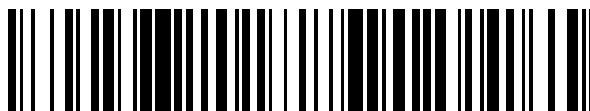


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 101**

51 Int. Cl.:

A61P 5/48 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 27/12 (2006.01)
A61K 31/13 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/275 (2006.01)
A61K 31/5375 (2006.01)
C07H 19/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.1998 E 98904931 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1021175**

54 Título: **Compuestos y métodos para intervención terapéutica en la prevención de complicaciones diabéticas**

30 Prioridad:

05.02.1997 US 794433

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2015

73 Titular/es:

**FOX CHASE CANCER CENTER (100.0%)
7701 Burholme Avenue
Philadelphia Pennsylvania 19111, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, TRUMAN R.;
KAPPLER, FRANCIS;
SZWERGOLD, BENJAMIN;
LAL, SUNDEEP y
SU, BANGYING**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 539 101 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

Compuestos y métodos para intervención terapéutica en la prevención de complicaciones diabéticas

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a agentes terapéuticos y su uso para el tratamiento de diabetes y en particular para prevenir, reducir o retrasar el inicio de complicaciones diabéticas y otros trastornos de etiología relacionada. De forma más particular, la presente invención se refiere a una clase de inhibidores enzimáticos que inhiben la conversión enzimática de la fructosa lisina (FL) en fructosa-lisina-3-fosfato (FL3P), lo que se cree que es una etapa importante en el mecanismo bioquímico que lleva a complicaciones diabéticas. La presente invención también describe un método de evaluación del riesgo de un paciente diabético para experimentar complicaciones diabéticas, así como un método para determinar la eficacia de la intervención terapéutica en la prevención, reducción o retraso de la aparición de complicaciones diabéticas.

Existen cuatro complicaciones especialmente graves de la diabetes, a saber, nefropatía diabética o enfermedad renal; retinopatía diabética que causa ceguera debido a la destrucción de la retina; neuropatía diabética que implica la pérdida de la función nerviosa periférica; y problemas circulatorios debido al daño capilar. Se cree que tanto la retinopatía como la nefropatía son subconjuntos de los problemas circulatorios generales asociados con esta patología. El papel de la disfunción microvascular en el estadio tardío de la diabetes se resumió recientemente (Tooke, *Diabetes*, 44: 721 (1995)). A lo largo de la presente divulgación, las expresiones "afecciones patológicas asociadas con la diabetes" y expresiones sino ni más pretenden incluir las diversas complicaciones retinopáticas, neuropáticas, nefropáticas, macroangiopáticas bien conocidas, así como otras complicaciones de la diabetes.

Se ha informado ampliamente acerca de las similitudes entre las patologías que surgen por la diabetes y las que resultan del envejecimiento. Los estudios han demostrado que muchas afecciones patológicas asociadas con la diabetes son clínicamente muy similares a las patologías que normalmente se asocian con el envejecimiento. Se ha demostrado, por ejemplo, que en la diabetes, las arterias y las articulaciones se endurecen prematuramente y la elasticidad pulmonar y la capacidad vital disminuyen prematuramente. Además, aterosclerosis, infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares se producen con más frecuencia en los individuos diabéticos que en los no diabéticos de la misma edad. Los diabéticos también son más susceptibles a las infecciones, y son más propensos a tener hipertensión, pérdida ósea acelerada, osteoartritis y alteración de la función de los linfocitos T con una edad más temprana que los no diabéticos.

Parecería que las similitudes entre las afecciones patológicas asociadas con la diabetes y el envejecimiento sugieren una lógica mecanística común. Se han propuesto varios mecanismos como una base bioquímica común para ambas afecciones patológicas asociadas con la diabetes y el envejecimiento. La hipótesis apoyada más firmemente por los datos de sujetos humanos se basa en un mecanismo de glicosilación no enzimática. Esta hipótesis afirma que el proceso de envejecimiento y las afecciones patológicas asociadas con la diabetes, tales como los que se han descrito anteriormente, son causadas, al menos en parte, por la modificación de proteínas y la reticulación por la glucosa y metabolitos derivados de glucosa a través de la reacción de Maillard (Monnier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 583 (1984) y Lee *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 123: 888 (1984)). En el presente documento, las proteínas modificadas que resultan de tales reacciones de glicosilación se denominan proteínas modificadas por productos finales de glicosilación avanzada (proteínas AGE). Se acepta ampliamente que la 3-desoxiglucosona (3DG) es un compuesto intermedio clave en la secuencia de reacción de múltiples etapas que conduce a la formación de proteínas AGE. 3DG es un metabolito derivado de la glucosa que puede reaccionar con proteínas que conducen a la reticulación de proteínas tanto intracelulares como extracelulares, tales como colágeno y membranas basales.

En el caso de complicaciones diabéticas, se cree que las reacciones que conducen a proteínas AGE se aceleran cinéticamente por la hiperglucemia crónica asociada con esta enfermedad. La evidencia que apoya este mecanismo incluye datos que muestran que las proteínas de larga vida, como el colágeno y el cristalino de los sujetos diabéticos contienen un contenido de proteína AGE significativamente más elevado que el que presentan los controles normales de la misma edad. Por lo tanto, la incidencia inusual de cataratas en los diabéticos a una edad relativamente temprana se puede explicar mediante el aumento de la tasa de modificación y reticulación del cristalino. Del mismo modo, la aparición temprana de rigidez de articulaciones y arterias, así como la pérdida de la capacidad pulmonar observada en los diabéticos se explica por el aumento de la tasa de modificación y reticulación del colágeno, la proteína estructural fundamental. Debido a que estas proteínas tienen vida larga, las consecuencias de la modificación tienden a ser acumulativas.

Otro factor que demuestra una relación de causa y efecto entre complicaciones diabéticas e hiperglucemia es la memoria hiperglucémica. Un ejemplo particularmente sorprendente de este fenómeno es el desarrollo de retinopatía grave en perros que inicialmente eran diabéticos, a continuación se trataron para restaurar los niveles normales de glucosa en sangre. Aunque los ojos de perro eran histológicamente normales en el momento del tratamiento, con el tiempo se desarrolló retinopatía diabética en estos animales a pesar de las concentraciones normalizadas de glucosa (Engerman *et al.*, *Diabetes*, 36: 808 (1987)). Por lo tanto, el daño subyacente a los ojos se produjo de forma

irreversible durante el período de la hiperglucemia temprana, antes de que los síntomas clínicos fueran evidentes.

Se ha mostrado que los seres humanos y animales diabéticos tienen concentraciones tempranas y tardías de proteínas AGE modificadas por azúcar más elevadas de lo normal. De hecho, el aumento de proteínas AGE es más elevado que el aumento en los niveles de glucosa en sangre. La concentración de proteínas AGE se puede valorar por la medida de la fluorescencia, como un cierto porcentaje de moléculas de azúcar que se reorganizan para producir moléculas fluorescentes unidas a proteínas.

El papel patogénico de las proteínas AGE no se limita a la diabetes. La glicosilación de proteínas se ha implicado en la enfermedad de Alzheimer (Harrington *et al.*, *Nature*, 370: 247 (1994)). También se observa aumento de fluorescencia de la proteína con el envejecimiento. De hecho, algunas teorías buscan el origen del proceso de envejecimiento en una combinación de daño oxidativo y modificación de proteínas inducida por azúcar. Por lo tanto, una terapia que reduce la formación de proteína AGE también puede ser útil en el tratamiento de otras patologías humanas etiológicamente similares, y quizá para retrasar el proceso de envejecimiento.

Generalmente se ha supuesto que la formación de proteínas AGE comienza con la reacción de un grupo amino de la proteína y un azúcar, principalmente glucosa. Una cita habitual de la bibliografía afirma que "El aducto inicial formado por la glicosilación de grupos ϵ -amino de restos de lisina es el compuesto de Amadori, fructosolisina. La glicosilación es una etapa inicial en una serie compleja de reacciones, conocida de forma colectiva como reacción de Maillard o reacción de oscurecimiento, que en última instancia conduce a la formación de proteínas reticuladas, precipitadas, oxidadas, de color marrón y fluorescentes". K.J. Knecht *et al.*, *Archives of Biochem. Biophys.*, 294: 130 (1992).

La formación de proteínas AGE a partir de azúcares es un proceso de múltiples etapas, que implican reacciones reversibles, iniciales con azúcares para producir proteínas que contienen fructosa-lisina. A continuación, estas proteínas modificadas continúan reaccionando para producir proteínas AGE modificadas de forma irreversible es evidente que las proteínas AGE no son idénticas a las proteínas que contienen restos de lisina glicosilada, ya que los anticuerpos dirigidos contra las proteínas AGE no reaccionan con fructosa-lisina. También es evidente que las proteínas AGE existen como múltiples especies químicas; sin embargo, se han identificado pocas. La especie química (ϵ -Amino-(carboximetil)lisina se ha identificado como una estructura final importante de la proteína AGE en estudios recientes (Reddy *et al.*, *Biochem.*, 34: 10872 (1995) e Ikeda *et al.*, *Biochemistry*, 35: 8075 (1996)). Este estudio fracasó en la identificación química de otro epítipo de proteína AGE que componía aproximadamente un 50 % de los sitios modificados. Recientemente se ha desarrollado un método de estudio de la cinética de formación de proteína AGE a partir de ribosa (Khalifah *et al.*, *Biochemistry*, 35: 4645 (1996)). Sin embargo, este estudio sugiere que la ribosa puede desempeñar un papel fisiológico importante en la formación de proteína AGE, lo que apoya las definiciones relativamente amplias de lisinas glicosilada y fructosa-lisina que se proporcionan a continuación.

Otras referencias indican la distinción entre proteínas que contienen restos de lisina glicosilada y proteínas AGE, "Los niveles de equilibrio de productos de base de Schiff y Amadori se alcanzan en horas y semanas, respectivamente. La naturaleza del equilibrio, reversible de los productos de glicosilación iniciales es importante, porque se refiere a que la cantidad total de tales productos, incluso proteínas de muy larga duración, alcanzar una meseta en estado estacionario en un periodo de tiempo corto. Dado que estos productos iniciales de glicosilación no se siguen acumulando en el colágeno ni en otras proteínas tisulares estables durante dos años en diabetes crónica, no es sorprendente que su concentración no se correlacione con cualquiera de la presencia o la gravedad de la retinopatía diabética. Sin embargo, algunos de los productos de glicosilación iniciales en el colágeno y otras proteínas de larga duración de las paredes de los vasos no se disocian. En su lugar, experimentan una serie compleja, lenta de transposiciones químicas para formar productos finales de glicosilación avanzada irreversible". M. Brownlee *et al.*, *New England Journal of Medicine*, 318: 1315 (1988). La única ruta para la producción de estas proteínas modificadas que se describe en la bibliografía científica implica una reacción inicial entre proteínas y moléculas de azúcar.

Numerosas referencias indican que la formación de proteínas AGE se produce a través de una ruta de múltiples etapas y que la 3-desoxiglucosona (3-DG) es un compuesto intermedio fundamental en esta ruta. M. Brownlee, *Diabetes*, 43: 836 (1994); M. Brownlee, *Diabetes Care*, 15: 1835 (1992); T. Niwa *et al.*, *Nephron*, 69: 438 (1995); W.L. Dills, Jr., *Am. J. Clin. Nutr.*, 58: S779 (1993); H. Yamadat *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 20275 (1994); N. Igaki *et al.*, *Clin. Chem.*, 36: 631 (1990). La ruta generalmente aceptada para la formación de 3DG a partir de la reacción de azúcares y proteínas se ilustra en la Figura 1. Tal como se puede observar en la Figura 1, una molécula de azúcar (glucosa) forma inicialmente una base de Schiff base con un grupo amino del aminoácido lisina de la proteína (I). La base de Schiff resultante se transpone a continuación para producir proteínas modificadas con fructosa-lisina (II). Las reacciones que conducen a (II) son libremente reversibles. (II) se puede transponer para producir 3DG y lisina de la proteína libre. La reacción posterior entre 3DG y la proteína es la primera etapa irreversible en la formación de proteína AGE.

En la medida en que se sabe, nunca se ha informado que 3DG se pueda producir mediante rutas alternativas, o de hecho, que la fuente principal de 3-DG sea a partir de una ruta metabólica catalizada con enzima, en lugar de a partir de las relaciones sin catalizar que se muestran en la Figura 1.

Los pacientes diabéticos tienen diabetes 3DG de forma más significativa en el suero que los pacientes no diabéticos ($12,78 \pm 2,49 \mu\text{M}$ frente a $1,94 \pm 0,17 \mu\text{M}$). (Toshimitsu Niwa *et al.*, *Nephron*, 69: 438 (1995)). Sin embargo, este compuesto tóxico se encuentra en individuos sanos normales. Por lo tanto, no es sorprendente que el organismo haya desarrollado una ruta de detoxificación para esta molécula. Una de estas reacciones se cataliza con la aldehído reductasa que detoxifica 3DG reduciéndola a 3-desoxifruktosa (3DF) que se excreta de forma eficaz en la orina (Takahashi *et al.*, *Biochem*, 34: 1433 (1995)). Otra reacción de detoxificación oxida 3DG a ácido 3-desoxi-2-cetoglucónico (DGA) mediante la oxoaldehído deshidrogenasa (Fujii *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 210: 852 (1995)).

Hasta la fecha, los resultados de los estudios muestran que la eficacia de al menos una de estas enzimas, aldehído reductasa, se ven afectados de forma adversa en la diabetes. Cuando se aíslan de hígado de rata normal, una fracción de esta enzima se glicosila parcialmente en las lisinas 67, 84 y 140 y tiene una eficacia catalítica baja cuando se compara con la enzima sin modificar, normal (Takahashi *et al.*, *Biochem.*, 34: 1433 (1995)). Dado que los pacientes diabéticos tienen relaciones más elevadas de proteínas glicosiladas que los individuos normoglucémicos, es más probable que tengan tanto niveles más elevados de 3DG como una capacidad reducida para detoxificar esta molécula reactiva por reducción a 3DF.

Se ha estudiado el mecanismo de la aldehído reductasa. Estos estudios determinan que esta enzima de detoxificación importante se inhibe con inhibidores de aldosa reductasa (ARI) (Barski *et al.*, *Biochem.*, 34: 11264 (1995)). Los ARI están en la actualidad en investigación clínica por su potencial para reducir las complicaciones diabéticas. Estos compuestos, como una clase, han mostrado algún efecto en complicaciones diabéticas a corto plazo. Sin embargo, carecen de efecto clínico en complicaciones diabéticas a largo plazo y empeoran la función renal en ratas alimentadas con una dieta alta en proteínas. Tal como aparece en el presente documento, este hallazgo es coherente con la ruta metabólica recién descubierta para la recuperación de lisina subyacente a la presente invención. Una dieta alta en proteínas aumentará el consumo de fructosa-lisina, que experimenta conversión en 3DG mediante la ruta de recuperación de lisina por el riñón. La detoxificación de la 3DG resultante por reducción a 3DF será inhibida por la terapia con los ARI, que conduce en consecuencia un aumento en el daño renal, en comparación con ratas que no reciben los ARI. Esto se debe a que la inhibición de la aldosa reductasa por los ARI reduciría la disponibilidad de la aldosa reductasa para reducir 3DG y 3DF.

Anteriormente se ha investigado el papel de 3-DG en la contribución a la enfermedad humana tal como se observará a partir de una revisión de las patentes que se resumen a continuación.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.476.849 de Ulrich *et al.*, describe un método para inhibir la formación de proteínas AGE usando ácidos y derivados amino-benzoicos. Estos compuestos actúan presuntamente por reacción con 3-DG y eliminando las del sistema antes de que reaccionen con proteínas para comenzar las etapas irreversibles de formación de proteínas AGE.

