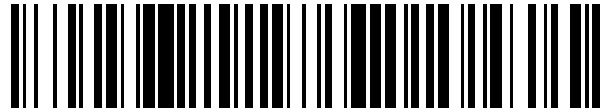


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 349**

51 Int. Cl.:

A61K 31/18 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2010 E 10761018 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2485723**

54 Título: **Inhibidores de CXCR1/2 como adyuvantes en el trasplante de islotes pancreáticos**

30 Prioridad:

06.10.2009 EP 09172364

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

26.03.2014

73 Titular/es:

**DOMPÉ S.P.A. (100.0%)
Località Campo di Pile snc
67100 L'Aquila AQ, IT**

72 Inventor/es:

**PIEMONTI, LORENZO;
DAFFONCHIO, LUISA y
ALLEGRETTI, MARCELLO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 451 349 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

Inhibidores de CXCR1/2 como adyuvantes en el trasplante de islotes pancreáticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a compuestos útiles como adyuvantes en el trasplante de islotes pancreáticos en pacientes con diabetes de Tipo 1.

Antecedentes de la invención

El trasplante de tejido pancreático, en forma de la totalidad del páncreas o de islotes pancreáticos aislados, se ha convertido en una opción clínica para el tratamiento de la diabetes mellitus insulino-dependiente de Tipo 1.

10 El trasplante de islotes pancreáticos resulta especialmente atractivo, puesto que es una alternativa menos invasiva, comparado con el trasplante de todo el páncreas, y se asocia con un riesgo mucho menor de complicaciones graves; sin embargo, este procedimiento sigue estando limitado por su escasa eficiencia.

15 Las primeras estrategias del trasplante de islotes se basaron en protocolos que habían demostrado tener éxito en el trasplante de órganos sólidos, y que comprendían la administración de agentes inmunosupresores tales como azatioprina, ciclosporina y corticosteroides. Estas estrategias no resultaron eficaces en el caso específico del trasplante de islotes pancreáticos y dieron resultados muy malos, en donde la mayoría de los injertos fracasaron en el primer año siguiente al trasplante (Sulaiman y Shapiro, Diabetes, Obesity and Metabolism, 8, 2006, 15-25).

En los últimos años, el desarrollo del protocolo de Edmonton, que ha introducido novedades específicas tanto en los regímenes inmunosupresores como en las técnicas de preparación de los islotes, ha mejorado de forma importante los resultados clínicos del trasplante de islotes.

20 De acuerdo con el protocolo de Edmonton, los islotes pancreáticos se aíslan del páncreas de un donante cadáver, se purifican y, a continuación, se trasplantan en el receptor a través de un catéter situado en la región superior del abdomen hacia la vena porta del hígado; poco tiempo después de su infusión en el hígado, las células comienzan a liberar insulina. Con el fin de prevenir el rechazo, se utiliza un nuevo régimen inmunosupresor que requiere el uso de una combinación de medicamentos inmunosupresores, a saber Sirolimus y Tacrolimus, y de un anticuerpo monoclonal CD25, Daclizumab (Saphiro et al., N. Engl. J. Med., 2000, 343(4):230-238).

Desgraciadamente, existen aún algunas insuficiencias en el trasplante de islotes que no se han resuelto y que impiden que este procedimiento se convierta en el tratamiento estándar de los pacientes con diabetes de Tipo 1.

30 Un primer inconveniente asociado con el trasplante de islotes pancreáticos es que, aun cuando el protocolo de Edmonton ha incrementado de manera significativa el índice de éxitos, continúa habiendo un porcentaje elevado de fracaso de los injertos iniciales, debido a una serie de fenómenos complejos tales como IBMIR (siglas en inglés de Reacción Inflamatoria Instantánea, Mediada por Sangre), reclutamiento de células inflamatorias e inmunidad no específica. De hecho, la infusión intrahepática de islotes en el ser humano se asocia con una reacción inflamatoria inmediata, mediada por sangre, trombosis e isquemia del tejido hepático, con incremento de las enzimas hepáticas (Barshes NR et al., J. Am. Coll. Surg., 2005, 200(3):353-361; Barshes NR et al., J. Leukoc. Biol., 2005, 77(5):587-97; Bertuzzi et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 2004, 89(11):5724-8; Bhargava R. et al., Diabetes, 2004, 53(5):1311-7; Contreras et al., 2004, 53(11):2894-14; Johansson et al., Diabetes, 2005, 54(6):1755-62). Se ha sugerido que la pérdida de hasta 50-75% de los islotes durante el prendimiento en el hígado (Contreras et al., véase antes) es el principal factor responsable del enorme número de islotes necesario para alcanzar la normoglucemia (Barshes et al., véase antes).

40 Además, aun cuando es trasplante tenga éxito inicialmente y dé lugar a la independencia de la insulina del receptor, con el tiempo los islotes trasplantados parecen perder su capacidad de funcionamiento. Este hecho limita la posibilidad de lograr una independencia prolongada de la insulina en el paciente trasplantado; solamente 14% de los pacientes muestra independencia de la insulina dos años después del trasplante (Meloche RM, World J. Gastroenterol., 2007; 13(47):6347-6355).

45 Un inconveniente adicional es que el protocolo de Edmonton requiere el empleo de una combinación de medicamentos inmunosupresores; Sirolimus y Tacrolimus deben tomarse de por vida o durante el tiempo que los islotes trasplantados conserven su función. Sin embargo, estos medicamentos tienen efectos secundarios importantes que sería deseable reducir. Las complicaciones derivadas de la terapia inmunosupresora representan el segundo acontecimiento adverso grave comunicado más a menudo en este tipo de trasplante.

50 De este modo, siguen siendo necesarios desarrollos adicionales para mejorar la viabilidad y el funcionamiento a largo plazo del injerto para mantener el control de la glucosa en el tiempo y reducir la terapia inmunosupresora.

CXCL8 es una quimiocina inducida por los mediadores inflamatorios, que interviene en las fases precoces de la reparación del tejido y que ha demostrado estimular la angiogénesis (Li et al., J. Immunol., 2003, 170:3369-3376) a través de la inducción de quimiotaxia, supervivencia y proliferación de células endoteliales, actuando como elemento de atracción de los neutrófilos. Desarrolla su acción uniéndose a sus receptores cognados CXCR1 y CXCR2 acoplados a la proteína G.

En la bibliografía reciente se plantea la hipótesis de que CXCL8 puede promover el prendimiento a través de la inducción de una revascularización del tejido injertado (Movahedi et al., Diabetes, 2008, 57:2128-36).

El documento EP 123.276 describe N-(2-aril-propionil)-sulfonamidas, entre ellas R(-)-2-[(4-isobutilfenil)-propionil]-metanosulfonamida (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, para usar como inhibidores de la quimiotaxia y degranulación de neutrófilos inducidas por CXCL-8, en particular para utilizar en el tratamiento de patologías tales como psoriasis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, insuficiencia respiratoria aguda (ARDS), fibrosis idiopática y glomerulonefritis.

El documento EP 1355641 describe el uso de R(-)-2-[(4-isobutilfenil)-propionil]-metanosulfonamida y sus sales farmacéuticamente aceptables, en particular sus sales de lisina, en la prevención y el tratamiento de la lesión por isquemia/reperusión de órganos trasplantados y de la lesión funcional causada por las reacciones de rechazo después del trasplante de órganos sólidos, en especial del riñón, que deben ser retirados de un donante y conservados antes del trasplante. Se considera que estas lesiones son responsables de la función retardada del injerto que determina la necesidad de diálisis en el caso del trasplante renal.

El documento EP 1579859 describe el uso de N-(2-aril-propionil)-sulfonamidas, entre ellas R(-)-2-[(isobutilfenil)-propionil]-metanosulfonamida y sus sales de lisina, para preparar medicamentos para el tratamiento de lesiones de la médula espinal.

El documento WO 0178708 describe el uso de antagonistas de CXCR3 para inhibir el rechazo de injertos trasplantados, incluidos los islotes pancreáticos.

El documento EP 1790637 describe el uso de antagonistas de receptores de quimiocinas para el tratamiento del rechazo del injerto de islotes pancreáticos.

