃ se formula en una forma de dosificación oral, tópica, transdérmica, parenteral, de inyección o de infusión.
- 15 6. El compuesto para la utilización según la reivindicación 4, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz varía de 0,1 ng/día a 5 ng/día.

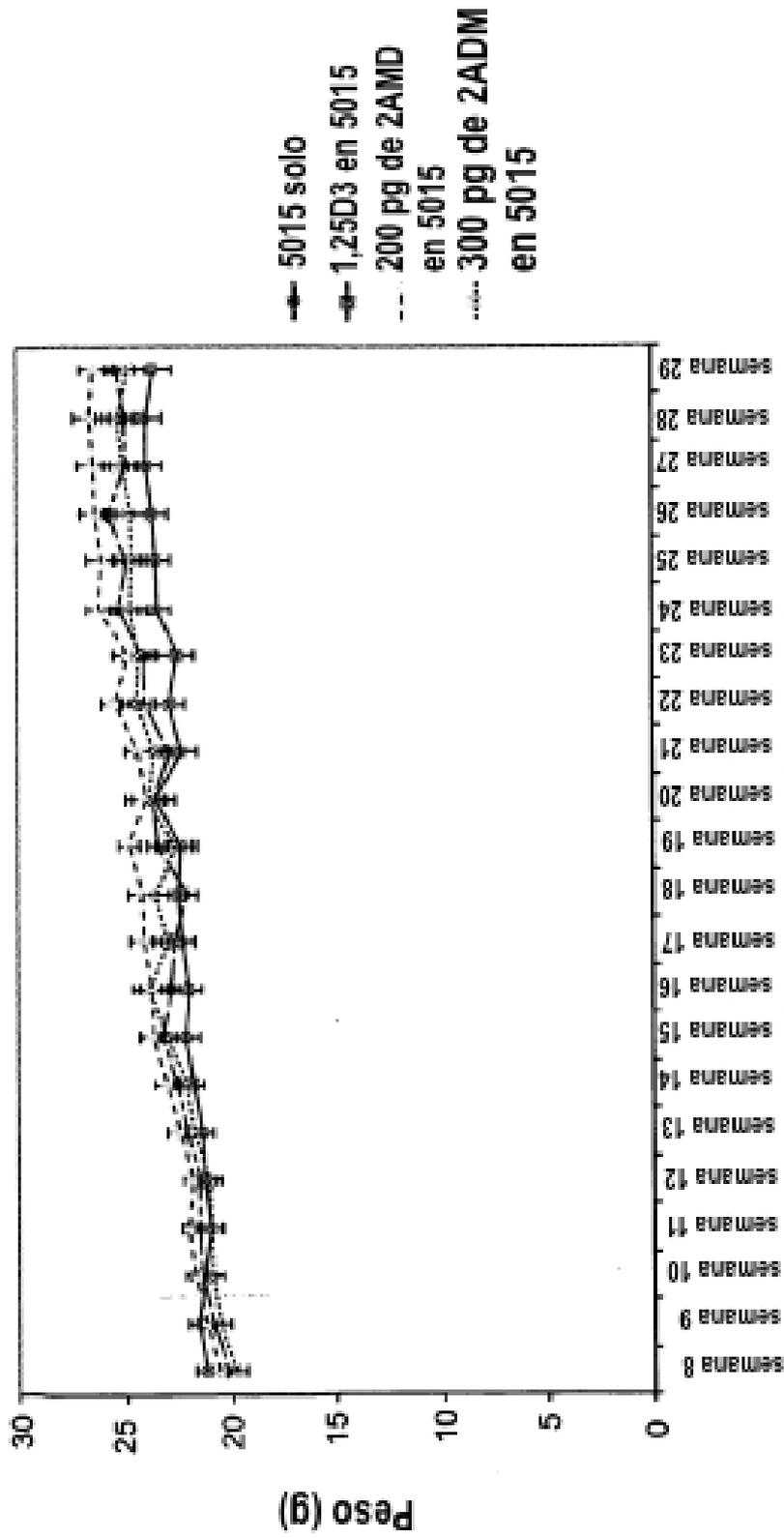


Tratamiento

Figura 1



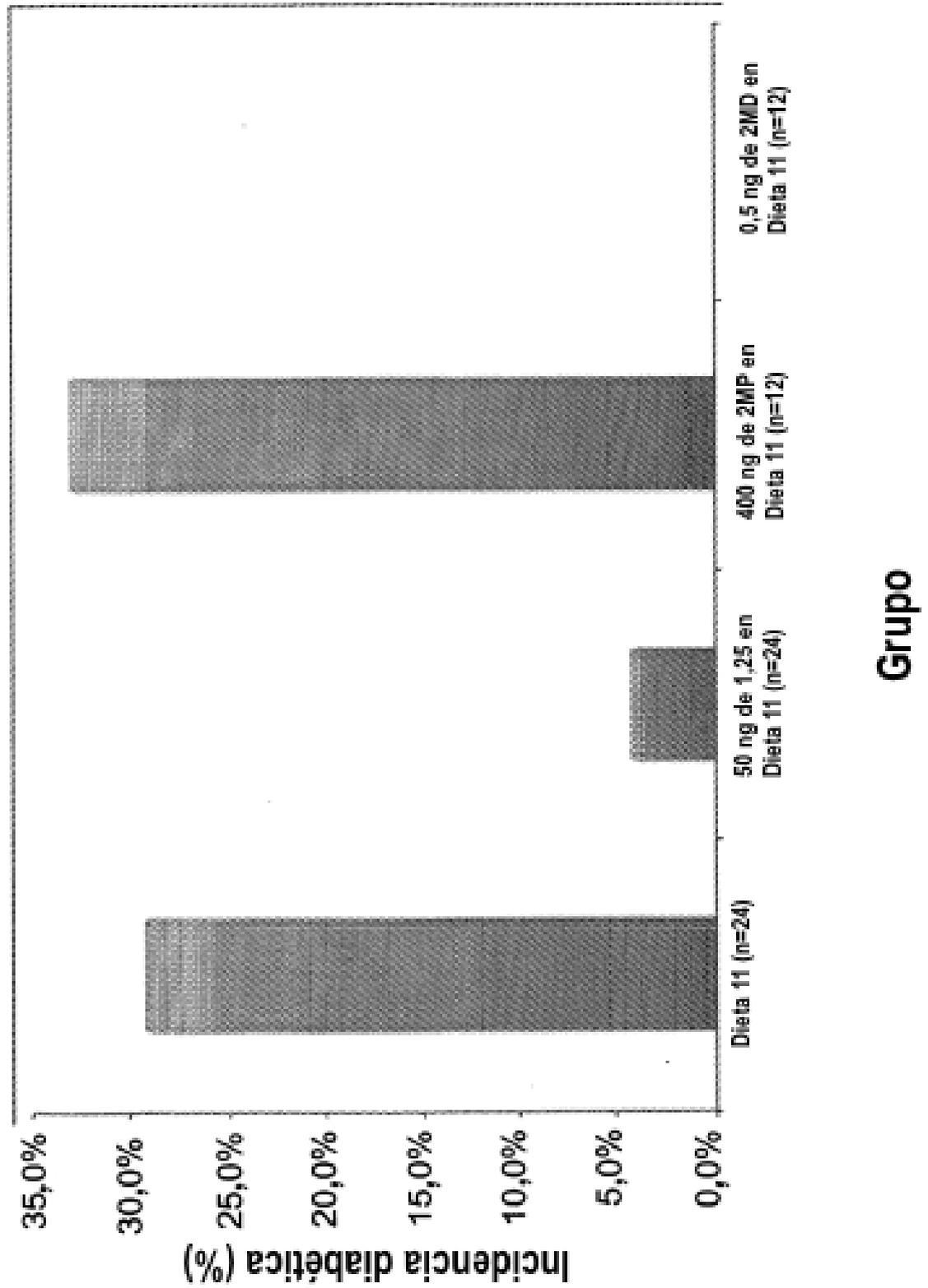
Momentos de sangrado (semanas)