Las Patentes de Estados Unidos Nºs 4.798.583 y 5.128.360 de Cerami *et al.*, describen el uso de aminoguanidina para prevenir la formación de proteína AGE y reticulación de proteínas de la pared arterial inducidas por diabetes. Se mostró que la aminoguanidina reacciona con un producto de glicosilación inicial. Este producto inicial es 3DG, tal como se define en el presente documento. Estas patentes no contemplan la posibilidad de inhibir la formación de 3-DG. Se centran exclusivamente en la formación de complejos de esta molécula tóxica.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.468.777 de France *et al.*, describe métodos y agentes para prevenir la tinción de los dientes causada por el oscurecimiento no enzimático de proteínas en la cavidad oral. En la presente solicitud la cisteína y derivados de cisteína se describen como particularmente útiles.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.358.960 de Ulrich *et al.*, describe un método para inhibir la formación de proteína AGE usando imidazoles aminosustituidos. Se mostró que estos compuestos reaccionan con un producto de glicosilación inicial (3DG). No se hace mención en esta patente a que pueda existir una fuente metabólica de 3DG. Esta patente visualiza que 3DG se prepara exclusivamente como un compuesto intermedio en el oscurecimiento enzimático de proteínas.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.334.617 de Ulrich *et al.*, describe aminoácidos útiles como inhibidores de formación de proteína AGE. A este respecto la lisina y otros aminoácidos bifuncionales se describen como particularmente útiles. Se describe que estos aminoácidos reaccionan con el producto de glicosilación inicial de la reacción de glucosa y proteínas. Parece que el producto de glicosilación inicial que se describe en esta patente es 3DG.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.318.982 de Ulrich *et al.*, describe la inhibición de la formación de proteína AGE usando 1,2,4-triazoles como el agente inhibidor. Los inhibidores que se describen en esta patente contienen sustituyentes de diamino que se colocan para reaccionar y para formar complejos con 3DG. En la patente se describe que estos compuestos reaccionan con un producto de glicosilación inicial (3DG tal como se define en el presente documento).

La Patente de Estados Unidos Nº 5.272.165 de Ulrich *et al.*, describe el uso de 2-alquiliden-aminoguanidinas como inhibidores de la formación de proteína AGE. Se dice que los inhibidores que se describen en esta patente son altamente reactivos con 3DG. En esta patente no se hace mención de inhibición de la formación metabólica de 3DG.

5 La Patente de Estados Unidos Nº 5.262.152 de Ulrich *et al.*, describe el uso de amidrazonas y derivados para inhibir la formación de proteína AGE. Los compuestos que se describen en esta patente son aminas de carácter α . W.P. Jencks, 3ª ed., McGraw Hill, Nueva York. Se sabe que los compuestos de esta categoría reaccionan con compuestos de dicarbonilo, por ejemplo, 3DG.

10 La Patente de Estados Unidos Nº 5.258.381 de Ulrich *et al.*, describe el uso de 2-imidazolinias sustituidas en la posición 2 para inhibir la formación de proteína AGE. Los compuestos que se describen en esta patente contienen grupos amino adyacentes que pueden reaccionar fácilmente con 3DG.

15 La Patente de Estados Unidos Nº 5.243.071 de Ulrich *et al.*, describe el uso de 2-alquiliden-aminoguanidinas para inhibir la formación de proteína AGE. Los compuestos que se prescriben en esta patente son altamente reactivos con 3DG y funcionan formando complejos de esta molécula tóxica, reactiva.

20 La Patente de Estados Unidos Nº 5.221.683 de Ulrich *et al.*, describe el uso de compuestos de diaminopiridina para inhibir la formación de proteína AGE. Los compuestos de diaminopiridina que se describen como particularmente útiles reaccionarán con 3DG para formar un complejo que contiene anillo de seis miembros, estable.

25 La Patente de Estados Unidos Nº 5.130.337 de Ulrich *et al.*, describe el uso de amidrazonas y derivados para inhibir la formación de proteína AGE. Los inhibidores que se describen en esta patente son aminas con carácter α que, como se sabe en la técnica, reaccionarán rápidamente con 3DG y formarán complejos estables.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.130.324 de Ulrich *et al.*, describe el uso de 2-alquiliden-aminoguanidinas para inhibir la formación de proteína AGE. Los compuestos que se describen en esta patente funcionan reaccionando con el producto de glicosilación inicial que resulta de la reacción de glucosa con proteínas (3DG).

30 La Patente de Estados Unidos Nº 5.114.943 by Ulrich *et al.*, describe el uso de pirimidinas sustituidas con amino para inhibir la formación de proteína AGE. Se dice que los compuestos que se describen en esta patente reaccionan rápidamente con 3DG y la detoxifican.

35 Ninguna de las patentes mencionadas anteriormente sugiere la inhibición de la formación metabólica de 3DG como un medio de intervención terapéutica para prevenir complicaciones diabéticas. De hecho, ninguna de estas patentes ni siquiera sugiere la implicación de una ruta enzimática en la producción de 3DG.

40 La Patente de Estados Unidos Nº 5.108.930 de Ulrich *et al.*, describe un método para detectar los niveles de aminoguanidina en muestras biológicas. Se describe que este ensayo tiene una utilidad potencial en la determinación de la función renal midiendo el tiempo de eliminación de la aminoguanidina. El uso principal pretendido para el método de ensayo que se describe en esta patente se encuentra en la medida de los niveles en tejido de la aminoguanidina, de modo que las dosis suficientes para inhibir la formación de proteína AGE se pueden mantener en estudios animales y humanos. En esta patente no se hace mención del uso de relaciones de 3DG, 3DF o DGA en orina para determinar los diabéticos con riesgo de complicaciones.

45 La Patente de Estados Unidos Nº 5.231.031 de Szwergold *et al.*, describe un método para evaluar el riesgo de afecciones patológicas asociadas con diabéticos y para determinar la eficacia de terapias para estas complicaciones. Esta patente describe la medida de dos compuestos fosforilados en eritrocitos de pacientes diabéticos. Estos dos compuestos no se identificaron químicamente en esta patente. Sin embargo, ni el compuesto es 3DG ni 3DF, cuyos niveles se miden en orina en la realización del diagnóstico de la presente invención.

50 Se conocen métodos para supervisar el control metabólico en pacientes diabéticos por medida de los productos finales de glicosilación. Se sabe que la concentración de hemoglobina glicosilada refleja la concentración media de glucosa en sangre durante las varias semanas precedentes. La Patente de Estados Unidos Nº 4.371.374, expedida por A. Cerami *et al.*, describe un método para supervisar los niveles de glucosa por cuantificación de los productos de degradación de proteínas glicosiladas, más específicamente aminoácidos y péptidos glicosilados de forma no enzimática, en la orina. Este método pretende usar la afinidad de ácidos borónicos alcalinos para formar complejos específicos con los grupos cis-diol coplanares encontrados en productos finales de glicosilación para separar y cuantificar tales productos finales.

60 La Patente de Estados Unidos Nº 4.761.368 expedida por A. Cerami describe el aislamiento y purificación de un cromóforo presente en polipéptidos oscurecidos, por ejemplo, albúmina de suero bovino y poli-L-lisina. El cromóforo, 2-(2-furoil)-4(5)-2(furoil)-1H-imidazol (FFI) es un heterociclo conjugado derivado de la condensación de dos moléculas de glucosa con dos grupos amino derivados de lisina. Esta patente describe adicionalmente el uso de FFI en un método para medir el "envejecimiento" (el grado de glicosilación avanzada) en una muestra de proteína en la que la "edad" de la muestra se determina midiendo la cantidad de cromóforo que se ha descrito anteriormente en la

muestra y a continuación comparando esta medida esta medida con un patrón (una muestra de proteína que tiene una cantidad de FFI que se ha correlacionado con la "edad" de la muestra).

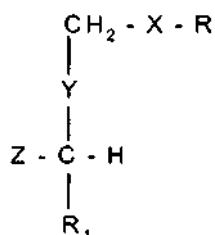
5 El documento de patente WO 93/04690 desvela compuestos para uso en el tratamiento de complicaciones y la patología de la diabetes. Los compuestos tienen actividad similar a la de la canosina, siendo el compuesto preferente la carnosina.

10 Existe una necesidad sin cubrir, de larga duración en los regímenes de tratamiento existentes de pacientes diabéticos de medios eficaces para identificar a las personas en riesgo de desarrollar afecciones patológicas asociadas con la diabetes, para prevenir, reducir o retrasar la aparición de tales afecciones por intervención terapéutica y para determinar el beneficio de este tipo de intervención terapéutica.

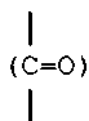
Sumario de la invención

15 La presente invención surgió a partir del descubrimiento de una ruta metabólica que implica la conversión mediada por enzimas de FL a FL3P y produce concentraciones relativamente elevadas de 3-desoxiglucosona (3DG) en órganos afectados por diabetes. La investigación posterior en la función bioquímica de esta ruta recién descubierta tiende a indicar que tiene un papel importante en la etiología de la enfermedad renal diabética. También se sospecha que esta ruta contribuye al desarrollo de diversas afecciones patológicas conocidas asociadas con la diabetes.

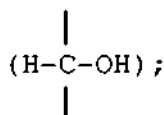
20 Este descubrimiento ha encontrado aplicación práctica en la presente invención que, en un aspecto, proporciona una clase de compuestos que tienen actividad inhibitora enzimática y son eficaces para inhibir la conversión enzimática de fructosa-lisina a fructosa-lisina-3-fosfato, en la que los compuestos tienen la fórmula estructural:



25 en la que X es -NR' u -O-, seleccionándose R' entre el grupo que consiste en H, y grupo alquilo de cadena lineal o ramificada (C₁-C₄) y un grupo arilo (C₆-C₁₀) o grupo aralquilo (C₇-C₁₀) sin sustituir o sustituidos; R es H o un resto de lisina; dichos sustituyentes de grupo arilo (C₆-C₁₀) o grupo aralquilo (C₇-C₁₀) se seleccionan entre el grupo que
 30 consiste en H, alquilo (C₁-C₆), halógeno, CF₃, CN, NO₂ y -O-alquilo (C₁-C₆); R₁ es un resto de poliol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono lineales, Y es cualquiera de un resto carbonilo



35 o un resto de hidroximetileno



40 Z se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -O-alquilo (C₁-C₆), -halógeno -CF₃, -CN, -COOH y -SO₃H₂; y los isómeros y sales farmacéuticamente aceptables de dicho compuesto, en los que el compuesto no es 3-desoxifrufructosa.

45 La actividad inhibitora enzimática relevante de los compuestos de la presente invención se puede determinar fácilmente mediante ensayo. El método de ensayo comprende proporcionar una solución acuosa de fructosa-lisina, adenosin trifosfato (ATP, una fuente de fructosa-lisina-3-fosfato quinasa y un compuesto de la presente invención en una cantidad suficiente para demostrar actividad inhibitora, sometiendo la solución resultante a condiciones que estimulan la formación de fructosa-lisina-3-fosfato y adenosin difosfato como productos de la interacción mencionada anteriormente de la quinasa, fructosa-lisina y adenosin trifosfato, y midiendo la producción de al menos uno de tales

productos, los compuestos de la presente invención reduciendo la cantidad de tales productos, en comparación con una solución acuosa de las mismas cantidades relativas de fructosa-lisina, adenosin trifosfato y fuente de fructosa-lisina-3-fosfato quinasa, sin la adición de un compuesto de la presente invención.

5 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una preparación farmacéutica para prevenir, reducir o retrasar el inicio de complicaciones diabéticas en un paciente diabético, que comprende, como un agente activo, un compuesto de la invención, como se ha descrito anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto de la presente invención para uso en la prevención, reducción o retraso del inicio de complicaciones diabéticas en un paciente con riesgo de desarrollar las mismas, método que comprende la administración al paciente del compuesto de la presente invención en una cantidad eficaz para inhibir la conversión enzimática de fructosa-lisina a fructosa-lisina-3-fosfato. Este mismo método se puede usar para la prevención o tratamiento de otras patologías etiológicamente similares, tal como se describirá adicionalmente en lo sucesivo en el presente documento. En el presente documento también se describe un método para evaluar un riesgo de un paciente diabético de experimentar una afección patológica asociada con la diabetes. Este método comprende la administración al paciente de una fuente de restos de lisina glicosilada en una cantidad que proporciona una dosis predeterminada de los restos de lisina glicosilada, y medir la relación de 3-desoxiglucosona con respecto a 3-desoxifruktosa en una muestra biológica obtenida del paciente, con referencia a la relación de 3-desoxiglucosona con respecto a 3-desoxifruktosa en un sujeto normal, es decir, un sujeto no diabético o uno que no presenta síntomas clínicos de diabetes. La relación más elevada de 3-desoxiglucosona con respecto a 3-desoxifruktosa en la muestra del paciente diabético, en comparación con la del sujeto asintomático es indicativo de que el paciente diabético presenta un riesgo más elevado de experimentar una afección patológica asociada con la diabetes.

25 Además, en el presente documento se describe un método para evaluar la eficacia de la intervención terapéutica en la prevención de complicaciones diabéticas. El método implica a la medida de la concentración de 3-desoxiglucosona, 3-desoxifruktosa y fructosa-lisina en muestras biológicas obtenidas de un paciente diabético, tanto antes como después del inicio de la intervención terapéutica. La suma de las concentraciones de 3-desoxiglucosona y 3-desoxifruktosa se compara a continuación con la concentración de fructosa-lisina en las muestras. Una disminución de la suma de las concentraciones de 3-desoxiglucosona y 3-desoxifruktosa con respecto a la concentración de fructosa-lisina en la muestra biológica tomada después del inicio de la intervención terapéutica, en comparación con las mismas concentraciones medidas en la muestra biológica tomada antes del inicio de la intervención terapéutica, es indicativo de la eficacia de la intervención terapéutica. Además, en el presente documento se describe adicionalmente un método para informar a una persona diabética del potencial de un producto alimentario a la contribución del desarrollo de una afección patológica asociada con la diabetes. Este método implica la medida que el contenido de restos de lisina glicosilada en el producto alimentario y proporcionar esta información a pacientes diabéticos, por ejemplo, en el envase del producto alimentario o en una publicación destinada a su uso por diabéticos.

40 Breve descripción de las figuras

La **FIGURA 1** muestra la etapa inicial implicada en la reacción de múltiples etapas que conduce a proteínas AGE modificadas de forma irreversible.

45 La **FIGURA 2** ilustra las reacciones implicadas en la ruta de recuperación de lisina.

La **FIGURA 3** es una representación gráfica de un perfil urinario que muestra la variación con el tiempo de 3DF, 3DG y FL a partir de una sola alimentación individual de 2 g. de FL y seguidos durante 24 horas.

50 La **FIGURA 4** es una representación gráfica de la excreción urinaria con el tiempo de 3DF de siete voluntarios alimentados con 2 g de fructoselisina.

La **FIGURA 5** muestra una comparación gráfica de 3DF y N-acetil- β -glucosaminidasa (NAG) entre un grupo de animales de control y un grupo experimental mantenido en una alimentación que contiene un 0,3 % de proteína glicosilada.

La **FIGURA 6** es un gráfico que muestra la relación lineal entre los niveles de 3DF y 3DG en orina de ratas alimentadas con una dieta de control o una enriquecida en proteína glicosilada.

60 Las **FIGURAS 7A y 7B** son representaciones gráficas de niveles en ayunas de 3DG en la orina de pacientes normales y diabéticos representadas frente al nivel en ayunas de 3DF.

Descripción detallada de la invención

65 Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente invención, tal como se describe con detalle adicional en lo sucesivo en el presente documento:

1. Restos de Lisina Glicosilada - La expresión "restos de lisina glicosilada", como se usa en el presente documento, se refiere al resto de lisina modificado de un aducto estable producido por la reacción de un azúcar reductor y una proteína que contiene lisina.

5 La mayor parte de los restos de lisina de la proteína se colocan en la superficie de las proteínas tal como se espera para un aminoácido con carga positiva. Por lo tanto, los restos de lisina en las proteínas que entran en contacto con suero, u otros fluidos biológicos, pueden reaccionar libremente con moléculas de azúcar en solución. Esta reacción se produce en múltiples etapas. La etapa inicial implica la formación de una base de Schiff entre el grupo amino libre de la lisina el grupo ceto del azúcar. Este producto inicial experimentara a continuación la transposición de Amadori, para producir un compuesto estable de cetamina.

