

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 195**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/132** (2006.01)

**A61K 31/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.1999** **E 99946470 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014** **EP 1115389**

54 Título: **Fructosamina oxidasa: antagonistas e inhibidores**

30 Prioridad:

**25.09.1998 NZ 33208498**

**28.09.1998 NZ 33207998**

**03.03.1999 NZ 33447199**

**03.08.1999 NZ 33704299**

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

**19.05.2014**

73 Titular/es:

**PHILERA NEW ZEALAND LIMITED (100.0%)**

**2 Crummer Road, Grey Lynn**

**Auckland, NZ**

72 Inventor/es:

**BAKER, JOHN RICHARD y**

**COOPER. GARTH JAMES SMITH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 461 195 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

Fructosamina oxidasa: antagonistas e inhibidores

5 **La presente invención**

La presente invención se refiere a procedimientos de tratamiento, composiciones farmacéuticas, formas de dosificación, usos de inhibidores de la enzima fructosamina oxidasa en medicina o para fabricar composiciones farmacéuticas, regímenes de tratamiento y combinaciones relacionadas, procedimientos y productos.

10 La diabetes mellitus es un trastorno frecuente que afecta a caso 16 millones de americanos. Véase, Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 20;1183 - 97 (1997). Los individuos diabéticos son propensos a sufrir complicaciones que son una amenaza importante tanto para la calidad como para la cantidad de vida. Casi la mitad de las personas diagnosticadas con diabetes antes de los 31 años de edad mueren antes de llegar a los 50 años en gran medida debido a complicaciones cardiovasculares o renales, a menudo con muchos años anteriores de enfermedad debilitante e incapacitante. Véase, Deckert T, Poulsen J, Larsen M. Diabetologia 14:363 - 70 (1978). Se ha estimado que los individuos diabéticos presentan un incremento de 25 veces el riesgo de ceguera, un incremento de 20 veces el riesgo de insuficiencia renal, un incremento de 20 veces el riesgo de amputación como resultado de una gangrena y un incremento de 2 a 6 veces el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria y daño cerebral isquémico. Véase, Klein R, Klein B, Moss S, Davis M, DeMets D. Diabetes Care 8;311 - 5 (1985).

25 En gran medida por estas complicaciones a largo plazo, se ha estimado que los costes de la diabetes en EE.UU. son de 98 billones de dólares americanos en 1997, que comprende 44 billones de dólares americanos por costes médicos directos por el cuidado de pacientes hospitalizados y de pacientes ambulatorios más 54 billones de dólares americanos por costes indirectos, como pérdida de ganancias y de productividad, y muerte prematura. Las innovaciones médicas que pueden ralentizar la progresión de la diabetes tienen un tremendo potencial para mitigar las repercusiones clínicas y de costes asociadas. Véase American Diabetes Association, "Economic consequences of diabetes in the US in 1997," Diabetes Care 21:296 - 309(1998).

30 Actualmente, niveles elevados de glucosa en sangre se consideran **causantes** de complicaciones diabéticas según los resultados del ensayo Diabetes Complications and Control Trial (DCCT) y del estudio United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). Véase, N Eng J Med. 379:977 - 85 (1993) and Lancet 352:837 - 53 (1998). El DCCT y el UKPDS han demostrado ambos que el desarrollo de complicaciones de la diabetes está relacionado con el grado de hiperglucemia y que el resultado a largo plazo se puede mejorar mediante un tratamiento estricto. Por ejemplo, el pronóstico mejora espectacularmente si la glucemia capilar y los niveles de hemoglobina glicada se mantienen a menos de 150 mg/dl y de 7,0 %, respectivamente.

40 El mecanismo de la toxicidad de la glucosa en los tejidos de pacientes con diabetes mellitus se desconoce. La glucosa se condensa con grupos amino libres sobre proteínas estructurales y funcionales para formar bases de Schiff que, a su vez, sufren una serie de transformaciones para dar productos de Maillard marrón oscuro. Se ha propuesto que las complicaciones por la diabetes se deben a la reticulación no enzimática de proteínas. Véase Cerami A, Ulrich PC, Brownlee M, la patente de EE.UU. 4758583 (1988). No obstante, aunque se observa un incremento de la reticulación de proteínas en los tejidos de personas con diabetes prolongada, el papel de los productos de Maillard como factor causante ciertamente no está claro. Véase, Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Free Rad Biol Med 10;339 - 52 (1991).

50 La reorganización de Amadori es la transformación de Maillard más importante por su producto, la fructosamina, es el precursor de todos los productos de Browning. Los inventores han aislado una nueva enzima extracelular que cataliza la eliminación de fructosaminas de la proteína glicada. La existencia de esta enzima no se ha reconocido anteriormente en la literatura mundial. Basado en esta elevada especificidad por la proteína glicada, los sustratos y su uso de oxígeno como aceptor, la enzima se puede clasificar como **fructosamina oxidasa 1,5.3**. Véase, Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Academic Press, London pp. 19 - 22, (1979).

55 La fructosamina oxidasa es una metaloenzima con cofactores de cobre y quinona, y pertenece al grupo de enzimas de las amina oxidasas de cobre que se han aislado de sueros de bacterias, hongos, levaduras y mamíferos. Los productos de la reacción catalizada por la fructosamina oxidasa son proteína no glicada libre, azúcar  $\alpha$ -dicarbonilo y la especie de oxígeno activa superóxido.

60 El incremento de la actividad de la fructosamina oxidasa podría causar muchas de las secuelas reconocidas de la diabetes al degradar las fructosaminas unidas a las proteínas de la membrana basal y generar especies de oxígeno reactivas como productos de reacción. Por ejemplo, los aniones superóxido producen un incremento en el calcio intracelular que modula la actividad de la óxido nítrico sintasa. El óxido nítrico es un potente vasodilatador y se ha implicado en la disfunción vascular de la diabetes precoz. Véase, Ido Y, Kilo C, Williamson JR. Nephrol Dial Transplant 11 Suppl 5:72 - 5 (1996). Las especies de oxígeno reactivas también producen una drástica disminución

dependiente de la dosis en la síntesis *de novo* de los proteoglicanos heparán sulfato que conducen a una reducción de los sitios aniónicos sobre la membrana basal glomerular y un incremento en la permeabilidad de la membrana basal a las proteínas plasmáticas catiónicas, tales como la albúmina. Véase, Kashira N, Watanabe Y, Makin H, Wallner EI, & Kanwar YS. Proc Natl Acad Sci USA 89:6309 - 13 (1992). El incremento del aclaramiento de la albúmina en orina es un indicador del riesgo en personas con diabetes mellitus de evolución a enfermedad renal y a mortalidad prematura principalmente por enfermedad cardíaca coronaria. Véase, Mattock MB, Barnes DJ, Viberti GC, et al. Diabetes 47:1786 - 92 (1998).

Una vez que se superan las defensas antioxidantes naturales, se pueden generar radicales hidroxilo a partir del superóxido mediante una reacción de Haber-Weiss catalizada con cobre. Véase, Halliwell B & Gutteridge JMC "Free radicals in Biology and Medicine" Clarendon Press, Oxford pp. 136 - 76 (1989). Los radicales hidroxilo son especies extremadamente reactivas y podrían causar daños específicos de sitio permanentes en las proteínas de la membrana basal y los cambios histopatológicos que son típicos de la enfermedad microvascular diabética. Véase, Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. "Pathologic basis of disease" 3ª ed WB Saunders, pp. 991 - 1061. (1984).