Descripción de las Figuras

Figura 1: El panel A muestra la glucemia postprandial (en mg/dl) medida desde el día -1 hasta el día +7 después del isotrasplante de 400 islotes pancreáticos en ratones "knock-out" (líneas descoloridas) y ratones de tipo silvestre (líneas negras). El panel B muestra los resultados de la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO). La glucemia (en mg/dl) se midió inmediatamente antes de la administración de glucosa y 10, 20, 30, 60 y 90 minutos después de la administración oral de glucosa. Se muestra la curva de glucosa en sangre para cada animal.

Figura 2: El panel A muestra la glucemia en diferentes periodos de tiempo después del trasplante, en ratones tratados con Reparixin (líneas macizas) o de control (líneas punteadas). El panel B muestra el análisis multivariado de regresión de Cox.

Figuras 3a y 3b ofrecen en diagramas de dispersión los valores medios obtenidos en la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO) (Figura 3a) y en la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Intravenosa (PTGIV) (Figura 3b) en ratones trasplantados, en presencia y ausencia de Reparixin, con islotes del mismo proceso de aislamiento. Las etiquetas identifican el número de aislamiento. Los cuadrados y círculos representan, respectivamente, ratones trasplantados con 250 o 150 EI. Los paneles inferior y superior presentan los datos 1 y 3 meses después del trasplante, respectivamente. La línea maciza es la línea de identidad: los círculos por encima de la línea de identidad representan las observaciones en el grupo de Reparixin con valores más altos que en el grupo tratado con vehículo ($\Delta+$).

Figura 4 muestra los niveles circulantes de alanina aminotransferasa (ALT) 24 h y 48 h después del trasplante en animales tratados con Reparixin y con vehículo, trasplantados con 150 EI (Panel A) o 250 EI (Panel B).

Figura 5: El panel A indica la glucemia en diferentes tiempos después del trasplante en ratones tratados con Reparixin, Rapamicina, Reparixin + Rapamicina o Vehículo. El panel B muestra el análisis multivariado de regresión de Cox.

Figura 6: Niveles circulantes de alanina aminotransferasa (ALT) 24 h y 48 h después del trasplante en ratones tratados con vehículo (A), Reparixin (B), Rapamicina (C) o Reparixin + Rapamicina (D).

Figura 7: El panel A muestra el porcentaje de supervivencia del trasplante en el tiempo después del trasplante en ratones tratados con Reparixin, Rapamicina, Reparixin + Rapamicina o Vehículo. El panel B muestra el análisis multivariado de regresión de Cox.

Figura 8 muestra el número de células polimorfonucleares (PMN) extraídas del hígado en el tiempo (días), después del trasplante de islotes (expresado como células por mg de tejido hepático) en ratones de control (línea en negrita) o tratados con Reparixin (línea descolorida).

5 Figura 9 muestra el número de células NK extraídas del hígado en el tiempo (días), después del trasplante de islotes (expresado como células por mg de tejido hepático) en ratones de control (línea en negrita) o tratados con Reparixin (línea descolorida).

Figura 10 muestra el porcentaje de células CXCR2+ en las diferentes subpoblaciones de leucocitos extraídos del hígado, 5 días después del trasplante alógeno de islotes. En la abscisa, las cifras 1 a 11 tienen los significados siguientes:

- 10 1: PMN (Gr1+ CD11b+ CD11c+)
 2: PMN (Gr1+ CD11b+ Ly6c-)
 3: Macrófagos (CD11b+ CD11c- Gr1-)
 4: Células dendríticas (CD11c+ CD11b+ Gr1-)
 5: Linfocitos (CD3+ CD4+)
 15 6: Linfocitos (CD3+ CD8+)
 7: Linfocitos B (CD19+)
 8: Células NKT (NK1.1+ CD3+)
 9: Células NKT (NK1.1+ CD3-)
 10: Linfocitos (CD4+ TCRb+)
 20 11: Linfocitos (CD8+ TCRb+).

Descripción detallada de la invención

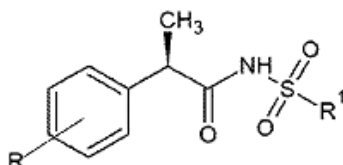
Los presentes inventores han encontrado ahora que, sorprendentemente y al contrario de lo que se esperaba de las enseñanzas de la técnica anterior, los agonistas de CXCR1 y/o CXCR2 son perjudiciales para la supervivencia de los islotes después del trasplante de islotes pancreáticos. Tal como se describirá en los ejemplos siguientes, los islotes pancreáticos exhiben un aumento de función y supervivencia cuando se trasplantan en ratones BALB/C “knock-out” para CXCR2, comparados con ratones de tipo silvestre, con una tolerancia a la glucosa consistentemente mejor y una concentración de glucosa menor que en los ratones de control.

Además, experimentos llevados a cabo por los presentes inventores demuestran claramente que los compuestos que inhiben la señalización de CXCR1 y/o CXCR2 tienen la capacidad de mejorar de manera efectiva la supervivencia y la función del injerto tras el trasplante de islotes pancreáticos.

En consecuencia, un primer objeto de la presente solicitud es el uso de inhibidores de CXCR1 y/o CXCR2 como adyuvantes en el trasplante de islotes pancreáticos en pacientes con diabetes de Tipo 1.

Por “inhibidores de CXCR1 y/o CXCR2” según la presente invención se dan a entender compuestos capaces de prevenir la actividad biológica de CXCL8 derivada de la activación de CXCR1 y/o CXCR2. Estos compuestos pueden ser antagonistas competitivos o inhibidores alostéricos de los receptores.

Compuestos preferidos de la invención son los compuestos de Fórmula I o sus sales farmacéuticamente aceptables:



(I)

5 en donde R se selecciona de 4-alquilo (C1-C6) lineal o ramificado, 4-trifluorometanosulfoniloxi o 3-benzoilo, y R1 es alquilo (C1-C6) lineal o ramificado. Compuestos particularmente preferidos según la presente invención son R(-)-2-[(4-isobutilfenil)-propionil]-metanosulfonamida (conocida comúnmente como Repertaxina o Reparixin y denominada, en lo sucesivo, Reparixin), y R(-)-2-[(4'-trifluorometanosulfoniloxi)-fenil]-propionil-metanosulfonamida (conocida comúnmente y denominada en lo sucesivo Meraxin).

Salas preferidas de los compuestos según la invención son las sales de lisina y de sodio. Sales particularmente preferidas de los compuestos según la invención con la sal de lisina de Reparixin y la sal sódica de Meraxin.

10 Tal como se describirá a continuación, en modelos animales los compuestos de Fórmula I son capaces de mejorar efectivamente la supervivencia y la función del injerto tras el trasplante de islotes pancreáticos.

De manera detallada, los datos obtenidos en los modelos experimentales de trasplante de islotes demuestran un efecto manifiesto de los compuestos anteriormente citados, representados por R(-)-2-[(4-isobutilfenil)-propionil]-metanosulfonamida, sobre la protección contra la pérdida de actividad y/o deterioro de las células β trasplantadas.

15 Según una realización preferida de la invención, dicho compuesto de Fórmula I es Reparixin. Según una realización preferida adicional, dicho compuesto de Fórmula I es Meraxin.

Los compuestos de la invención son eficaces como apoyo del prendimiento de las células de islotes pancreáticos trasplantados en la diabetes de Tipo 1.

20 De hecho, tal como resultará más evidente en la siguiente sección experimental, la administración intravenosa de Reparixin en modelos animales desde el día -1 hasta el día +6 después del trasplante singénico o alogénico de islotes pancreáticos dio como resultado una probabilidad mayor y tiempo mediano menor para alcanzar niveles normales de glucemia (un nivel postprandial de glucosa en sangre menor que 250 mg/ml), en comparación con los controles.

25 De esta forma, un objeto adicional de la presente invención es el uso de inhibidores de CXCR1 y/o CXCR2, preferiblemente de los compuestos de Fórmula I, más preferiblemente de Reparixin o Meraxin, para mejorar el prendimiento y la función precoz del injerto, y para reducir la aparición de fracasos tempranos del injerto después del trasplante de islotes pancreáticos en pacientes con diabetes de Tipo 1.

Dicho trasplante se lleva a cabo preferiblemente en el hígado o en la médula ósea de los pacientes.

30 Experimentos de trasplante alogénico de islotes demostraron que la administración del inhibidor de CXCR1/CXCR2 Reparixin redujo significativamente la aparición de reacciones de rechazo en los ratones en los que se produjo una función primaria después del trasplante.