15 Esta serie de reacciones se pueden producir con diversos azúcares. Cuando el azúcar implicado es la glucosa, el producto de base de Schiff inicial implicará la formación de imina entre el resto de aldehído en C-1 de la glucosa el grupo ε-amino de la lisina. La transposición de Amadori dará como resultado la formación de lisina acoplada al carbono C-1 de la fructosa, 1-desoxi-1-(ε-aminolisina)-fructosa, denominan en el presente documento fructosa-lisina o FL.

20 Se producirán reacciones similares con otros azúcares de aldosa, por ejemplo galactosa y ribosa (Dills, Am. J. Clin. Nutr., 58: S779 (1993)). Para el fin de la presente invención, los productos iniciales de la reacción de cualquier azúcar reductor y del resto ε-amino de la lisina de la proteína se incluyen dentro del significado de resto de lisina glicosilada, independientemente de la estructura exacta de la molécula de azúcar de modificación.

25 Además, las expresiones resto de lisina glicosilada, proteína glicosilada y resto de proteína o lisina glicosilada se usan indistintamente en el presente documento, lo que es coherente con el uso actual en las revistas científicas en las que tales expresiones a menudo se usan indistintamente.

30 2. Fructosa-lisina – La expresión "fructosa-lisina" (FL) se usa en el presente documento para hace referencia a cualquier lisina glicosilada, tanto si se incorpora en una proteína/o se libera a partir de una proteína/péptido mediante digestión proteolítica. Esta expresión no está limitada de forma específica a la estructura química denominada habitualmente fructosa-lisina, que se indica que se forma a partir de la reacción de restos de lisina de proteína y glucosa. Tal como se indicaba anteriormente, los grupos amino de la lisina pueden reaccionar con una amplia diversidad de azúcares. De hecho, un informe indica que la glucosa es el azúcar menos reactivo de un grupo de dieciséis (16) azúcares diferentes sometidos a ensayo (Bunn *et al.*, Science, 213: 222 (1981)). Por lo tanto, la tagatosa-lisina formada a partir de la lactosa y lisina, de forma análoga a la glucosa, se incluye cuando la expresión fructosa-lisina se menciona en la presente descripción, ya que es el producto de condensación de todos los demás azúcares, tanto si son de origen natural o no. En el presente documento, a partir de la descripción se entenderá que la reacción entre restos de proteína-lisina y azúcares implica múltiples etapas de reacción. Las etapas finales en esta secuencia de reacción implican la reticulación de proteínas y la producción de especies multiméricas, conocidas como proteínas AGE, algunas de las cuales son fluorescentes. La digestión proteolítica de tales proteínas modificadas no produce lisina unida covalente mente a una molécula de azúcar. Por lo tanto, estas especies no se incluyen dentro del significado de "fructosa-lisina", tal como se usa ese término en el presente documento.

35 3. Fructosa-lisina-3-fosfato - Este compuesto se forma por la transferencia enzimática de un grupo fosfato de alta energía de ATP a FL. La expresión fructosa-lisina-3-fosfato (FL3P), como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los restos fosforilados de fructosa-lisina que se pueden formar enzimáticamente cuando están libres o unidos a proteínas.

40 4. Fructosa-lisina-3-fosfato quinasa – Esta expresión se refiere a una o más proteínas que pueden convertir enzimáticamente FL en FL3P, como se ha definido anteriormente, cuando se proporciona adicionalmente con una fuente de fosfato de alta energía.

50 5. 3-Desoxiglucosona – La 3-desoxiglucosona (3DG) es el 1,2-dicarbonil-3-desoxiazúcar (también conocido como 3-desoxihexulosa) que se forma después de la descomposición de FL3P para proporcionar lisina libre y fosfato inorgánico.

55 6. Ruta de Recuperación de Lisina FL3P - En el riñón humano existe una ruta de recuperación de lisina, y posiblemente en otros tejidos, que regenera la lisina sin modificar como el aminoácido libre o la incorpora en una cadena polipeptídica. Como se explicará adicionalmente a continuación, esta ruta es un factor importante que contribuye a las complicaciones de la diabetes.

60 7. Proteínas AGE – La expresión "proteínas AGE" (proteínas modificadas por Producto final de Glicosilación Avanzada) se ha usado en revistas científicas, y se usa en el presente documento, para hacer referencia al producto final de la reacción entre azúcares y proteínas (Brownlee, Diabetes Care, 15: 1835 (1992) y Niwa *et al.*, Nephron, 69: 438 (1995)). Es evidente que la reacción, por ejemplo, entre restos de lisina de proteína y glucosa no se detiene con la formación de fructosa-lisina. La FL puede experimentar reacciones múltiples de deshidratación y transposición para producir 3DG no enzimática, que reacciona de nuevo con grupos amino libres, lo que conduce a reticulación y oscurecimiento de la proteína implicada. De hecho, existen evidencias razonables de que la 3DG, como se ha definido anteriormente en el presente documento, es un compuesto intermedio fundamental en esta reacción de modificación.

65 9. "Dieta Glicosilada" – Como se usa en el presente documento, esta expresión se refiere a cualquier dieta dada

en la que un porcentaje de proteína normal se sustituye con proteína glicosilada. La expresión "dieta glicosilada" y "dieta de proteína glicosilada" se usan indistintamente en el presente documento.

- 5 Al menos algunas, y posiblemente todas, las complicaciones de la diabetes se deben a la modificación covalente de las proteínas por la glucosa y otros azúcares reactivos. M. Brownlee, *Diabetes*, 43: 836 (1994). Como se ha indicado anteriormente, se ha mostrado que seres humanos diabéticos y animales presentan concentraciones más elevadas de proteínas modificadas por azúcar de lo normal. De hecho, el aumento de proteínas AGE asociadas con la diabetes mayor que el aumento en los niveles de glucosa en sangre.
- 10 Anteriormente, se había aceptado que por lo general el origen de la 3DG *in vivo* provenía de la descomposición de proteínas que contienen restos de lisina glicosilada. También se había creído comúnmente que estas lisinas glicosiladas no se podían usar como una fuente de aminoácidos. Tal como se aparecerá en lo sucesivo en el presente documento, esta creencia anterior era incorrecto.
- 15 Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se desarrolló a partir del descubrimiento de una ruta metabólica anteriormente desconocida que produce 3DG en una reacción catalizada por enzimas. Esta ruta enzimática es capaz de inhibición enzimática, reduciendo de este modo la producción de 3DG tóxica.
- 20 Durante el transcurso de una serie de estudios en riñones diabéticos, el examen de espectros de RMN ³¹P de extractos de ácido perclórico de riñones a partir de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina reveló un nuevo pico inusual en el espectro de RMN. Los estudios anteriores de los presentes inventores habían demostrado la presencia de fructosa-3-fosfato en cristalino de ratas y eritrocitos humanos (A. Petersen *et al.*, *Biochem. J.*, 284: 363-366 (1992); Lal *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 318: 191 (1995); Szwegold *et al.*, *Science*, 247: 451 (1990) y Lal *et al.*, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 36(5): 969 (1995)). Los estudios anteriores habían identificado otros azúcares fosforilados no habituales en cristalino de rata (Szwegold *et al.*, *Diabetes*, 44: 810 (1995) y Kappler *et al.*, *Metabolism*, 44: 1527 (1995)). Por lo tanto, era razonable suponer que este pico recién identificado era otro azúcar fosforilado. Además, una investigación extensa de laboratorio reveló que este nuevo compuesto no era un azúcar sencillo, sino que era fructosa-lisina fosforilada en la posición 3 del componente de fructosa.
- 25
- 30 Esta identificación se confirmó de dos maneras. El fructosa-lisina-3-fosfato (FL3P) auténtico se sintetizó con el procedimiento que se desvela en el Ejemplo 2, a continuación, y muestra que tiene una co-resonancia en el espectro de RMN ³¹P con el pico en riñones de ratas diabéticas. También se inyectó fructosa-lisina sintética en ratas no diabéticas. Estas ratas presentaban un aumento sustancial en los niveles de FL3P en sus riñones después de esta inyección.
- 35
- 40 Se realizaron dos experimentos para demostrar que FL3P se deriva directamente de FL en una reacción catalizada con enzimas. La fructosa-lisina marcada con deuterio en la posición C3 del resto de fructosa se sintetizó y se inyectó en ratas. Tres horas después de la inyección, los riñones de estas ratas se retiraron y se extrajeron con ácido perclórico. La espectroscopia de RMN reveló que el material de FL3P aislado de estas ratas contenía la marca de deuterio en la posición C3 del resto de fructosa. Además, los homogenados de riñón de rata demuestran la capacidad para producir FL3P en una reacción que requiere tanto ATP como fructosa-lisina. Este último experimento mencionado confirma la presencia de una FL3P quinasa específica, ya que no se forma FL3P cuando solamente se incuban fructoselisina y ATP en conjunto en condiciones fisiológicas. Los experimentos adicionales que implicaban el fraccionamiento de la corteza renal han demostrado que esta actividad de quinasa no se distribuye de manera
- 45 uniforme en el riñón sino que se concentra en la región tubular proximal, que es uno de los sitios anatómicos más iniciales para demostrar daño en riñones diabéticos humanos y animales.
- El FL3P no es estable en solución acuosa. Se degrada rápidamente para formar 3DG, lisina y fosfato inorgánico. Esta reacción también se produce *in vivo*. En la actualidad no se sabe si la degradación de FL3P *in vivo* es una reacción espontánea o catalizada por enzimas. Sin embargo, se sospecha intensamente que está implicada esa catálisis enzimática, ya que la producción a partir de fructosa-lisina se produce muy rápidamente en riñón intacto.
- 50
- Las etapas de reacción en la ruta de recuperación de FL3P lisina se presentan en la Figura 2. En la primera etapa, fructosa-lisina y ATP reaccionan para formar fructosa-lisina-3-fosfato (FL3P) y ADP en una reacción catalizada por FL3P quinasa. La fosforilación se produce en la posición 3 del resto de fructosa, lo que conduce a la desestabilización de la molécula de fructoselisina. El FL3P resultante se descompone a continuación para formar 3-desoxiglucosona (3DG), fosfato inorgánico, y lisina reutilizable, libre, sin modificar, que está disponible para uso en síntesis de proteínas. La aldehído reductasa detoxifica 3DG por reducción a 3-desoxifruktosa (3DF), que se excreta en la orina.
- 55
- 60 Aunque la Figura 2 ilustra esta ruta usando la lisina glicosilada más prevalente, la fructosa-lisina, será rápidamente evidente para los expertos en la materia que a partir de esta ruta puede fluir una amplia diversidad de moléculas. De hecho, tal como se explicará a continuación con detalles adicionales, la selectividad del sustrato de la ruta de recuperación de FL3P lisina es bastante amplia, lo que garantiza una amplia definición de las expresiones proporcionadas anteriormente.
- 65

Los experimentos adicionales han mostrado que la ruta de recuperación de lisina se encuentra en una amplia variedad de especies animales, que incluye oveja, cerdo, perro, conejo, vaca, ratones y pollo. Esta ruta también está presente en seres humanos. La presencia extendida de la cuota de recuperación de FL3P lisina se puede entender, dado que la lisina es un aminoácido esencial que está presente en concentraciones relativamente bajas en la mayoría de los alimentos. Además, existirá un porcentaje apreciable de los restos de lisina en los alimentos en la forma glicosilada y la proporción de esta lisina modificada aumentará cuando el alimento se cocina. Dado que estos restos de lisina glicosilada no se pueden usar para síntesis de proteínas, una ruta de recuperación para la lisina es de gran utilidad y proporciona una ventaja selectiva a los organismos que la poseen.

La diabetes tiene dos efectos en la ruta de recuperación de lisina. Las proteínas de la sangre contienen concentraciones más elevadas de lisina glicosiladas cuando se aíslan de individuos diabéticos en lugar de individuos no diabéticos. Por lo tanto, los diabéticos son sujetos para mayor flujo a través de la ruta de recuperación de lisina que los no diabéticos. Además, a partir de observaciones preliminares en las relaciones de 3DG y 3DF en la orina de individuos diabéticos y normales, los individuos diabéticos parece que tienen una capacidad reducida para detoxificar la 3DG que se produce a través de esta ruta. Estos dos factores se combinan para producir concentraciones de 3DG en orina más elevadas en individuos diabéticos (Véase la Figura 7; también Lal *et al.*, Arch. Biochem. and Biophys., 342 (1): 254-60 (1997).

Los agentes implicados en la ruta de recuperación lisina se han identificado en otros tejidos además del riñón, específicamente en glóbulos rojos, cristalino, y tejidos del nervio periférico. Todos estos tejidos se ven afectados por las complicaciones de la diabetes. La ubicación en los glóbulos rojos se correlaciona con las complicaciones microvasculares de la diabetes, por ejemplo, retinopatía diabética, la ubicación del riñón se correlaciona con la nefropatía diabética, mientras que la ubicación en el nervio periférico se correlaciona con la nefropatía periférica diabética. Estos agentes también se encuentran en el páncreas. Existen experimentos en desarrollo para determinar la presencia de estos agentes en la piel. Si se encontrara que están presentes, se cree que sus efectos perjudiciales se pueden mejorar con un tratamiento tópico usando los compuestos inhibidores de la invención en un vehículo adecuado para evitar la reticulación del colágeno, y por lo tanto mejorando la elasticidad cutánea.

Se han realizado experimentos que tienden a demostrar que los seres humanos producen tanto 3DG como 3DF a partir de proteínas ingeridas por vía oral que contienen restos de lisina glicosilada. Estos experimentos, que se describen con detalle a continuación, demuestran de forma convincente que la ruta de recuperación de lisina existen seres humanos. Estos experimentos también arrojaron luz en un fenómeno de desconcertante, a saber, que algunos pacientes diabéticos desarrollan complicaciones diabéticas, mientras que otros, incluso los que se encuentran con un escaso control de glucemia, no desarrollan tales complicaciones. La razón de este fenómeno es evidente a partir de los datos que se presentan en el presente documento. Los diabéticos tienen una capacidad de diferenciación para detoxificar la 3DG. Un subconjunto de la población diabética parece que tiene actividades de aldehído reductasa relativamente más elevadas que la mayoría de los diabéticos. En consecuencia, estos individuos son capaces de manejar el aumento del flujo a través de la ruta de recuperación de lisina mediante la detoxificación de forma eficaz del nivel más alto de lo normal de 3DG. Otros con alteración de la capacidad son menos capaces de detoxificar sus niveles de 3DG elevados, y en consecuencia están en riesgo más elevado de desarrollar complicaciones diabéticas.

Tal como se describirá con más detalle a continuación, se ha demostrado experimentalmente que la estimulación de la ruta de recuperación de lisina se puede producir a través del uso de una dieta de proteína glicosilada. Como fue el caso con la FL mencionada anteriormente, se observó aumento de FL3P, 3DG y 3DF en animales de ensayo que se alimentaron con la dieta de proteína glicosilada.

Los compuestos inhibidores enzimáticos de la invención bloquean la ruta de recuperación de lisina, previniendo la formación de 3DG tóxica de FL3P.

A continuación se describe un conjunto de criterios extensos que debería presentar un inhibidor enzimático adecuado para uso en la práctica de la presente invención, así como determinados ensayos para determinar si cualquier supuesto inhibidor satisface estos criterios. Los inhibidores de quinasa candidatos para uso de acuerdo con la presente invención pueden ser productos naturales aislados a partir de plantas o microorganismos. Como alternativa, pueden ser moléculas sintéticas derivadas del conocimiento racional de la reacción enzimática y su mecanismo. También se pueden sintetizar inhibidores mediante métodos de combinación. Se pueden generar bibliotecas de combinación a partir de un punto de partida aleatorio. Además, se pueden usar métodos de combinación para generar una amplia variedad de compuestos relacionados con los inhibidores identificados previamente de la FL3P quinasa diana.