De un modo similar, cualquier incremento prolongado de la actividad de la fructosamina oxidasa producirá estrés oxidativo que podría representar el exceso del riesgo de enfermedad macrovascular y un incremento del 75 % de la mortalidad observada en pacientes con diabetes mellitus en comparación con individuos no diabéticos. En estudios recientes se ha demostrado de forma convincente que la modificación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) están implicadas en el desarrollo de aterosclerosis de vasos arteriales coronarios y periféricos y se encuentran concentraciones elevadas de LDL oxidadas en los sujetos con diabetes mellitus. Véase, Witztum JL Br Heart J 69 (Suppl):S12 - S18 (1993) y Picard S, Talussot C, Serusclat A et. al. Diabetes & Metabolism 22:25 - 30 (1996). Los cambios oxidativos en los lípidos de la membrana y en los grupos SH de las proteínas de membrana también producen aberraciones en la homeostasis del calcio celular y contribuyen al incremento de la incidencia de muerte cardíaca repentina que es típica de la diabetes. Véase, Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S et al. Clin Chem 44:148 - 54 (1998).

Cameron et al., 1995, J. Clin. Invest., Vol. 96, pp. 1159 - 1163, describe disfunción neurovascular en ratas; la potencial contribución de la autooxidación y de los radicales libres se examina usando agentes quelantes de metales de transición.

Squadrito et al., 1991, Annali Italiani di Medicina Interna, Vol. 6, pp. 126 - 136, describe complicaciones tardías de la diabetes mellitus.

### 35 Sumario de la invención

La existencia de esta enzima no se ha reconocido anteriormente en la literatura mundial. Esta es una enzima nueva. El inventor cree que el exceso de actividad de fructosamina oxidasa con el sustrato de la proteína de la membrana basal glicada desempeña un papel vital en las complicaciones de la diabetes mediante la formación de  $\alpha$ -dicarbonilo y de especies de radicales libres de oxígeno reactivo.

El inventor también cree que este daño se puede mejorar administrando inhibidores o antagonistas específicos de la fructosamina oxidasa seleccionados de los grupos: (i) agentes quelantes de cobre; (ii) análogos del sustrato; y (iii) compuestos de hidrazina.

Como se usa en el presente documento (incluidos en las reivindicaciones), las expresiones:

- "agentes quelantes de cobre" significa cualquier agente que reduce la actividad en el cuerpo de la fructosamina oxidasa (p. ej., disminuyendo las reservas de cobre en el cuerpo o uniéndose e inactivando la molécula de cobre en el centro reactivo de la enzima) que se puede administrar en cantidades eficaces mediante cualquier vía de administración adecuada (p. ej., por vía oral, mediante inyección etc.). Véase algunos ejemplos a continuación.
- "análogo de sustrato" significa cualquier sustrato peptídico o aminoácido modificado químicamente que inactiva la fructosamina oxidasa (p. ej., uniéndose (preferentemente sustancialmente) de forma irreversible al centro reactivo de la enzima) que se puede administrar en cantidades eficaces mediante cualquier vía de administración adecuada (p. ej., por vía oral, mediante inyección etc.). Véase algunos ejemplos a continuación.
- "compuesto de hidrazina" significa cualquier agente que contiene el resto -NH-NH<sub>2</sub> que inactiva la fructosamina oxidasa (p. ej., uniéndose e inactivando la molécula de quinona en el centro reactivo de la enzima) que se puede administrar en cantidades eficaces mediante cualquier vía de administración adecuada (p. ej., por vía oral, mediante inyección etc.). Véase algunos ejemplos a continuación.
- "al menos periódicamente" incluye desde una sola administración a una administración continua.
- "daño macrovascular y microvascular" hace referencia a tipos generales de daños, pero puede hacer referencia a un tipo general de este daño siempre que exista una vista de minimizar o mejorar las consecuencias y/o la probabilidad de esta categoría de daño.
- "comprende" puede significar "incluye".
- "y/o" significa tanto "y" como "o".

- “de acuerdo con” no necesariamente significa como resultado de la administración simultánea o la autoadministración (p. ej., puede ser en serie y dicha aplicación en serie se puede espaciar, es decir trieno entre comidas y otro agente con una comida).

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de trietilentetramina diclorhidrato para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente humano, en el que el medicamento es para tratar o reducir la probabilidad de miocardiopatía diabética.

10 En algunos casos, el medicamento se puede administrar además de o en combinación con un agente para controlar los niveles de glucosa en sangre.

En algunos casos, el medicamento puede ser para administración oral.

15 En algunos casos, el medicamento puede ser para autoadministración por el paciente.

En algunos casos, el medicamento comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un agente para reducir la glucosa en sangre.

20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona trietilentetramina diclorhidrato para usar en un procedimiento de tratar o reducir la probabilidad de miocardiopatía diabética en un paciente humano.

### Breve descripción de las figuras

25 La **Figura 1** muestra un mecanismo de reacción detallado para la formación de fructosamina y productos de Maillard a partir de glucosa y proteína. La fructosamina oxidasa degrada la fructosamina en una reacción de dos etapas con liberación inicial de un azúcar  $\alpha$ -dicarbonilo y la posterior oxidación del complejo enzima/proteína para liberar la proteína no glicada libre. El cofactor de cobre reducido se oxida in vivo mediante oxígeno molecular y el producto de la oxidación es superóxido.

30 La **Figura 2** muestra los espectros de absorbancia de las enzimas fructosamina oxidasa extraídas de sueros humanos combinados (A) y del organismo microbiano, *Enterbacter aerogenes* (B).

La **Figura 3** muestra los espectros de absorbancia del ducto de *p*-nitrofenilhidrazina (NPH) de la enzima *Enterbacter aerogenes* (A) y un desplazamiento de absorbancia en rojo cuando el aducto NPH-enzima se diluye en KPH 2M.

35 La **Figura 4** muestra la curva de supervivencia para ratas diabéticas no tratadas con STZ en comparación con animales diabéticos tratados con inhibidores de la fructosamina oxidasa.

La **Figura 5** muestra el crecimiento mensual de ratas diabéticas tratadas y no tratadas con STZ en comparación con animales no diabéticos.

### Descripción detallada de la invención

#### 40 (i) Extracción de holoenzima

45 La fructosamina oxidasa en plasma sanguíneo se encuentra principalmente como conjugado enzima-sustrato, unido a péptidos y proteínas (Fig 1). Para obtener un rendimiento máximo de la holoenzima activa, es necesario que el pH del medio sea alcalino, preferentemente con tampón fosfato, para añadir reactivos sulfhidrilo y para incubar la mezcla con prooxidante de forma que se liberen las especies glicadas. La activación más eficaz se encuentra con sales cúpricas.

50 La holoenzima de la fructosamina oxidasa se separa de la apoenzima inactiva por cromatografía de adsorción por afinidad. Se prepara un soporte de afinidad glicado adecuado a partir de perlas de alquilamina o de agarosa reticulada con perlas con residuos en amino terminal unidos por ramas espaciadoras de 6-10 átomos (disponible en Pierce™, Bio-Rad™, & Pharmacia™). El soporte de afinidad se glica incubando con tampón de fosfato potásico 400mM a pH 7,4, que contiene glucosa 50 mM y 0,01 % de azida sódica a 37 °C durante 7 días. La holoenzima se une fuertemente a residuos amino glicados y el cobre residual se elimina fácilmente lavando con agua. La holoenzima activa se eluye con NaCl 800mM en tampón acetato sódico a pH 4,8. Las fracciones activas se combinan y la proteína se precipita con 50 % de disolvente de acetona fría. El sedimento proteico se reconstituye con un volumen mínimo de agua o solución salina fisiológica y se liofiliza para su almacenamiento a largo plazo.

60 La extracción de 35 ml de sueros humanos combinados diabéticos y no diabéticos dio una preparación insoluble transparente con picos de absorbancia a 196 nm y 264 nm típicos de los espectros de absorbancia de la fructosamina oxidasa (Fig 2). Una enzima fructosamina oxidasa de *Enterobacter aerogenes* que muestra picos de absorbancia a 196 nm y 255 nm se incluye para comparar. La actividad enzimática y la actividad relativa es la siguiente.

TABLA 1.