Además, los resultados demuestran que la función del injerto se mantiene durante un periodo de tiempo más prolongado, en comparación con los controles, con un incremento del tiempo mediano de supervivencia.

La eficacia de Reparixin sobre la mejoría de la función y supervivencia del injerto se ha puesto de manifiesto en el trasplante de islotes pancreáticos tanto en el hígado como en la médula ósea.

35 De este modo, un objeto adicional de la presente invención es el uso de inhibidores de CXCR1 y/o CXCR2, preferiblemente de los compuestos de Fórmula I, más preferiblemente de Reparixin, para reducir las reacciones de rechazo del injerto y para mejorar la supervivencia del injerto a largo plazo.

40 Los compuestos de la invención se pueden usar con este objetivo solos o en una terapia de combinación con uno o múltiples inmunosupresores, seleccionados preferiblemente de Sirolimus (conocido también como Rapamicina) y Tacrolimus.

45 Sin embargo, los datos obtenidos que se dan a conocer en la sección experimental, indican también que el uso de un compuesto de la invención por sí solo puede ser suficiente para inhibir el rechazo del injerto. De hecho, tal como se muestra en la sección experimental, el bloqueo del receptor de CXCR1/2 provocado por Reparixin aumentó de manera significativa el tiempo de rechazo en los ratones que alcanzaron la función primaria después del trasplante, en tanto que Rapamicina no varió significativamente este parámetro. Adicionalmente, la administración de Reparixin en solitario ofreció resultados comparables a los obtenidos con la administración de una combinación de Reparixin con Rapamicina.

50 Estos datos indican que la administración de Reparixin en solitario puede ser suficiente para reducir la reacción de rechazo del injerto, sin necesidad o con una menor necesidad de terapia inmunosupresora, lo cual representa una ventaja destacable en términos de toxicidad.

La síntesis de los compuestos según la invención se puede realizar de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Reparixin se puede preparar de la forma descrita en el Ejemplo 1 del documento EP 1123276 y en el Ejemplo 1 del documento EP 1355641, en tanto que la sal de lisina puede prepararse de la forma descrita en el Ejemplo 7 y el Ejemplo 2, respectivamente, de las patentes mencionadas anteriormente. Por ejemplo, Meraxin se puede preparar según el Ejemplo 1 del documento EP 1776336.

Los compuestos usados según la presente invención se formulan en composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso por administración oral tales como comprimidos, cápsulas, jarabes, preferiblemente en forma de formulaciones de liberación controlada, o por administración parenteral, preferiblemente en forma de soluciones estériles para administración intravenosa o intramuscular. Las formas farmacéuticas se pueden preparar según métodos convencionales tales como los que se describen, por ejemplo, en Remington, "The Science and Practice of Pharmacy", 21^a edición (Lippincott, Williams y Wilkins). Preferiblemente, la cantidad de Reparixin o su sal farmacéuticamente aceptable en cada una de las formas de administración mencionadas anteriormente aportará entre 2 y 15 mg de compuesto o sal/kg de peso corporal, en tanto que la cantidad de Meraxin o su sal farmacéuticamente aceptable aportará entre 10 y 20 mg de compuesto o sal/kg de peso corporal. En cualquier caso, el régimen y la cantidad de medicamento que se debe administrar serán determinados por el médico de acuerdo con las necesidades del paciente.

A continuación, la invención se ilustrará adicionalmente y de manera más detallada en la sección experimental siguiente.

Sección experimental

20 1. Trasplante singénico de islotes en ratones "knock-out"

Con el fin de analizar el papel de la activación de la vía de señalización de CXCL8 a través de CXCR1 y CXCR2 sobre la supervivencia de los islotes, se evaluó la función de los islotes tras el trasplante singénico intrahepático de islotes en ratones Balb/c CXCR2^{-/-} y CXCR2^{+/+}. CXCR1 no se expresa en el ratón y, por lo tanto, la abolición de CXCR2 anula totalmente la señalización inducida por CXCL8.

25 Como indicadores de funcionalidad se tomaron en consideración la glucemia postprandial durante la primera semana siguiente al trasplante y la tolerancia a la glucosa oral 4 semanas después del trasplante. Tal como se señala en la Figura 1, los ratones "knock-out" para CXCR2 trasplantados mostraron claramente una tolerancia consistentemente mejorada a la glucosa con respecto a los ratones de tipo silvestre de control, como se demuestra por la reducción significativa de la concentración de glucosa circulante durante todo el periodo de evaluación.

30 La prueba de tolerancia a la glucosa oral se llevó a cabo de la forma descrita más adelante, en la sección 2.

2. Trasplante singénico de islotes en ratones

En el hígado de ratones C57 diabéticos (diabetes inducida por aloxana, glucemia >450 mg/dl) se trasplantaron islotes de ratones C57 de 12 semanas de edad. Se utilizaron dos modelos diferentes de masa marginal de islote, 150 EI (Equivalentes de Islote) y 250 EI. Se administró Reparixin por infusión subcutánea (s.c.) continua, comenzando el día -1 hasta los días 6 o 13 después del trasplante de islotes, a una dosis de 8 mg/kg/h. Los animales de control recibieron vehículo s.c. de forma continua.

En primer lugar, se evaluó la capacidad para alcanzar un nivel postprandial de glucosa en sangre menor de 200 mg/dl en dos mediciones consecutivas después del trasplante de islotes. Como se muestra en la Figura 2, la probabilidad y el tiempo mediano hasta alcanzar la euglucemia (<200 mg/dl) fueron: 50% y 7 días para los ratones tratados con Reparixin, en comparación con 35,1% y 50 días en los ratones tratados con vehículo (Rango Logarítmico p<0,012).

Un Análisis Multivariado de Regresión de Cox, en el que se incluyeron como covariables el tratamiento con Reparixin, la duración del tratamiento, el número de islotes trasplantados y la glucemia del receptor previa al trasplante, confirmó que el resultado mejoró de manera significativa (cociente de probabilidades [Odds ratio]: 2,6; IC 95%: 1,1-6,1; p<0,021). Como era de esperar, el trasplante de 250 EI dio como resultado un injerto mejor (cociente de probabilidades: 1,6; IC 95%: 0,6-4,3; p<0,28), mientras que la glucemia previa al trasplante afectó negativamente al resultado (cociente de probabilidades: 0,6; IC 95%: 0,3-1,1; p=0,12).

Después de 1 y 3 meses del trasplante, se llevaron a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa (PTGIV) y una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) para evaluar la funcionalidad de los islotes injertados. La PTGIV se inició después de un ayuno de 16 horas; los ratones recibieron glucosa (0,5 g/kg) por una inyección en la vena caudal. Se tomaron muestras de sangre 0, 1, 5, 15, 20, 30 y 60 minutos después de la inyección y se usaron para determinar las concentraciones de glucosa. A partir de la PTGIV, la tolerancia a la glucosa se cuantificó por la constante de eliminación de glucosa (KG; expresada como eliminación porcentual de glucosa por minuto) como la reducción de la glucosa circulante entre 1 y 15 minutos (KG1-15) después de la administración intravenosa,

siguiendo la transformación logarítmica de los valores individuales de glucosa plasmática. Se efectuó una estimación similar para el índice total de desaparición de la glucosa de 1 a 60 min (KG1-60). Este parámetro indica la velocidad de desaparición de la glucosa durante toda la prueba. La PTGO se inició después de un ayuno de 4 horas; los ratones recibieron glucosa (1 g/kg) a través de una sonda oral. Se tomaron muestras de sangre 0, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa, y se utilizaron para determinar las concentraciones de glucosa. Usando el método trapezoidal, se calculó el área bajo la curva (AUC) para la glucosa durante la PTGO (punto inicial = 0 min). En la Figura 3 se ilustran los efectos del trasplante de islotes sobre la tolerancia a la glucosa tras PTGIV y PTGO. Los datos se presentan como diagramas de dispersión. Cada punto representa el valor medio del parámetro medido en ratones trasplantados, en presencia o en ausencia de Reparixin con islotes del mismo aislamiento; las etiquetas identifican el número de aislamiento, en tanto que los cuadrados y círculos representan, respectivamente, ratones trasplantados con 250 o 150 EI. Los paneles superior e inferior muestran, respectivamente, los datos 1 y 3 meses después del trasplante. La línea maciza es la línea de identidad: los círculos situados por encima de la línea de identidad representan la observación en el grupo tratado con Reparixin con valores mayores que en el grupo tratado con vehículo ($\Delta+$). La PTGO 1 y 3 meses después del trasplante demostró que en ratones tratados con Reparixin, la AUC continúa siendo más baja que la de los ratones de control. De acuerdo con estos datos, las constantes de eliminación de glucosa entre 1 y 15 min (KG1-15) y 1 y 60 min (KG1-60) aumentaron de forma significativa en los ratones tratados con Reparixin, en comparación con los ratones de control.

