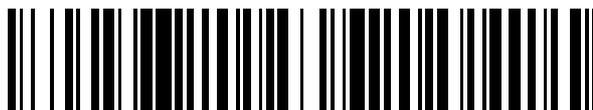


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 732**

51 Int. Cl.:

A61K 31/155 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2009 E 09741802 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2271327**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende rimeporide para tratar enfermedades asociadas con la disfunción de células beta.**

30 Prioridad:

09.05.2008 EP 08008763

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

10.08.2015

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**BEIER, NORBERT;
SCHOLZ, WOLFGANG;
BETZ, ULRICH y
BRAENDLE, MARIAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 542 732 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

Composición farmacéutica que comprende rimeporide para tratar enfermedades asociadas con la disfunción de células beta.

5 La presente invención hace referencia a una composición que comprende, como ingrediente activo, una cantidad efectiva de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para la profilaxis y terapia de la diabetes melitus de tipo II, nefropatía y/o neuropatía diabética. Otro objeto de la invención hace referencia al uso de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento profiláctico de enfermedades que están asociadas con la disfunción de las células β .

10 Las enfermedades metabólicas tales como obesidad, resistencia a la insulina (RI) y dislipidemia están emergiendo como causas dominantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Especialmente en las últimas décadas, la RI se ha convertido en una condición sumamente frecuente en la población, con enormes consecuencias para el sistema de salud pública. La RI se define como la respuesta reducida y no adecuada del cuerpo a las acciones habituales de la insulina. La RI es un factor de riesgo importante para el desarrollo de una enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus de tipo II (T2DM). Además, la RI está asociada con una variedad de factores de riesgo cardiovasculares (obesidad, dislipidemia, hipertensión y alteraciones de la coagulación sanguínea) que cuando se muestran de forma conjunta se denominan Síndrome Metabólico o Síndrome X. Existe en la actualidad evidencia considerable de que la RI puede ser el factor causal unificador que constituye la base del Síndrome Metabólico (Turner & Hellerstein (2005) Curr Opin Drug Discovery & Develop 8(1): 115-126).

20 Las intervenciones terapéuticas actuales que tienen como objetivo mejorar de forma directa la sensibilidad la insulina de los tejidos, utilizan tiazolidinedionas (TZDs). Sin embargo, mientras que se ha mostrado que las TZDs mejoran la sensibilidad a la insulina de todo el organismo, recientemente se ha conocido que aumentan el riesgo de insuficiencia cardíaca y de complicaciones cardiovasculares. Por lo tanto, son necesarias alternativas para el tratamiento de la RI en la lucha contra la creciente epidemia de enfermedades de desequilibrio metabólico, teniendo como una de sus características la RI.

Además de la RI, la disfunción pancreática de las células β juega un papel central en la progresión del estado pre-diabético al diabético. El reciente desarrollo de agentes, tales como exendina-4 (Xu et al. Diabetes (1999) 48(12): 2270-2276; DeFronzo et al. (2005) Diabetes Care 28(5): 1092-1100) o un análogo de sitagliptina (Mu et al. (2006) Diabetes 55(6): 1695-1704), que puede estimular la regeneración de las células β y aumentar la masa de las células β , ha concentrado un mayor interés en la masa de las células β como una diana terapéutica en la T2DM.

30 Por lo tanto, el problema técnico que forma la base de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que permita una aplicación efectiva en la prevención o terapia de enfermedades que están asociadas con la disfunción de las células β , especialmente composiciones del tipo que mejoren la eficacia y minimicen los efectos adversos.

35 La presente invención resuelve este problema proporcionando una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo una cantidad efectiva de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades que están asociadas con la disfunción de las células β .

40 Sorprendentemente, se ha demostrado por parte de los inventores que la 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina y dichas sales y/o solvatos, pueden aplicarse como ingredientes activos en una composición farmacéutica para hacer frente a indicaciones médicas tales como la T2DM y enfermedades que están asociadas a la misma.

45 Antes de la presentación de esta solicitud, se conoce únicamente de la memoria EP 0 758 644 B1 que las sulfonilbenzoil-guanidinas son inhibidores del antiportador de Na^+/H^+ celular, es decir, inhiben el mecanismo de intercambio de Na^+/H^+ de las células, siendo por tanto buenos agentes antiarrítmicos, que son adecuados, en particular, para el tratamiento de la arritmia que tiene lugar como consecuencia del empobrecimiento de oxígeno. Las sustancias muestran una buena acción cardioprotectora y son por tanto adecuadas para el tratamiento del infarto de miocardio agudo, tratamiento profiláctico del infarto, tratamiento post-infarto, insuficiencia cardíaca crónica y para el tratamiento de la angina de pecho. Además, hacen frente a todo el daño patológico hipóxico e isquémico, permitiendo de ese modo que las enfermedades causadas en una primera o segunda instancia sean tratadas.

50 Debido a la acción protectora de estas sustancias en situaciones patológicas hipóxicas o isquémicas, surgen aplicaciones adicionales en intervenciones quirúrgicas para la protección de órganos con suministro de oxígeno reducido temporal, en trasplantes de órganos para la protección de los órganos retirados, en intervenciones angioplásticas vasculares o cardíacas, en isquemia del sistema nervioso, en la terapia de estados de shock y para la prevención de hipertensión esencial. Además, los compuestos son adecuados para el uso diagnóstico para el reconocimiento de enfermedades acompañadas de actividad aumentada del antiportador Na^+/H^+ , por ejemplo en

eritrocitos, trombocitos o leucocitos. El arte previo ha sugerido adicionalmente emplear estas sustancias como agentes terapéuticos en enfermedades causadas por la proliferación celular, tales como arteriosclerosis, diabetes y complicaciones tardías de la diabetes, enfermedades tumorales, enfermedades fibróticas, en particular de los pulmones, hígado y riñones, e hipertrofia e hiperplasia de órganos.

5 Pero ahora la presente invención revela un aumento de la RI en todo el organismo, mientras que, simultáneamente, la compensación de células β se conserva. Estos fenómenos se estimulan por el impacto del compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoilguanidina, que forma la base del medicamento de la invención para dichos cuadros clínicos especificados como T2DM y el síndrome metabólico.

10 El compuesto mencionado anteriormente muestra propiedades farmacológicas valiosas, junto con una buena tolerabilidad. El aumento de peso, los niveles de glucosa en sangre en ayunas o en eventos aleatorios no cambian en ninguna dosis sometida a prueba en ensayos clínicos. En contraste, la insulina en ayunas se reduce en comparación con el tratamiento previo con 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina. El valor del área bajo la curva (AUC) de la insulina se reduce también después de una carga de glucosa oral, mientras que la respuesta de la AUC a la carga de glucosa permanece de forma similar al tratamiento previo y posterior. Es un descubrimiento
15 inesperado, sin embargo, que los niveles inferiores de insulina no aparecen en un descenso relacionado con la edad, en la función de las células β , ya que el compuesto de la invención mantiene o incluso aumenta la respuesta de las células β . Por consiguiente, la 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina aumenta de forma significativa la sensibilidad a la insulina periférica.

20 Dichas actividades biológicas del compuesto de la invención pueden determinarse mediante técnicas conocidas por el experto en el arte. Animales adecuados para los experimentos son, por ejemplo, ratones, ratas, conejillos de indias, perros, gatos, simios o cerdos. El estándar de oro para el análisis in-vivo de la RI es la técnica del clamp euglucémico-hiperinsulinémico. Otras herramientas son el análisis de la glucosa en plasma en estado estacionario (SSPG, por sus siglas en inglés) o la prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa de muestreo frecuente. Entre las técnicas disponibles para medir la proliferación de células β pancreáticas se incluyen las aproximaciones [^3H]timidina (^3HdT) o 5-bromodesoxiuridina (BrdU). Las técnicas que son adecuadas para determinar los cambios en la
25 sensibilidad a la insulina y en la dinámica de las células β han de ser sensibles, reproducibles, operativamente simples y relativamente de alto rendimiento.

30 Tal como se ha establecido anteriormente, la resistencia a la insulina es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la diabetes mellitus de tipo 2 y de enfermedad cardiovascular. La patogénesis de la diabetes de tipo 2 implica no solamente resistencia a la insulina, sino también insuficiencia pancreática progresiva. Se ha desarrollado una prueba cuantitativa fiable y que se realiza de forma sencilla. Mediante esta prueba de utilización de glucosa deuterada ($^2\text{H-GDT}$) pueden cuantificarse ambos aspectos de la diabetes de tipo 2.

35 La utilización glucolítica de una carga de glucosa por parte de los tejidos periféricos, tales como el músculo esquelético, depende de una cantidad de etapas dependientes de la insulina, incluyendo el transporte, la fosforilación y el paso a través de enzimas de la vía glucolítica. Además, la efectividad de la glucosa, es decir acciones de glucosa per se tanto para inhibir la producción de la glucosa hepática como para acelerar su captación en los tejidos, también contribuye a la utilización de una carga oral de glucosa. La $^2\text{H-GDT}$ mide la tasa de captación, fosforilación y metabolismo glucolítico de la glucosa y, por tanto, puede ser utilizada para cuantificar tanto la resistencia a la insulina (RI) como si la compensación de las células β pancreáticas es adecuada. La $^2\text{H-GDT}$
40 consiste en una prueba de provocación con glucosa deuterada por vía oral, seguido de la medición de la producción de agua pesada ($^2\text{H}_2\text{O}$) y de las concentraciones plasmáticas. Debido a que los átomos de H se liberan en el agua del tejido durante el metabolismo glucolítico, la medición de la producción de $^2\text{H}_2\text{O}$ representa la tasa de la utilización glucolítica de la glucosa de todo el organismo. La producción de $^2\text{H}_2\text{O}$ corregida para las concentraciones ambientales de insulina (es decir, el metabolismo glucolítico por unidad de insulina), revela sensibilidad a la insulina de los tejidos. La compensación pancreática cuando se corrige para la excursión glucémica (para explicar la efectividad de la contribución de glucosa), revela el grado en el que el metabolismo glucolítico (producción de $^2\text{H}_2\text{O}$ absoluta) se corresponde con la sensibilidad a la insulina. En los estados resistentes a la insulina, la compensación pancreática no se efectúa y la tolerancia a la glucosa se encuentra afectada.

45 En detalle, la prueba de utilización de glucosa deuterada ($^2\text{H-DGT}$), recientemente desarrollada, que implica la evaluación mediante espectrometría de masas de isótopos estables de la glucólisis de todo el organismo, permite la evaluación de la RI mediante la medición de la producción de $^2\text{H}_2\text{O}$ por unidad de insulina plasmática*glucosa, que se basa en la tasa de liberación de deuterio (^2H) a partir de una carga (oral) del animal o individuo con [6,6'- $^2\text{H}_2$]glucosa y en las concentraciones de insulina plasmática (Turner & Hellerstein (2005) Curr Opin Drug Discovery & Develop 8(1): 115-126). Además, el grado de compensación de células β pancreáticas ante la RI puede ser valorado
50 mediante la medición de la producción de $^2\text{H}_2\text{O}$ absoluta alcanzada después de la carga de [6,6'- $^2\text{H}_2$]glucosa. Puede valorarse si compensación pancreática es adecuada distinguiendo entre la utilización glucolítica por unidad de la insulina en el entorno del organismo (que refleja la sensibilidad a la insulina) y la tasa absoluta de la utilización de glucosa alcanzada (que refleja la compensación pancreática ante la RI).

La ²H-GDT está diseñada para cumplir con los siguientes principios: i) las concentraciones de insulina y glucosa en el entorno del organismo deberían reflejar las condiciones metabólicas fisiológicamente relevantes, ii) la prueba debería medir la utilización de glucosa mediada por insulina por parte de los tejidos y revelar RI en modelos establecidos, y iii) el método debería reflejar condiciones metabólicas comparables con otras pruebas que han demostrado ser predictivas para diagnósticos cardiovasculares y riesgo de T2DM. Las concentraciones de insulina en suero en el “rango dinámico” entre las condiciones de utilización de glucosa basal y máxima completan estos criterios (Beysen et al. (2007) Diab Care 30:1143-1149). Además, la ²H-GDT, que mide la glucólisis de todo el organismo en animales o humanos de manera cuantitativa, está fuertemente correlacionada con la técnica del clamp euglicémico-hiperinsulinémico o la prueba SSPG. La utilización de dicho ensayo cinético se prefiere, consecuentemente, en el alcance de la invención para determinar el efecto in-vivo de un agente sobre la sensibilidad a la insulina, además de las respuestas compensatorias de la insulina, en particular a un rendimiento relativamente alto, y en muchos modelos animales preclínicos utilizados comúnmente. Además, la ²H-GDT es completamente trasladable a un escenario clínico con un grado similar de simplicidad y rendimiento.