Muestra	Proteína ( $\mu\text{g/ml}$ )	Actividad del citocromo C* (U/l)	Actividad de Sp† (U/g)
humana	32,9	4,58	139,4
<i>E aerogenes</i>	541,5	66,32	115,11

\*El extracto enzimático se preincubó en tampón TES 0,05 M a pH 7,4 que contened sustrato DMF 1mM a 37 °C durante 5 minutos. La actividad enzimática se midió con ferrocitocromo 10  $\mu\text{M}$ . La reacción se inició con sustrato fructosamina 50  $\mu\text{M}$  como as g-BSA y se determinó la  $\Delta A_{550\text{nm}}$  en 5 minutos.

† Concentración de proteínas determinada a partir de  $A_{210\text{nm}}-A_{220\text{nm}}$  en comparación con los patrones de BSA.

## (ii) Identificación del cofactor

- 5 El aducto de *p*-nitrofenilhidrazina (NPH) de la enzima de *Enterbacter aerogenes* con  $A_{\text{máx}}$  399nm se obtuvo como se ha descrito anteriormente. Véase, Palcic MM, Janes SM. Meth Enzymol 258:34 - 8 (1995). Se observó un desplazamiento de la absorbancia en rojo a  $A_{\text{máx}}$  438nm cuando el aducto NPH-enzima se diluyó en KOH 2M. Dicho desplazamiento de la absorbancia es típico de los cofactores de quinona de la cobre amino oxidasa.

## 10 EJEMPLO 1: Identificación de los inhibidores de la fructosamina oxidasa

El objetivo de este ejemplo es demostrar cómo el ensayo de la fructosamina oxidasa, el sujeto de una especificación de patente internacional PCT presentada NZ 332085, se puede usar en la identificación y la graduación de los inhibidores candidatos de la fructosamina oxidasa. Este abordaje tiene en cuenta la actividad del fármaco en una matriz de plasma humano *in vitro*. Los inhibidores de la enzima encuentran amplia aplicación en la medicina clínica como tratamientos para una serie de trastornos metabólicos. Por ejemplo, los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina se han usado en el tratamiento de la hipertensión. Véase, Harris EE, Patchett AA, Tristram EW, & Wyvratt MJ. Aminoacid derivatives as antihypertensives. Patente de EE.UU. 4374829 (1983). De un modo similar, los inhibidores de la enzima 3 - hidroxil-3 - metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa se han usado en el tratamiento de la hipertensión. Véase, Hoffman WF, Smith RL, Lee TJ. Novel HMG-CoA reductase inhibitors. Patente de EE.UU. 4866090 (1989). Los inhibidores de la *fructosamina oxidasa* se pueden seleccionar de las sustancias que se unen y bloquean el cofactor de quinona (compuestos e hidrazina), el cofactor de cobre (quelantes de cobre) o que imitan al sustrato normal de la enzima (análogo del sustrato).

## 25 Procedimiento:

Los potenciales inhibidores de la *fructosamina oxidasa* se analizaron en suero o plasma humano (individualmente y en combinación) usando el procedimiento de ensayo de la actividad de la *fructosamina oxidasa* descrita con detalle en la especificación de la patente de Nueva Zelanda N° 332085. La inhibición enzimática irreversible se caracteriza por una disminución progresiva de la actividad con el tiempo que, en última instancia, alcanza una inhibición completa incluso con las concentraciones muy diluidas del inhibidor siempre que el inhibidor esté en exceso de la cantidad de la enzima presente.

## 35 Resultados:

La actividad relativa de una selección de inhibidores de la fructosamina oxidasa hidrazina, quelante de cobre y análogo del sustrato se muestran en la Tabla 2. En algunos casos, se produjo un grado de solapamiento entre clases, es decir, algunos compuestos de hidrazina también son quelantes de cobre. Para aclarar este punto, está indicado el potencial quelante de cobre para algunos compuestos ( $\beta$ ). La eficacia del inhibidor se expresa no mediante una constante de equilibrio sino mediante una constante de velocidad (K), que determina la fracción de la enzima inhibida en un periodo de tiempo dado mediante una determinada concentración del inhibidor. La especificidad del inhibidor por el centro activo de la enzima está indicada por la concentración de inhibidor QUE CAUSA una inactivación del 50 % de la enzima ( $CI_{50}$ ).

45

TABLA 2

Inhibidor:	$CI_{50}^1$	$K(\text{min}^{-1})^2$	$\beta^3$
<b>Inhibidor: compuestos de hidrazina</b>			
aminoguanidina	231,2 $\mu\text{M}$	0,0067*	-
semicarbazida	45,1 $\mu\text{M}$	0,0276*	+++
benserazida	13,6 $\mu\text{M}$	0,0095*	-
Dihidrazida oxálica	1,59 $\mu\text{M}$	0,0542	-
hidralazina	1,52 $\mu\text{M}$	0,0029	+++
Fenilhidrazina	0,81 $\mu\text{M}$	0,1160	-
Carbidopa	0,50 $\mu\text{M}$	0,1496	-
Diaminoguanidina	0,36 $\mu\text{M}$	0,1340	-
<b>Inhibidor: Análogos del sustrato</b>			
lisinopril	216,9 $\mu\text{M}$	0,0174	-
enalapril	3,95 $\mu\text{M}$	0,0326	+++

captopril	1,78 $\mu\text{M}$	0,0259	-
acetilpenicilamina	1,06 $\mu\text{M}$	0,0811	
acetilcisteína	0,83 $\mu\text{M}$	0,1677	
<b>Inhibidor: Quelantes de cobre</b>			
Desferrioxamina	40,6 $\mu\text{M}$	0,0109*	
EDTA	15,7 $\mu\text{M}$	0,0755*	
Azida sódica	9,48 $\mu\text{M}$	0,0004	
Cianuro potásico	6,36 $\mu\text{M}$	0,0116	
Trieno	5,40 $\mu\text{M}$	0,0196	
o-fenantrolina	4,25 $\mu\text{M}$	0,0385	
histidina	2,29 $\mu\text{M}$	0,0554	
<b>Inhibidor: Agentes combinados</b>			
Acetilcisteína + hidralazina	0,57 $\mu\text{M}$	0,1654	
Acetilcisteína + diaminoguanidina	1,07 $\mu\text{M}$	0,0795	
Acetilcisteína + histidina	1,11 $\mu\text{M}$	0,0722	
Acetilcisteína + carbidopa	0,27 $\mu\text{M}$	0,2000	

1 Suero humano fresco se incubó con inhibidor 0 - 1.000  $\mu\text{M}$  en tampón TES 0,05 M a pH 7,4 a 37°C durante 5 minutos. La actividad enzimática se midió con ferrocitocromo 10  $\mu\text{M}$ . La reacción se inició con sustrato fructosamina 50  $\mu\text{M}$  como as g-BSA y se determinó la  $\Delta A_{550\text{nm}}$  en 5 minutos.

2 Las constantes de la velocidad se calcularon a partir de la reacción de fructosamina oxidasa bien con inhibidor 1,0  $\mu\text{M}$  o con inhibidor 10,0  $\mu\text{M}$  (\*).

3 El potencial quelante de cobre ( $\beta$ ) se determinó a partir de la capacidad del agente para eliminar el cobre en diálisis del sustrato de BSA saturado con cobre.

#### Conclusión:

1. La inhibición irreversible de la *fructosamina oxidasa* es viable.
2. Los inhibidores se pueden clasificar ampliamente en tres clases de compuesto. hidrazinas, análogos de sustrato y quelantes de cobre.
3. La actividad de la *fructosamina oxidasa* en plasma sanguíneo humano se puede eliminar mediante concentraciones micromolares de los inhibidores.
4. Muchos de los inhibidores activos son fármacos que ya se han administrado como medicamentos en seres humanos para tratar otros trastornos (no la diabetes).