El daño hepático agudo se cuantificó por medio de los niveles circulantes de alanina aminotransferasa (ALT) 24 h y 48 h después del trasplante. El tratamiento con Reparixin no afectó a los niveles de ALT en los ratones trasplantados con 150 o 250 EI (Figura 4). De manera similar, tampoco se observaron diferencias para los niveles circulantes de leucocitos, eritrocitos y plaquetas (no se muestran los datos).

3. Trasplante alogénico de islotes en ratones

En el hígado de ratones C57 diabéticos (aloxana, glucemia >450 mg/dl) se trasplantaron islotes de ratones Balb/c de 12 semanas de edad. En algunos experimentos, se trasplantaron islotes de ratones C57/6 (B6) de 12 semanas de edad en el hígado de ratones NOD/LtJ (NOD) hembras diabéticos para evaluar la presencia de cualquier reacción autoinmune. Se utilizaron ratones NOD como receptores del trasplante de islotes después de al menos tres lecturas postprandiales de glucosa en sangre mayores de 350 mg/dl. En ambos casos, se trasplantaron 400 EI. Los animales se trataron con Reparixin solo (5,28 mg/kg/h en infusión s.c. continua, que se inició el día -1 hasta el día 7 después del trasplante.), Rapamicina sola (inyecciones intraperitoneales (i.p.) diarias, que comenzaron con una dosis de inducción de 0,3 mg/kg el día 0, seguida de una dosis de mantenimiento de 0,15 mg/kg hasta el día 14), Reparixin + Rapamicina, o vehículo.

En primer lugar, se evaluó la capacidad para alcanzar la función primaria, definida como niveles postprandiales de glucosa en sangre menores de 250 mg/dl en dos mediciones consecutivas después del trasplante de islotes, y el tiempo hasta el rechazo, definido como dos lecturas consecutivas de glucosa postprandial en sangre mayores que 300 mg/dl.

Considerando todos los ratones trasplantados en condiciones alogénicas, la probabilidad y el tiempo mediano para alcanzar la función primaria (glucemia <250 mg/dl) fueron: 72% y 1 día para los ratones tratados solamente con Reparixin; 73% y 1 día para los ratones tratados solamente con Rapamicina; 69% y 1 día para los ratones tratados con Reparixin + Rapamicina; 44% y 2 días para los ratones tratados con vehículo (Figura 5, Rango Logarítmico $p < 0,041$). Un Análisis Multivariado de Regresión de Cox, en el que se incluyeron como covariables el tratamiento de Reparixin, el tratamiento con Rapamicina y la glucemia de los receptores previa al trasplante, confirmó la mejoría del resultado producida por Reparixin (cociente de probabilidades: 2,5; IC 95%: 0,79-2,99; $p < 0,202$). El tratamiento con Rapamicina (cociente de probabilidades: 1,1; IC 95%: 0,62-2,15; $p < 0,62$) y la glucemia previa al trasplante (cociente de probabilidades: 1,03; IC 95%: 0,68-1,59; $p < 0,88$) fueron menos relevantes.

Los niveles circulantes de ALT medidos 24 h y 48 h después del trasplante no estuvieron afectados por Reparixin tanto en presencia como en ausencia de Rapamicina (Figura 6).

Además, el tratamiento con Reparixin aumentó significativamente el tiempo hasta el rechazo en ratones que alcanzaron la función primaria después del trasplante (Figura 7). El tiempo mediano de supervivencia fue de $12 \pm 0,6$ días ($n=13$) y $8 \pm 0,5$ días ($n=7$), respectivamente, para los ratones tratados con Reparixin y con vehículo en ausencia de Rapamicina. En presencia de Rapamicina, el tiempo mediano de supervivencia fue de 12 ± 2 días ($n=11$) y $8 \pm 0,6$ días ($n=11$), respectivamente, para los ratones que recibieron Reparixin y de control.

Los datos se confirmaron por un Análisis Multivariado de Regresión de Cox que incluyó como covariables el tratamiento con Reparixin, el tratamiento con Rapamicina y la glucemia del receptor antes del trasplante. El tratamiento con Reparixin se confirmó como un importante factor de protección independiente contra la pérdida de supervivencia del injerto (cociente de probabilidades: 0,252; intervalo de confianza 95%: 0,099-0,64; $p=0,004$), en tanto que el tratamiento con Rapamicina (cociente de probabilidades: 1,173; intervalo de confianza 95%: 0,562-2,45;

p=0,67) y la glucemia previa al trasplante (cociente de probabilidades: 1,002; intervalo de confianza 95%: 0,604-1,661; p=0,99) no fueron significativos.

4. El bloqueo de CXCR1/2 con Reparixin modula el estado inflamatorio del hígado después del trasplante allogénico de islotes

5 La población intrahepática de leucocitos se analizó en presencia o en ausencia del tratamiento con Reparixin después del trasplante allogénico intrahepático de islotes en el ratón. Se trasplantaron islotes (400 EI) de ratones Balb/c de 12 semanas de edad en el hígado de ratones C57 diabéticos (inducida por aloxana, >450 mg/dl), en presencia de una infusión s.c. continua de Reparixin durante 7 días, que se inició el día -1 con una dosis de 8 mg/kg/h, o de vehículo. Los ratones fueron sacrificados los días 0, +1, +3, +5, +7, +10 y +14 después del trasplante de islotes, y se pesaron los hígados en el momento de la autopsia. A partir de dos lóbulos hepáticos de peso conocido se prepararon suspensiones de células simples, y se llevó a cabo el análisis de la población intrahepática de leucocitos (IHL) por citometría de flujo. Las superficies celulares se tiñeron con anticuerpos (Abs) anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3, anti-CD19, anti-TCR, anti-NK1.1, anti-CD11, anti-Gr-1, anti-CD11b y anti-CD11c marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o alofococianina (APC) (PharMingen, San Diego, CA) para la detección de células Gr-1+/CD11b+/CD11c- (principalmente, PMNs), células CD4+/TCR+ (principalmente, células cooperadoras T), células CD8+/TCR+ (principalmente, CTLs), células NK1.1+/CD3- (células NK), células NK1.1+/CD3+ (células NKT), y Gr-1-/CD11b+/CD11c- (principalmente, macrófagos), CD115+/CD11b+/CD11c- (principalmente, monocitos), CD11c+/CD11b+/Gr1- (principalmente, células dendríticas), CD19 (principalmente, linfocitos B). Las muestras se depositaron en un citómetro de flujo FACSCalibur y los datos se analizaron usando el software CELLQuest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA).

En un segundo conjunto de experimentos, se evaluó la expresión de CXCR2 y CXCR1 sobre la población de IHL en los tiempos en los que la infiltración de leucocitos alcanzó el grado máximo de infiltración.

Los resultados obtenidos confirman que el tratamiento con Reparixin reduce el reclutamiento e infiltración de leucocitos en el hígado tras el trasplante allogénico. De manera particular, resultan significativamente afectados los PMNs (Figura 8) y las células NKT (Figura 9), que son las subpoblaciones leucocitarias que expresan CXCR2, tal como se puede ver también en la Figura 10.

5. El bloqueo de CXCR2/1 con Reparixin influye sobre el resultado del trasplante allogénico de islotes después del trasplante de islotes en la médula ósea.

30 En la médula ósea de ratones C57 diabéticos (inducida con aloxana, >450 mg/dl) se trasplantaron islotes (400 EI) de ratones Balb/c de 12 semanas de edad, en presencia de una infusión s.c. continua de Reparixin durante 7 días, que se inició el día -1 a una dosis de 8 mg/kg. Un grupo de ratones de control se trató con vehículo. Las variables primarias del experimento fueron la capacidad para alcanzar la función primaria, que se define como niveles postprandiales de glucosa en sangre menores que 250 mg/dl durante dos mediciones consecutivas después del trasplante de islotes, y el tiempo hasta el rechazo, definido como dos lecturas consecutivas de glucosa postprandial en sangre mayores que 350 mg/dl.