El ingrediente activo de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención es una cantidad efectiva del compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonyl)-benzoil-guanidina, o los solvatos farmacéuticamente utilizables y/o sales fisiológicamente aceptables.

Una “composición farmacéutica” dentro del significado de la invención es cualquier agente en el área de la medicina que comprende una o más sustancias o preparaciones de la misma, y que puede ser utilizada en la profilaxis, terapia, seguimiento o cuidado posterior de pacientes que sufren de enfermedades que están asociadas con la resistencia a la insulina y/o la disfunción de células β, de tal manera que podría establecerse, al menos temporalmente, una modificación patogénica de su condición global o de la condición de regiones del organismo en particular.

El término “disfunción de células β” hace referencia a cualquier mal funcionamiento en la proliferación de células β y/o en su metabolismo celular, lo que da como resultado una viabilidad y/o actividad metabólica reducida con la consecuencia de una compensación de células β y niveles de insulina reducidos. Una pérdida de este tipo del funcionamiento de las células β puede, por ejemplo, estar causada por el deterioro relacionado con la edad o bien desarrollarse durante el estado de progresión hacia la diabetes de tipo II, pero no deberá excluirse cualquier otra causa. Dentro del alcance de la invención, se prefiere una clara conexión de la disfunción de células β y la resistencia a la insulina, de manera que la composición farmacéutica de la invención establece como diana enfermedades asociadas tanto con la disfunción de células β y la resistencia a la insulina, en particular.

Los términos “cantidad efectiva” o “dosis efectiva” o “dosis” se utilizan en la presente patente de forma intercambiable y designan una cantidad del compuesto farmacéutico que tiene un efecto profiláctico o terapéuticamente relevante sobre una enfermedad o condición patológica. Un efecto profiláctico previene la aparición de una enfermedad. Un efecto terapéuticamente relevante alivia en cierta medida uno o más síntomas de una enfermedad, o devuelve a la normalidad, ya sea parcial o completamente, uno o más parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causa de la enfermedad o las condiciones patológicas. El rango de dosis o dosificación respectivo para la administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, es suficientemente alta para lograr el deseado efecto profiláctico o terapéutico de reducción de los síntomas de las enfermedades mencionadas anteriormente, particularmente la T2DM y dichas otras enfermedades que pueden aparecer a continuación. Deberá entenderse que el nivel de dosis, frecuencia y periodo de administración específicos a cualquier humano en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, estado general de salud, género, dieta, tiempo y vía de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular a la que la terapia específica se aplica. Utilizando medios y métodos bien conocidos, la dosis exacta puede ser determinada por un experto en el arte como parte de la experimentación rutinaria.

El compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonyl)-benzoil-guanidina, que se utiliza de manera acorde a la invención, y los materiales de partida para su preparación, respectivamente, se producen mediante métodos conocidos per se, según se describe en la literatura (por ejemplo en trabajos estándar, tales como Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie [Método de Química Orgánica], Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart), es decir, bajo condiciones de reacción que son conocidas y adecuadas para dichas reacciones. Se puede hacer uso también de variantes que son conocidas per se, pero que no se mencionan en mayor detalle en la presente patente. Si se desea, los materiales de partida pueden también formarse in-situ dejándolos en un estado no aislado en la mezcla de reacción cruda, pero convirtiéndolos inmediatamente en el compuesto de acuerdo a la invención. Por otro lado, es posible realizar la reacción paso a paso.

Por ejemplo, un proceso para la preparación de derivados de alquilbenzoilguanidina se describe en la EP 0 758 644 B1. Además, la EP 1 282 598 B1 describe un método para la producción de sales de sulfonilbenzoilguanidino, en donde la preparación es particularmente preferida con respecto al compuesto clorhidrato de N-(4,5-bis-metanosulfonyl-2-metilbenzoil)guanidina. Otro proceso para la preparación del hidrato de clorhidrato y clorhidrato de N-(4,5-bis-metanosulfonyl-2-metilbenzoil)guanidina se revela en la patente DE 199 51 418 A1.

Los "solvatos" se consideran como enlaces de moléculas de disolventes inertes al compuesto, las cuales se forman mediante respectivas fuerzas de atracción mutuas. Preferiblemente, los solvatos son mono hidratos, deshidratados o alcoholatos.

5 Proporcionar una forma salina puede realizarse convirtiendo un ácido del compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina en la sal de adición ácida utilizando una base, por ejemplo mediante cantidades equivalentes del ácido y la base en un disolvente inerte, tal como etanol, seguido de una concentración por evaporación. Bases adecuadas en particular para esta reacción son aquellas que proporcionan sales fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, un ácido del compuesto anteriormente mencionado puede ser convertido en la correspondiente sal de metal, particularmente una sal de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, o en la correspondiente sal de amonio, utilizando una base, por ejemplo hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato sódico o carbonato potásico. Son también adecuadas para esta reacción, en particular, bases orgánicas que proporcionan sales fisiológicamente aceptables, tales como etanolamina.

15 Por otro lado, una base del compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina puede ser convertida en la sal de adición ácida asociada, por ejemplo mediante reacción de cantidades equivalentes de la base y del ácido en un disolvente inerte, tal como etanol, seguido de evaporación. Ácidos adecuados para esta reacción son, en particular, aquellos que proporcionan ácidos fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, es posible utilizar ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácidos hidrácidos, tales como ácido clorhídrico o ácido bromhídrico, tal como ácido ortofosfórico, o ácido sulfámico, además de ácidos orgánicos, en particular ácidos alifático, alicíclico, aralifático, aromático o heterocíclico monobásico o carboxílico polibásico, sulfónico o sulfúrico, por ejemplo ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido nicotínico, ácido isonicotínico, ácido metano- o etanosulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácidos naftalenmono- y -disulfónico, y ácido laurilsulfúrico. Las sales con ácidos fisiológicamente no aceptables, por ejemplo picratos, pueden ser utilizadas para el aislamiento y/o la purificación del compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina.

25 Son derivados preferidos las sales de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina seleccionadas del grupo que consiste en clorhidrato, metanosulfonato, hemi-sulfato, hemi-fumarato y hemi-malato. En un modo de realización de mayor preferencia de la invención el clorhidrato de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina representa el ingrediente activo de la composición farmacéutica.

30 La composición farmacéutica puede además comprender mezclas del compuesto y al menos un único derivado, o mezclas de derivados, respectivamente, que comprenden solvatos y/o sales, por ejemplo. Es de mayor preferencia utilizar el hidrato de clorhidrato de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina.

El ingrediente activo de acuerdo con la invención puede además fusionarse o formar complejo con otra molécula que promueva su transporte al destino, la incorporación y/o la distribución dentro de las células diana.

35 Además, el ingrediente activo puede ser administrado solo o en combinación con otros tratamientos. Puede lograrse un efecto sinérgico utilizando más de un compuesto en la composición farmacéutica, es decir, el compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina se combina con al menos otro agente como ingrediente activo, tal como glitazona, exenatida, pramlintide o TZDs. Los compuestos pueden ser utilizados simultáneamente o bien secuencialmente.

40 La composición farmacéutica de la invención puede ser utilizada como medicamento en medicina humana y veterinaria. Se prefiere particularmente que las enfermedades, que están asociadas con la disfunción de células β , sean las representadas por T2DM, nefropatía y/o neuropatía.

45 En un modo de realización preferido de la invención, la enfermedad que es la base de la invención es la T2DM. La indicación médica "T2DM" es una enfermedad progresiva que implica el desarrollo de RI y otras anomalías metabólicas, mucho antes de que se muestre la intolerancia a la glucosa manifiesta y la hipoglucemia en ayunas.

50 La indicación médica "nefropatía" hace referencia a enfermedades del riñón y de la función del riñón que cursan principalmente de forma no inflamatoria. El subtipo de provocación en el alcance de la invención está reflejado por nefropatía diabética (nephropatia diabetica), que también se conoce como síndrome de Kimmelstiel-Wilson y glomerulonefritis intercapilar. Es una enfermedad progresiva del riñón causada por angiopatía de capilares en los glomérulos renales, y está caracterizada por síndrome nefrótico y glomeruloesclerosis nodular. Se debe a la diabetes mellitus de larga duración, y es una causa principal para la diálisis en muchos países occidentales.

La indicación médica "neuropatía" es habitualmente una abreviatura de neuropatía periférica. La neuropatía periférica se define como la función y estructura desequilibrada de las neuronas motoras, sensoriales y autónomas periféricas, que implican la totalidad de la neurona o bien niveles seleccionados. Las neuropatías a menudo surgen

de forma secundaria a partir de otras enfermedades, tales como la diabetes mellitus, o de sustancias neurotóxicas, tales como el abuso de alcohol.

5 La composición farmacéutica de la invención se produce de una forma conocida utilizando soportes sólidos o líquidos, diluyentes y/o aditivos y adyuvantes usuales para la ingeniería farmacéutica y con una dosificación apropiada. La cantidad de material de excipiente que se combina con el ingrediente activo para producir una única forma de dosificación varía dependiendo del individuo tratado y del modo de administración en particular. Excipientes adecuados incluyen sustancias orgánicas o inorgánicas que son adecuadas para las diferentes vías de administración, tales como la aplicación enteral (por ejemplo, oral), parenteral o tópica, y que no reaccionan con 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, o derivados de la misma. Ejemplos de excipientes adecuados son agua, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, alquilenglicoles, polietilenglicoles, triacetato de glicerol, gelatina, 10 carbohidratos, tales como lactosa o almidón, estearato de magnesio, talco, y vaselina.

15 En el significado de la invención, un "adyuvante" indica cada sustancia que permite, intensifica o modifica una respuesta específica contra el ingrediente activo de la invención si se administra simultáneamente, al mismo tiempo o secuencialmente. Adyuvantes conocidos para soluciones para inyección son, por ejemplo, composiciones de aluminio, tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, saponinas, tales como las QS21, muramil dipéptido o muramil tripéptido, proteínas tales como interferón gamma o TNF, M59, escualenos o polioles.

20 Los ingredientes activos de la presente composición se adaptan a formas que son adecuadas para su administración por vía oral, tales como comprimidos, comprimidos peliculares, comprimidos recubiertos, grageas, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, jarabes, jugos, gotas, soluciones, dispersiones, suspensiones o formas depot de los mismos; para su administración por vía transdérmica, tales como soluciones, suspensiones, cremas, ungüentos, polvos, geles, emulsiones o parches; para su administración por vía parenteral, tales como supositorios, suspensiones, emulsiones, implantes o soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas; para su administración por vía rectal, tales como en particular supositorios; para su aplicación tópica, tales como ungüentos, cremas, pastas, lociones, geles, pulverizadores, espumas, aerosoles, soluciones (por ejemplo, soluciones en 25 alcoholes, tales como etanol o isopropanol, acetonitrilo, dimetilacetamida, 1,2-propanodiol o mezclas de los mismos entre sí y/o con agua) o polvos; y para su administración mediante infusión intravenosa, inyección subcutánea o intramuscular, siendo ejemplos de estas tres últimas soluciones y suspensiones. Los ingredientes activos pueden además adaptarse para su administración por vía transmucosa, transuretral, vaginal o pulmonar, en las formulaciones apropiadas proporcionadas anteriormente.

30 En un modo de realización preferido de la presente invención, la composición farmacéutica es administrada por vía oral o parenteral, más preferiblemente por vía oral. En particular, el ingrediente activo se proporciona en una forma soluble en agua, tal como una sal farmacéuticamente aceptable, lo que se supone incluye sales de adición tanto ácidas como básicas. La composición puede también incluir uno o más de los siguientes: proteínas portadoras, tales como seroalbúmina, tampones, agentes estabilizantes, agentes colorantes, y similares. Los aditivos son bien 35 conocidos en el arte, y se utilizan en una variedad de formulaciones.

40 Además, la 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable de la misma, puede liofilizarse y los liofilizados resultantes utilizarse, por ejemplo, para producir preparaciones para inyección. Los principios básicos para obtener liofilizados son conocidos para el experto en el arte. Un método para la producción de liofilizados con una tasa de dilución mejorada, se describe a modo de ejemplo en la patente DE 199 03 275 A1.