#### EJEMPLO COMPARATIVO 2: Utilidad clínica de la inhibición de la *fructosamina oxidasa*: Primer estudio preclínico

- 15 El objetivo de este ejemplo es demostrar cómo la utilidad clínica de los candidatos a inhibidores de la *fructosamina oxidasa* se puede evaluar usando un modelo animal estándar de la diabetes melitus, la rata diabética-estreptozocina (rata STZ). Este abordaje tiene en cuenta la biodisponibilidad del fármaco, la actividad del fármaco y sus metabolitos y cualquier efecto adverso del fármaco o os factores de toxicidad.

#### 20 Procedimiento:

48 ratas WISTAR de 6-8 semanas de edad y de 200-300 g de peso se aleatorizaron a:

- Grupo 1 Control no diabéticas
- Grupo 2 Control diabéticas
- Grupo 3 Diabéticas tratadas con hidralazina
- Grupo 4 Diabéticas tratadas con EDTA
- Grupo 5 Diabéticas tratadas con hidralazina y acetilcisteína
- Grupo 6 Diabéticas tratadas con acetilcisteína.

- 30 Se administró estreptozocina (60 mg por kg) en una vena lateral de la cola. Los controles no diabéticos recibieron una inyección simulada de tampón. La diabetes se confirmó mediante medición de la glucosa en sangre venosa >15mmol/l tras 1 semana y los animales diabéticos se trataron con inyecciones subcutáneas de insulina ultralente (4 U/inyección) 3 – 5 días a la semana para mantener el crecimiento corporal. Los medicamentos se administraron a 50 mg/l en el agua de bebida durante un periodo de 8 meses. Se recogió orina y se extrajeron muestras de plasma venoso a intervalos mensuales.

#### Resultados:

- 40 (a) **Control de la glucosa en sangre:** La tasa de conversión en diabetes con administración intravenosa de STZ fue >95 %. La STZ intravenosa indujo una forma grave de diabetes dependiente de insulina que se mantuvo durante los 8 meses del estudio. A pesar de la terapia de sustitución de la insulina, el control de la glucemia fue malo, como

pone de manifiesto la media  $\pm$  SD de la glucosa (semana 4) y los niveles de HbA<sub>1c</sub> (semana 32) en la TABLA 3.

**TABLA 3.**

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Glucosa (mmol/l)	9,1 $\pm$ 1,5	30,1 $\pm$ 9,7	35,7 $\pm$ 9,5	39,0 $\pm$ 6,4	30,4 $\pm$ 8,8	37,8 $\pm$ 5,2
HbA <sub>1c</sub> (%)	3,92 $\pm$ 0,11	10,85 $\pm$ 0,05	8,65 $\pm$ 1,18	9,30 $\pm$ 0,63	8,72 $\pm$ 0,55	9,47 $\pm$ 1,23

- 5 **(b) Supervivencia:** La tasa de mortalidad entre ratas STZ sin tratar fue extremadamente alta. La supervivencia mejoró significativamente mediante la administración de inhibidores de la *fructosamina oxidasa* (TABLA 4).

**TABLA 4.**

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Supervivientes a la semana 32	8	2	6	5	8	7
Significación*	-	-	ns	ns	P <0,025	P <0,05

\* Prueba del Chi cuadrado en comparación con las ratas STZ sin tratar (Grupo 2)

- 10 La curva de supervivencia para ratas STZ comparadas con controles no diabéticos se muestra en la FIGURA 4. Se supuso que la muerte era secundaria a un acontecimiento cardiovascular. En general, la función renal permaneció normal.

- 15 **(c) Ganancia de peso:** Se produjo una ganancia progresiva de peso entre los controles no diabéticos en las 32 semanas del estudio, que se anuló en los animales diabéticos STZ. Al final del periodo de estudio de 32 semanas, el cambio de peso medio entre los animales supervivientes del estudio fue: Grupo 1, +74,6 %; Grupo 2, -21,0 %, Grupo 3, -11,0 %; Grupo 4, +1,2 %, Grupo 5, +16,0 %; y Grupo 6, -8,1 % (FIGURA 5). En comparación con los controles diabéticos no tratados, los inhibidores de la fructosamina oxidasa produjeron una mejora en la ganancia de peso corporal aproximadamente en proporción con la actividad del inhibidor (TABLA 2), es decir acetilcisteína/hidralazina > EDTA > acetilcisteína > hidralazina.

- 20 **(d) Farmacocinética clínica:**

- 25 **► Hidralazina.** La biodisponibilidad de la hidralazina en seres humanos tras la administración oral es 26 - 55 %. No obstante, solo el 2,0 - 3,6 % del fármaco se excreta en la orina sin modificar durante 24 horas después de la administración oral. La mayor parte del fármaco se recupera con producto acetilado inactivo. Véase, Talseth T, Eur J Clin Pharmacol 10:395 - 401 (1976) y Talseth T, Clin Pharmacol Ther 21:715 - 20 (1977). Esto podría justificar la eficacia reducida de la hidralazina como inhibidor de la *fructosamina oxidasa* en el presente estudio. Además, las dosis de fármaco administradas a cada rata STZ se calcularon en 12,5 mg de hidralazina/día o 35 mg/kg, basado en el consumo medio de 250 ml de agua al día y suponiendo una masa corporal media de 350 g. Esta dosis en ratas supera con mucho la dosis humana máxima recomendada de 200 mg de hidralazina al día (3 mg/kg suponiendo una masa corporal media de 70 kg).

- 30 **► EDTA** La biodisponibilidad del EDTA tras la administración oral es muy baja (menos del 5 %) por la mala absorción en el intestino, lo que limita su utilidad en seres humanos a la administración parenteral o técnicas de irrigación. Véase, Wynn JE et al Toxicol Appl Pharmacol 16:807 - 17 (1970).

- 35 **► Acetilcisteína** La acetilcisteína se absorbe rápidamente en el intestino, con una biodisponibilidad en el ser humano que varía entre 6 y 10 %. Véase, Borgstrom L et al Eur J Clin Pharmacol 31:217 - 22 (1986). No obstante, el fármaco se degrada rápidamente en el hígado mediante eliminación del resto acetilo. Véase, Holdiness MR. Clin Pharmacokinet 20:123 - 34 (1991). La inducción de enzimas hepáticas podría justificar la pérdida progresiva de eficacia del fármaco que se observa tras la semana 12 en el presente estudio,.

#### 40 CONCLUSIÓN:

5. La estreptozocina induce una forma grave de diabetes dependiente de insulina en ratas con una morbilidad y una mortalidad altas.
- 45 6. La supervivencia de las ratas STZ se potenció tratando con inhibidores de la *fructosamina oxidasa* en proporción con su actividad en un ensayo *in vitro*.
7. La ganancia de peso de las ratas STZ se potenció tratando con inhibidores de la *fructosamina oxidasa*.
8. Se produjo un beneficio de la coadministración de acetilcisteína e hidralazina, lo que sugiere un efecto de sinergia entre las clases de inhibidores de la *fructosamina oxidasa*.
- 50 9. Basándose en estos estudios *in vivo* en ratas, es probable la eficacia de un candidato de inhibidor de la *fructosamina oxidasa* en un ser humano se vea influido por la biodisponibilidad del fármaco, la degradación del compuesto activo *in vivo* y la dosis oral máxima tolerada en el fármaco.

#### EJEMPLO 3: Utilidad clínica de la inhibición de la *fructosamina oxidasa*: Segundo estudio preclínico

- 55 El objetivo de este ejemplo es demostrar cómo la utilidad clínica de los candidatos a inhibidores de la *fructosamina oxidasa*, solos o en combinación, se puede evaluar usando un modelo animal estándar de la diabetes melitus, la rata diabética-estreptozocina (rata STZ). Este abordaje tiene en cuenta la biodisponibilidad del fármaco, la actividad de los fármacos y sus metabolitos, interacciones entre fármacos y cualquier efecto adverso del fármaco o los factores de toxicidad.