Edad del ratón

Figura 3

Figura 4



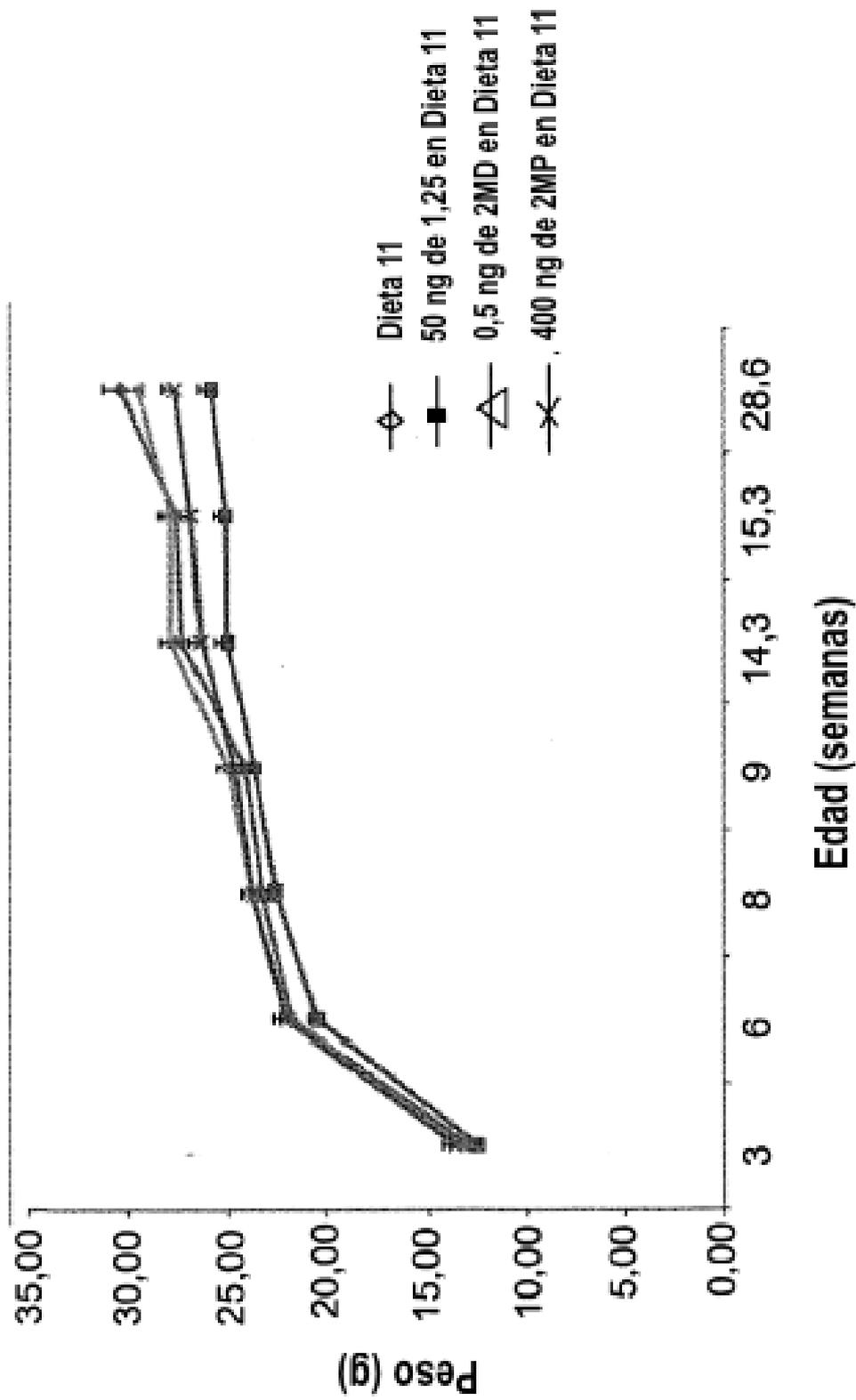