45 Las preparaciones indicadas pueden ser esterilizadas y/o pueden comprender sustancias auxiliares, tales como lubricantes, conservantes, estabilizantes, sustancias de relleno, agentes quelantes, antioxidantes, disolventes, agentes aglutinantes, agentes de suspensión, agentes humectantes, emulsificantes, sales (para influir sobre la presión osmótica), sustancias tampón, colorantes, saborizantes y una o más sustancias activas adicionales, por ejemplo, una o más vitaminas.

50 La concentración del ingrediente profiláctica o terapéuticamente activo en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 a 100% en peso. Preferiblemente, el compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina y/o una sal o solvato farmacéuticamente aceptables del mismo se administran en dosis de aproximadamente 1 a 600 mg, más preferiblemente, entre 5 y 100 mg por unidad de dosis. En general, un rango de dosis de este tipo es apropiado para una incorporación diaria total. En otros términos, la dosis diaria se encuentra preferiblemente entre aproximadamente 0,02 y 200 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 20 y 100 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente entre aproximadamente 0,02 y 10 mg/kg de peso corporal. La dosis específica para cada paciente depende, sin embargo, de una amplia variedad de factores tal como ya se ha descrito en la presente especificación.

55 La invención también hace referencia al uso de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o a una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para la producción de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico y/o la monitorización de enfermedades que están asociadas con la disfunción de células β . La 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable de la misma, pueden

además utilizarse como sustancia intermedia para la preparación de ingredientes activos adicionales de medicamentos. El medicamento se prepara preferiblemente de forma no química, por ejemplo combinando el ingrediente activo con al menos un soporte o excipiente sólido, fluido y/o semi-fluido, y opcionalmente en conjunto con una única o más sustancias activas distintas en una forma de dosificación apropiada.

5 El fármaco puede ser utilizado para prevenir de forma anticipada el inicio de enfermedades asociadas con la disfunción de células β , o para tratar los síntomas continuos y que van surgiendo. Las enfermedades que conciernen a la invención son preferiblemente la T2DM y/o enfermedades relacionadas con la misma, siendo estas últimas más preferiblemente seleccionadas del grupo de nefropatía y neuropatía diabética. La descripción anterior de la presente especificación referente a la composición farmacéutica es válida y aplicable sin restricciones al uso de 2-Metil-4,5-di-
10 (metilsulfonil)-benzoil-guanidina y/o una sal y o solvato fisiológicamente aceptable para la producción de un medicamento para la profilaxis y terapia de dichas enfermedades.

Los productos médicos del uso inventivo mencionados anteriormente se utilizan particularmente para el tratamiento terapéutico. La monitorización se considera un tipo de tratamiento, siempre que los compuestos se administren en intervalos discretos, por ejemplo, a fin de reforzar la respuesta y erradicar por completo los agentes patógenos y/o
15 los síntomas de la enfermedad. Se puede aplicar el compuesto idéntico o bien diferentes compuestos. En el sentido de la invención, se recomienda el tratamiento profiláctico si el sujeto posee cualquier condición previa para la aparición de T2DM, tales como una predisposición familiar, un defecto genético o una enfermedad reciente.

Es también objeto de la presente invención el uso de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal y o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para el aumento de la sensibilidad a la insulina y/o la conservación o
20 aumento de la compensación de células β . En la presente patente, conservación hace referencia a un valor similar dentro de un rango estadístico normal que se genera mediante el método de medición y el hecho de que haya un organismo vivo implicado. Una desviación estándar de máximo 10% se considerará conservación, preferiblemente únicamente de un 3% máximo. Contrariamente a esto, la sensibilidad a la insulina excederá notablemente los valores iniciales. La sensibilidad a la insulina es al menos doblada, preferiblemente al menos triplicada, más preferiblemente al menos cuadruplicada, y de mayor preferencia al menos quintuplicada.

El uso de acuerdo con el párrafo previo de la especificación se lleva a cabo en modelos in vitro o in vivo. Sus células β o bien son susceptibles a su propio deterioro, es decir pierden funcionalidad de forma natural o sufren apoptosis, respectivamente, o ser expuestas a sustancias que promueven el envejecimiento celular, tales como sustancias pro-
30 apoptóticas. De igual manera, las células somáticas pueden ser en sí mismas resistentes a la insulina, es decir las cantidades normales de insulina son inadecuadas para producir una respuesta normal de la insulina, o pueden estar expuestas a fármacos que promueven la RI, tales como la cortisona, TNF-alfa, PAI-1 o resistina. Tanto los procesos de envejecimiento celular, que se previenen, como la respuesta a la insulina, que se sensibiliza, pueden ser monitorizados por técnicas descritas en el curso de la presente especificación. El uso in vitro se aplica preferiblemente a muestras de humanos que padecen de T2DM. El análisis de varios derivados específicos del
35 compuesto 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina realiza la selección del posible ingrediente activo que sea más adecuado para el tratamiento del sujeto humano. La tasa de dosificación in vivo del derivado seleccionado se ajusta previamente de manera ventajosa a la susceptibilidad al deterioro y/o a la gravedad de la RI de las respectivas células específicas con respecto a los datos in vitro. Por lo tanto, la eficacia terapéutica se ve notablemente aumentada. Más aún, la descripción previa de la presente especificación referente al uso de 2-Metil-
40 4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable para la producción de un medicamento para la monitorización y/o tratamiento profiláctico o terapéutico se considera válido y aplicable, sin restricciones al uso del compuesto para la prevención de la compensación reducida de células β y el aumento de la RI, si fuera oportuno.

Es otro objeto de la invención proporcionar un método para tratar la diabetes mellitus de Tipo II, nefropatía y/o
45 neuropatía, en donde una cantidad efectiva de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable de la misma, se administra a un mamífero con necesidad de un tratamiento de este tipo. Los mamíferos a ser tratados son en particular humanos. El tratamiento preferido es una administración por vía oral o parenteral. El tratamiento de los pacientes con T2DM o personas en riesgo de desarrollar la T2DM en base a una RI existente, mediante el 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina inhibidor de NHE1, mejora la sensibilidad a
50 la insulina de todo el organismo y mejora la RI en estos individuos. La anterior descripción de la invención y de sus realizaciones es válida y aplicable sin restricciones al método de tratamiento, si fuera oportuno.

En el alcance de la presente invención, la 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina se utiliza para la monitorización y/o el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades en humanos que están asociadas con la disfunción de células β por primera vez. La invención aborda el papel de la compensación de células β en respuesta a una resistencia a la insulina prolongada. Los efectos mencionados anteriormente están interrelacionados de tal
55 manera que la 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina actúa bien como un sensibilizador de insulina periférica (preservando en segundo lugar la función de las células β al reducir la carga secretora en el páncreas), o bien como un secretagogo de insulina directo (mejorando en segundo lugar la sensibilidad a la insulina al aumentar la insulinización de los tejidos), o ambos. Como resultado de proporcionar una composición farmacéutica de acuerdo

- 5 con la invención, la sensibilidad a la insulina es aumentada mientras que la disminución de la función de las células β (compensación) se previene, pero puede incluso ser revertida. Su uso es una nueva y prometedora aproximación para un amplio espectro de terapias que causan una reducción directa e inmediata de los síntomas. El impacto corresponde a un beneficio especial para combatir de forma eficaz la T2DM y las enfermedades que surgen de la T2DM. El compuesto y los derivados del mismo se caracterizan por una elevada especificidad y estabilidad, bajos costes de fabricación y un manejo conveniente. Estas características forman la base para una acción reproducible, en donde se incluye la carencia de reactividad cruzada y efectos adversos, y para una interacción fiable y segura con sus estructuras diana coincidentes.
- 10 Se ha de entender que esta invención no está limitada a los compuestos, composiciones farmacéuticas, usos y métodos en particular descritos en la presente patente, ya que tal objeto puede, por supuesto, variar. También se ha de entender que la terminología utilizada en la presente patente tiene el propósito de describir formas de realización en particular solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por medio de las reivindicaciones anexas. Tal como se utiliza en la presente patente, incluyendo en las reivindicaciones anexas, las formas singulares de palabras tales como "un", "una" y "el/la" incluyen sus correspondientes plurales, a menos que el contexto determine claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un ingrediente activo" incluye un único o varios ingredientes activos diferentes, y la referencia a "un método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por el experto en el arte, y así sucesivamente. A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente patente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un especialista en el arte al que pertenece la presente invención.
- 15 Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente patente se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen ejemplos apropiados. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración. Dentro de los ejemplos, se utilizan reactivos y tampones estándar que están libres de actividades contaminantes (cuando sea práctico).
- 20 La Figura 1 muestra el peso corporal de ratas Zucker obesas o ZF (del inglés Zucker fatty) (fa/fa), con 8-12 semanas de edad durante el tratamiento (Media de +/- DE, n=12).
- 25 La Figura 2 muestra el nivel de glucosa de la mañana aleatorio de ratas ZF (fa/fa) de 8-12 semanas de edad durante el tratamiento (Media de +/- DE, n=12, *p<0,05). En la semana 4 los datos son lecturas de la glucosa en ayuno de 4 horas procedentes del grupo GDT.
- 30 La Figura 3 muestra el nivel de glucosa en sangre en ayunas en ratas ZF (fa/fa) con 12 semanas de edad a continuación de 4 semanas de tratamiento (Media de +/- DE, n=6).
- La Figura 4 muestra el nivel de insulina en ayunas en ratas ZF (fa/fa) con 12 semanas de edad a continuación de 4 semanas de tratamiento (Media de +/- DE, n=6, *p<0,01).
- 35 La Figura 5 muestra las respuestas de la insulina (AUC de insulina) ante una carga de glucosa por vía oral en ratas ZF (fa/fa) con 12 semanas de edad a continuación de 4 semanas de tratamiento (Media de +/-DE, n=6, GDT, *p<0,01 vs. pre-tratamiento).
- La Figura 6 muestra la respuesta de la glucosa (AUC de glucosa) ante una carga de glucosa por vía oral en ratas ZF (fa/fa) con 12 semanas de edad a continuación de 4 semanas de tratamiento (Media de +/-DE, n=6, GDT).
- 40 La Figura 7 muestra la compensación pancreática según se cuantifica mediante la prueba de utilización de glucosa deuterada (^2H -GDT; % de recuperación de D_2O en 90 minutos) en ZF ratas (fa/fa) con 12 semanas de edad a continuación de 4 semanas de tratamiento (Media de +/- DE, n=6, grupo GDT, *p<0,01).
- La Figura 8 muestra la sensibilidad a la insulina según se cuantifica mediante la prueba de utilización de glucosa deuterada (^2H -GDT; recuperación de % D_2O / AUC de insulina) en ratas ZF (fa/fa) con 12 semanas de edad a continuación de 4 semanas de tratamiento (Media de +/- DE, n=6, *p<0,01).
- 45 La Figura 9 muestra los pesos corporales de ratas Zucker fa/fa y ratas magras de control durante el periodo de tratamiento con fármacos. Los datos son la media de +/- la desviación estándar; n = 6/ grupo (las barras de error están oscurecidas por los símbolos); *p<0,01 de las ratas fa/fa de control.
- La Figura 10 muestra la glucosa en sangre aleatoria determinada una vez por semana a aproximadamente las 9 a.m. No hubo diferencias significativas entre los grupos. Los datos son la media de +/- la desviación estándar; n = 6/ grupo.
- 50 La Figura 11 muestra las concentraciones de glucosa en sangre en ayuno de 4 horas, según se determina mediante una lectura de glucómetro durante 4 semanas de tratamiento con fármacos. Los datos son de +/- la desviación

estándar; n = 6/ grupo; # diferente de magras de control (post-test de Bonferroni).

La Figura 12 muestra las concentraciones de insulina después en ayuno de 4 horas determinadas en intervalos de una semana. Los datos son la media de +/- la desviación estándar; n = 6/ grupo; * significativamente diferente de fa/fa con comida (vehículo) estándar de control.