**Procedimiento:**

80 ratas Wistar de 200-300 g de peso y de 6-8 semanas de edad se aleatorizaron a:

- Grupo 1 Control no diabéticas
- Grupo 2 Control diabéticas
- Grupo 3 Diabéticas tratadas con captopril (análogo del sustrato)
- Grupo 4 Diabéticas tratadas con carbidopa (hidrazina)
- Grupo 5 Diabéticas tratadas con trieno (quelante de cobre)
- Grupo 6 Diabéticas tratadas con captopril y trieno.
- Grupo 7 Diabéticas tratadas con captopril y carbidopa
- Grupo 8 Diabéticas tratadas con trieno y carbidopa

5 La diabetes se indujo administrando estreptozocina (60 mg por kg) mediante inyección intraperitoneal. Los controles no diabéticos recibieron una inyección simulada de tampón. La diabetes se confirmó mediante medición de la glucosa en sangre venosa >15mmol/l tras 1 semana y los animales diabéticos se trataron con inyecciones subcutáneas de insulina ultralente (4 U/inyección) 3 días a la semana para mantener el crecimiento corporal. Los medicamentos se administraron a 50 mg/l en el agua de bebida durante un periodo de 6 meses. Se recogió orina y se extrajeron muestras de plasma venoso a intervalos mensuales. Se sacrificó a los animales y se les realizó la autopsia al final del estudio.

**Resultados:**

15 **(a) Control de la glucosa en sangre:** La tasa de conversión en diabetes con administración intraperitoneal de STZ fue ≈ 80 %. Un mal control de la glucemia se sostuvo durante los 6 meses de duración del estudio, como pone de manifiesto la media ± SD de los niveles HbA<sub>1c</sub> (semana 4, 12 y 24) (TABLA 5).

20 **TABLA 5.**

HbA <sub>1c</sub> (%)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Semana 4	4,1 ± 0,1	8,3 ± 0,9	8,5 ± 0,9	9,0 ± 1,0	8,0 ± 1,0	9,0 ± 5,2	9,1 ± 1,5	9,1 ± 1,5
Semana 12	4,1 ± 0,1	9,2 ± 0,6	9,2 ± 1,1	9,6 ± 0,7	8,8 ± 0,9	9,5 ± 0,8	9,5 ± 1,0	9,3 ± 0,9
Semana 24	3,7 ± 0,1	9,4 ± 1,3	9,6 ± 1,3	9,9 ± 1,1	9,0 ± 1,4	9,5 ± 1,3	9,8 ± 1,2	9,1 ± 1,2

25 **(b) Supervivencia:** Comparada con la administración intravenosa de STZ, la administración intraperitoneal de STZ indujo una forma menos grave de diabetes con una tasa de mortalidad menor. Al final del periodo de estudio de 24 semanas, la tasa de mortalidad entre los animales del estudio fue: Grupo 1, 0 %; Grupo 2, 14,3 %, Grupo 3, 0 %; Grupo 4, 0 %, Grupo 5, 0 %; y Grupo 6, 12,5 %, Grupo 7, 0 % y grupo 8, 0 %. No se observaron diferencias significativas entre los grupos por la baja frecuencia de los acontecimientos.

30 **(c) Ganancia de peso:** La diabetes STZ produce una profunda pérdida de peso en ratas diabéticas en comparación con los controles no diabéticos. La ganancia media de peso de los animales del estudio desde el principio al final del periodo de 24 semanas se indica en la TABLA 6.

30 **TABLA 6.**

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Media ± SEM de la ganancia de peso	342,8 ± 13,7	54,4 ± 12,5	60,7 ± 20,7	33,7 ± 20,4	123,6 ± 20,5	56,1 ± 21,3	55,1 ± 17,1	75,8 ± 25,4
P*	-	ns	ns	ns	0,0138	ns	ns	ns

• Prueba t Student en comparación con las ratas STZ sin tratar (Grupo 2)

35 En términos del bienestar general, el trieno (Grupo 5) parece más eficaz que captopril (Grupo 3) y carbidopa (Grupo 4). La utilidad del trieno se redujo cuando el fármaco se coadministró con captopril (Grupo 6) o carbidopa (Grupo 8). No se observaron signos de sinergia entre las clases de inhibidores de la *fructosamina oxidasa*.

40 **(d) Formación de cataratas** Las cataratas es una complicación a largo plazo reconocida de la diabetes mal controlada. La formación macroscópica de cataratas en ratas STZ en comparación con los animales control diabéticos al final del estudio la semana 24 se muestra en la (TABLA 7).

40 **TABLA 7.**

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Nº (%) con cataratas	0 (0 %)	8 (40 %)	2 (25 %)	2(25 %)	0 (0 %)	2(28 %)	5(62 %)	1(12 %)
P	-	-	ns	ns	< 0,10	ns	ns	ns

• Prueba del Chi cuadrado en comparación con las ratas control diabéticas (Grupo 2)

Aunque no significativo al nivel de P = 0,05, el trieno parece más eficaz que captopril y carbidopa en la inhibición de la formación macroscópica de cataratas. No se observaron signos de sinergia entre las clases de inhibidores de la *fructosamina oxidasa*.

45 **(e) Miocardiopatía diabética** La miocardiopatía es una complicación a largo plazo reconocida de la diabetes mal



controlada. Macroscópicamente, corazones de ratas STZ se dilataron con adelgazamiento de la pared ventricular. Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina en Tricromo de Masson mostraron una palidez focal con una pérdida de arquitectura normal del miocardio de ambos ventrículos que comenzó en las regiones subendocárdicas y subepicárdicas y se extienden para abarcar toda la pared ventricular en los animales afectados gravemente. También se observó una infiltración marcada por tejido conjuntivo fibroso entre miocitos y un incremento del tejido conjuntivo fibroso en las paredes de las arterias intramurales. Estos aspectos son consistentes con miocardiopatía dilatada. La fibrosis miocárdica macroscópica en ratas STZ se comparó con los animales control no diabéticos al final del estudio la semana 24 se muestra en la (TABLA 8).

TABLA 8.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8
Nº (%) de ratas con fibrosis grave	0 (0 %)	10 (50 %)	6 (75 %)	2 (25 %)	0 (0 %)	6 (75 %)	8 (100 %)	7 (87 %)
P	-	-	ns	ns	< 0,005	ns	<0,005	<0,05

• Prueba del Chi cuadrado en comparación con las ratas control diabéticas (Grupo 2)

El trieno parece altamente eficaz en la inhibición del desarrollo de la miocardiopatía diabética. No se observaron signos de sinergia entre las clases de inhibidores de la *fructosamina oxidasa*.

#### (f) Farmacocinética clínica:

► **Trieno** La biodisponibilidad del trieno es inferior al 10 %. La mayoría de los fármacos no modificados se elimina en la orina en las primeras 6 horas de dosificación oral, principalmente como un derivado de acetilo, lo que indica que será necesario un régimen farmacológico de tres o cuatro veces al día y una preparación de liberación sostenida. Véase, Kodama H et al Life Sci 61:899 - 907 (1997). Además, los niveles en plasma de ratas que no habían ayunado son significativamente menores que los observados en animales en ayunas y la captación de trieno en el borde en cepillo intestinal se inhibe competitivamente mediante otros compuestos de amina. Véase, Tanabe R et al J Pharm Pharmacol 48:517 - 21 (1996). Esto implica que el trieno se administra mejor en estado de ayunas. La interferencia en la absorción del fármaco desde el borde en cepillo del intestino podría justificar las discrepancias entre los grupos de tratamiento con trieno (Grupos 5, 6 y 8). Por último, en el estudio actual, cada rata STZ consumió aproximadamente 250 ml de agua al día (12,5 mg de trieno/rata/día). Suponiendo una masa corporal media de 350 g, esta dosis de trieno equivale a 35 mg/ kg. La dosis de trieno usada previamente en el tratamiento de seres humanos con otra afección (distinta a la diabetes) varía de 1,2 - 2,4 g (17 - 35 mg/ kg suponiendo una masa corporal media de 70 kg). Véase, Walshe JM Lancet 8273:643 - 7 (1982). Esto implica que los seres humanos pueden ser tratados de un modo seguido con dosis comparables de trienos a las administradas a ratas en el estudio actual para provocar de este modo las ventajas de la inhibición de la fructosamina oxidasa y/o del antagonismo en un paciente diabético al que se hace referencia en el presente documento.