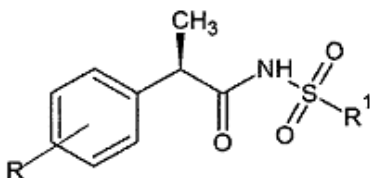
Los resultados obtenidos confirmaron que el tratamiento con Reparixin mejoró el desenlace final.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de CXCR1 y/o CXCR2 para usar como medicamento adyuvante para el trasplante de islotes pancreáticos en pacientes con diabetes de Tipo 1.

5 2. Un inhibidor según la reivindicación 1, para usar según la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor es un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

en donde R se selecciona de 4-alkilo (C1-C6) lineal o ramificado, 4-trifluorometanosulfonilo y 3-benzoilo, y R1 es



(I)

alkilo (C1-C6) lineal o ramificado.

3. Un inhibidor según la reivindicación 2, para usar según la reivindicación 1, en donde la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona entre la sal de lisina y la de sodio.

10 4. Un inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para usar según la reivindicación 1, en donde dicho medicamento mejora el prendimiento de las células de los islotes pancreáticos y la función temprana del injerto.

5. Un inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para usar según la reivindicación 1, en donde dicho medicamento reduce la aparición de fracasos de los islotes pancreáticos trasplantados.

15 6. Un inhibidor según la reivindicación 5, para usar según la reivindicación 1, en donde dicho medicamento reduce el tiempo y la aparición del rechazo del injerto de células de islotes pancreáticos.

7. Un inhibidor según la reivindicación 6, para usar según la reivindicación 1, en donde dicho medicamento mejora la supervivencia del injerto a largo plazo.

20 8. Un inhibidor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para usar según la reivindicación 1, seleccionado de R(-)-N-2-[(4-isobutilfenil)-propionil]-metanosulfonamida y R(-)-2-[(4'-trifluorometanosulfonilo)-fenil]-propionil-metanosulfonamida.