5 La Figura 13 hace referencia al pre-tratamiento y muestra las concentraciones de insulina y glucosa en sangre en respuesta a una prueba de provocación de glucosa durante la GDT previamente al comienzo del tratamiento con fármacos. Los datos son la media de +/- la desviación estándar (las barras de error están oscurecidas por símbolos para algunos grupos); n = 6 para el compuesto A 80 mg/kg y control magro; n = 5 para fa/fa veh, Compuesto A 40 mg/kg, Compuesto B 40 mg/kg; n = 4 para Compuesto B 80 mg/kg; * diferente de fa/fa con vehículo de control; # significativamente diferente del vehículo magro. La Figura 13a muestra la concentración en puntos de tiempo sucesivos en respuesta a una prueba de provocación de glucosa. La Figura 13b muestra el área bajo la curva (AUC 60 min) para la respuesta de la glucosa representada en la Figura 13a. La Figura 13c muestra la concentración en puntos de tiempo sucesivos en respuesta a una prueba de provocación de glucosa. La Figura 13d muestra la AUC de 60 min para la respuesta de la insulina representada en la figura 13c. Para las Figuras 13b y 13d los diferentes grupos están representados por las barras de izquierda a derecha: Magro Veh, fa/fa-Veh, Cmp A 40 mpk, Cmp A 80 mpk, Cmp B 40 mpk, Cmp 80 mpk.

La Figura 14 hace referencia a 2 de tratamiento con fármacos y muestra las concentraciones de glucosa e insulina en respuesta a una prueba de provocación de glucosa durante la GDT 2 semanas después de empezar con el tratamiento con fármacos. Los datos son la media de +/- la desviación estándar (las barras de error están oscurecidas por símbolos en algunos grupos); n = 6 para fa/fa veh, Compuesto A 40 mg/kg, Compuesto A 80 mg/kg, Compuesto B 40 mg/kg y control magro; n = 4 para Compuesto B 80 mg/kg; * diferente de fa/fa con vehículo de comida equilibrada; # significativamente diferente del vehículo magro. La Figura 14a muestra la concentración de glucosa en puntos sucesivos en respuesta a una prueba de provocación de glucosa. La Figura 14b muestra el área bajo la curva (AUC 60 min) para la respuesta de la glucosa representada en la Figura 14a. La Figura 14c muestra la concentración de insulina en puntos de tiempo sucesivos en respuesta a una prueba de provocación de glucosa. La Figura 14d muestra la AUC de 60 min de la respuesta de la insulina representada en la Figura 14c. Para las Figuras 14b y 14d los diferentes grupos están representados por las barras de izquierda a derecha: magro Veh, fa/fa-Veh, Cmp A 40 mpk, Cmp A 80 mpk, Cmp B 40 mpk, Cmp 80 mpk.

La Figura 15 hace referencia a 4 semanas de tratamiento con fármacos y muestra la concentración en sangre de glucosa e insulina en respuesta a una prueba de provocación de glucosa durante la 3ª GDT que tuvo lugar 4 semanas después de comenzar con el tratamiento con fármacos. Los datos son la media de +/- la desviación estándar (las barras de error están oscurecidas por símbolos en algunos casos); n = 6 para fa/fa con comida equilibrada, Compuesto A 40 mg/kg, Compuesto B 40 mg/kg y control magro; n = 5 para Compuesto A 80 mg/kg, Compuesto B 80 mg/kg; * diferente de fa/fa con vehículo de comida equilibrada; # diferente del control magro. La Figura 15a muestra la concentración de glucosa en respuesta a una prueba de provocación de glucosa. La Figura 15b muestra el área bajo la curva (AUC 60 min) para la respuesta de la glucosa representada en la Figura 15a. La Figura 15c muestra la concentración de insulina en puntos de tiempo sucesivos en respuesta a una prueba de provocación de glucosa. La Figura 15d muestra el AUC de 60 min para la respuesta a la insulina representada en la Figura 15c. Para las Figuras 15b y 15d los diferentes grupos están representados por las barras de izquierda a derecha: Veh magro, fa/fa-Veh, Cmp A 40 mpk, Cmp A 80 mpk, Cmp B 40 mpk, Cmp 80 mpk.

La Figura 16 muestra la sensibilidad a la insulina (a, c, e) y la compensación pancreática (b, d, e) en respuesta a un pretratamiento con una prueba de provocación de glucosa (a, b), 2 semanas después de comenzar el tratamiento (c, d) y 4 semanas después del comienzo del tratamiento (e, f). * significativamente diferente a las fa/fa tratadas con el vehículo (comida equilibrada); # significativamente diferente del control magro (ANOVA seguido de test de Tukey). Para las Figuras 16a - 16f los diferentes grupos están representados por las barras de izquierda a derecha: Veh magro, fa/fa-Veh, Cmp A 40 mpk, Cmp A 80 mpk, Cmp B 40 mpk, Cmp 80 mpk.

Informe del estudio farmacológico I

Diseño del estudio

Se utilizaron como modelo de RI ratas ZF (fa/fa) obesas, resistentes a la insulina, que se tratan desde las 8-12 semanas de edad.

Las ratas se alojaron con un ciclo de 12-h de luz/oscuridad y acceso libre a comida y agua a menos que se indique de otro modo. Los estudios fueron aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se utilizó un total de 18 animales en el estudio (machos de 8 semanas de edad, proporcionados por Charles River). Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos (grupo del vehículo, grupo del Compuesto A, grupo del Compuesto B, n=6 por grupo), en base al nivel de glucosa aleatorio al principio del estudio:

Grupo 1: ratas ZF (fa/fa) (n = 6), compuesto A (150mg/kg a través de alimentación forzada)

Grupo 2: ratas ZF (fa/fa) (n = 6), compuesto B (40 mg/kg/día en forma de mezcla con la comida)

Grupo 3; ratas ZF (fa/fa) (n = 6), tratamiento con vehículo (comida de control, vehículo alimentación forzada)

5 Los animales del grupo 1 y 3 fueron tratados con el compuesto A o el vehículo (agua) durante 4 semanas (de 8-12 semanas) mediante alimentación forzada, dos veces al día. La comida que contiene el compuesto B se suministró al Grupo 2 ad lib. El Grupo 1 y el Grupo 3 fueron alimentados con comida equilibrada sin el compuesto B ad lib. El Compuesto A corresponde a Cariporide. El compuesto B corresponde a hidrato clorhidrato de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonyl)-benzoil-guanidina.

Toma de muestras de sangre y ensayos de glucosa e insulina plasmática

10 Se extrajo sangre por la mañana de forma aleatoria de ratas alimentadas ad libitum, mediante un pequeño corte en el extremo de la cola. La sangre se recogió en tubos con heparina. Las concentraciones de glucosa en sangre se midieron según el diseño del estudio utilizando un glucómetro One-Touch (Lifescan Inc. Milptias, CA). Las muestras de sangre se colocaron en hielo y se centrifugaron, y el plasma se almacenó a -20°C hasta que la insulina se sometió a ensayo. La concentración de insulina plasmática se midió con un kit ELISA específico para ratas (Crystal Chem Inc, Downers Grove, IL).

²H-GDT

15 Las ratas sufrieron un ayuno de 4 horas. Una hora antes de la prueba de provocación de ²H-GDT, las ratas recibieron 1,75 mg/g de peso corporal de H₂O¹⁸ (10 % ¹⁸O, Spectra, X XX) mediante alimentación forzada oral para permitir la determinación del agua corporal total, según se ha descrito previamente. En el t=0, las concentraciones de glucosa en sangre fueron determinadas con un glucómetro, y se obtuvo una muestra de sangre para la determinación de la insulina de referencia y la dilución de H₂O¹⁸. A continuación, los animales recibieron [6,6'-²H]glucosa (2 g/kg de peso corporal, 50 % en agua, Cambridge Isotope Laboratory, Inc., Andover, MA) por alimentación forzada oral. La carga de glucosa oral de 2 g/kg utilizada en el protocolo para las ratas logró niveles de glucosa dentro o cerca del rango dinámico deseado. Una segunda muestra de sangre recogida en el t=30 min para la determinación de las concentraciones de glucosa e insulina y el contenido de ²H₂O.

Protocolo de marcaje de agua pesada

20 Los animales recibieron un bolo IP (0,35 ml/g de peso corporal) de 99 % de agua pesada en NaCl al 0,9 % para lograr un enriquecimiento de agua en el organismo de aproximadamente un 5 % (utilizando un 60 % de peso corporal como agua) y a continuación recibieron 8 % de ²H₂O en agua para beber durante las últimas 4 semanas de estudio. El enriquecimiento con ²H₂O logra valores en estado en reposo estables dentro de un periodo de pocos días en los roedores en este protocolo.

Análisis por IRMS

25 Cien microlitros de alícuotas de muestras de plasmas, dentro del extremo de un vial invertido, se colocaron en un bloque de calentamiento relleno con perlas de vidrio a 70 °C durante la noche y se recogió el agua destilada del interior del vial. Las relaciones isotópicas del deuterio y el oxígeno-18 de la sangre de las muestras de plasma se determinaron utilizando un Analizador de Conversión a alta temperatura/Elemental Thermo Finnigan acoplado con un espectrómetro MAT 253 IRMS de Thermo Finnigan a través de una interfaz ConFlo-III. Las primeras dos mediciones fueron descartadas para minimizar los efectos de la histéresis de la muestra previa. La abundancia del isótopo deuterio se calcula en primer lugar en valores de δ 2H en relación al estándar internacional VSMOW, y a continuación se transforma en APE utilizando una curva de calibración de estándares con enriquecimientos conocidos. El enriquecimiento con ²H₂O se calculó para ratas a los 30 min después de la carga de glucosa. El enriquecimiento con ²H₂O se convirtió a mmoles multiplicando el enriquecimiento por el tamaño del depósito de TBW y dividiendo por 20 (MW ²H₂O). El ²H₂O total producida se calculó como un porcentaje de la carga de [6,6'-²H₂]glucosa proporcionada. Las áreas bajo las curvas de la insulina plasmática (INS AUC) y de la glucosa (GLU AUC) se calcularon utilizando el método trapezoidal. Se calcularon dos parámetros de ²H-GDT: 1) Producción de ²H₂O (% carga) / INS AUC*GLU AUC y 2) la tasa absoluta de la producción de ²H₂O (% carga).

Resultados

Peso corporal

30 No hubo diferencias significativas en el peso corporal (Figura 1) entre los grupos tratados con el vehículo, Compuesto A o Compuesto B.

Nivel de glucosa en sangre de la mañana aleatorio

Los niveles de glucosa en sangre de la mañana aleatorios se midieron semanalmente entre las 9 y 11 a.m. No hubo diferencias significativas en los niveles de glucosa de la mañana aleatorios entre los grupos tratados con el Compuesto B y con el vehículo durante las 4 semanas de este estudio. (Figura 2). Sin embargo, el grupo tratado con el Compuesto A mostró una tendencia a bajar el nivel de glucosa hacia el final del estudio, en comparación con los otros dos grupos.

Niveles de glucosa e insulina en ayunas

Al final del estudio, las ratas se dejaron en ayunas durante 4 horas y se midió el nivel de glucosa e insulina. Los niveles de glucosa en ayunas en animales tratados con el Compuesto A y con el Compuesto B mostraron una tendencia hacia valores más bajos posteriormente al tratamiento, mientras que no hubo diferencias significativas en el grupo tratado con el vehículo, previa- y posteriormente al tratamiento (Figura 3). No hubieron niveles de insulina en ayunas significativamente más bajos tanto en los animales tratados con el compuesto A como con el compuesto B, en comparación con sus niveles antes del tratamiento (Figura 4).

GDT

Todos los animales fueron sometidos a ^2H -GDT tanto antes como después de 4 semanas de tratamiento. Para la ^2H -GDT, los animales se dejaron en ayunas durante 4 horas. Una hora antes de la prueba de provocación de ^2H -GDT, las ratas recibieron 1,75 mg/g por peso corporal de H_2^{18}O mediante alimentación forzada oral para permitir la determinación del contenido de agua total. En $t=0$ min, se obtuvo una muestra de sangre para la determinación de la insulina de referencia de base, la glucosa y la dilución de H_2^{18}O . A continuación se administró [6,6'- $^2\text{H}_2$]glucosa (2 g/kg por peso corporal, 50 % en agua) a los animales mediante alimentación forzada oral. Se tomaron muestras de sangre en serie para las concentraciones de glucosa e insulina y el contenido de $^2\text{H}_2\text{O}$ en el punto de tiempo de 90 min. Se evaluó si la compensación pancreática fue adecuada distinguiendo entre la tasa absoluta de utilización de glucosa lograda (lo que refleja compensación pancreática ante RI), y la utilización glucolítica de la glucosa administrada por unidad de insulina en el entorno del organismo (lo que refleja sensibilidad a la insulina). La compensación de células β se expresa como el % de recuperación de $^2\text{H}_2\text{O}$ después de la carga de [6,6'- $^2\text{H}_2$]glucosa por AUC de la sensibilidad a la insulina.