► **Captopril** La biodisponibilidad del captopril es de aproximadamente el 65 % tras la dosis oral. No obstante, el fármaco está casi completamente unido *in vivo* a la albúmina y a otras proteínas plasmáticas y forma disulfuros mixtos inactivos con tioles endógenos de modo que los niveles en plasma del fármaco activo pueden ser muy bajos. La semivida de eliminación del captopril sin modificar es de aproximadamente 2 horas. Véase, Duchin KL et al Clin Pharmacokinet 14:241 - 59 (1988). Estas observaciones podrían explicar la eficacia reducida del captopril en ratas STZ en comparación con los estudios *in vitro*. Además, cada rata STZ consumió aproximadamente 12,5 mg de captopril/día, que equivale a 35 mg/kg, suponiendo una masa corporal media de 350 g. Esta dosis supera con mucho la dosis humana máxima recomendada de 150 mg de captopril al día (2 mg/kg suponiendo una masa corporal media de 70 kg).

► **Carbidopa** En un estudio de perros beagle, la absorción oral de carbidopa fue casi completa y la biodisponibilidad absoluta fue del 88 %. La semivida biológica fue de 5 horas. Véase, Obach R et al J Pharm Pharmacol 36:415 - 6 (1984). No obstante, la carbidopa es un compuesto inestable y se degrada de forma natural en un periodo corto. Las soluciones se dejaron reposar expuestas a la luz a temperatura ambiente y sufrirán una degradación oxidativa del 50 % en 24 horas. Véase, Pappert EJ et al Movement Disorders 12:608 - 23 (1997). La biodisponibilidad reducida debido a la degradación oxidativa del fármaco activo antes de su consumo y después de su ingestión en ratas podría explicar (en parte) la eficacia reducida de la carbidopa en el estudio actual. Por último, cada rata STZ consumió aproximadamente 12,5 mg de carbidopa/día, que equivale a 35 mg/kg, suponiendo una masa corporal media de 350 g. Esta dosis supera con mucho la dosis humana máxima recomendada de 200 mg de carbidopa al día (3 mg/kg suponiendo una masa corporal media de 70 kg).

#### CONCLUSIÓN:

10. la estreptozocina intraperitoneal está asociada con una tasa de mortalidad más baja que la estreptozocina intravenosa en ratas.
11. la ganancia de peso se potenció en las ratas STZ tratadas con el quelante de cobre, trieno. El captopril y la carbidopa fueron ineficaces.
12. El desarrollo de cataratas se puede inhibir con trieno. La eficacia del trieno disminuye cuando el fármaco se coadministra con captopril o carbidopa.
13. El desarrollo de miocardiopatía diabética se previno mediante el tratamiento con trieno. La eficacia del

trieno disminuye cuando el fármaco se coadministra con captopril o carbidopa.

14. Las dosis orales que inhiben el desarrollo de complicaciones en ratas (cataratas, miocardiopatía y muerte prematura) son equivalentes basándose en la masa corporal a dosis de trieno que anteriormente se han usado para tratar a seres humanos con otra afección (no diabetes).

5 15. Cuando se administra a seres humano tres o cuatro veces al día o como una preparación de liberación sostenida en dosis previamente toleradas de 1,2 - 2,4 g/día, el trieno puede proporcionar un medio eficaz de tratamiento de las complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus.

#### 10 **EJEMPLO COMPARATIVO 4: Utilidad clínica de la inhibición de la fructosamina oxidasa: ensayo clínico doble ciego y controlado con placebo**

15 El objetivo de este ejemplo es demostrar cómo la utilidad clínica de los candidatos a inhibidores de la *fructosamina oxidasa* se evaluarán en sujetos humanos diabéticos. El Comité de Ética Regional de Auckland ha aprobado un protocolo detallado basado en esta propuesta. Este abordaje tiene en cuenta la biodisponibilidad del fármaco, la actividad de los fármacos y sus metabolitos, las interacciones entre fármacos, cualquier efecto adverso del fármaco o factores de toxicidad y el factor de "escalada" del tratamiento de ratas a seres humanos.

20 **Objetivo:** Un estudio piloto para determinar si el trieno reducirá la tasa de progresión de la enfermedad renal y las complicaciones microvasculares asociadas en pacientes con nefropatía diabética por DMNID.

20 **Población de pacientes:** 60 varones y mujeres con edades comprendidas entre los 40 y los 70 años de edad con un mal control de la glucemia y nefropatía diabética por DMNID. **Diseño y duración del estudio:** Diseño del estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo que consiste en cinco periodos:

- 25 • periodo de selección (desección de posibles candidatos que cumplan los criterios del estudio);
- periodo de reclutamiento (obtención del consentimiento informado y mediciones basales);
- periodo de preinclusión (ensayo de aceptabilidad de los protocolos del estudio y la medicación del estudio);
- periodo de mantenimiento (tratamiento con fármaco/placebo, monitorización de la eficacia/seguridad);
- periodo de seguimiento (detectar cualquier efecto desfavorable cuando se interrumpe la medicación).

30 La terapia enmascarada (400 mg de trieno o placebo) se administrará tres veces al día media hora antes de las comidas además de las terapias antihipertensoras e hipoglucémicas actuales. El estudio terminará cuando todos los pacientes se aleatorizan y han participado en el estudio (periodo de mantenimiento) durante un mínimo de 6 meses. Todos los pacientes aleatorizados que interrumpan el fármaco del estudio por cualquier motivo distinto a la muerte serán seguidos durante todo el estudio; los pacientes que se sometan a un trasplante renal o diálisis serán seguidos únicamente para determinar el estado vital.

#### Resultados

##### 40 Eficacia

- La medida principal del resultado consistirá en la tasa de disminución de la función renal medida mediante la tasa e filtración glomerular (aclaramiento de creatinina).
- Las medidas de resultado secundarias a evaluar son el desarrollo de retinopatía diabética, neuropatía periférica diabética y neuropatía autonómica diabética.

##### 45 Seguridad:

- 50 • Los parámetros de seguridad evaluados serán los acontecimientos adversos y las anomalías de laboratorio clínico se evaluarán en los puntos de tiempo mediante el historial médico, la exploración física y los análisis de laboratorio y se compararon entre grupos.

55 **Consideraciones estadísticas:** El tamaño de la muestra estimado para este ensayo se determina para la hipótesis primaria de que la tasa proyectada de la degradación del aclaramiento de creatinina (1 ml.min<sup>-1</sup>) en pacientes con DMNID con nefropatía diabética (aclaramiento de creatinina <90 ml.min<sup>-1</sup>) se reducirá tratando con trieno. El estudio tiene potencia para detectar (80 %) un cambio de 6 ml.min<sup>-1</sup> en el aclaramiento de creatinina en 6 meses con cuatro lecturas cada dos meses (es decir, 0, 2, 4 y 6 meses) suponiendo una tasa del 10 % de pérdida de seguimiento al valor de significación del 5 %.

#### 60 **CONCLUSIÓN:**

16. La **eficacia** del trieno como tratamiento de las complicaciones microvasculares en pacientes con DMNID se confirmará.

17. La **seguridad** de la administración a largo plazo del trieno en pacientes con un mal control de la glucosa en sangre y nefropatía diabética debido a la DMNID se confirmará.