Independientemente de la fuente del supuesto inhibidor, los compuestos que no satisfacen todos los criterios que se enumeran a continuación no se consideran agentes terapéuticos útiles capaces de inhibir la ruta de recuperación de lisina y por lo tanto prevenir, reducir o retrasar el inicio de complicaciones diabéticas o trastornos de etiología relacionada.

1. El inhibidor debería ser una molécula pequeña y se debería absorber rápidamente por las células. Con el fin

de satisfacer este criterio, el inhibidor debe tener un peso molecular inferior a 2.000 y de forma más ideal aproximadamente 1.000 daltons o inferior.

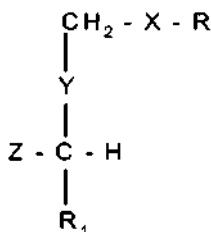
2. El inhibidor debe mostrar inhibición competitiva, no competitiva, irreversible o suicida de la FL3P quinasa. Si el inhibidor es un inhibidor competitivo o no competitivo, la constante de inhibición, K_i , debe ser inferior a aproximadamente 1 mM. De forma ideal, debe ser inferior a 100 μM y de forma más ideal, aproximadamente 40 μM o inferior. Si el inhibidor muestra inhibición suicida u otra inhibición irreversible, este requisito de constantes de inhibición se vuelve discutible.

3. El inhibidor debe ser tanto soluble en solución acuosa como estable en solución acuosa al pH fisiológico. El requisito de solubilidad satisface solamente si el inhibidor, o una sal del inhibidor, es soluble en solución salina o suero fisiológicos alguna concentración igual o superior a 10 μM . Este requisito de estabilidad se satisface solamente si una solución de inhibidor disuelto en solución salina fisiológica a 37 °C mantiene más de un 50 % de su actividad después de incubación durante una hora. De forma ideal, el inhibidor debe retener más de un 50 % de actividad después de incubación durante un día o más.

4. El inhibidor debe mostrar farmacocinética aceptable. Es decir, debe permanecer a una concentración terapéuticamente eficaz durante al menos una hora después de la administración del agente. De forma ideal, debería mantener una concentración eficaz durante al menos ocho horas. De forma más ideal una vez al día de dosificación debería ser todo lo que es necesario para mantener una concentración terapéutica del inhibidor. Este requisito no significa que el inhibidor deba ser capaz de establecer una concentración terapéutica después de la primera dosis. Existen numerosos ejemplos de agentes farmacéuticos satisfactorios en los que la eficacia médica se observa solamente después de la dosificación prolongada. El criterio no significa que, una vez que se alcanza una concentración eficaz, se debería poder mantener esta concentración durante un periodo superior a una hora después de la última administración de la medicación. En el presente documento se describe un ensayo de eficacia terapéutica.

5. El inhibidor debe ser no tóxico. Este criterio requiere que el inhibidor no demuestre toxicidad humana cuando se administra a la dosis terapéutica. De forma ideal, la toxicidad no debería ser evidente cuando el inhibidor está presente a niveles en sangre y/o tejido diana del doble del necesario para el efecto terapéutico. De forma más ideal, no debería haber toxicidad apreciable a niveles de 6 o más veces el intervalo terapéutico. Las complicaciones diabéticas solamente se pueden prevenir mediante tratamiento inhibidor a largo plazo. Por lo tanto, el requisito de no toxicidad debe incluir tanto toxicidad aguda como toxicidad crónica que se puede hacer evidente durante el uso a largo plazo, prolongado. La toxicidad de las moléculas candidatas se puede evaluar rápidamente usando estudios animales bien establecidos. La toxicidad humana se evalúa en el estadio uno de ensayos clínicos.

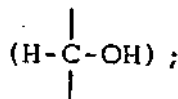
Los compuestos para uso en la práctica de la presente invención son los que tienen la fórmula:



en la que X es -NR'- u -O-, seleccionándose R' entre el grupo que consiste en H, y grupo alquilo de cadena lineal o ramificada (C₁-C₄) y un grupo arilo (C₆-C₁₀) o grupo aralquilo (C₇-C₁₀) sin sustituir o sustituidos; R es H o un resto de lisina; dichos sustituyentes de grupo arilo (C₆-C₁₀) o grupo aralquilo (C₇-C₁₀) se seleccionan entre el grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₆), halógeno, CF₃, CN, NO₂ y -O-alquilo (C₁-C₆); R₁ es un resto de poliol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono lineales, Y es cualquiera de un resto carbonilo



o un resto de hidroximetileno



Z se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -O-alquilo (C₁-C₆), -halógeno -CF₃, -CN, -COOH, y -SO₃H₂, y

opcionalmente -OH; y los isómeros y sales farmacéuticamente aceptables de dicho compuesto, en los que el compuesto no es 3-desoxifruktosa.

Los ejemplos ilustrativos de sustituyentes "R" que contienen nitrógeno u oxígeno incluyendo los derivados del ácido γ -amino- α -hidroxi butírico $(-(\text{CH}_2)_2\text{-CHOH-COOH})$, 1,2,4 triaminobutano $(-(\text{CH}_2)_2\text{-CHNH}_2\text{-CH}_2\text{NH}_2)$, ácido 3,6-diamino-5-hidroxi-heptanoico $(-\text{CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-COOH})$, y similares.

La estructura de fórmula I tiene centros asimétricos y se puede producir como racematos, mezclas racémicas y diversos estereoisómeros, estando todas estas formas isoméricas dentro del alcance de la presente invención, así como mezclas de las mismas.

Aunque ciertos compuestos que tienen la estructura de fórmula I, mencionada anteriormente, se conocían anteriormente, se cree que otros son nuevos y como tal están dentro del alcance de la presente invención, al igual que lo es el uso de todos los compuestos de fórmula I para inhibir la producción catalizada con enzimas de 3DG *in vivo*.

Los inhibidores de la fórmula anterior se pueden preparar haciendo reaccionar el azúcar apropiado, por ejemplo, glucosa, galactosa, manosa, ribosa, xilosa, o derivado de los mismos, con un aminoácido u otra amina primaria o secundaria apropiada para producir inhibidores que tienen un resto de carbonilo (es decir, $\text{Y}=\text{C}(=\text{O})$ -). Como alternativa, los azúcares tales como glucosa, galactosa, manosa, ribosa, xilosa, o similares, se pueden hacer reaccionar con un reactivo sustituido con amino o hidroxilo del tipo que se describe en el presente documento en presencia de un agente, tal como NaBH_3CN , que reduce de forma selectiva el compuesto intermedio de base de Schiff a una amina, reduciendo de este modo un inhibidor que tiene un resto de alcohol (es decir, $\text{Y}=\text{CH}(\text{-OH})$ -). El resto reactivo de un reactivo aminoácido, cuando se usa, puede ser el grupo amino en el carbono alfa, o el grupo amino group o grupo hidroxilo en la cadena lateral ácida. Los aminoácidos adecuados incluyen los aminoácidos esenciales. Los ejemplos específicos incluyen, sin limitación, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, metionina, ácido aspártico, fenilalanina, tirosina, histidina y triptófano. Otros reactivos adecuados son de la clase más amplia de ácido aminocarboxílico, por ejemplo, ácido piroglutámico, beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico, ácido épsilon-amino caproico y similares. Si se desea, también se pueden usar derivados de N-acrilo de los aminoácidos mencionados anteriormente, tales como formil lisina.

Otros reactivos apropiados incluyen, pero no se limitan a, compuestos de arilo ($\text{C}_6\text{-C}_{10}$) sin sustituir o sustituidos, en los que el sustituyente puede ser grupos alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_3$), alcoxi, carboxi, nitro o halógeno, alcanos sin sustituir o sustituidos, en los que el sustituyente puede ser al menos un grupo alcoxi; o compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno sin sustituir o sustituidos, en los que los sustituyentes pueden ser grupos alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_3$), arilo ($\text{C}_6\text{-C}_{10}$), alcoxi, carboxi, nitro o halógeno. Los ejemplos ilustrativos del último grupo de reactivos mencionado incluyen m-metil-, p-metil-, m-metoxi-, o-metoxi- y m-nitro-aminobencenos, ácidos o- y p-aminobenzoicos; n-propilamina, n-butilamina, 3-metoxipropilamina; morfolina y piperidina.

Los compuestos inhibidores representativos que tienen las fórmulas mencionadas anteriormente se exponen en la Tabla A adjunta. Los ejemplos de compuestos conocidos que se pueden usar como inhibidores en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, meglumina, sorbitol lisina y manitol lisina.

Los compuestos inhibidores que se describen en el presente documento pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con diversos ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Las bases adecuadas incluyen, por ejemplo, sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, amonio, amonio sustituido y otras sales de amina. Los ácidos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico y ácido metanosulfónico.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I se pueden preparar siguiendo procedimientos que son familiares para los expertos en la materia.

La capacidad de un compuesto para inhibir la FL3P quinasa se puede determinar usando una amplia variedad de ensayos de actividad de quinasa. Un ensayo útil implica la incubación del inhibidor potencial con fructosa-lisina y ATP en presencia de homogenado de riñón u otra fuente enzimática. Se prepara una solución de los componentes del ensayo, que por lo general contienen 1 milimol o una cantidad inferior del compuesto inhibidor de la presente invención, una cantidad de fructosa lisina (FL) en el intervalo de 1-10 milimoles, una cantidad de ATP en el intervalo de 0,1-10 milimoles y una cantidad de la fuente enzimática que es suficiente para convertir la FL en fructosa lisina-3-fosfato. La incubación se debería realizar dentro de un intervalo de pH de 4,5 a 9,5 y de forma ideal pH neutro o casi neutro. La incubación se debería realizar a una temperatura que sea compatible con la actividad enzimática, entre 4 °C y 40 °C. De forma ideal, la incubación se realiza a temperatura fisiológica. Después de la incubación, la reacción se detiene mediante precipitación ácida de la proteína y la producción de FL3P medida con espectroscopía de RMN ^{31}P . La producción de FL3P se reducirá o eliminará en muestras que contienen un compuesto inhibidor cuando se compara con muestras de control que están libres de inhibidor.

Otros ensayos tienen utilidad para la determinación rápida de la inhibición enzimática. Uno de tales ensayos implica el uso de fructosa-lisina y ATP ^{32}P o ^{33}P marcado con γ . Dado que FL3P no se une a Dow-1 sino a ATP y también lo

hacen la mayoría de los otros fosfatos, es posible separar el FL3P producto de la mezcla de reacción restante pasando la solución de ensayo a través de una columna de resina Dow-1 después de un tiempo de reacción determinado previamente, por lo general de 10 minutos. La solución resultante se añade a un envase de líquido de centelleo, por ejemplo, Ecoscint A, y se hace el recuento para determinar la cantidad de radiactividad producida.

5 Dado que es difícil obtener cantidades grandes de tejido humano, es preferente usar una versión recombinante de la quinasa que se clona en un sistema de expresión, tal como *E. Coli*. La quinasa clonada se puede obtener fácilmente a partir de la clonación "al azar" de bibliotecas de ADNc específico de tejido. Tales bibliotecas están disponibles fácilmente a partir de fuentes comerciales. Por ejemplo, se pueden obtener en Clontech, Palo Alto, CA. La clonación al azar visualizada se puede realizar usando el sistema de clonación lambda disponible en el mercado en Stratagen, localizado en San Diego, California. Este kit de clonación contiene instrucciones detalladas para su uso.

10 Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más de los compuestos que se han descrito anteriormente, como el principio activo, en combinación con un medio de vehículo o agente auxiliar farmacéuticamente aceptables.

15 Estos ingredientes se pueden preparar en diversas formas de administración, formas tanto líquidas como sólidas. Por lo tanto, la preparación se puede presentar en forma de comprimidos, comprimidos encapsulados, píldora o granjeas, o se pueden rellenar en envases adecuados, tales como cápsulas, o, en el caso de las suspensiones, se pueden rellenar en frascos. Cómo se usa el presente documento, "medio de vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, diluyentes, u otro vehículo líquido, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes de superficie activa, agentes isotónicos, agentes espesantes emulgentes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según se ajuste a la forma de dosificación deseada en particular. Los ejemplos representativos de medios de vehículo adecuados incluyen gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, 20 grasas y aceites vegetales y animales, goma, polialquilenglicol, o similares. Pharmaceutical Sciences de Remington, Decimoquinta Edición, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA 1975) desvela diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier medio de vehículo convencional es incompatible con los inhibidores enzimáticos de la invención, tal, mediante la producción de cualquier efecto biológico indeseado o interactuando de otro modo de una 25 manera perjudicial con cualquiera del otro u otros componentes de la preparación farmacéutica, se contempla que su uso está dentro del alcance de la presente invención.

30 En las preparaciones farmacéuticas de la invención, el agente o agentes activos pueden estar presentes en una cantidad de al menos un 5 % y por lo general no superior a un 98 % en peso, basándose en el peso total de la preparación, incluyendo medios de vehículo y/o agente o agentes auxiliares, si los hubiera. Preferentemente, la proporción de agente activo varía entre un 65 % - 95 % en peso de la composición.

35 Los agentes activos complementarios preferentes son compuestos que se unen a 3DG *in vivo*. Esta clase de compuestos incluye, sin limitación, aminoguanidina, ácido amino benzoico y derivados del mismo, cisteína y derivados de la misma, imidazoles amino-sustituidos, benzimidazoles 1,2-disustituidos, 1,2,4-triazoles sustituidos, diaminopiridina y derivados de la misma, pirimidinas amino-sustituidas, aminoalcoholes, diaminas y similares. También se pueden incluir fármacos antihipertensivos, incluyendo en particular los inhibidores de enzima que convierte angiotensina (ACE), como agentes activos complementarios en las preparaciones farmacéuticas de la 40 presente invención.

45 En la preparación farmacéutica también se pueden incorporar agentes auxiliares, tales como compuestos que protegerán el compuesto activo de la destrucción ácida en el estómago o facilitarán la absorción el compuesto activo en el torrente sanguíneo, si fuera necesario o deseable. Tales agentes auxiliares pueden incluir, por ejemplo, agentes de formación de complejos tales como borato u otras sales que compensan parcialmente las condiciones 50 ácidas en el estómago, y similares. La absorción se puede aumentar administrando el compuesto activo como la sal de un ácido graso (en esos casos en los que el compuesto activo contiene uno o más grupos funcionales básicos).

55 Los compuestos de la invención, junto con cualquier principio o principios activos complementarios se pueden administrar, usando cualquier cantidad que cualquier vía de administración y eficaz para inhibir la ruta de recuperación de la FL3P lisina. Por lo tanto, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente del inhibidor enzimático para proporcionar la terapia deseada para contrarrestar complicaciones diabéticas o para inhibir la producción metabólica de 3DG por otras razones médicas, tales como reducción de los efectos del envejecimiento de otras patologías humanas en las que la formación de Proteína AGE tiene un papel causal. La cantidad exacta necesaria puede variar, dependiendo 60 de la especie, era, y condición general del paciente, la naturaleza de las complicaciones, el inhibidor enzimático en particularismo de administración, y similares.

65 Los compuestos de la invención se formulan preferentemente en forma de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación en el presente documento se usa para hacer referencia a una unidad físicamente separada de inhibidor enzimático apropiado para el paciente a tratar. Cada dosificación debería contener la cantidad de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado

como tal, o en asociación con el medio de vehículo farmacéutico seleccionado. Por lo general, los compuestos de la invención se administrarán unidades de dosificación que contienen de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2.500 mg del compuesto, en peso de la preparación, con un intervalo de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 250 mg siendo preferente.