Hubo dos diferencias significativas en los niveles del AUC de insulina (Figura 5) o del AUC de glucosa (Figura 6) entre los tres grupos, bien previa o bien posteriormente al tratamiento. La AUC de glucosa durante la carga de glucosa oral siguió una tendencia similar a la de los niveles de glucosa en ayunas. Como puede verse, hubo una gran desviación estándar, lo que probablemente representa una variación fisiológica. Sin embargo, todos los niveles de la AUC de insulina posterior al tratamiento fueron significativamente inferiores en comparación con los previos al tratamiento. La caída mostrada en los animales tratados con el vehículo representa probablemente la historia natural del deterioro de las células β con el envejecimiento celular (desde 8 a 12 semanas de edad) en ratas ZF.

Debido a que el cambio de la AUC de insulina en los animales tratados con el Compuesto A y con el Compuesto B puede ser originado por un deterioro relacionado con el envejecimiento celular o bien con necesidades de insulina reducidas debido a una sensibilidad a la insulina mejorada, la causa se averiguó mediante la medición de la GDT. No hubo diferencias significativas entre los grupos en la compensación pancreática, tanto previa como posteriormente al tratamiento. Las comparaciones de la compensación antes y después del tratamiento dentro de cada grupo, sin embargo, revelaron que los grupos tanto del vehículo como del Compuesto A mostraron menor compensación pancreática posterior al tratamiento (Figura 7), muy probablemente debido a la progresión natural de la disfunción de células β en ratas ZF. En contraste, las ratas ZF tratadas con el Compuesto B mantuvieron el mismo grado de compensación pancreática que estaba presente en el valor de referencia. Estos resultados sugieren la conservación de la función de las células β únicamente en respuesta al tratamiento con el Compuesto B.

Conforme con estos resultados, la sensibilidad a la insulina medida mediante la GDT (Figura 8) mostró que los animales tratados con el Compuesto B había aumentado de forma significativa la sensibilidad a la insulina (~4 veces) en comparación con los valores previos al tratamiento, mientras que no hubo ningún cambio significativo en la sensibilidad a la insulina posterior al tratamiento en los grupos tratados con el vehículo y el Compuesto A, en comparación con la previa al tratamiento, aunque hubo una tendencia hacia valores aumentados en ambos grupos. Por tanto, el hidrato clorhidrato de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina según se representa mediante el Compuesto B, aumentó de forma significativa la sensibilidad a la insulina y evitó la reducción relacionada con el envejecimiento celular en la compensación de células β , lo que indica que la reducción en la AUC de insulina posterior al tratamiento fue fisiológica en los animales tratados con el Compuesto B. Estos resultados además enfatizaron la necesidad de caracterizar la sensibilidad a la insulina cuando se evalúa las concentraciones de insulina en modelos de resistencia a la insulina.

Informe del estudio farmacológico II

Diseño del estudio

En el anterior estudio de ²H-GDT (Informe del estudio farmacológico I), el Compuesto B aumentó la sensibilidad a la insulina (SI) y o bien aumentó o mantuvo la sensibilidad de las células β (compensación pancreática) en ratas Zucker fa/fa. Sin embargo, en este estudio los niveles de insulina en ayunas de referencia difirieron entre grupos.

5 Hubo una reducción general en los niveles de insulina en ayunas y en la AUC en todos los grupos de animales, a pesar del hecho de que no hubieron cambios en la glucosa aleatoria, glucosa en ayunas, o la AUC de glucosa en cualquiera de los grupos de tratamiento. El objetivo del presente estudio era confirmar las observaciones originales de los efectos de los compuestos A y B en la SI y en la compensación pancreática (CP). Un objetivo secundario era definir mejor el transcurso temporal de los efectos de los fármacos sobre las respuestas de la glucosa y la insulina
10 ante una carga de glucosa oral. Se realizaron una cantidad de cambios a partir del estudio previo:

1. Los Compuestos A y B se mezclaron con comida para eliminar el estrés de la alimentación forzada diaria. La presencia del fármaco en la dieta no afectó de manera adversa la ingesta de comida y proporcionaría una concentración aceptable del fármaco en el plasma.

15 2. Se asignaron ratas Zucker fa/fa a un grupo de tratamiento en base a mediciones preliminares del peso corporal, concentraciones de glucosa e insulina, y niveles de hemoglobina A1c glicosilada (Gly-HbA1c), para eliminar una desviación potencial en los resultados finales.

3. Las concentraciones de glucosa e insulina fueron determinadas semanalmente.

20 4. La ²H-GDT se llevó a cabo en los días 0, 14 y 28. Además, durante la ²H-GDT, los niveles de insulina y glucosa en sangre fueron determinados a los 0, 15, 30, 60 y 90 minutos, para definir mejor tanto la respuesta de la insulina como la de la glucosa.

5. Los niveles de la HbA1c glicosilada se determinaron en los días 0 y 28 para proporcionar una evaluación adicional de cualquier mejora general en la homeostasis de la glucosa lograda mediante el tratamiento.

6. Se incluyó en el estudio un grupo de control magro.

Sujetos

25 Treinta y seis ratas macho Zucker fa/fa obesas y seis Zucker fa/? Magras, obtenidas de Charles River, se alojaron bajo condiciones de terrario normales en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Las ratas se mantuvieron dos por jaula con comida y agua disponible ad lib, excepto durante los ayunos semanales de 4 horas. El agua siguió estando disponible durante estos ayunos.

Fármaco

30 El compuesto A corresponde a Cariporide. El compuesto B corresponde a hidrato clorhidrato de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina. Los compuestos A y B se suministraron en forma de polvos por parte de Merck Serono. Los fármacos fueron incorporados a una dieta granulada (LabDiet, 5001) por parte de Research Diets, Inc (New Brunswick, NJ) en concentraciones de 0,44 g/kg o 0,88 g/kg de dieta para producir dosis aproximadas de 40 u
35 g/d de comida equilibrada. La misma comida, pero sin fármaco, se suministró a ratas tanto del grupo de animales de control magros como fa/fa.

Asignación de grupos

40 Una semana antes del comienzo del estudio, todas las ratas se pesaron. Después de 4 horas de ayuno, se obtuvo una muestra de sangre para la determinación de los niveles de glucosa, insulina, y hemoglobina glicolisada (HbA1c) en sangre. Los animales se clasificaron a continuación en base a estos parámetros en los grupos detallados a continuación. Las ratas tenían ocho semanas de edad al comienzo del tratamiento.

Grupos de tratamiento:

1. Ratas ZF (fa/fa) (n = 6) comida sin fármaco

2. Ratas ZF (fa/fa) (n = 6) compuesto A (40 mg/kg/día)

45 3. Ratas ZF (fa/fa) (n = 6) compuesto A (80 mg/kg/ día)

4. Ratas ZF (fa/fa) (n = 6) compuesto B (40 mg/kg/ día)
5. Ratas ZF (fa/fa) (n = 6) compuesto B (80 mg/kg/ día)
6. Ratas Zucker magras (fa/?) (n = 6) comida sin fármaco

Régimen de dosificación

- 5 La comida de tratamiento apropiada permaneció continuamente disponible durante 4 semanas, excepto durante las 4 horas de ayunos programadas realizadas una vez por semana.

Peso corporal e ingesta de comida

- 10 Los pesos corporales individuales se determinaron una vez por semana. La ingesta de comida media por jaula también se determinó una vez por semana y el consumo de cada rata individualmente fue calculado dividiendo la media de la jaula por 2 (2 ratas alojadas/jaula).

Niveles de glucosa e insulina

- 15 Tanto los niveles de glucosa en sangre en ayunas (4 h) como los aleatorios, fueron determinados utilizando un glucómetro portátil (OneTouch Ultra, Lifescan, Inc. Milapitas, CA) en la sangre obtenida de muestras de capilares de la cola. Los niveles de insulina en plasma se determinaron mediante un Kit ELISA específico para ratas (Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit, Crystal Chem, Inc., Chicago, IL). El periodo de ayuno comenzó a las 9 a.m. y terminó después de una extracción de sangre a la 1 p.m.

Niveles de HbA1c

Los niveles de HbA1c se determinaron utilizando un analizador DCA 2000 (Bayer Healthcare LLC, Elkhart IN) previamente al comienzo del estudio y nuevamente al final de la 4ª semana del periodo de tratamiento.

20 ²H-GDT

La sensibilidad a la insulina (SI) y la compensación pancreática (CP) se midieron realizando una prueba de utilización de glucosa en los días 0, 14 y 28.

- 25 Tiempo -4 h: Antes de que comenzara el ayuno en la mañana de la GDT, se tomó una muestra de sangre para determinar el nivel de glucosa aleatorio (ver más arriba). Se recogió una muestra de sangre adicional para determinar los enriquecimientos de ²H₂O y ¹⁸O de referencia. Las ratas se pesaron y se dio comienzo a las 4h de ayuno. Hubo agua disponible durante el ayuno.

Tiempo -3 h: Una hora después del comienzo del ayuno, se administró, a razón de 1,75 mg/g de peso corporal, de H₂¹⁸O al 10% mediante alimentación forzada (agua ²H₂O-libre H₂O¹⁸; átomo de ¹⁸O al 10% de Spectra; Cat. No 51350).

- 30 Tiempo 0: 4 horas después del comienzo del ayuno, se determinaron los niveles de insulina y de glucosa en sangre. Las ratas recibieron 4 ml/kg de una solución de glucosa al 50% (compuesta de 25% de [6,6-2H₂] glucosa y 25% de D-glucosa) mediante alimentación forzada.

- 35 En los tiempos 15, 30, 60 y 90 min posteriores a la prueba de provocación de glucosa, se determinaron nuevamente las concentraciones de glucosa en sangre mediante una lectura con glucómetro de sangre venosa de la cola. Se recogieron muestras de sangre adicionales para determinar la insulina. En los minutos 60 y 90 posteriores a la prueba de provocación de glucosa, se recogió sangre entera para determinar los enriquecimientos de ²H₂O y H₂¹⁸O. Todas las muestras de sangre se centrifugaron y el plasma se almacenó a -20°C hasta que se sometió a ensayo. El enriquecimiento isotópico del agua corporal con deuterio y oxígeno -18 se determinó mediante un análisis IRIS del destilado de agua de las muestras de plasma.

40 Cálculos

El enriquecimiento con ²H₂O se convirtió a mmol multiplicando el enriquecimiento (²H₂O APE) por el tamaño del depósito de agua total y dividiendo por 20 (el peso molecular de ²H₂O). El ²H₂O producida se calculó como el porcentaje de la carga de [5,6-²H₂]glucosa administrada. Las áreas bajo la curva (AUC 60 min) de la glucosa e insulina plasmática se calcularon utilizando el método trapezoidal (GraphPad Prism).

Se calcularon dos parámetros de ²H-GDT:

1. Índice de sensibilidad a la insulina (SI) = producción de ²H₂O (% de carga)/(AUC de glucosa x AUC de insulina).
2. Compensación pancreática (CP) = la producción absoluta de ²H₂O como un porcentaje de la carga total de [6,6-2H₂] glucosa (% de carga)/ respuesta de la glucosa global (AUC de glucosa; para corregir la utilización independiente de la insulina).

Estadísticas

Los resultados globales de las medidas de glucosa e insulina se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas de 2 vías, utilizando el fármaco y el tiempo (repetido) como factores. Al análisis primario siguieron los post-test de Bonferroni para comparar todos los grupos. Los datos se consideran significativos en p < 0,05. Se analizaron los valores de AUC de 60 min para la glucosa y la insulina mediante ANOVA de 1 vía, seguido de comparación de Turkey de todos los grupos.

Exclusión de datos

Se omitieron los datos que indicaron que existía una carencia de enriquecimiento debido a un fallo, o fallo parcial de la administración de la glucosa durante la ²H-GDT.