65 18. También proporciona un medio para determinar la utilidad clínica de los inhibidores alternativos de la

fructosamina oxidasa, tales como los quelantes de cobre D-penicilamina, sar y diamsar (es decir, se podría usar trieno en lugar de placebo en ensayos clínicos posteriores).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de trietilentetramina diclorhidrato para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente humano, en el que el medicamento es para tratar o reducir la probabilidad de miocardiopatía diabética.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el medicamento se administra además de, o en combinación con un agente para controlar los niveles de glucosa en sangre.
- 10 3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento es para administración oral.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento es para autoadministración por el paciente.
- 15 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un excipiente o un agente para reducir la glucosa en sangre.
6. Trietilentetramina diclorhidrato para usar en un procedimiento de tratar o reducir la probabilidad de miocardiopatía diabética en un paciente humano.
- 20

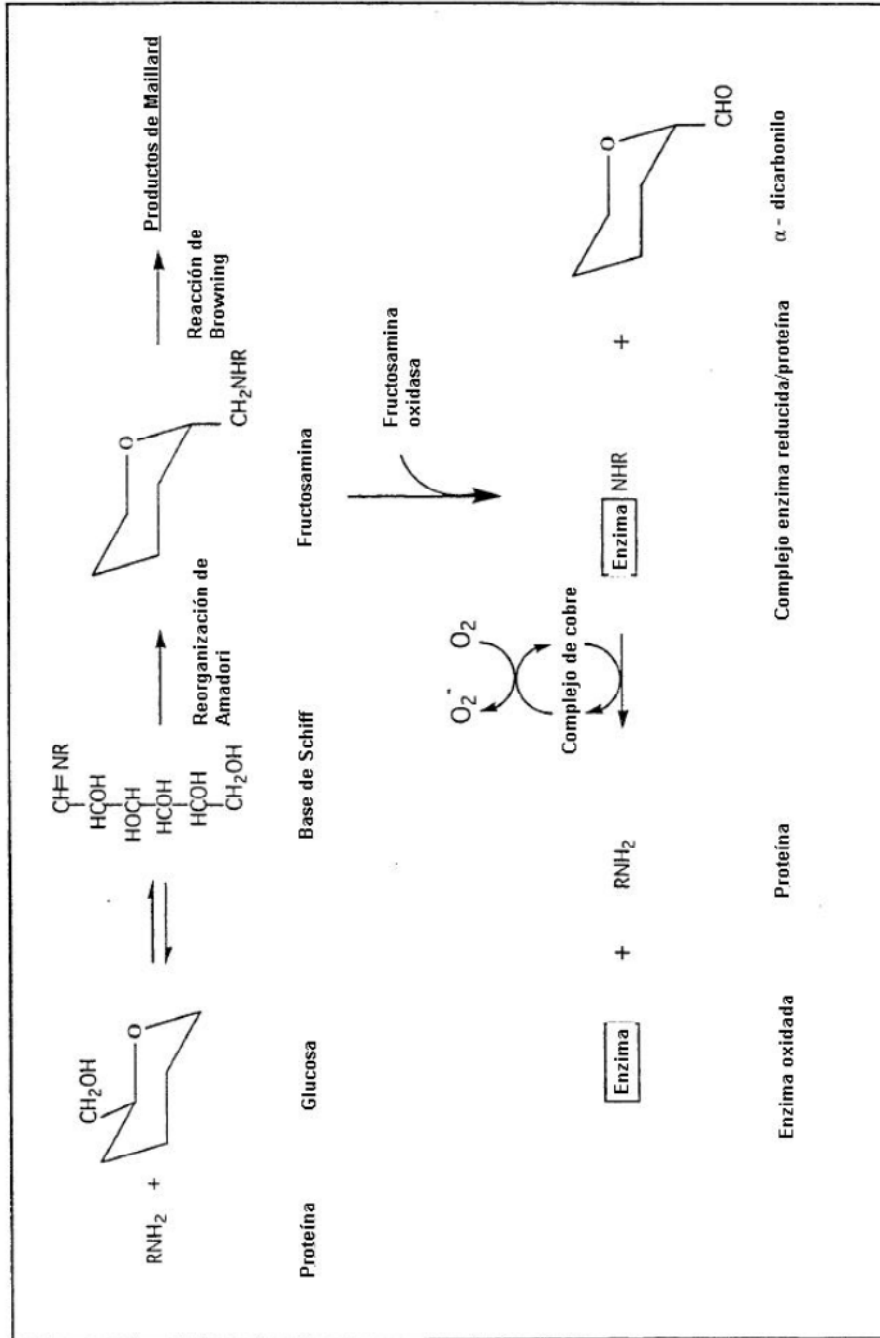
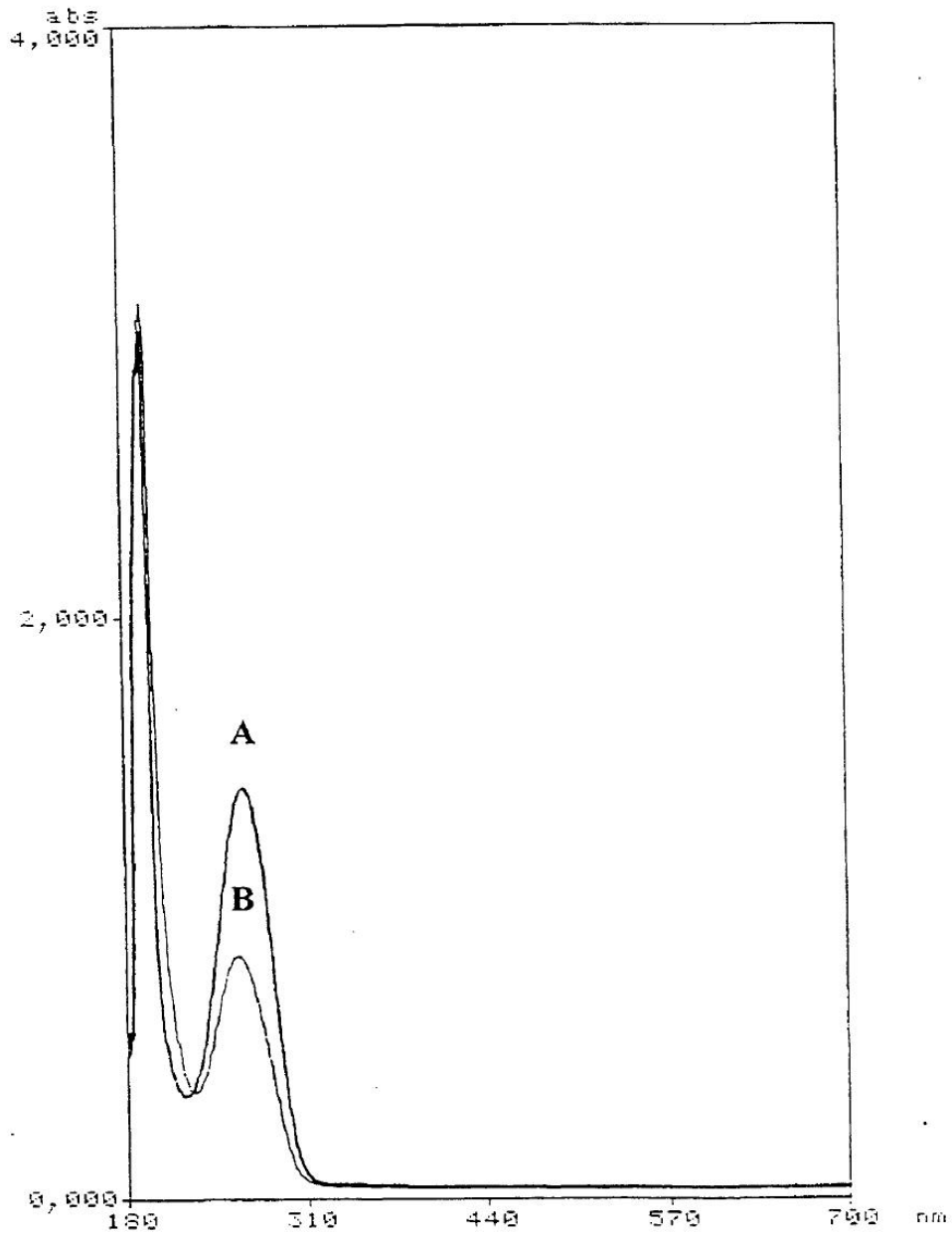
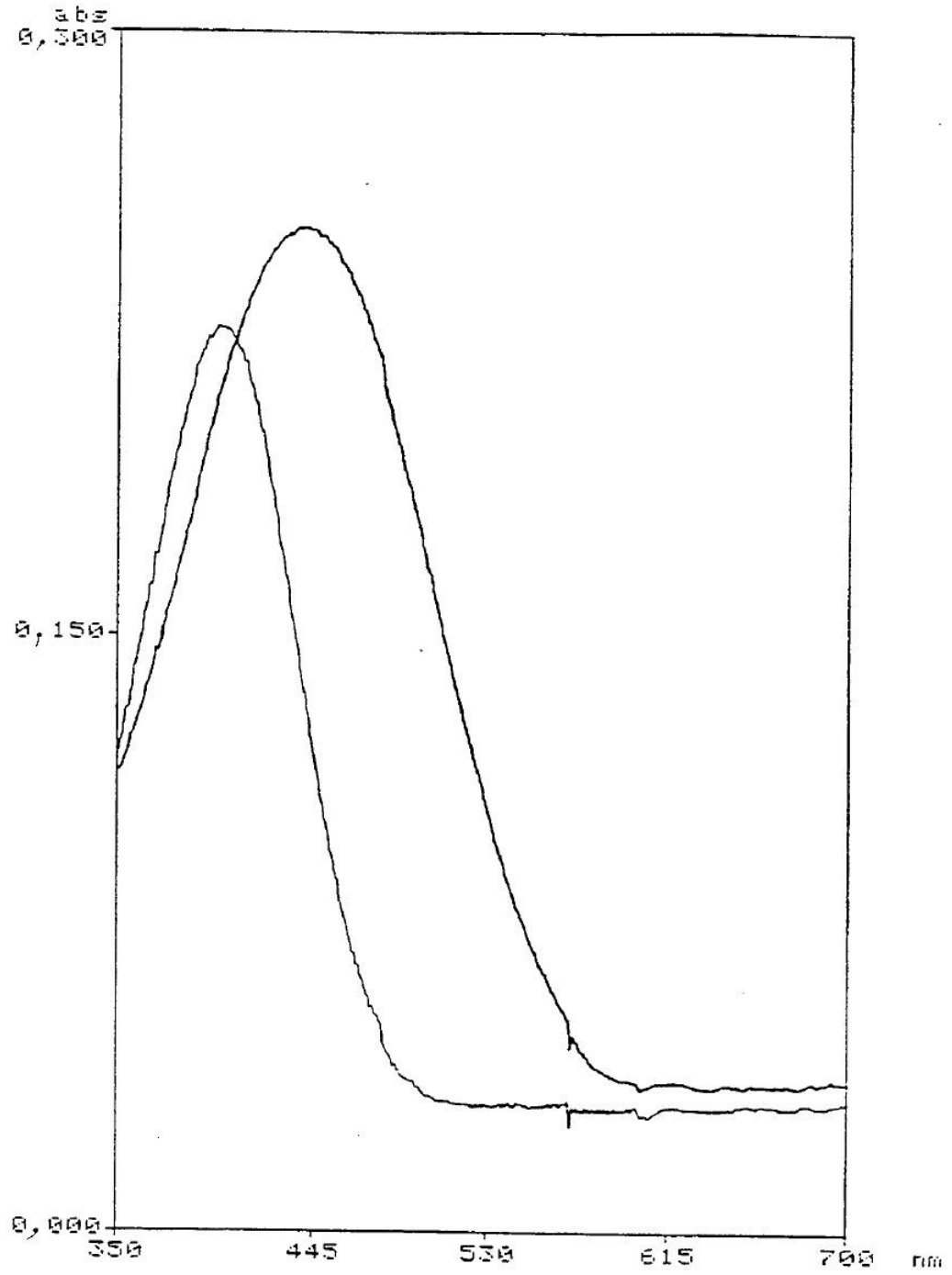