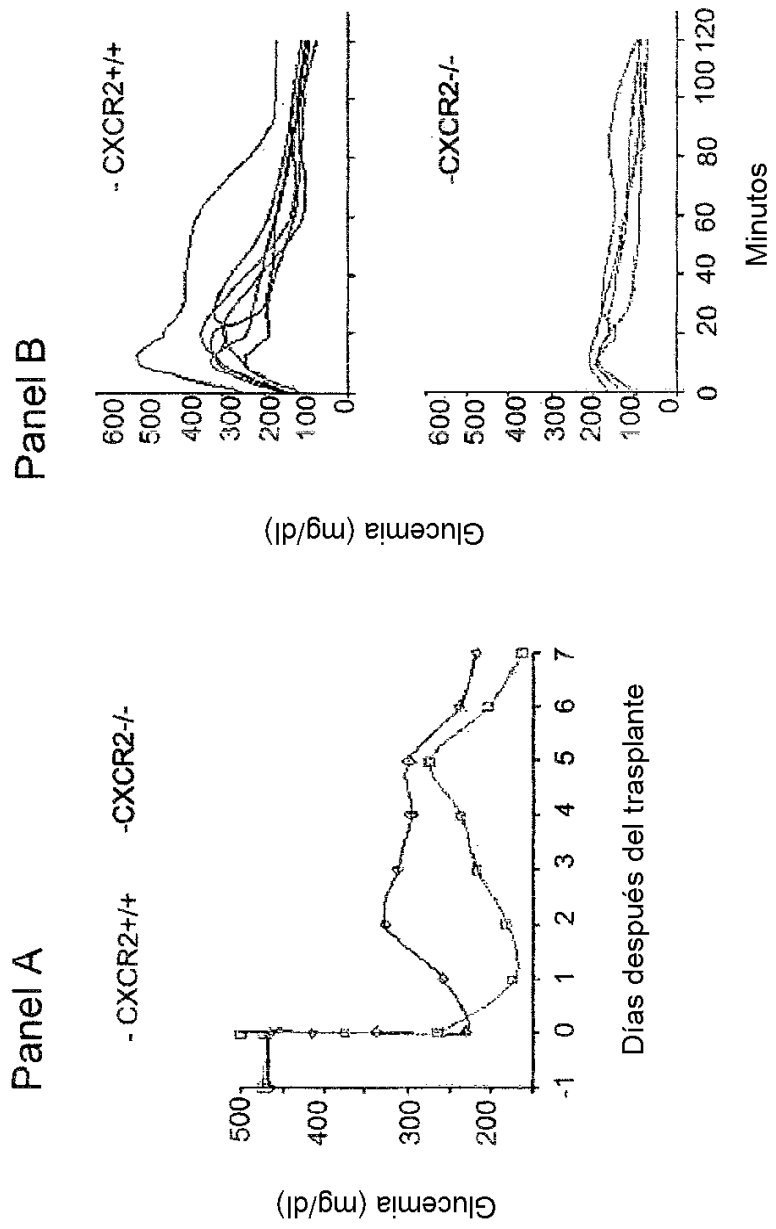


Figura 1

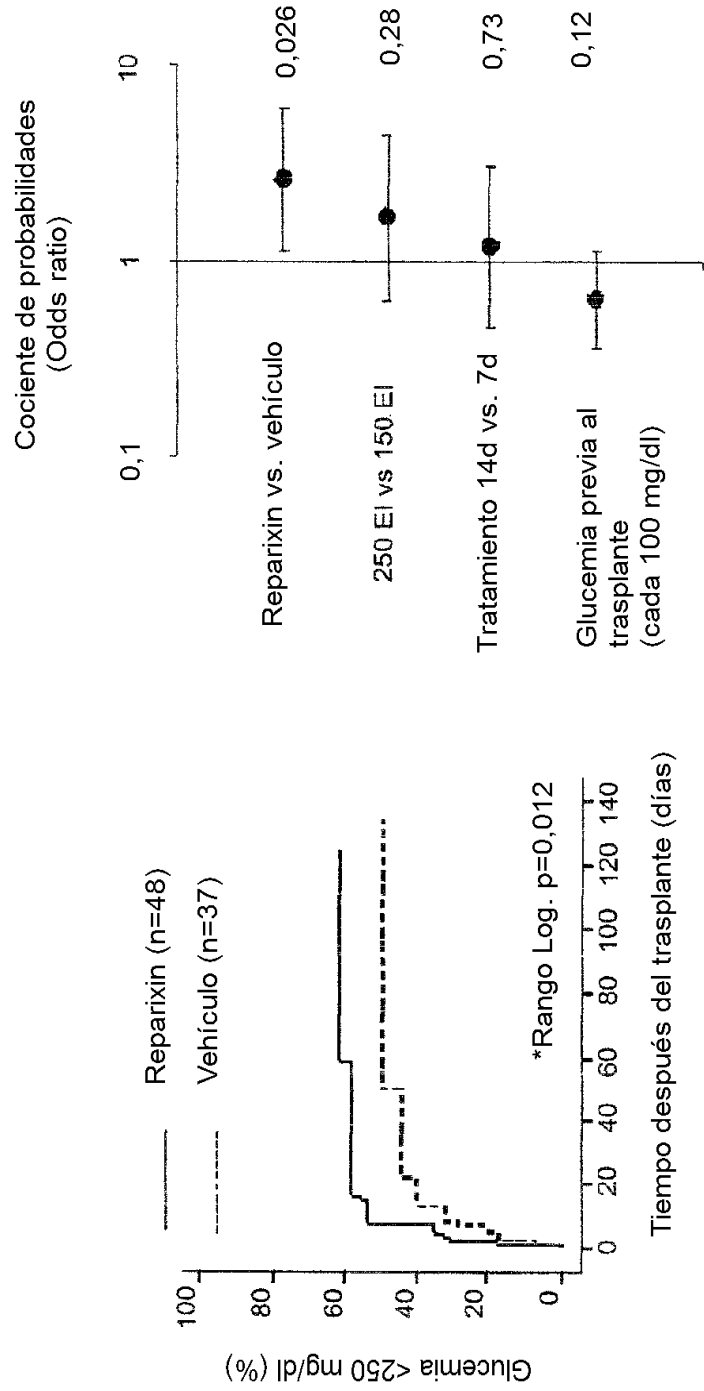


Figura 2

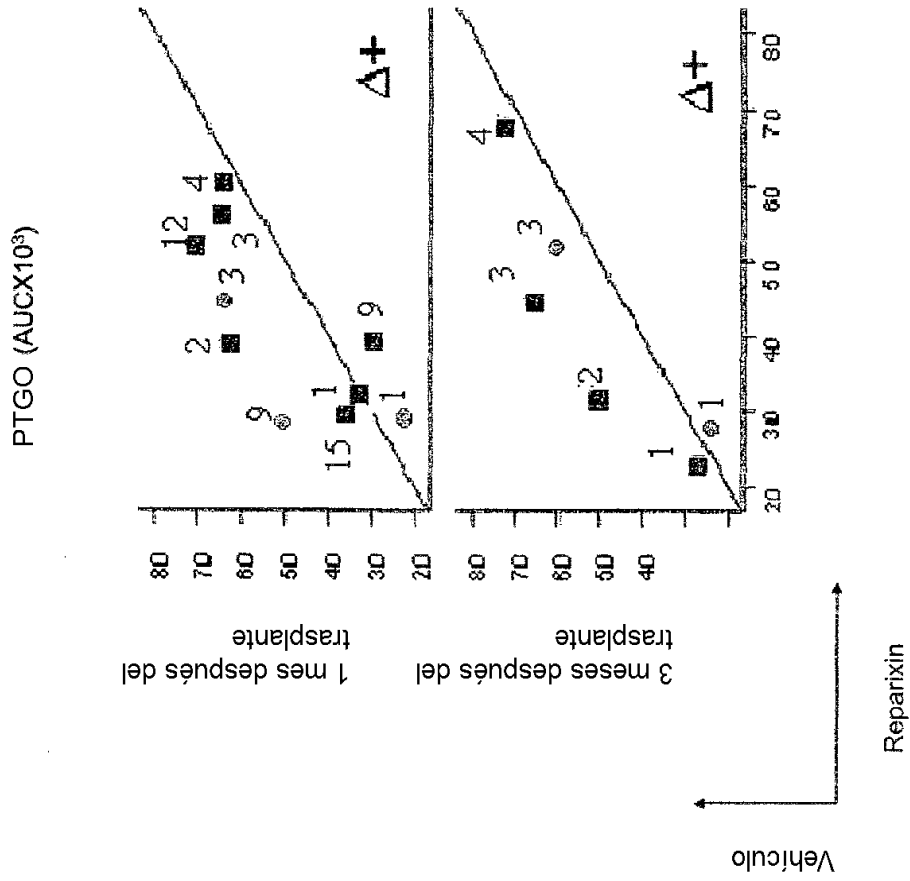


Figura 3a

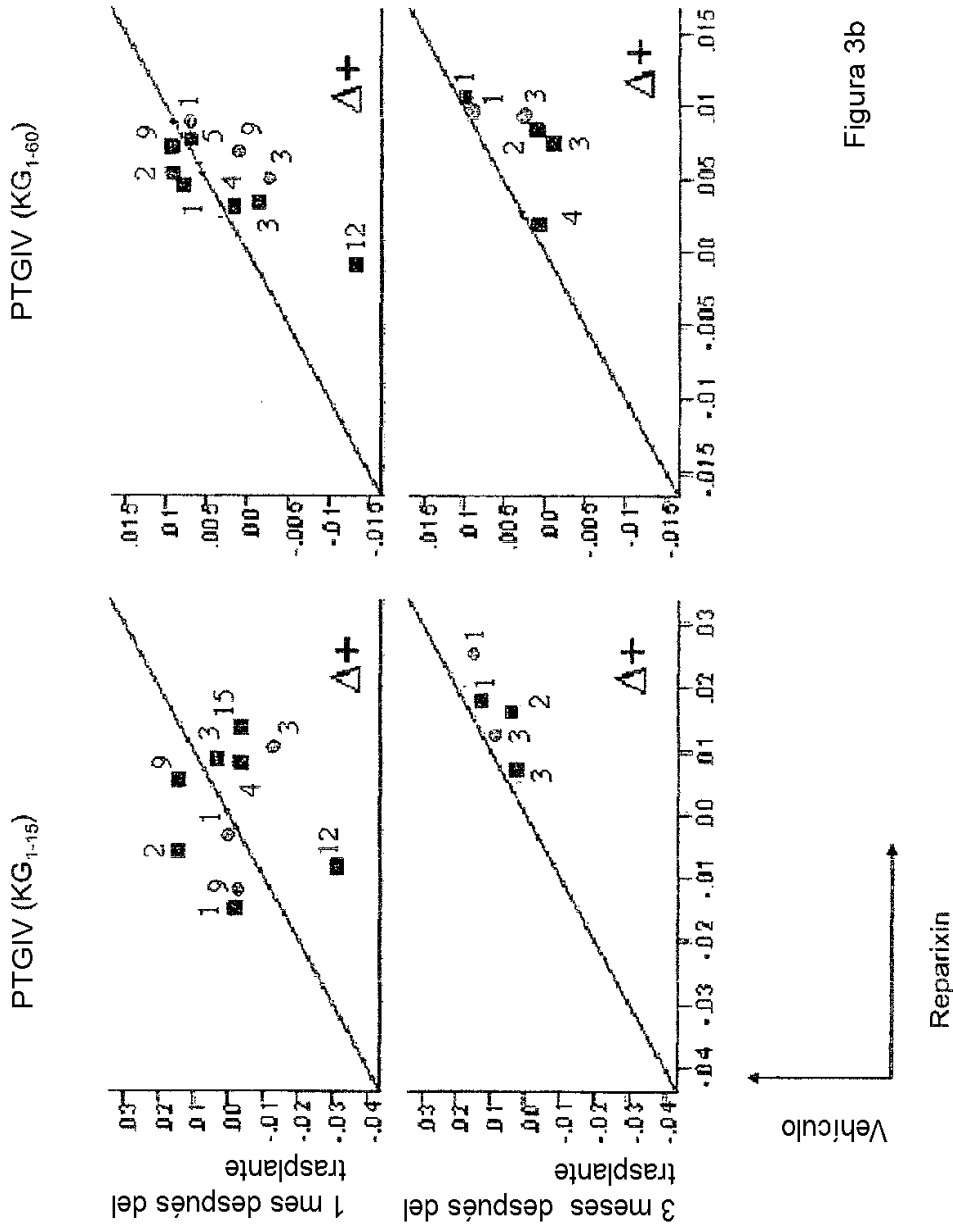
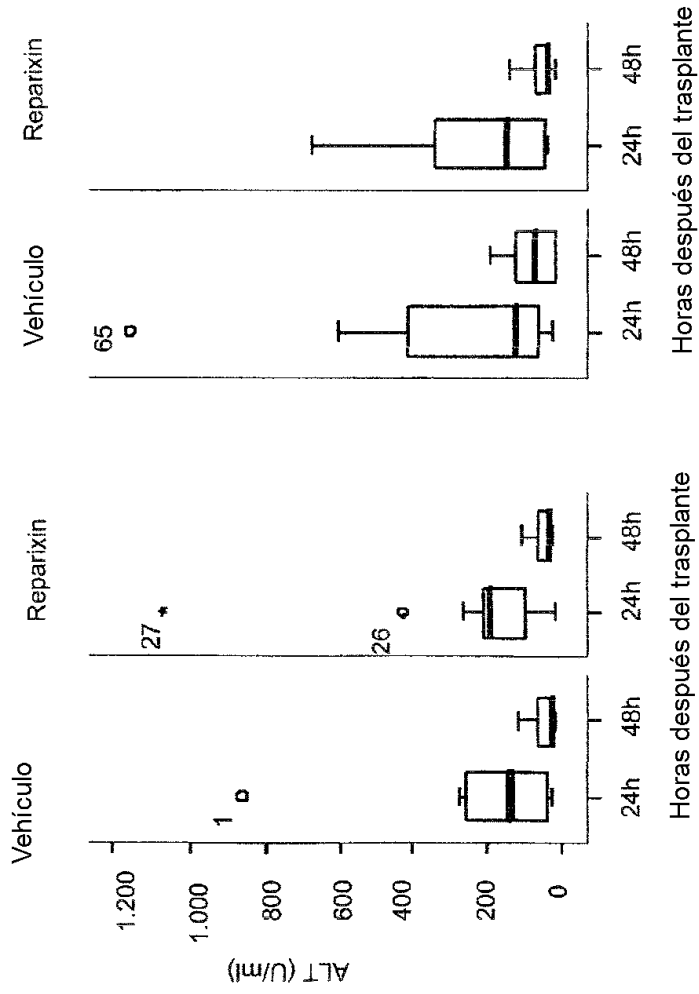
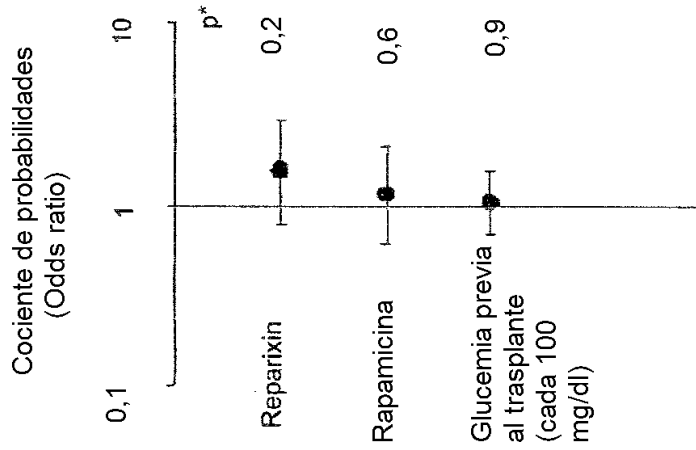