Resultados

Asignación de grupos previa al estudio

No hubieron diferencias significativas entre los grupos fa/fa al comienzo del estudio. Tal como se esperaba, el peso corporal y los niveles de insulina en ayunas de los animales magros difirieron de manera significativa de todos los animales fa/fa. Aunque los niveles de hemoglobina glicosilada y de glucosa en ayunas fueron algo más bajos en los animales magros, estos valores no fueron significativamente diferente de los de otros grupos de tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1: Niveles de pesos corporales previos al estudio, glucosa en sangre en ayunas, insulina y Gly-HbA1c. Los datos son las medias ± SEM, n = 6/grupo; * p<0,001, difiere de forma significativa en comparación con todos los grupos de tratamiento fa/fa.

Grupo	Comida fa/? magras	Comida fa/fa	fa/fa cmp A 40 mg/kg	fa/fa cmp A 80 mg/kg	fa/fa cmp B 40 mg/kg	fa/fa cmp B 80 mg/kg
BW (g)	259,6±2,7*	378,9±12,6	381,2±15,3	377,2±12,6	379,1±13,0	376,3±11,6
BG (mg/dl)	100,6±2,6	113,6±6,0	113,2±6,4	118,7±10,3	109,5±6,7	122,8±6,4
Insulina (ng/ml)	1,0±0,2*	10,5±1,4	10,3±1,0	10,5±1,7	11,1±0,8	10,3±0,6
HbA1c (%)	3,5±0,1	3,8±0,1	4,0±0,2	3,9±0,1	3,8±0,1	4,0±0,1

Peso corporal e ingesta de comida

Todos los animales continuaron ganando peso durante la duración del experimento, lo que indica que los fármacos fueron bien tolerados (ANOVA de medidas repetidas de 2 vías seguido de post-test de Bonferroni: tiempo: F_(4,136) = 1488,41, p<0,0001; tratamiento: F_(6,36) = 31,02, p<0,0001, interacción tratamiento x tiempo: F_(24,136) = 12,69, p<0,0001). No se observó diferencia significativa en el peso corporal entre los grupos fa/fa durante el periodo de tratamiento de 4 semanas (Figura 9), aunque todos se incrementaron en relación al grupo de control magro. La ingesta de comida media semanal de los grupos del Compuesto A y del Compuesto B se vio incrementada en comparación con los controles magros, pero no difirió de forma significativa de la de los controles fa/fa alimentados con comida equilibrada (Tabla 2).

Tabla 2: Consumo de comida medio en gramos durante el periodo de tratamiento de 4 semanas. Los datos son la media de +/- la desviación estándar; * p<0,01 del control fa/fa con comida equilibrada.

Tratamiento	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Control fa/fa comida equilibrada	34,1 +/- 2,0	32,7 +/- 5,6	34,7 +/- 1,5	35,3 +/- 1,9
Compuesto A 40 mg/kg	32,2 +/- 3,5	33,1 +/- 2,6	33,9 +/- 2,4	34,9 +/- 2,7
Compuesto A 80 mg/kg	34,3 +/- 2,5	32,8 +/- 4,3	32,3 +/- 4,5	30,8 +/- 5,6
Compuesto B 40 mg/kg	32,1 +/- 3,2	33,8 +/- 2,9	31,7 +/- 2,9	33,6 +/- 4,4
Compuesto B 80 mg/kg	31,8 +/- 1,4	32,9 +/- 1,9	33,0 +/- 0,7	34,0 +/- 2,9
Control magro	21,2 +/- 1,5 *	22,0 +/- 1,3*	21,1 +/- 0,8 *	21,8 +/- 0,9 *

Glucosa en sangre aleatoria

5 La glucosa en sangre aleatoria se determinó una vez por semana a aproximadamente las 9 a.m. en ratas no sometidas a ayuno. No hubo diferencia significativa entre los niveles de glucosa aleatorias del grupo fa/fa con comida equilibrada y cualquiera de los demás grupos de tratamiento (Figura 10) (ANOVA de medidas repetidas de 2 vías seguido de Bonferroni post-test: tratamiento $F_{6,136} = 0,93$; $p = 0,48$ ns; tiempo: $F_{4,136} = 3,25$, $p = 0,01$; interacción $F_{24,136} = 0,97$, $p = 0,51$ ns).

Niveles de glucosa en sangre en ayunas

10 La glucosa en sangre en ayunas se determinó una vez por semana después de 4 horas de ayuno (ayuno a las 9 a.m., muestra a las 1 p.m.). Los niveles de glucosa en los diversos grupos de tratamiento con fármacos no difirieron de forma significativa del grupo de fa/fa de control (Figura 11). La dosis de 40 mg/kg del Compuesto A incrementó la concentración de glucosa en ayunas después de 4 semanas de administración (ANOVA de medidas repetidas de 2 vías seguido de Bonferroni post-test: tratamiento: $F_{6,138} = 5,26$; $p = 0,0006$; tiempo: $F_{4,136} = 7,68$, $p = 0,0001$; interacción $F_{24,136} = 0,97$, $p = 0,51$ ns).

15 Concentraciones de insulina en ayunas

20 Las concentraciones de insulina en ayunas en la línea de referencia y después de 4 semanas de tratamiento se resumen en la Tabla 3 (ANOVA de medidas repetidas de 2 vías seguido de Bonferroni post-test: tratamiento: $F_{6,36} = 11,24$, $p < 0,0001$; tiempo: $F_{6,36} = 9,48$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{24,136} = 3,21$, $p < 0,0001$). Las concentraciones de insulina de los controles magros fueron significativamente diferentes de los del control fa/fa con comida equilibrada en cada semana, con la excepción de la 3ª semana. Para la 4ª semana de tratamiento ambos Compuestos A a 80mg/kg disminuyeron de forma significativa la insulina en ayunas en relación al vehículo de control fa/fa. Estos valores, sin embargo, permanecieron más elevados que los de los controles magros (Figura 12).

Hemoglobina glicosilada

25 Los niveles de HbA1c reflejan el control glucémico en el tiempo. En la línea de referencia, los niveles de media de HbA1c de todos los grupos fa/fa fueron, pero no de manera significativa, algo más elevados que los controles magros. En la semana 4, los niveles de HbA1c del grupo fa/fa de control y el grupo del Compuesto B 80 mg/kg fueron significativamente más elevados que los de los controles magros (Tabla 3). Los cambios en la HbA1c no fueron estadísticamente significativos entre cualquiera de los grupos de tratamiento durante el periodo de tratamiento de 4 semanas (Tabla 3).

30 Tabla 3: Línea de referencia, Semana 4 y el cambio durante el periodo de tratamiento de 4 semanas de la insulina en ayunas y HbA1c. Los datos son las medias de \pm la DE, $n = 5-6$ /grupo; * significativamente diferente del vehículo (comida equilibrada) de control fa/fa; # significativamente diferente del control magro (test de Tukey, $p < 0,05$).

Grupo	Comida fa/? magras	Comida fa/fa	fa/fa cmp A 40 mg/kg	fa/fa cmp A 80 mg/kg	fa/fa cmp B 40 mg/kg	fa/fa cmp B 80 mg/kg
Insulina de referencia (ng/ml)	1,4 \pm 0,5*	13,4 \pm 2,9 [#]	17,6 \pm 5,1 [#]	15,9 \pm 5,5 [#]	14,7 \pm 2,7 [#]	16,2 \pm 11,2 [#]

Grupo	Comida fa/? magras	Comida fa/fa	fa/fa cmp A 40 mg/kg	fa/fa cmp A 80 mg/kg	fa/fa cmp B 40 mg/kg	fa/fa cmp B 80 mg/kg
Semana 4						
Insulina (ng/ml)	1,7±0,5*	21,6±10,7 [#]	18,2±11,81 [#]	12,5±7,5 [#]	14,5±5,3 [#]	13,1±8,2 [#]
Cambio en La Insulina (ng/ml)	0,3±0,8	8,2±9	0,6±9,6	-3,4±8,2	-0,2±4,4	-3,2±11,2
HbA1c (%) de referencia	3,5±0,1	3,8±0,4	4,0±0,5	3,9±0,4	3,8±0,2	4,0±0,4
Semana 4						
HbA1c (%)	3,8±0,1*	4,7±0,7 [#]	4,4±0,2	4,4±0,52	4,3±0,3	4,8±0,4 [#]
Cambio en HbA1c (%)	0,4±0,2	0,9±0,4	0,4±0,6	0,4±0,9	0,4±0,2	0,8±0,7

Prueba de utilización de la ²H-glucosa

5 Para determinar el efecto de los compuestos A y B en la función pancreática y la sensibilidad a la insulina, las ratas se sometieron a ²H-GDT previamente a que los animales fueran destetados para darles la comida con el fármaco, y a continuación después de 2 y 4 semanas de tratamiento con el fármaco.

²H-GDT previa al tratamiento de la respuesta de la glucosa y la insulina

10 En respuesta a una prueba de provocación de glucosa antes del comienzo del tratamiento con fármacos, las concentraciones de glucosa en sangre se incrementaron en todas las ratas fa/fa en relación a los controles magros (Figura 13a). En el punto de tiempo de 60 minutos, los niveles de glucosa de los grupos a ser asignados con el Compuesto A tanto de 40 como de 80 mg/kg se incrementaron por encima de aquellos de los animales fa/fa a ser asignados con el vehículo. Sin embargo, la AUC de glucosa (60 min) indicó que todos los grupos de ratas fa/fa tenían un grado similar de tolerancia deteriorada a la glucosa en relación a los controles magros (Figura 13b). En la línea de referencia, todos los animales fa/fa mostraron un grado similar de hiperinsulinemia deteriorada en
15 comparación a los controles magros durante la prueba de provocación de ²H-GDT (Figura 13c, d).

²H-GDT de la respuesta de la glucosa y la insulina a las dos semanas

20 2 semanas después del comienzo del tratamiento con fármacos, todos los animales fa/fa tenían un aumento significativo en las concentraciones de glucosa en sangre en relación a los controles magros (Figura 14a, b). De igual manera, todos los animales fa/fa habían aumentado sus concentraciones de insulina en relación a los controles magros (Figura 14c, d). Los compuestos A y B no afectaron a la respuesta de insulina o glucosa después de 2 semanas de tratamiento.

GDT de la respuesta de la glucosa y la insulina a las cuatro semanas

25 4 semanas después del comienzo del tratamiento con fármacos, las ratas tratadas con el compuesto A (40 y 80 mg/kg) y el compuesto B (40 y 80 mg/kg) continuaron teniendo concentraciones elevadas de insulina y glucosa en sangre (Figura 15a, b, c, d). De hecho, en el punto de tiempo de 90 min, el nivel de glucosa se encontraba elevado por encima del de las ratas fa/fa tratadas con el vehículo en el grupo tratado con 40 mg/kg del Compuesto A. En el grupo de 80 mg/kg, el Compuesto B disminuyó ligeramente los niveles de glucosa en sangre, de tal manera que los valores no fueron significativamente diferentes de aquellos de las ratas con vehículo magro o fa/fa con vehículo de control. Las concentraciones de insulina permanecieron elevadas en el grupo de 80 mg/kg del Compuesto B.

30 Función pancreática y sensibilidad a la insulina

Pretratamiento

35 La sensibilidad a la insulina y la compensación pancreática determinada en la línea de referencia fueron similares en todos los grupos fa/fa (Figura 16a, b) y se redujeron significativamente en comparación con los controles magros. Esto indica que la habilidad de las ratas fa/fa para compensar su grave resistencia a la insulina no es efectiva y contribuye a su intolerancia a la glucosa. La aparente reducción en la compensación pancreática observada en el

grupo de animales que se trataron más tarde con 80 mg/kg del Compuesto B puede ser considerada como un artefacto experimental ya que esta disminución no se observó en puntos de tiempo posteriores y estos animales no difirieron en otras medidas realizadas al mismo tiempo (por ejemplo, peso, concentraciones de insulina o glucosa en ayunas). Resultados de ANOVA para la CP: $F_{6,29} = 33,02$, $p < 0,0001$; para la SI: $F_{6,29} = 35,8$, $p < 0,0001$.

5 Dos semanas de tratamiento

Después de 2 semanas de tratamiento, la compensación pancreática en el grupo de 80 mg/kg del Compuesto B fue intermedia entre el de los grupos de control magro y fa/fa (Figura 16c, d). Resultados de ANOVA para la CP: $F_{6,32} = 9,121$, $p < 0,0001$; para la SI $F_{6,32} = 132,7$, $p < 0,0001$.