FIGURA 1



**FIGURA 2**



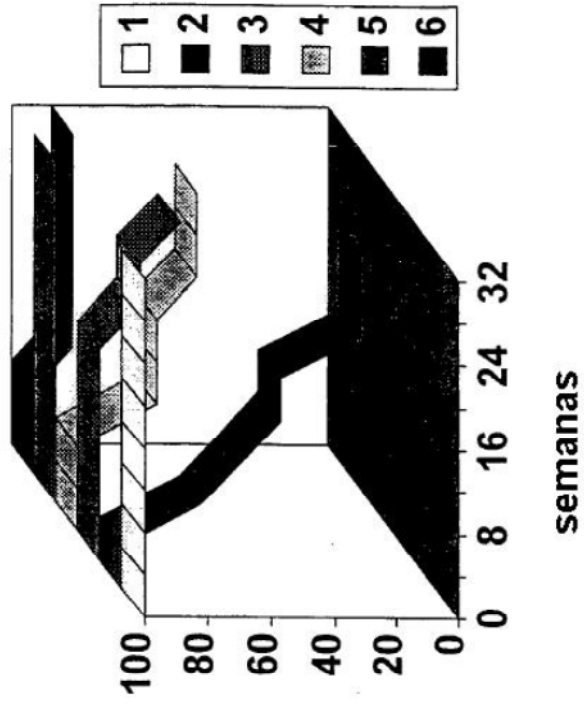
**FIGURA 3**

# Figura 4

- Supervivencia (%)

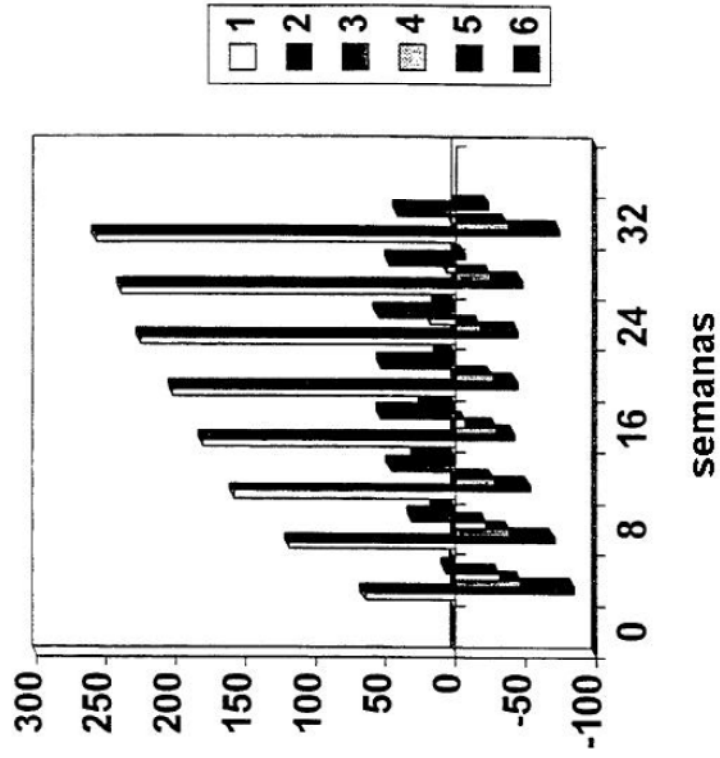
- Grupos de tratamiento

- no diabéticos (1)
- control diabéticos (2)
- hidralazina (3)
- EDTA (4)
- acetilcisteína e hidralazina (5)
- acetilcisteína (6)





**FIGURA 5**



- **Cambio de peso**

- media del grupo (g)

- **Grupos de tratamiento**

- no diabéticos (1)
- control diabéticos (2)
- hidralazina (3)
- EDTA (4)
- acetilcisteína e hidralazina (5)
- acetilcisteína (6)