5 Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral, tal como mediante inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, infusión intravenosa o similar, dependiendo de la naturaleza de la complicación diabética que se está tratando. Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral o
10 por vía parenteral a niveles de dosificación de aproximadamente 0,7 μg a aproximadamente 20 mg y preferentemente de aproximadamente 30 μg a aproximadamente 3,5 mg/kg, de peso corporal del paciente al día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

Son particularmente preferentes los inhibidores enzimáticos activos por vía oral, con la condición de que la dosis oral sea capaz de generar niveles del inhibidor en sangre y/o tejido diana que sean terapéuticamente activos. Los
15 expertos en la materia pueden medir fácilmente los niveles de un inhibidor de molécula pequeña en muestras desproteinizadas de sangre, riñón y otros tejidos diana. La concentración de inhibidor en estas muestras se puede comparar con la constante de inhibición determinada previamente. Los niveles de tejido que están muy por debajo de la constante de inhibición sugieren una falta de actividad terapéutica. En el caso de inhibidores irreversibles, esta falta se puede confirmar o refutar mediante ensayo de los niveles de FL3P quinasa en el tejido respectivo. En todos
20 los casos, la actividad terapéutica se puede evaluar alimentando al sujeto humano o animal con un alimento rico en restos de lisina glicosilada o fructosa-lisina y midiendo la cantidad de 3DG y 3DF en su orina, tanto antes como después de la alimentación. Los sujetos que tienen inhibidor terapéuticamente activo en su sistema experimentarán una disminución de la secreción tanto de 3DG como de 3DF y un aumento de la secreción urinaria de fructosa-lisina cuando se compara con niveles secretados por estos mismos sujetos antes de la terapia con inhibidor tal como se
25 describirá con detalles adicionales en lo sucesivo en el presente documento.

Los compuestos de la invención por lo general se administrarán una vez al día o hasta 4-5 veces al día, dependiendo del inhibidor exacto elegido. Aunque es preferente un programa de dosificación de una vez al día, los
30 pacientes diabéticos están acostumbrados a prestar atención cercana a su patología, y de este modo afectarán fácilmente programas de dosificación más frecuentes si fuera necesario, con el fin de administrar la dosificación diaria mencionada anteriormente. Sin embargo, el régimen exacto de administración de los compuestos y composiciones que se describen en el presente documento dependerá necesariamente de las necesidades del paciente individual que se está tratando, el tipo de tratamiento administrado y el criterio del médico que prescribe. Como se usa en el presente documento, el término "paciente" incluye tantos seres humanos como animales.
35

Los compuestos inhibidores que se describen en el presente documento son útiles para contrarrestar complicaciones diabéticas, especialmente nefropatía diabética que afecta a más de un cuarenta por ciento de diabéticos y es la
40 causa principal de enfermedad renal en estadio terminal que requiere diálisis y trasplante. Además, estos inhibidores se pueden usar para la prevención o tratamiento de otras afecciones patológicas que se pueden atribuir a la formación de proteínas AGE, tales como hipertensión, ictus, trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, demencia senil de tipo Alzheimer, enfermedad circulatoria, aterosclerosis, osteoartritis, cataratas y los efectos debilitantes generales del envejecimiento.

Experimentos preliminares han mostrado que efectos de salud adversos graves resultan de la estimulación de la ruta
45 de recuperación de lisina a través del consumo largo plazo de proteínas glicosiladas. Tal como fue el caso con FL, se observó aumento de FL3P, 3DG y 3DF en animales de ensayo que se alimentaron con una dieta de proteína glicosilada. Véase la Tabla B. Después de ocho meses de tal dieta, se observó una clara evidencia de patología renal, parecida a la que se encontró en riñones diabéticos, en los animales con la dieta de proteína glicosilada, tal como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10, que sigue a continuación. También se observó elevación
50 transitoria de los niveles de 3DG y 3DF en la orina de voluntarios humanos que comieron una pequeña cantidad de proteína glicosilada.

TABLA B

% de Proteína Glicosilada	Conc. de FL3P (nM en Riñón)	Concs de 3DG/3DF (1 μM en plasma)
0	97	1,4/0,05
1	295	-
2,5	605	-
5	937	-
10	1066	3,6/0,12
20	1259	5,2/0,14
30	1267	6,2/0,28

Dado que la estimulación de la ruta de recuperación de lisina recién descubierta conduce argumentos básicos en los niveles de 3DG sistémico, se realizó una investigación para determinar si una dieta glicosilada provocaría efectos significativos en el embarazo. Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que existe un efecto muy fuerte debido a esta ruta, tal como aparecerá en los ejemplos que siguen a continuación.

5 Además, es bien sabido que en cepas susceptibles de ratas y ratones, las dietas en las que se mantienen los animales al inicio de su vida (después del destete), pueden tener un marcado efecto en la incidencia de la diabetes de tipo 1, con la incidencia variando desde un 10 % a un 90 %. Un esfuerzo considerable se ha puesto en la investigación de este fenómeno en los últimos 10 años. Véase, por ejemplo, Diabetes, 46 (4): 589-98 (1997) y
 10 Diabetes Metab. Rev., 12 (4): 341-59 (1996), y referencias mencionadas en las mismas. Algunos de los presentes inventores han realizado una investigación con respecto a dos dietas que se encuentran en los extremos para la inducción de la diabetes. AIN-93 (Dyets, Inc.) provoca la menor incidencia de diabetes y produce la relación más baja de 3DF urinaria/creatinina (1,0) observada todavía. La Purina 500 induce la incidencia más elevada de diabetes y produce un aumento de 2,5 veces en la relación de 3DF/creatinina. Dado que FL3P, 3DG y 3DF se observaron en
 15 el páncreas de ratas, es probable que la fructosolisina quinasa y los metabolitos de esta ruta metabólica estén involucrados en el desarrollo de la diabetes de Tipo I. Los animales que son susceptibles a este tipo de diabetes (un modelo útil de dependencia de insulina o diabetes de Tipo I en seres humanos) tienen un sistema inmune anómalo que los hace sensibles a un antígeno desconocido que se desarrolla en las células β del páncreas, dando como resultado un ataque autoinmune por el propio sistema inmune del animal en sus células β y esto da como resultado
 20 su posterior destrucción, privando de este modo al animal de la capacidad de producir insulina. Es bien sabido que la 3DG que reacciona con proteínas puede preparar nuevos sitios antigénicos. Por lo tanto, la fuente de las propiedades antigénicas de las diversas dietas parece ser la 3DG creada por la descomposición del fructosolisina-3-fosfato en el páncreas.

25 Además, debido a que se sabe que 3DG interactúa con aminos generalmente, éste puede ser capaz de interactuar con el ADN y mostrar potencial mutagénico y carcinogénico, así como proteínas de reticulación.

El descubrimiento de la ruta de recuperación de la FL3P lisina hace que sea práctico, por primera vez, diferenciar la población de diabéticos y determinar qué subconjunto de la población es probable que desarrolle complicaciones diabéticas. Esta determinación se puede realizar de forma conveniente en un fluido biológico del sujeto de ensayo, tal como orina, fracciones de sangre (en particular plasma o suero), fluido linfático, fluido intersticial o similares.

Después de una noche en ayunas, un sujeto humano se alimenta con una fuente de alimento que contiene una concentración relativamente elevada de lisina glicosilada. A modo de ejemplo, este alimento puede estar en forma de una "galleta" de caseína/azúcar, tal como se describe en el Ejemplo 5, que sigue a continuación, o alguna otra
 35 fuente adecuada de lisinas glicosiladas o fructosa-lisina sintética. Cuando se usan proteínas que contienen restos de lisina glicosilada, el contenido de lisina glicosilada debería estar preferentemente entre un 0,02 y un 10 % del aminoácido de la proteína total, o más preferentemente entre aproximadamente un 0,2 y un 0,4 %. La cantidad total de restos de lisina glicosilada en la dosis oral debería ser de aproximadamente 0,3 gramos. Preferentemente, se recoge una muestra de orina antes del consumo de la fuente de lisina glicosilada, a continuación a una, tres y cinco
 40 horas, o en otros momentos apropiados de modo que se pueda garantizar por la situación clínica individual.

Se miden los niveles de 3DG y 3DF en estas muestras de orina y se calculan las relaciones de estos metabolitos. La metodología en particular usada en esta medida no es esencial para la práctica de la presente invención. Si se desea, se puede usar el método de GC que se describe en el Ejemplo 5, que sigue a continuación. Como alternativa, se pueden usar métodos de ensayo colorimétricos o inmunológicos, tal como será evidente para los expertos en materia.

Es evidente que el factor de riesgo principal que afrontan los diabéticos es el control de glucemia, tal como se demostró claramente con el Ensayo de Control y Complicaciones de la Diabetes completado recientemente. Sin embargo, la incidencia de complicaciones diabéticas no se puede explicar solamente con los niveles de azúcar en sangre; se observa una dispersión bastante amplia cuando la incidencia de complicaciones diabéticas se compara con los niveles históricos de azúcar en sangre.

55 Un método para determinar qué subconjunto de población diabética que presenta mayor riesgo de desarrollar complicaciones diabéticas es un aspecto particularmente significativo de la presente invención. Este método implica la medida de los niveles de FL, 3DG y 3DF antes y, de forma óptima, después de ingerir una fuente de lisina glicosilada.

60 Por ejemplo, los sujetos normales tienen una relación de 3DG con respecto a 3DF en ayunas en la orina de aproximadamente 0,025, mientras que los diabéticos tienen relaciones más elevadas, que pueden ser de hasta cinco veces más elevadas, o superiores. Esto se corrobora con los datos de la Figura 7, que muestran que los normoglucémicos tienen una relación de 3DG/3DF de 0,025 (1/39,77) con una dispersión bastante estrecha alrededor de este valor, mientras que los diabéticos tienen una relación media de más de 2 veces más elevada
 65 (promedio de 0,069) con mucha más dispersión alrededor del promedio.

Tal como se demuestra el presente documento, los diabéticos presentan un aumento de la producción de 3DG. Por lo tanto, la resistencia complicaciones diabéticas requiere una eliminación altamente eficaz de este metabolito tóxico. La relación de 3DG con respecto a 3DF, calculada con el método que se describe en el presente documento, permite que se evalúe la eficacia de las rutas de detoxificación de 3DG. Los individuos con una relación baja por lo general serán resistentes al desarrollo de complicaciones diabéticas. Los individuos con relaciones más elevadas, incluyendo las relaciones contenidas dentro del intervalo normal, presentan más riesgo, mientras que los individuos con relaciones elevadas por encima del intervalo normal se encuentran particularmente en riesgo de desarrollar estas complicaciones.

Las medidas recientes de fructoselisisina (FL) en el plasma y la orina de cuatro cepas diferentes de ratas han demostrado una variabilidad considerable en la manera en que sus respectivos riñones procesan la FL en sangre. En dos de las cuatro cepas (Long Evans, Brown Norway) virtualmente todas las FL filtradas por el riñón aparecían en la orina basándose en relaciones de este compuesto y sus metabolitos con creatinina. Con las otras dos cepas (Sprague Dawley, Fischer) un 10-20 % de la FL en el plasma aparecían en la orina, basándose en comparaciones con la filtración de creatinina. Estas medidas sugieren fuertemente una variabilidad principal en el procesamiento de FL en el riñón de mamífero. Teniendo en cuenta lo que se sabe sobre la equivalencia funcional y riñones de roedor y de ser humano, es razonable suponer que existirá una variación similar en el procesamiento de FL entre seres humanos. Dado que FL es la entrada principal de la ruta de recuperación de fructoselisisina, es probable que toda la ruta se estimule básicamente en esos seres humanos en los que una gran cantidad de FL se absorbe a partir del ultrafiltrado, lo que conduce a los niveles locales elevados de 3-desoxiglucosona (3DG) en el riñón, así como sistémica mente a través de todo el organismo. Esta observación puede servir como la base de un ensayo de diagnóstico en el que la comparación de una muestra de plasma o suero obtenida de forma contemporánea con una muestra de orina determinaría el flujo de FL en el riñón, y la fracción de ese flujo que aparece en la orina. Los individuos en los que esta relación es básicamente inferior a uno (1) entonces estarían en riesgo de desarrollar varias patologías que incluyen, pero no se limitan a, nefropatía diabética, insuficiencia renal en la vejez y carcinoma renal.

La eficacia terapéutica de los inhibidores de quinasa de la invención se puede determinar de forma fácil y segura usando un ensayo de la ruta de recuperación de lisina. El protocolo del ensayo es idéntico al que se ha presentado inmediatamente antes, con excepción de que los niveles de fructoselisisina en orina se miden además de los niveles de 3DG y 3DF en orina. Es útil realizar este ensayo tanto antes como después de el comienzo de la terapia con inhibidor de FL3P quinasa. Los niveles en orina de 3DG y 3DF se suman en cada punto temporal y se comparan con los niveles de fructosa-lisina medidos en la misma muestra.

Los niveles máximos de 3DG y 3DF encontrados en la orina después de la ingestión de alimentos ricos en restos de lisina glicosilada se derivan de la actividad de la ruta de recuperación de lisina. La relación de la concentración de estos metabolitos con respecto a fructosa-lisina sin reaccionar (que es un componente normal en la orina humana) refleja la actividad de esta ruta. La inhibición de la ruta de recuperación de lisina causará una disminución en la cantidad de 3DG y 3DF excretada, y un aumento de los niveles de fructosa-lisina excretados. Por lo tanto, la eficacia terapéutica de un inhibidor de quinasa se puede cuantificar midiendo la disminución de la relación de (3DG + 3DF)/fructosa-lisina después del inicio de la terapia. Es de destacar que el volumen de orina o las concentraciones de metabolito no son un factor en la interpretación de este ensayo, ya que solamente se considera una relación de metabolitos.

A partir de la divulgación anterior se observará que el alimento ingerido por vía oral contendrá concentraciones elevadas de restos de lisina glicosilada que conducirán a la producción de 3DG en riñón y en suero. Es razonable advertir a los individuos en riesgo de enfermedad renal, por ejemplo diabéticos, que eviten alimentos con estas concentraciones elevadas. Las concentraciones de restos de lisina glicosilada se pueden medir usando una amplia variedad de métodos. Uno de tales métodos se describe en el Ejemplo 4, que sigue a continuación. Sin embargo, cualquier metodología de medida adecuada que determine de forma precisa los niveles de restos de lisina glicosilada se puede sustituir el lugar del método de ensayo que se usa a modo de ejemplo a continuación. Los ejemplos de métodos de ensayo contemplados específicamente incluyen, pero no se limitan a, métodos colorimétricos e inmunológicos.

Independientemente del método de medida usado, está dentro del alcance de la presente invención determinar el contenido de restos de lisina glicosilada en alimentos preparados e informar a los individuos en riesgo de desarrollar disfunción renal de estas determinaciones, de modo que tales individuos se puedan abstener de ingerir alimentos con alto contenido en lisina glicosilada.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención con detalles adicionales. Estos ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos, y no se deberían interpretar en modo alguno como limitantes de la invención. Todas las temperaturas proporcionadas en los ejemplos están en grados centígrados a menos que se indique de otro modo.

65 EJEMPLO 1

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE FL3P: Un análisis de RMN ³¹P de un extracto de ácido perclórico de riñones de ratas diabéticas presentaba una nueva resonancia de monofosfato de azúcar a 6,24 ppm, que no se observa en tejido no renal y está presente a niveles ampliamente reducidos en riñón no diabético. El compuesto responsable de la resonancia observada se aisló por cromatografía del extracto en una columna de celulosa microcristalina usando 1-butanol-ácido acético-agua (5:2:3) como eluyente. La estructura determinada mediante 2D COSY de protón era fructosa-lisina 3-fosfato. Este se confirmó posteriormente inyectando animales con FL, preparado como se ha descrito anteriormente (Finot y Mauson, *Helv. Chim. Acta*, 52: 1488 (1969)), y mostrando una fosforilación directa a FL3P. Usando FL específicamente deuterado en la posición 3 se confirmó la posición del fosfato en el carbono 3. Esto se realizó analizando los espectros de RMN ³¹P tanto acoplados como desacoplados. El acoplamiento de P-O-C-H normal produce un duplete en FL3P con un valor de J de 10,3 Hz, mientras que P-O-C-D no presenta acoplamiento y produce un singlete tanto acoplado como desacoplado, tal como se encontró para el deuterado en la posición 3. Una propiedad única del FL3P es que cuando se trata con borohidruro sódico se convierte en dos nuevas resonancias a 5,85 y 5,95 ppm, que corresponde a los 3-fosfatos de manitol y sorbitol-lisina.