Figura 3b

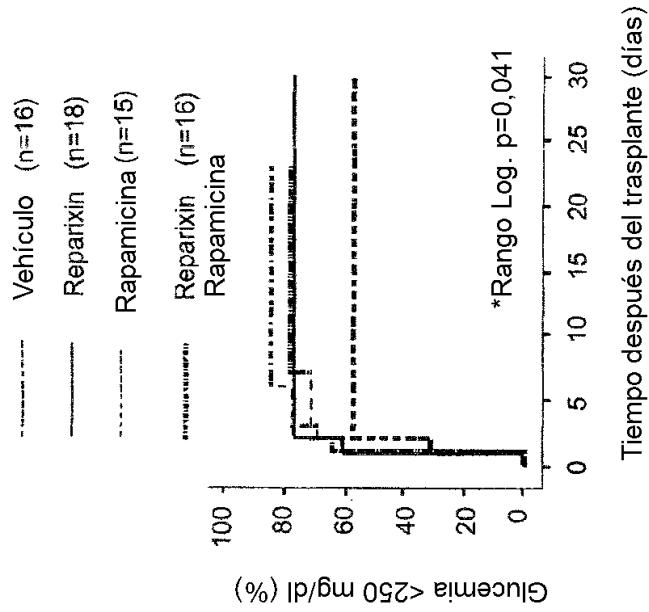


PANEL B Figura 4

PANEL A



PANEL B



PANEL A

Figura 5

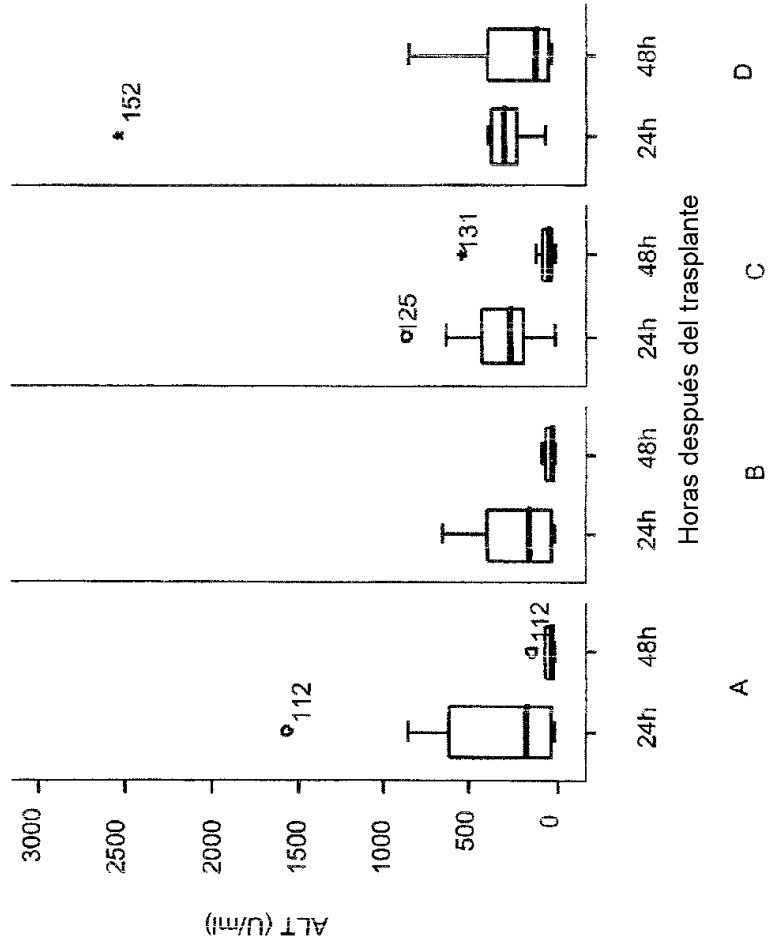


Figura 6

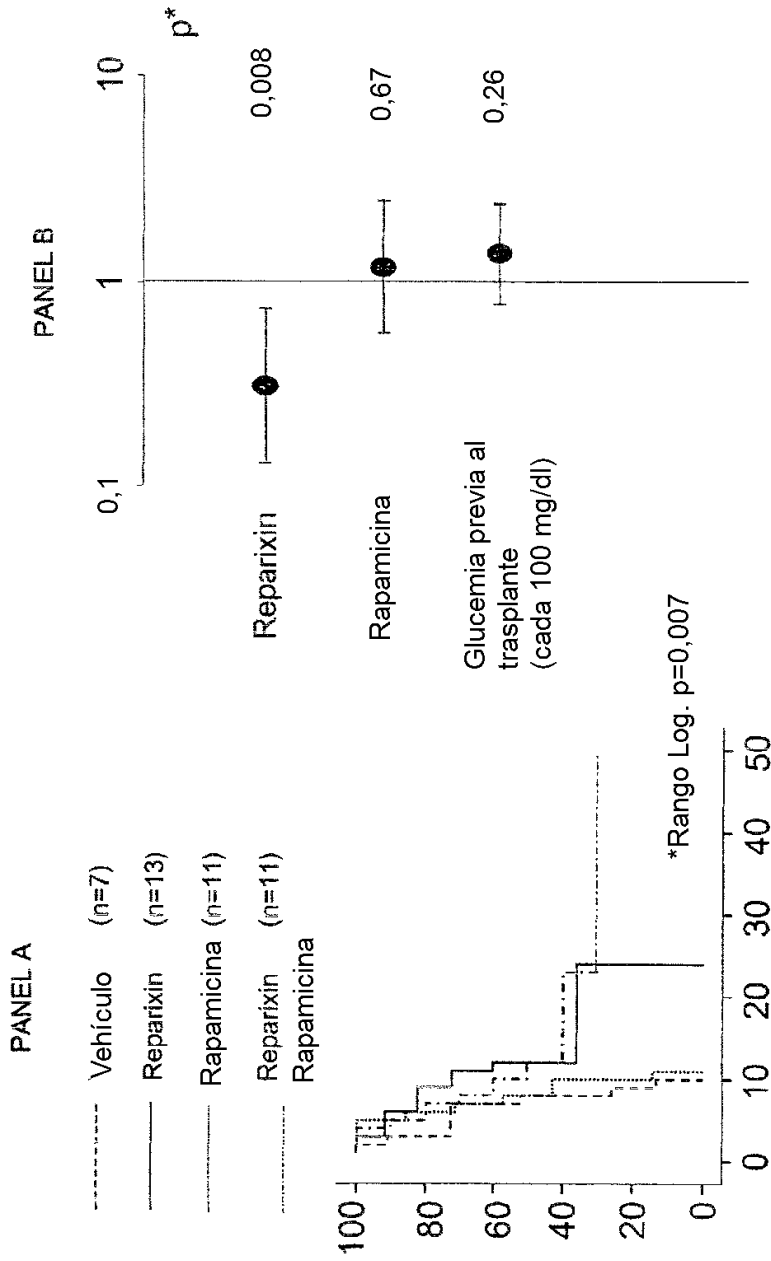


Figura 7

Tiempo después del trasplante (días)