Figura 5

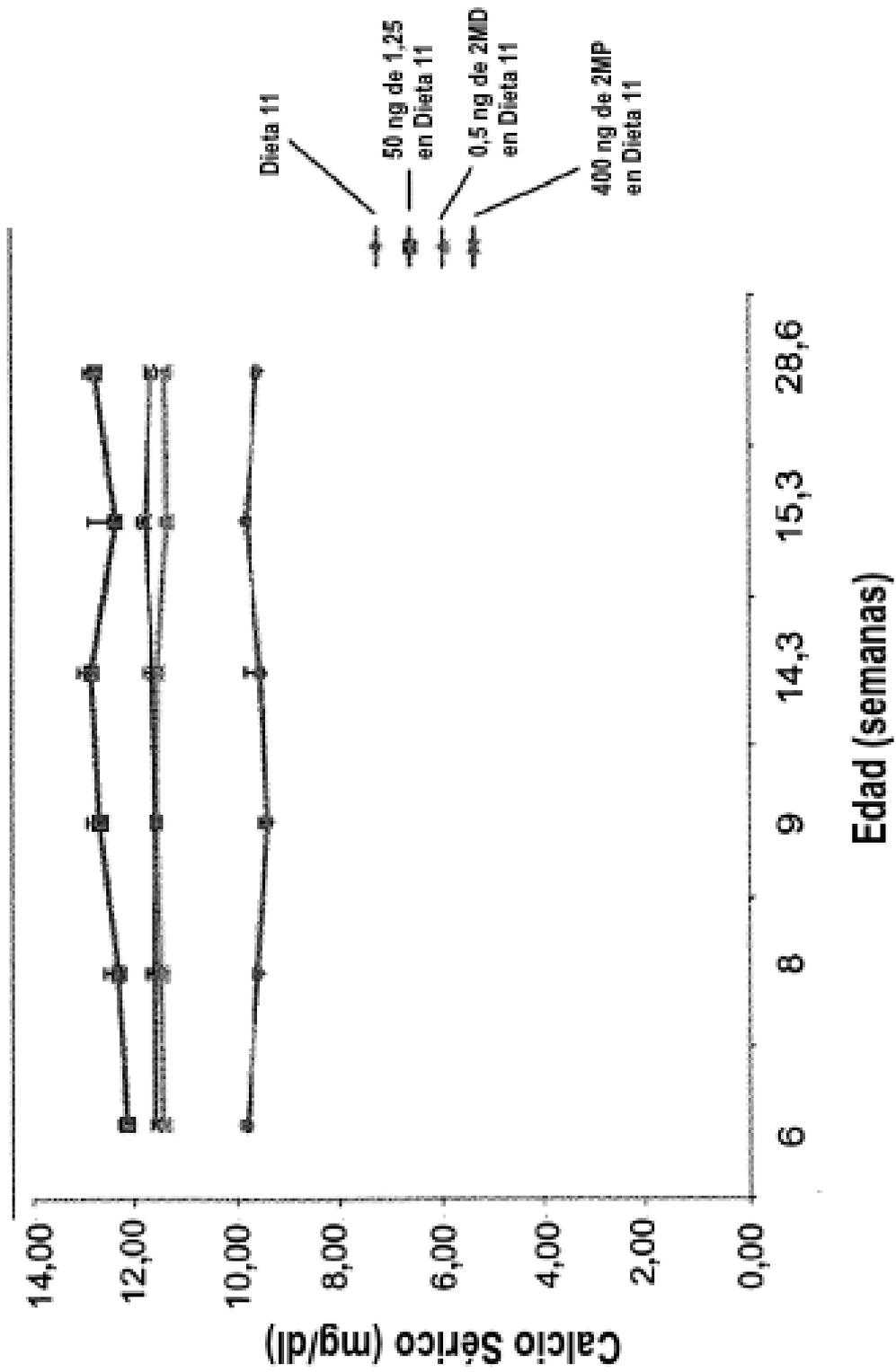


Figura 6