EJEMPLO 2

SÍNTESIS DE FL3P: 1 mmol de 3-fosfato de dibencil-glucosa y 0,25 mmol de α-carbobenzoxi-lisina se calentaron a reflujo en 50 ml de MeOH durante 3 horas. La solución se diluyó con 100 ml de agua y se cromatografió en una columna Dow-50 (2,5 x 20 cm) en la forma de piridinio y se eluyó primero con agua (200 ml) y a continuación con 600 ml de tampón (piridina 0,1 M y ácido acético 0,3 M). El compuesto diana se eluyó al final del lavado con agua y al comienzo del lavado con tampón. La retirada de los grupos de bloqueo de cbz y bencilo con Pd al 5 %/C a 138 kPa de hidrógeno proporcionó FL3P con un rendimiento de un 6 %.

EJEMPLO 3

PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE FL3P A PARTIR DE FL Y ATP AND Y ENSAYOS DE IDENTIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE INHIBIDORES: Inicialmente se usó RMN ³¹P para demostrar la actividad de quinasa en la corteza renal. Una muestra de 3 g de corteza renal de cerdos recién preparada se homogeneizó en 9 ml de Tris·HCl 50 mM que contenía KCl 150 mM, DTT 5 mM, MgCl₂ 15 mM, pH 7,5. Esto se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos, y a continuación el sobrenadante se centrifugó a 100.000 g durante 60 minutos. Se añadió sulfato de amonio hasta una saturación de un 60 %. Después de 1 hora a 4 °C, el precipitado se recogió por centrifugación y se disolvió en 5 ml del tampón original. Una alícuota de 2 ml de esta solución se incubó con ATP 10 mM y 10 mM de FL (preparado como en el Ejemplo 1, mencionado anteriormente) durante 2 horas a 37 °C. La reacción se inactivó con 300 ul de ácido perclórico, se centrifugó para retirar la proteína, y se desaló en una columna de Sephadex G 10 (5 x 10 cm). El análisis de RMN ³¹P de la mezcla de reacción detectó la formación de FL3P.

Basándose en la prueba de la actividad de quinasa obtenida de este modo, se desarrolló un ensayo radiactivo. Este ensayo se designó para tener ventaja de la carencia de unión a la resina de intercambio aniónico Dow-1 por FL3P. Esta característica de FL3P se descubrió durante los esfuerzos para aislarlo. Dado que la mayoría de los fosfatos se unen a esta resina, se sospechó que el volumen de todos los compuestos que reaccionan con ATP así como cualquier exceso de ATP se uniría, dejando FL3P en solución. La primera etapa era determinar la cantidad de resina necesaria para retirar el ATP en el ensayo. Esto se consiguió pipeteando la mezcla en una suspensión de 200 mg de Dow-1 en 0,9 ml de H₂O, sometiendo a agitación vorticial y centrifugando para empaquetar la resina. A partir de estos 0,8 ml de sobrenadante se quite creó en 200 mg de resina seca recién preparada, se sometió a agitación vorticial y se centrifugó. Un volumen de 0,5 ml de sobrenadante se pipeteó en 10 ml de Ecoscint A y se hizo recuento. Los recuentos residuales eran de 85 cpm. Este procedimiento se usó para el ensayo. El precipitado a partir de precipitación de sulfato de amonio al 60 % del homogenado de corteza en bruto se volvió a disolver en el tampón de homogenado a 4 °C. El ensayo contiene γ³³P-ATP 10 mM (40.000 cpm), FL 10 mM, KCl 150 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 5 mM en 0,1 ml de Tris·HCl 50 mM, pH 7,5. La relación entre las tasas de producción de FL3P y concentración enzimática se determinó usando determinaciones por triplicado con 1,2 y 4 mg de proteínas durante 30 minutos a 37 °C. Los blancos ejecutados de forma simultánea sin FL se restaron y los datos se registraron. La actividad observada se corresponde con una tasa de síntesis de FL3P aproximada de 20 nmol/h/mg de proteína.

EJEMPLO 4

INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DE 3-DESOXIGLUCOSONA CON MEGLUMINA Y DIVERSAS POLIOLLISINAS

a. Síntesis general de poliollisina.

El azúcar (11 mmoles), α-carbobenzoxi-lisina (10 mmoles) y NaBH₃CN (15 mmoles) se disolvieron en 50 ml de MeOH-H₂O (3:2) y se agitó a 25 °C durante 18 horas. La solución se trató con un exceso de resina de intercambio iónico Dow-50 (H) para descomponer el exceso de NaBH₃CN. Esta mezcla (líquido más resina) se transfirió en una columna Dow-50 (H) (2,5 x 15 cm) y se lavó bien con agua para retirar el exceso de azúcar y ácido bórico. La carbobenzoxi-poliollisina se diluyó con NH₄OH al 5 %. El residuo obtenido después de la evaporación se disolvió en agua-metanol (9:1) y se redujo con gas hidrógeno (138 kPa) usando un catalizador de paladio al 10 % sobre carbón vegetal. La filtración y la evaporación proporcionan la poliollisina.

b. Protocolo experimental para reducción de 3-desoxiglucosona en orina y plasma por sorbitol-lisina, manitol-lisina y galactitol-lisina.

5 Se recogió orina de seis ratas durante tres horas. También se obtuvo una muestra de plasma. Se proporcionaron a los animales 10 1μ moles de cualquiera de sorbitol-lisina, manitol-lisina, o galactitol-lisina mediante inyección intraperitoneal. Se recogió orina durante otras tres horas, y se obtuvo una muestra de plasma al final de las tres horas.

10 Se midió la 3-desoxiglucosona en estas muestras, tal como se describe en el Ejemplo 5, que sigue a continuación, y los volúmenes variables se normalizaron a creatinina. La reducción media de la 3-desoxiglucosona en orina era de un 50 % con sorbitol-lisina, un 35 % con manitol-lisina y un 35 % con galactitol-lisina. La 3-desoxiglucosona en plasma se redujo un 40 % con sorbitol-lisina, un 58% con manitol-lisina y un 50 % con galactitol-lisina.

c. Uso de meglumina para reducir la 3-desoxiglucosona en orina.

15 Se trataron de ratas como en b), del apartado inmediatamente anterior, excepto en que se inyectó meglumina (100 $mmoles$) por vía intraperitoneal en lugar de los derivados de lisina mencionados anteriormente. Tres horas después de la inyección, las concentraciones medias de 3-desoxiglucosona en la orina disminuyeron en un 42 %.

EJEMPLO 5**AUMENTO DE FL, 3DG Y 3DF EN ORINA EN SERES HUMANOS DESPUÉS DE INGESTIÓN DE PROTEÍNA GLICOSILADA:**

25 a. Preparación de producto alimenticio que contiene proteína glicosilada: se mezclaron 260 g de caseína, 120 g de glucosa y 720 ml de agua para proporcionar una mezcla homogénea. Esta mezcla se transfirió a una bandeja de metal y se cocinó a 65 °C durante 68 horas. La torta resultante se pulverizó a continuación hasta un polvo grueso.

Este polvo contenía un 60 % de proteína tal como se determina con el procedimiento de Kjeldahl.

30 b. Medida del contenido de lisina glicosilada: se hidrolizó 1 g del polvo preparado en la etapa a., mencionada anteriormente, calentando a reflujo con HCl 6 N durante 20 horas. La solución resultante se ajustó a pH 1,8 con solución de NaOH y se diluyó hasta 100 ml. El contenido de fructoselisisina se midió en un analizador de aminoácidos como furosina, el producto obtenido a partir de la hidrólisis ácida de la fructoselisisina. De este modo, se determinó que la torta contenía un 5,5 % (p/p) de fructoselisisina.

35 c. Protocolo experimental: Los voluntarios estuvieron dos días con una dieta sin fructoselisisina y a continuación consumieron 22,5 g del producto alimentario preparado tal como se describe en el presente documento, recibiendo de este modo de forma eficaz una dosis de 2 g de fructoselisisina. Se recogió orina a intervalos de 2 horas durante 14 horas y se hizo una recogida final a las 24 horas.

40 d. Medida de FL, 3DG y 3DF en orina: FL se midió por HPLC con una Matriz de diodo 996 de Waters usando una columna de Aminoácido Libre C18 de Waters a 46 °C y un sistema de elución en gradiente de acetonitrilo-alcohol metílico-agua (45:15:40) en acetonitrilo-acetato sódico-agua (6:2:92) a 1 ml/min. La cuantificación usó un patrón interno de meglumina.

45 Se midió 3DF mediante HPLC después de la desionización de la muestra. Los análisis se realizaron en un sistema de HPLC Dionex DX-500 usando una columna PAI (Dionex) incluyendo con hidróxido sódico 32 mM a 1 ml/min. La cuantificación se realizó a partir de curvas estándar obtenidas diariamente con 3DF sintético.

50 3DG se midió con GC-MS después de la desionización de la muestra. 3DG se derivatizó con un exceso de 10 veces de diaminonaftaleno en PBS. La extracción con acetato de etilo proporcionó una fracción libre de sal que se convirtió en los éteres de trimetil sililo con Tri-Sil (Pierce). El análisis se realizó en un sistema de GC-MS de control y iónico seleccionado de Hewlett-Packard 5890. Se realizó GC en una columna capilar de sílice fusionada (DB-5,25 m x 0,25 mm) usando el siguiente programa de temperatura: puerto inyector 250 °C, temperatura inicial de la columna 150 °C que se mantiene durante 1 minuto, a continuación se eleva a 290 °C a 16 °C/minuto y se mantiene durante 15 minutos. La cuantificación de la 3DG puso control iónico seleccionado usando un patrón interno de U-13C-3DG.

55 El gráfico que se muestra en la Figura 3 representa la producción de FL, 3DF y 3DG en la orina de un voluntario después del consumo de la proteína glicosilada. La rápida aparición de los tres metabolitos es claramente evidente. Tanto 3DF como 3DG muestran un ligero aumento incluso después de veinticuatro horas.

60 El gráfico que se muestra en la Figura 4 representa la formación de 3DF en cada uno de los miembros de un grupo de ensayo de siete personas. En todos los casos se observó un patrón similar. Tal como aparece en la Figura 4, la excreción de 3DF tiene máximos aproximadamente 4 horas después del bolo de FL y se puede observar un ligero aumento de 3DF incluso 24 h después del bolo.

65

EJEMPLO 6

EXPERIMENTO DE ALIMENTACIÓN: La N-acetil- β -glucosaminidasa (NAGasa) es una enzima excretada en la orina en concentración elevada en diabéticos. Se cree que es un marcador inicial del daño tubular, pero la patogénesis de la NAGasa elevada en la orina no se entiende bien. Se ha propuesto que el aumento de la producción urinaria de la NAGasa en diabéticos se debe a la activación de lisosomas en túbulos proximales inducida por diabetes con un aumento de la producción en la orina en lugar de destrucción de células.

Los resultados obtenidos en este ejemplo muestran que todas las comparaciones, los niveles de 3DF y NAGasa están elevados en el grupo experimental con respecto al control. Por lo tanto, los animales alimentados con proteína glicosilada excretan un exceso de NAGasa en su orina, similar a los resultados obtenidos con diabéticos. Se produce un aumento aproximado de un 50 % en la producción de NAGasa en comparación con animales de control. Estos animales también tienen un aumento de cinco veces de 3DF en orina en comparación con los controles. El 3DF en orina se correlaciona extremadamente bien con 3DG, como se puede observar en las Figuras 5 y 6. Parece que ambos compuestos se eliminan del plasma a la tasa de filtración glomerular, sin reabsorción.

EJEMPLO 7

GEL DE SDS DE PROTEÍNAS RENALES: Dos ratas se inyectaron diariamente con 5 *mmoles* de cualquiera de FL o manitol (usado como un control) durante 5 días. Los animales se sacrificaron y los riñones se extirparon y se diseccionaron en la corteza y la médula. Los tejidos se homogeneizaron en 5 volúmenes de Tris·HCl 50 mM que contenía KCl 150 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 5 mM, pH 7,5. El residuo celular se eliminó por centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos, y el sobrenadante se centrifugó a continuación a 150.000 g durante 70 minutos. Las proteínas solubles se analizaron por SDS PAGE en geles de poliacrilamida al 12 % así como en geles de gradiente de un 4-15 y un 10-20 %. En todos los casos, las bandas de menor peso molecular se pierden o se reducen visualmente a partir del extracto de riñón del animal infectado con FL cuando se compara con el animal inyectado con manitol.

EJEMPLO 8**SÍNTESIS DE 3-O-METILFRUCTOSA LISINA:**

Una suspensión de 19,4 g (0,1 mol) de 3-O-metil glucosa anhidra y 1 g de bisulfito sódico en 30 ml de metanol y 15 ml de glicerol se calentó a reflujo durante 30 minutos, seguido de la adición de 0,035 mol de α -carbobozenxi-lisina y 4 ml de ácido acético. Esta solución se calentó a reflujo durante 3 horas. La solución se trató con 1 volumen de agua y se cromatógrafió en una columna Dowex-50 (4 x 50 cm) en la forma de piridinio, y se eluyó primero con agua y a continuación con acetato de piridinio. Las fracciones que contenían el material puro se combinaron y se evaporaron. El material resultante se disolvió en 50 ml de agua-metanol (9:1) y se redujo con gas hidrógeno (138 kPa) usando un catalizador de paladio al 10 % sobre carbón vegetal. La filtración y la evaporación proporcionaron 3-O-metil-fructoselisina.

Otros compuestos específicos que tienen la estructura de fórmula (I), mencionada anteriormente, se pueden preparar, por ejemplo, por glicosilación de un material de partida seleccionado que contiene nitrógeno u oxígeno, que puede ser un aminoácido, poliaminoácido, péptido o similar, con una gente de glicosilación, tal como fructosa, que se puede modificar químicamente, si se desea, de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia.

EJEMPLO 9**ENSAYO ADICIONAL PARA LA ACTIVIDAD DE FL3P QUINASA:****a. Preparación de Soluciones de Reserva:**

Se preparó una solución de tampón de ensayo que tenía HEPES 100 mM a pH 8,0, ATP 10 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 5 mM, PMSF 0,5 mM. Se preparó una solución de reserva de fructosil-espermina, que tenía HCl de fructosil-espermina 2 mM. Se preparó una solución de control de espermina que tenía HCl de espermina 2 mM.

b. Síntesis de Fructosil-espermina:

La síntesis de fructosil-espermina se realizó mediante una adaptación de un procedimiento conocido (J. Hodge y B. Fisher, Methods Carbohydr. Chem., 2: 99-107 (1963)). Se preparó una mezcla de espermina (500 mg), glucosa (500 mg) y piro-sulfito sódico (80 mg) en una relación molar de 8:4:1 (espermina:glucosa:pirosulfito) en 50 ml de metanol-agua (1:1) y se calentó a reflujo durante 12 horas. El producto se diluyó hasta 200 ml con agua y se cargó en una columna DOW-50 (5 x 90 cm). La glucosa sin reaccionar se eliminó mediante 2 volúmenes de columna de agua y el producto y la espermina sin reaccionar se eliminaron con NH₄OH 0,1 M. Las fracciones máximas combinadas del producto se liofilizaron y la concentración de fructosil-espermina se determina midiendo la integral del pico de C-2 fructosilo en un espectro de RMN ¹³C cuantitativo del producto (los datos de RMN se recogen con un pulso de 45°,

un retraso de relajación de 10 segundos y sin desacoplamiento de NOE).

c. Ensayo de Quinasa para Purificación:

5 Una mezcla de incubación se preparó incluyendo 10 μl de la preparación enzimática, 10 μl de tampón de ensayo, 1,0 μCi de ^{33}P ATP, 10 μl de solución de reserva de fructosil-espermina y 70 μl de agua y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Al final de la incubación, se hace una aplicación puntual de 90 μl (2 x 45 μl) de la muestra en dos discos de fosfato de celulosa de 2,5 cm de diámetro (Whatman P-81) y se permite que se sequen. Los discos se lavaron minuciosamente con agua. Después del secado, los discos se colocaron en viales de centelleo y se hizo el recuento.