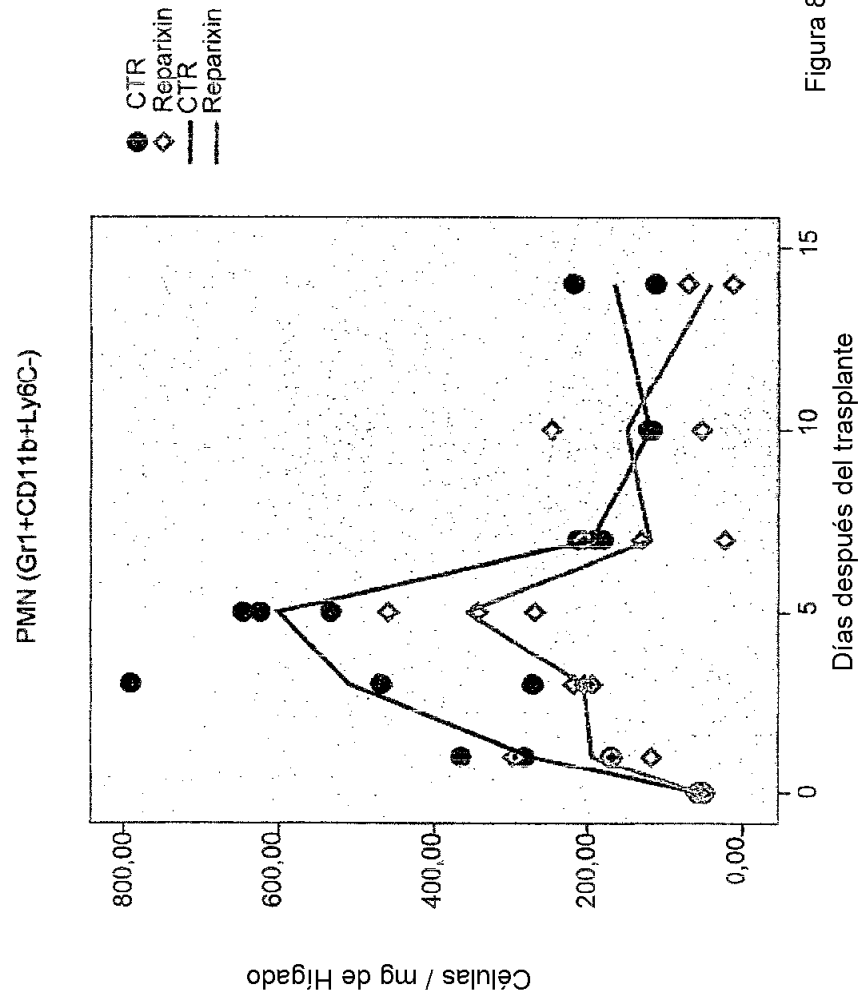


Figura 8

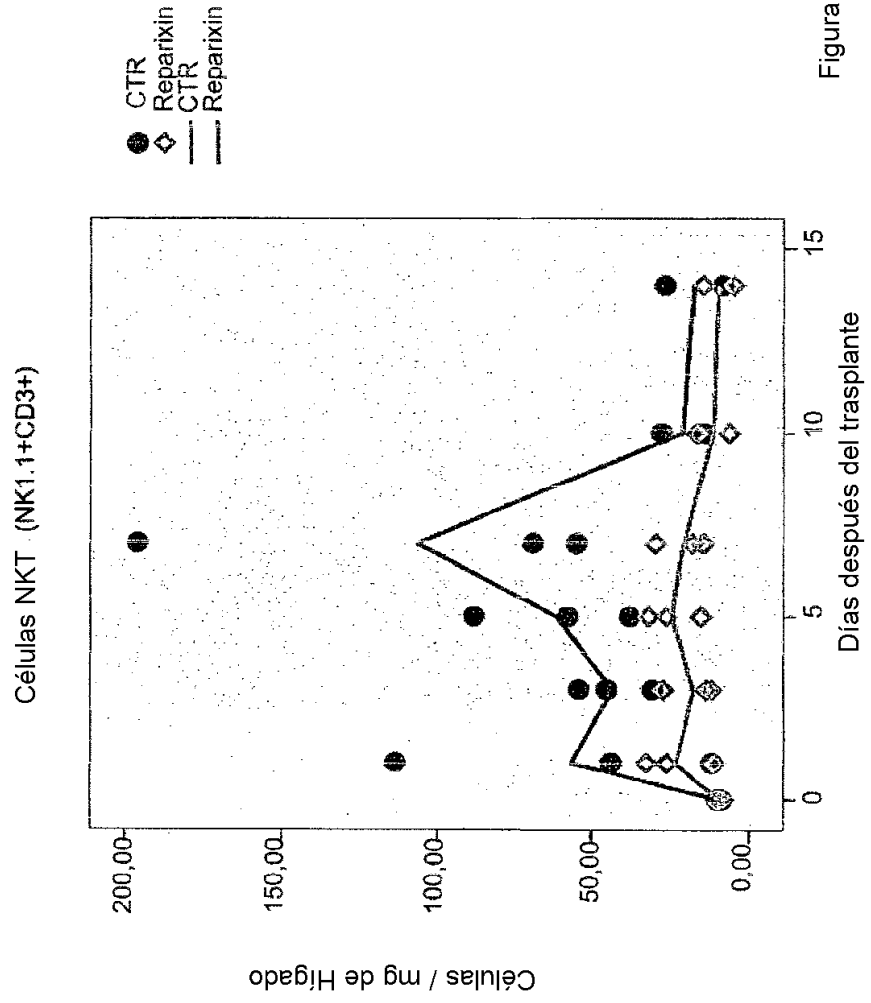


Figura 9

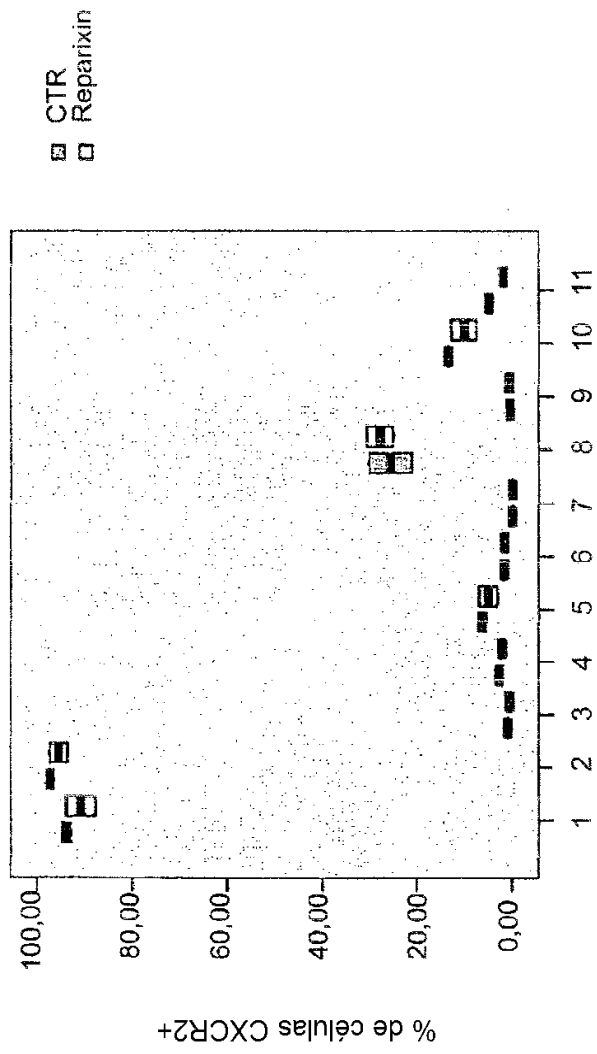


Figura 10