Cuatro semanas de tratamiento

- 10 Después de 4 semanas de tratamiento con fármacos, los resultados fueron similares a los de 2 semanas (Figura 16e, f). Aunque la sensibilidad a la insulina en el grupo de 80 mg/kg del compuesto B no fue mejorada de forma significativa, hubo una ligera mejora en la compensación pancreática. Resultados de ANOVA para la CP: $F_{6,32} = 6,17$, $p = 0,0002$; para la SI: $F_{6,32} = 35,01$, $p < 0,0001$.

Conclusiones

- 15 En la línea de referencia, no hubieron diferencias significativas entre los grupos fa/fa en el peso corporal, consumo de comida, HbA1c, glucosa en sangre aleatoria, concentraciones de insulina y glucosa en sangre. De igual manera, en respuesta a una prueba de provocación de glucosa, los grupos fa/fa no difirieron entre sí en la AUC de glucosa (60 min) o AUC de insulina (60 min), pero fueron significativamente diferentes de los controles magros. Tanto la sensibilidad a la insulina como la compensación pancreática fueron similares en todas las ratas fa/fa en la línea de referencia, con excepción del grupo del compuesto B (80 mg/kg/d) que estaba reducido en relación a los otros grupos. Después de 4 semanas de tratamiento, 80 mg/kg del compuesto A disminuyó las concentraciones de insulina en ayunas, pero fue sin efecto sobre cualquiera de los otros parámetros. Ninguna de las dosis del compuesto A mejoró de forma significativa los niveles de glucosa (ya sea en ayunas o en respuesta a la prueba de provocación), la sensibilidad a la insulina o la compensación pancreática. Los efectos del compuesto B en el presente experimento fueron moderados. Después de 4 semanas de tratamiento a 80 mg/kg/d, el compuesto B disminuyó la AUC de glucosa de 60 min en respuesta a una prueba de provocación de glucosa. La concentración de glucosa fue intermedia entre la de los vehículos de control magros y fa/fa, pero ligeramente diferente de ambos. No hubo prácticamente ningún efecto en la AUC de insulina de 60 min, o en la medida de sensibilidad a la insulina (SI) calculada. La compensación pancreática pareció estar ligeramente mejorada tanto después de 2 como 4 semanas de tratamiento y fue ligeramente diferente de los vehículos de control magros o fa/fa. Se observa, sin embargo, que la compensación pancreática en este grupo se mostró inferior (peor) que la de los otros grupos en la línea de referencia. 4 semanas de tratamiento con el compuesto A no mejoraron la tolerancia a la glucosa o mejoraron significativamente la hiperinsulinemia y las respuestas exageradas de la insulina observadas en las ratas fa/fa. La alta dosis del compuesto B atenuó el deterioro en la compensación pancreática en relación a los controles fa/fa. El compuesto B tiene un efecto positivo sobre la función pancreática, incluso aunque no aumenta de forma efectiva la sensibilidad a la insulina.

Ejemplos relacionados con las preparaciones farmacéuticas

Ejemplo A: viales de inyección

- 40 Una solución de 100 g de un ingrediente activo según la invención y 5 g de hidrógeno-fosfato de disodio en 3 l de agua bidestilada se ajusta a un pH 6,5 utilizando 2 N de ácido clorhídrico, se filtra de forma estéril, transferido a viales de inyección, liofilizado bajo condiciones estériles y sellado bajo condiciones estériles. Cada vial de inyección contiene 5 mg de ingrediente activo.

Ejemplo B: Supositorios

- 45 Una mezcla de 20 g de un principio activo según la invención se fundió con 100 g de lecitina de soja y 1400 g de manteca de cacao, se vertió en moldes y se dejó enfriar. Cada supositorio contiene 20 mg del principio activo.

Ejemplo C: Solución

- 50 Se prepara una solución a partir de 1 g de un principio activo según la invención, 9,38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 28,48 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ y 0,1 g de cloruro de benzalconio en 940 ml de agua bidestilada. El pH se ajusta a 6,8, y la solución se completa hasta 1 l y se esteriliza por irradiación. Esta solución puede utilizarse en forma de gotas oftálmicas.

Ejemplo D: Ungüento

Se mezclan 500 mg de un principio activo según la invención con 99,5 g de vaselina en condiciones asépticas.

Ejemplo E: Comprimidos

5 Se comprime una mezcla de 1 kg del principio activo según la invención, 4 kg de lactosa, 1,2 kg de almidón de patata, 0,2 kg de talco y 0,1 kg de estearato de magnesio de manera convencional para formar comprimidos, de tal modo que cada comprimido contenga 10 mg del principio activo.

Ejemplo F: Comprimidos recubiertos

Se prensan los comprimidos de manera análoga al ejemplo E y posteriormente se recubren de manera convencional con una cobertura de sacarosa, almidón de patata, talco, goma tragacanto y colorante.

10 **Ejemplo G: Cápsulas**

Se introducen 2 kg del principio activo según la invención en cápsulas de gelatina dura de manera convencional, de tal modo que cada cápsula contenga 20 mg del principio activo.

Ejemplo H: Ampollas

15 Una solución de 1 kg de un principio activo según la invención en 60 l de agua bidestilada se filtra en forma estéril, se transfiere a ampollas, se liofiliza bajo condiciones estériles y se sella bajo condiciones estériles. Cada ampolla contiene 10 mg del principio activo.

Ejemplo I: Pulverizador de inhalación

20 14 g de un principio activo según la invención se disolvieron en 10 l de solución isotónica de NaCl, y la solución se transfiere a envases de pulverización comercialmente disponibles con un mecanismo de bomba. La solución se puede pulverizar en la boca o la nariz. Una pulverización (aproximadamente 0,1 ml) corresponde a una dosis de aproximadamente 0,14 mg.

REIVINDICACIONES

1. 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades que están asociadas con la disfunción de las células β .
- 5 2. Composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo una cantidad efectiva de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades que están asociadas con la disfunción de las células β .
3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, junto con adyuvantes farmacéuticamente tolerables.
- 10 4. Composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 2 o 3, en donde las enfermedades son diabetes mellitus de tipo II, nefropatía y/o neuropatía diabética, preferiblemente diabetes mellitus tipo II.
5. Composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 2 a 4, en donde el ingrediente activo es la sal de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina seleccionada del grupo de clorhidrato, metanosulfonato, hemi-sulfato, hemi-fumarato y hemi-malato.
- 15 6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en donde el ingrediente activo es hidrato de clorhidrato de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina.
7. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el ingrediente activo se combina con al menos otro ingrediente activo.
- 20 8. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 para su administración por vía oral o parenteral, preferiblemente administración oral.
9. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 para su administración diaria en un rango de dosis de 20 a 100 mg por kg de peso corporal.
10. Uso de 2-Metil-4,5-di-(metilsulfonil)-benzoil-guanidina, y/o una sal y/o solvato fisiológicamente aceptable del mismo, para la conservación o aumento de la compensación de células β in vitro.
- 25 11. Uso según la reivindicación 10, en donde la sensibilidad a la insulina es al menos doblada, preferiblemente al menos triplicada, más preferiblemente al menos cuadruplicada, de mayor preferencia al menos quintuplicada.
12. Uso según la reivindicación 10, en donde la compensación pancreática de células β se conserva, preferiblemente al menos un 70 % de la línea de referencia previa al uso, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 90 %, de forma sumamente preferible un 100 %.
- 30 13. Uso según la reivindicación 12 durante un periodo de al menos 1 semana, preferiblemente 2 semanas, más preferiblemente 3 semanas, de mayor preferencia 4 semanas.