10 Cada reacción enzimática se sometió a ensayo por duplicado con un control de espermina apropiado.

EJEMPLO 10

PATOLOGÍA RENAL OBSERVADA EN ANIMALES DE ENSAYO CON DIETA DE PROTEÍNA GLICOSILADA

15 Tres ratas se mantuvieron con una dieta de proteína glicosilada (20 % de proteína total; glicosilada al 3 %) durante 8 meses y se compararon con 9 ratas de la misma edad mantenidas con una dieta de control. El hallazgo principal fue un aumento sustancial de los glomérulos dañados en los animales con la dieta glicosilada. Las lesiones habituales observadas en estos animales eran esclerosis segmentaria del penacho glomerular con adhesión a la cápsula de Bowman, metaplasia tubular del epitelio parietal y fibrosis intersticial. Los tres animales con la dieta de proteína glicosilada, y solamente uno de los animales con la dieta de control mostraron más de un 13 % de glomérulos dañados. La probabilidad de que esto se produzca por casualidad es inferior a un 2 %. Además de la patología observada en los glomérulos, se observó una serie de modelos hilinados dentro de los túbulos. Se encontraron más de los mismos en los animales con la dieta glicosilada, aún que éstos no se cuantificaron. También se observó
20 aumento de los niveles de NAGasa en los animales con la dieta glicosilada.
25

A partir de los resultados de este experimento, parece que la dieta glicosilada hace que los animales de ensayo desarrollen la serie de lesiones histológicas similares a las observadas en el riñón diabético.

30 **EJEMPLO 11**

EFFECTOS DE DIETAS GLICOSILADAS EN EL EMBARAZO

35 En un experimento preliminar, 5 parejas de ratones se colocaron con una dieta glicosilada (18 % de proteína total; glicosilada al 3 %) y se alimentaron seis veces durante un periodo de 7 meses. Los seis embarazos resultantes produjeron las siguientes crías vivas; 17, 23, 13, 0, 3 y 0. En vista de esta fuerte disminución de crías vivas después de la tercera cría, dos poblaciones bases de diez parejas cada una se colocaron con cualquiera de una dieta glicosilada (13 % de proteína total; glicosilada al 3 %) o una dieta de control (13 % de proteína total; glicosilada al 0 %). Hasta el momento, los dos grupos de crías se habían alimentado cuatro veces obteniendo resultados similares
40 en ambos grupos. El primer embarazo produjo 49/20 crías (glicosilada/control); el segundo, 18/41; el tercero 37/27; y el cuarto 20/33. El quinto embarazo está en curso en la actualidad. Las parejas de ratones se han sometido ensayo para la hiperglucemia. Los niveles de glucosa en sangre son 120 y 112 mg/dl en los grupos experimental y de control, respectivamente.

45 Las medidas preliminares de los niveles de 3DF en la orina de los ratones indica, tal como se esperaba, un aumento sustancial (aproximadamente 5-10 veces) del 3DF sistémico cuando se está con la dieta glicosilada que se describe en el presente documento.

EJEMPLO 12

50 **EFFECTOS CARCINOGENICOS DE LA RUTA DE LA FRUCTOSELISINA**

Para investigar el potencial carcinogénico de los metabolitos formados en la ruta de la fructoselisisina, se ha realizado experimentos en una cepa de ratas con una susceptibilidad elevada a los carcinomas de riñón. Se colocaron cuatro
55 ratas con una dieta de proteína glicosilada y tres ratas con una dieta de control. Después de diez semanas con la dieta, los animales se sacrificaron y sus riñones se examinaron. En los cuatro animales con la dieta, se encontraron carcinomas de riñón de tamaño superior a 1 mm, mientras que no se encontraron lesiones de este tamaño en los animales de control. La probabilidad de que esto se produzca por casualidad es inferior a un 2 %. Los datos muestran que los niveles elevados de 3DG causados por el exceso de fructoselisisina que viene de la ruta proteína glicosilada en la dieta de los animales encontrado en las células tubulares del riñón (conocidas por ser la célula de origen de la mayoría de los carcinomas de riñón) puede interactuar con el ADN celular conduciendo a diversos sucesos mutagénicos y en última instancia carcinogénicos. Existe la posibilidad de que este proceso sea importante en el desarrollo de cánceres humanos en el riñón y en cualquier parte.
60

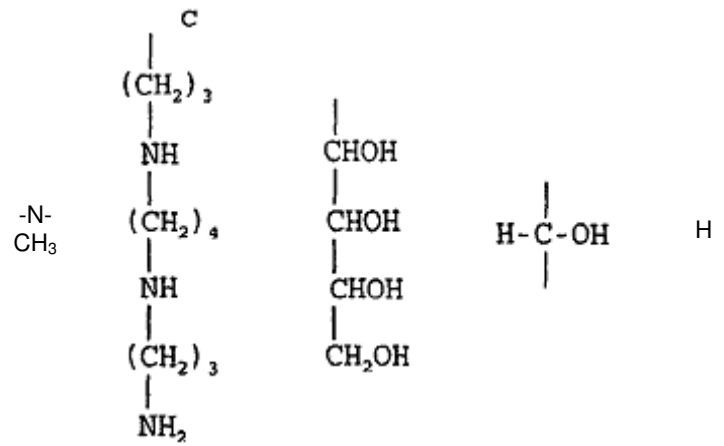
65 Aunque ciertas realizaciones de la presente invención se han descrito y/o usado a modo de ejemplo anteriormente, otras diversas realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la divulgación precedente.

Por lo tanto, la presente invención no se limita a las realizaciones en particular que se describen Ibarra o usan a modo de ejemplo, pero es capaz de variación y modificación de consideración sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

TABLA A					
Nombre del Compuesto	X	R	R ₁	Y	Z
3-O-metilfructosa lisina	-N-H	^a $\begin{array}{c} \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COO}- \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ \text{C=O} \\ \end{array}$	-O-CH ₃
galactitol lisina	do	do	do	$\begin{array}{c} \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \end{array}$	-OH
3-desoxi sorbitol lisina	do	do	do	do	-H
3-desoxi-3-fluoro-xilitol lisina	do	do	$\begin{array}{c} \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	do	-F
3-desoxi-3-ciano sorbitol lisina	do	do	$\begin{array}{c} \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	do	-C=N
3-carboxi xiulosa lisina	do	do	$\begin{array}{c} \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ \text{C=O} \\ \end{array}$	-COO-
ácido 3-sulfónico fructosa gaba	do	^b $\begin{array}{c} \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{COO}- \end{array}$	$\begin{array}{c} \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	do	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{S}-\text{O}- \\ \\ \text{O}- \end{array}$
1,3-didesoxi-3-fluoro-tagatosa morfolina	mor	folina	do	do	F

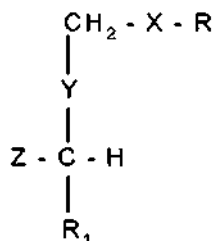
3-desoxi-sedoheptitol espermina



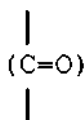
- a - resto de lisina
- b - resto de ácido γ-amino butírico
- c - resto de espermina

REIVINDICACIONES

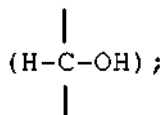
1. Un inhibidor de la conversión enzimática de fructosa-lisina en fructosa-lisina-3-fosfato para uso en la prevención o el tratamiento de una afección seleccionada entre complicaciones diabéticas, hipertensión, ictus, trastornos neurodegenerativos, enfermedad circulatoria, aterosclerosis, osteoartritis, los efectos debilitantes del envejecimiento, o cataratas; en donde dicha afección está causada por los efectos de la 3-desoxiglucosona (3DG) en un paciente, produciéndose dicha 3DG por la conversión enzimática de fructosa-lisina en fructosa-lisina-3-fosfato: en donde el inhibidor tiene la fórmula:



en la que X es -NR' u -O-, seleccionándose R' entre el grupo que consiste en H, y grupo alquilo (C₁-C₄) de cadena lineal o ramificada y un grupo arilo (C₆-C₁₀) o grupo aralquilo (C₇-C₁₀) sin sustituir o sustituidos; R es H o un resto de lisina; seleccionándose dichos sustituyentes de grupo arilo (C₆-C₁₀) o grupo aralquilo (C₇-C₁₀) entre el grupo que consiste en H, alquilo (C₁-C₆), halógeno, CF₃, CN, NO₂ y -O-alquilo (C₁-C₆); R₁ es un resto de poliol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono lineales, Y es cualquiera de un resto carbonilo



o un resto de hidroximetileno



Z se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -OH, -O- alquilo (C₁-C₆), -halógeno -CF₃, -CN, -COOH y -SO₃H₂, y los isómeros y sales farmacéuticamente aceptables de dicho compuesto.

2. Un inhibidor de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en la prevención o el tratamiento de complicaciones diabéticas.

3. Un inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el trastorno neurodegenerativo es demencia senil del tipo Alzheimer.

4. Un inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor es un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en meglumina, sorbitol-lisina, manitol-lisina y galactitol-lisina.

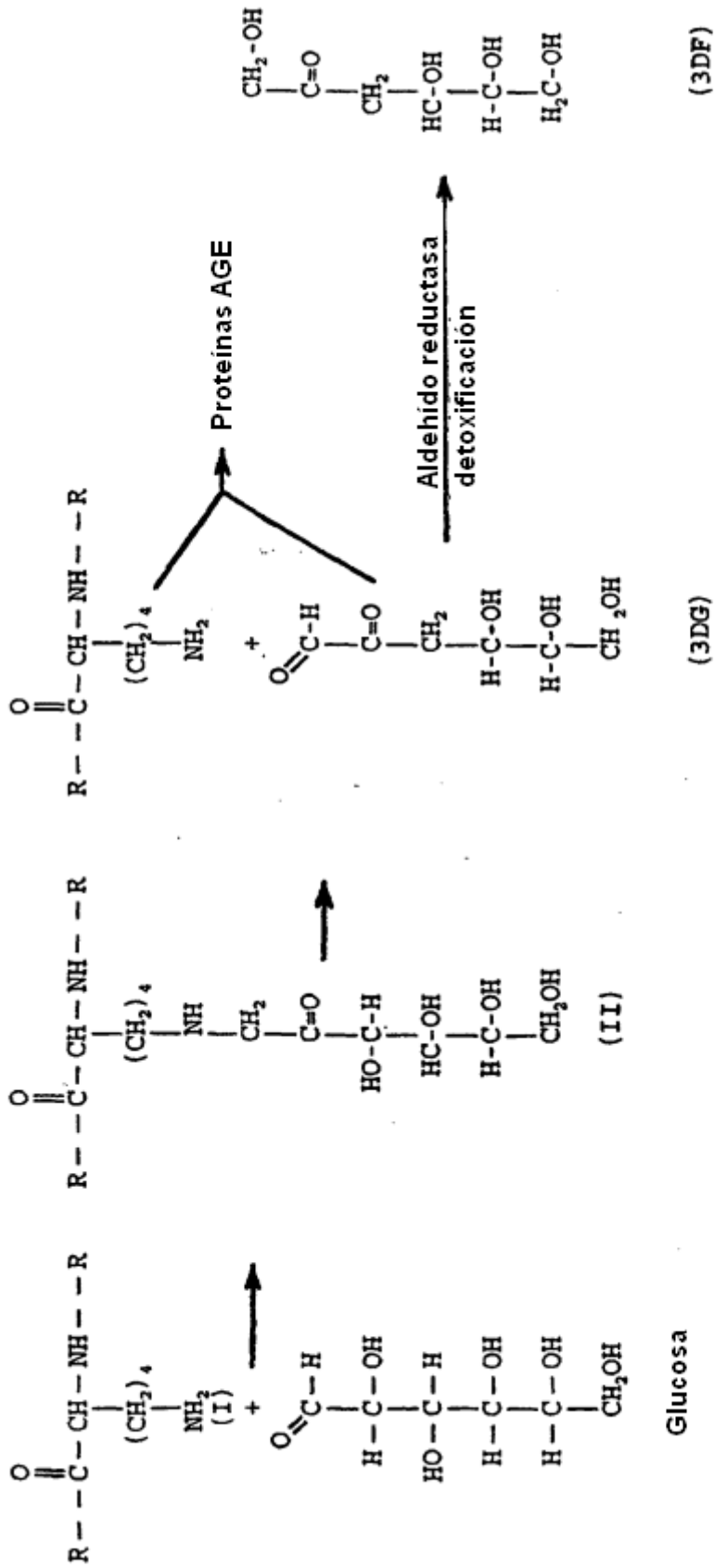


FIG. 1

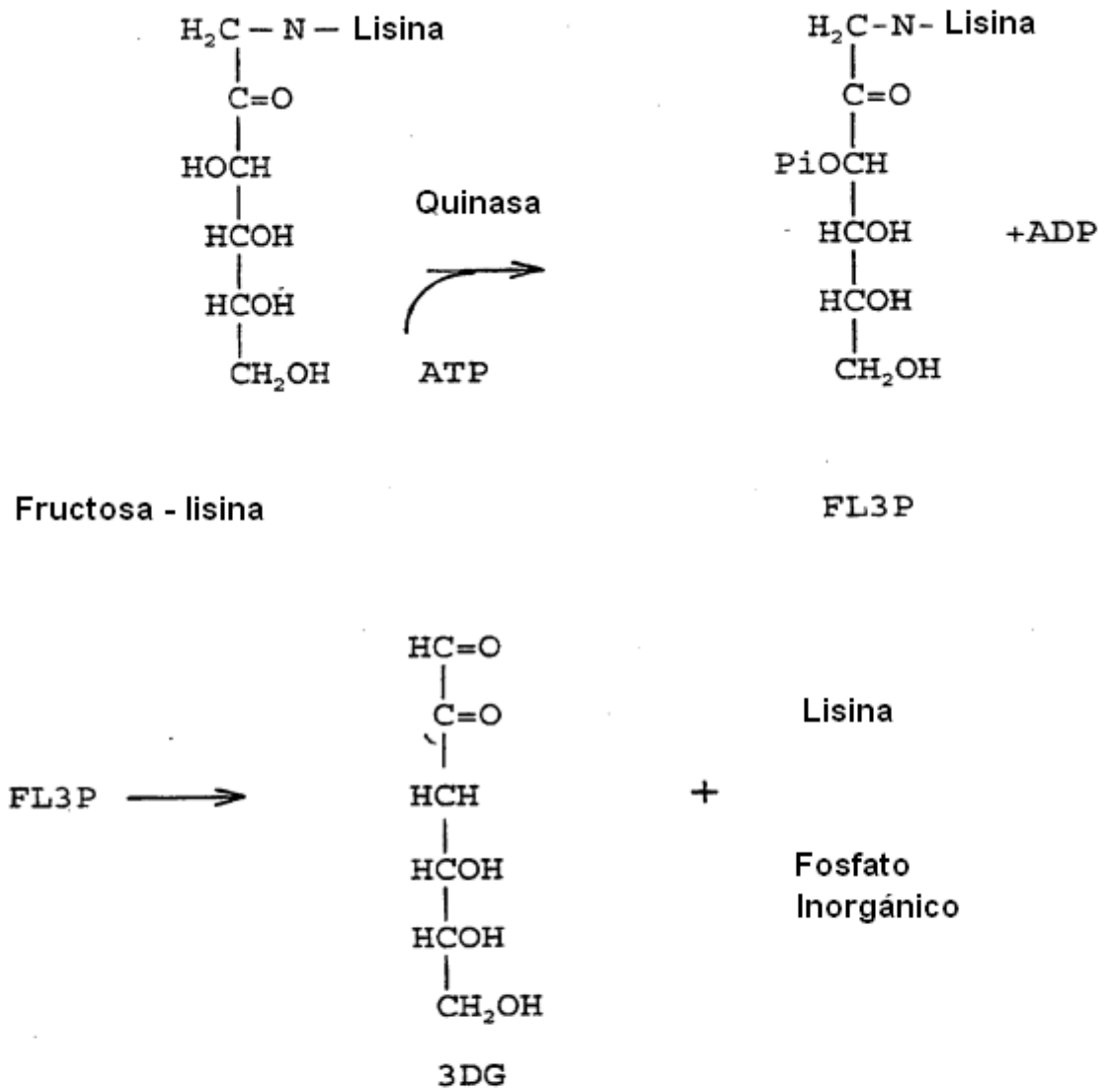


FIG. 2

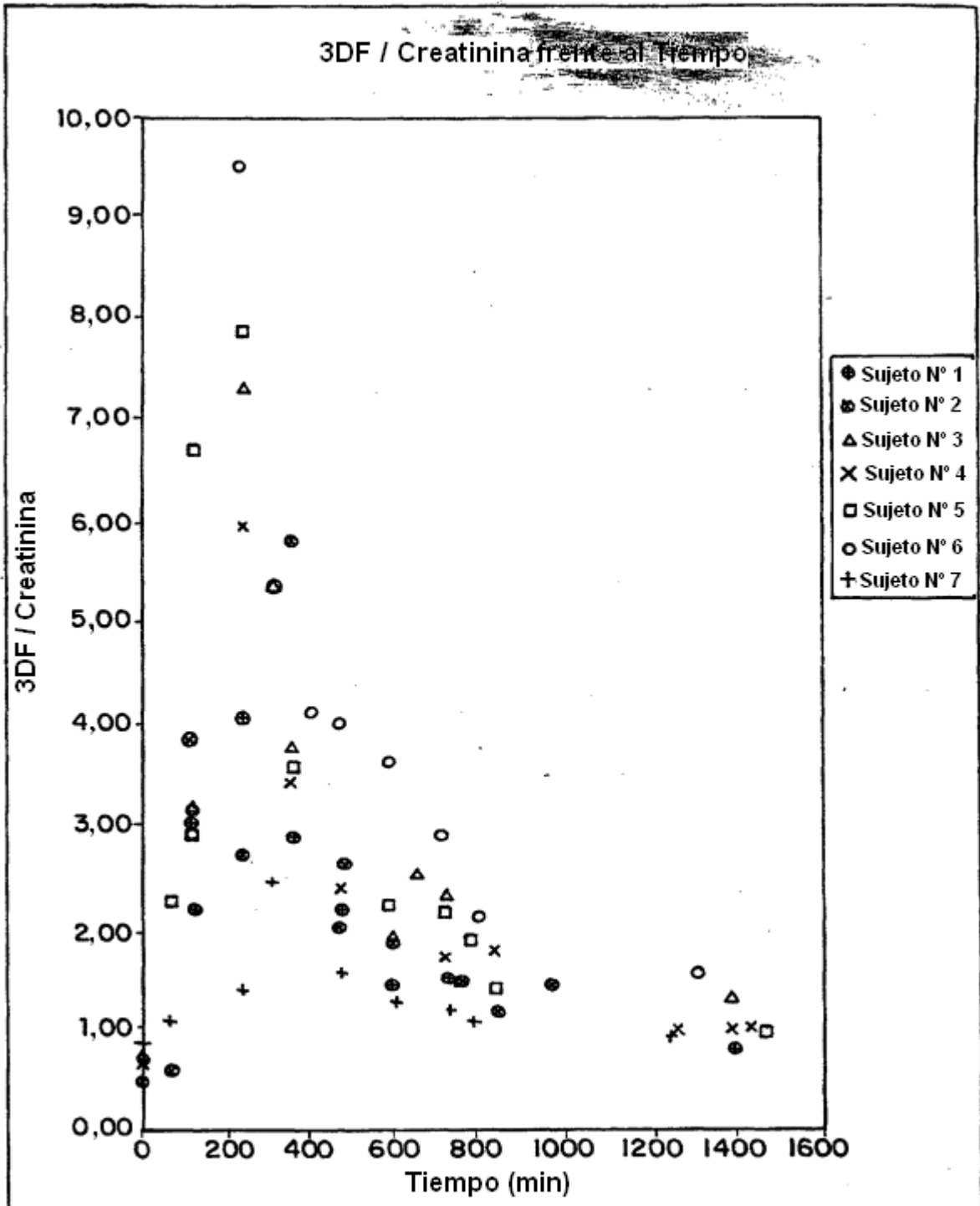


FIG. 4

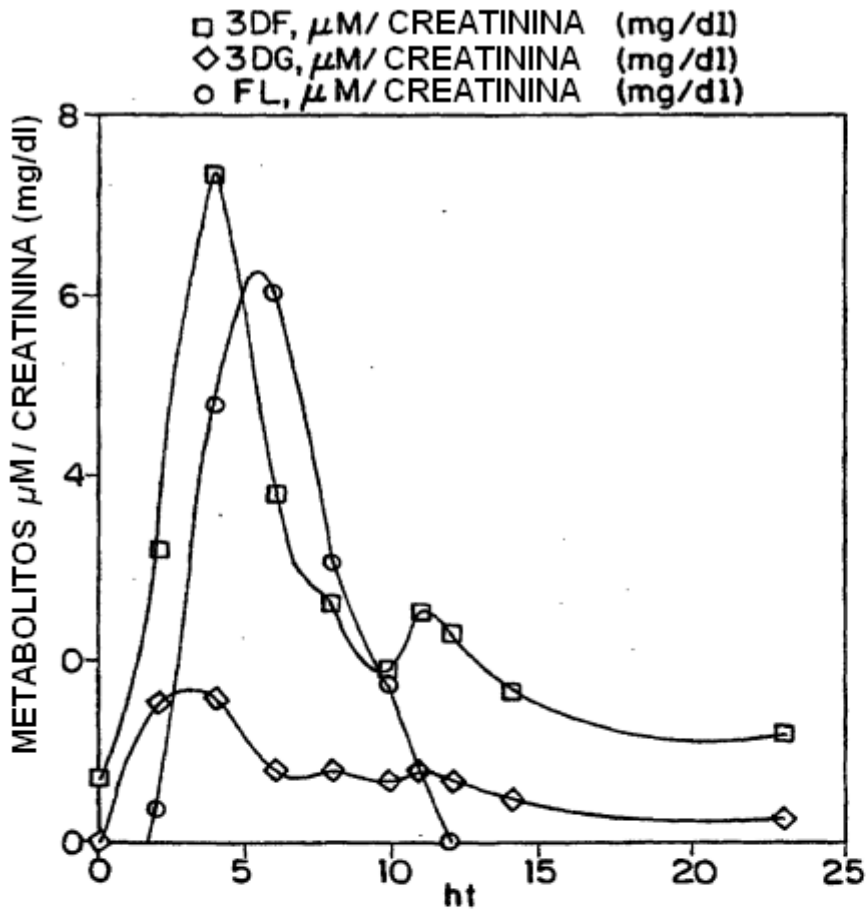


FIG. 3

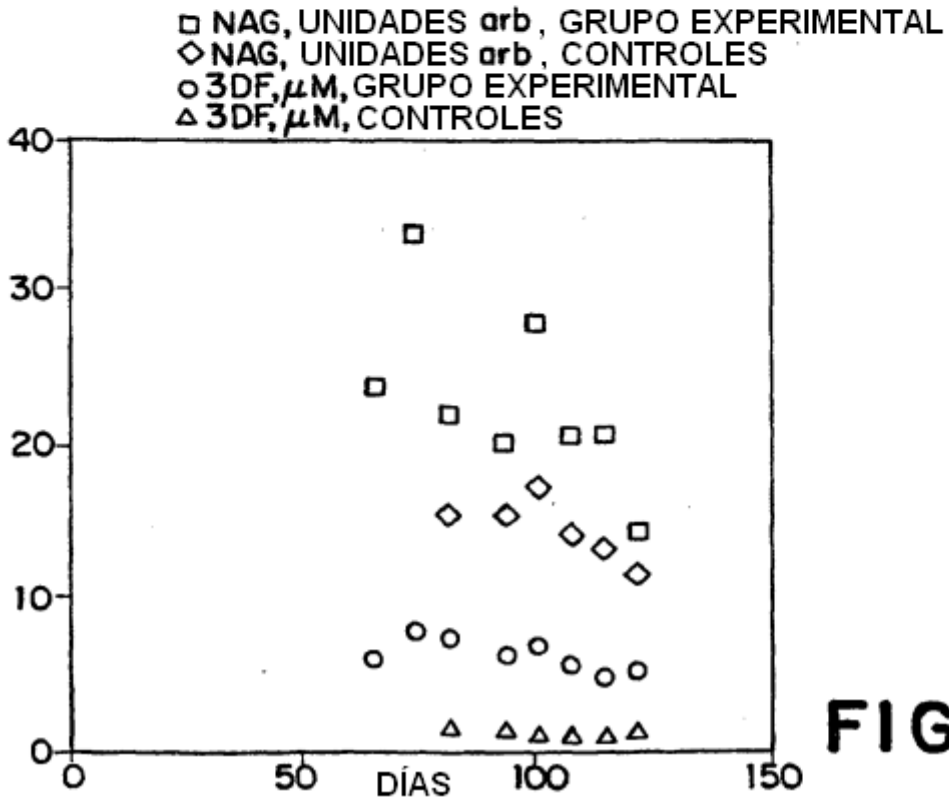


FIG. 5

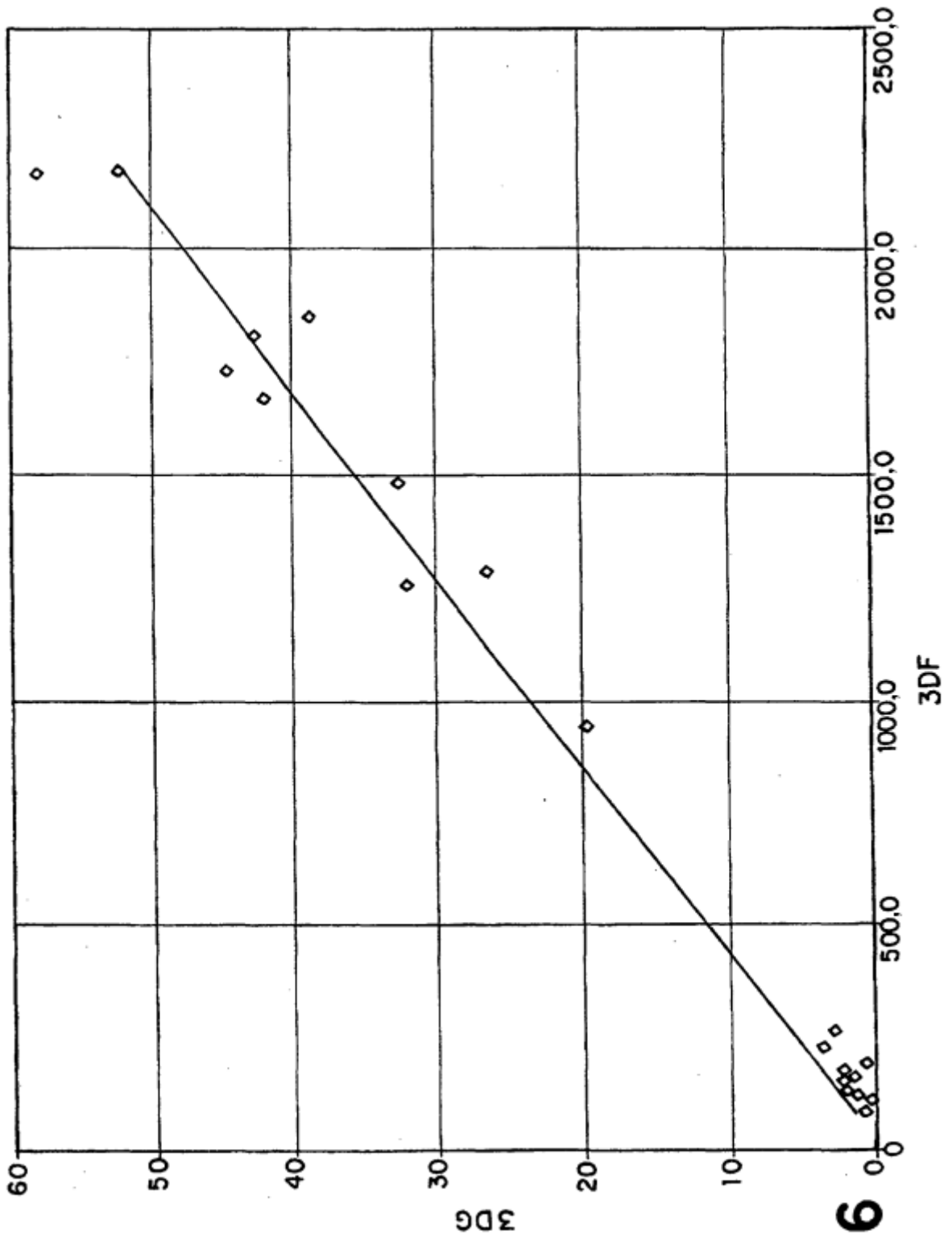


FIG. 6

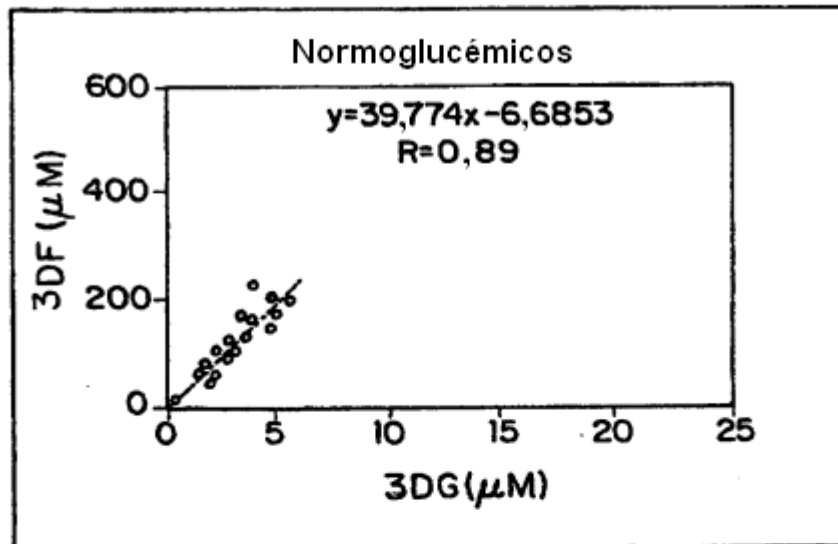


FIG. 7A

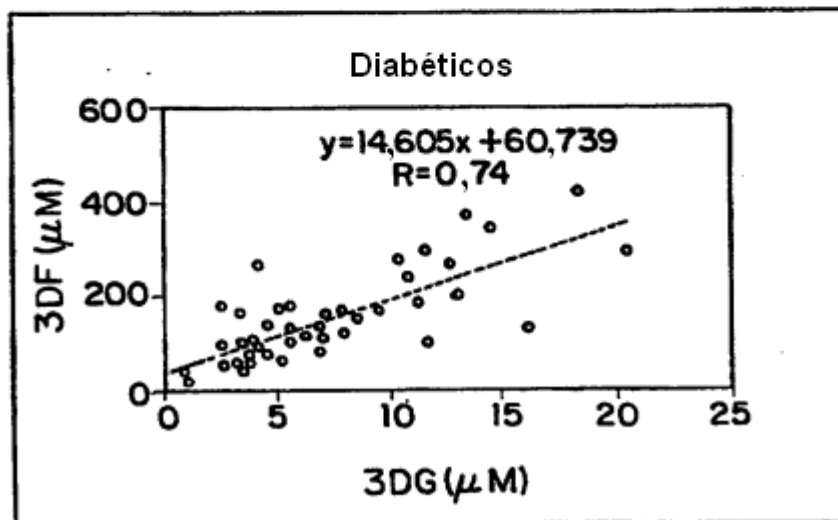


FIG. 7B