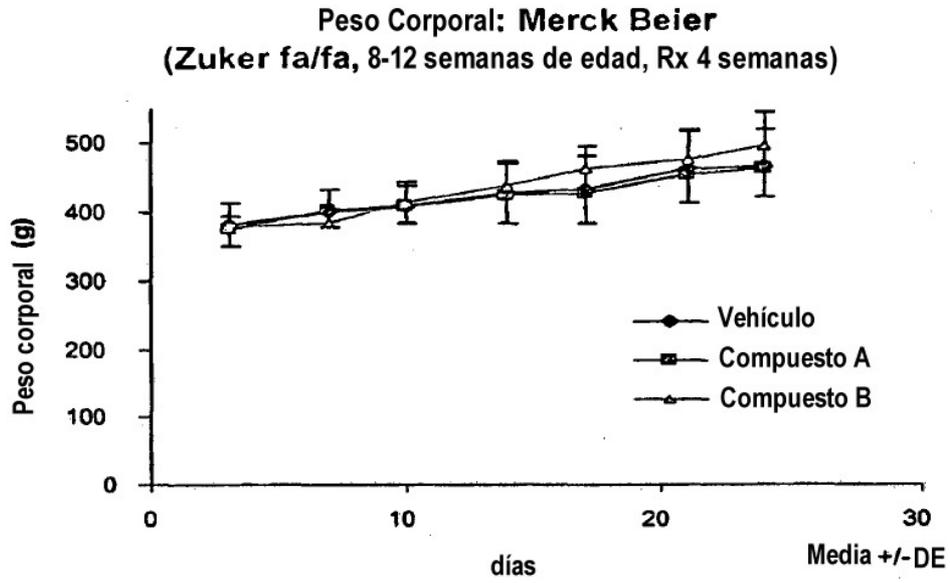


Figura 1

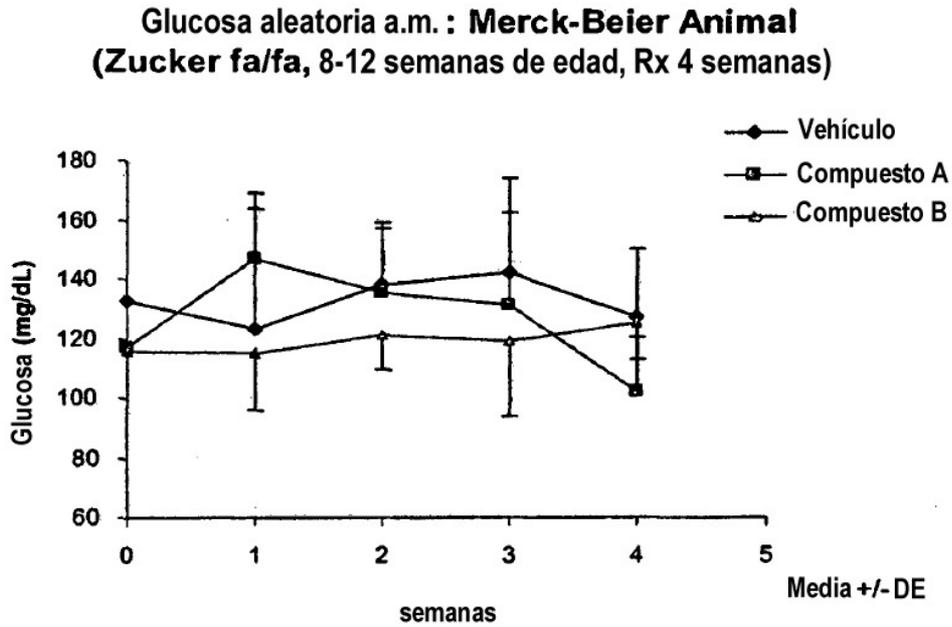


Figura 2

**Nivel de glucosa en ayunas: Merck Beier
(Zucker fa/fa, 8-12 semanas de edad, Rx 4 semanas)**

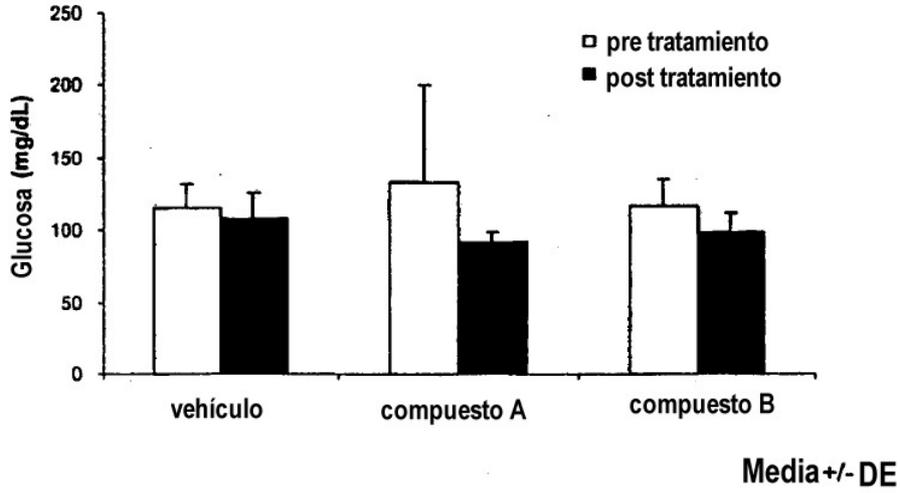


Figura 3

**Niveles de insulina en ayunas: Estudio Merck Beier
(Zucker fa/fa, 8-12 semanas de edad, Rx 4 semanas)**

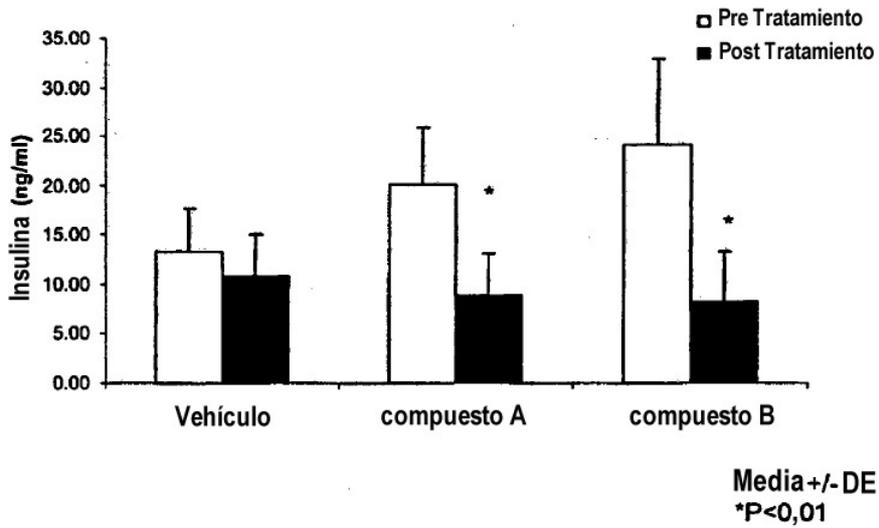


Figura 4

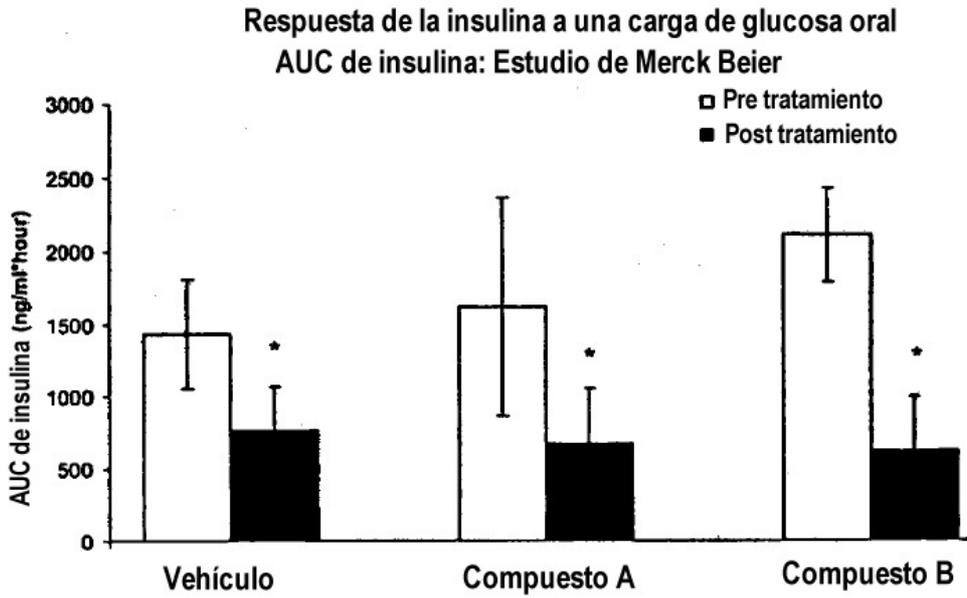


Figura 5

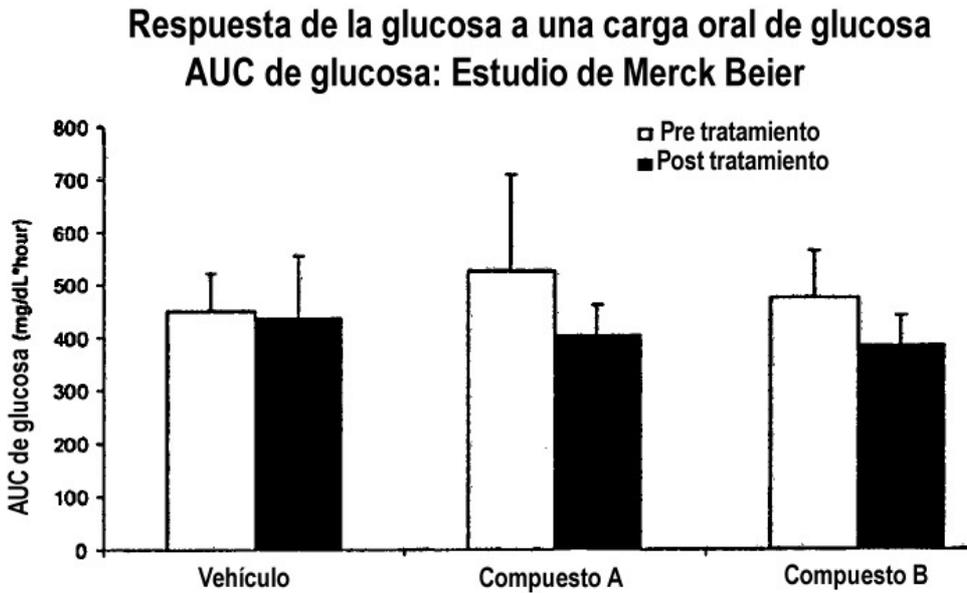


Figura 6

**GDT de Merck-Beier : Compensación pancreática
(% recuperación de D2O en 90 minutos)
(Zucker fa/fa, 12 semanas de edad, Rx 4 semanas)**

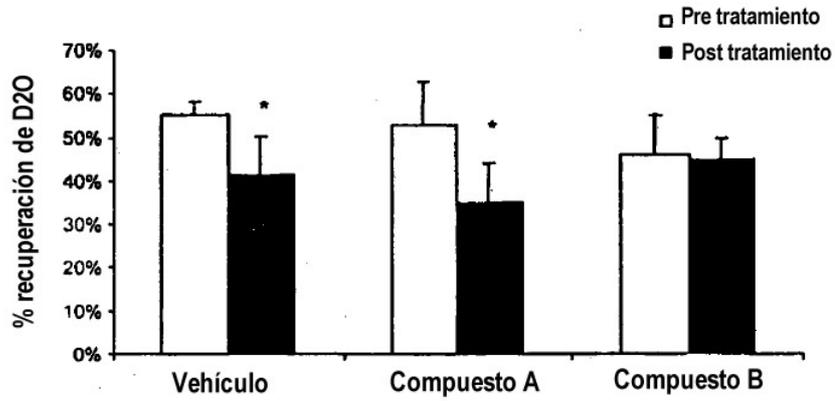


Figura 7

**GDT de Merck-Beier : Sensibilidad a la insulina
(% de recuperación de D2O/AUC de insulina)
(Zucker fa/fa, 12 semanas de edad, 4 semanas Rx)**

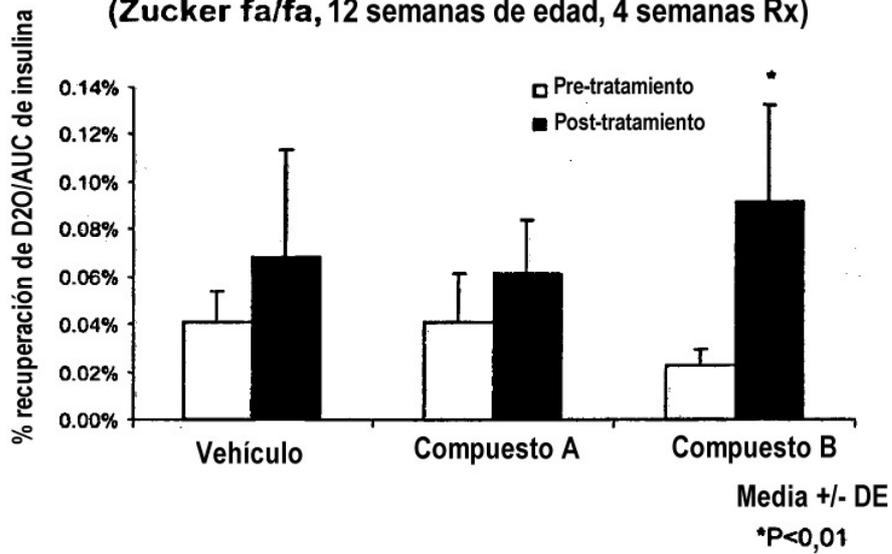


Figura 8

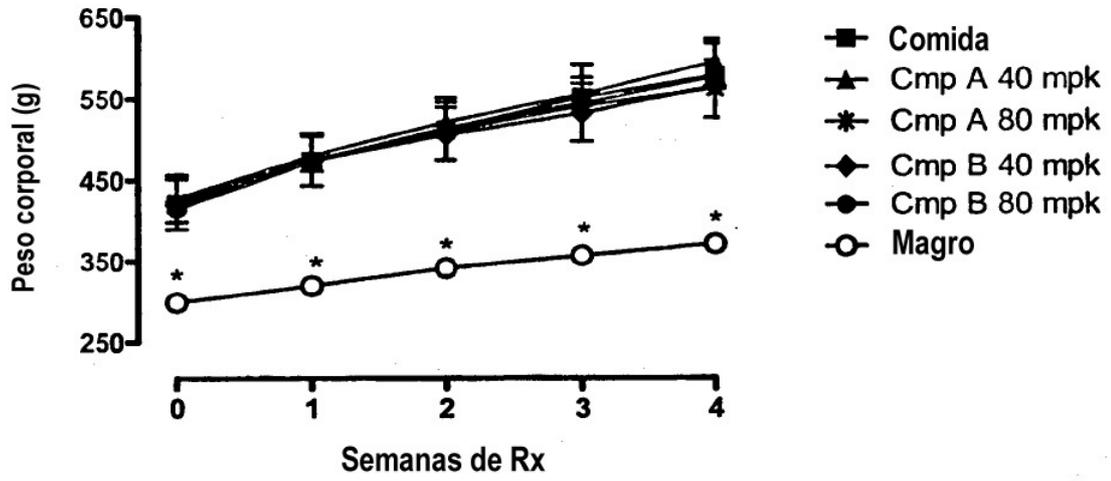


Figura 9

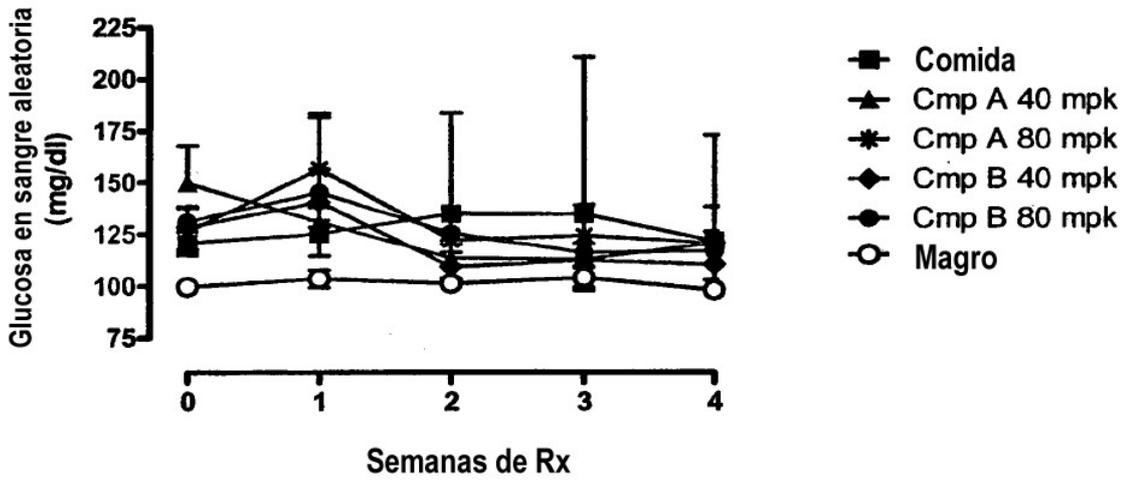


Figura 10

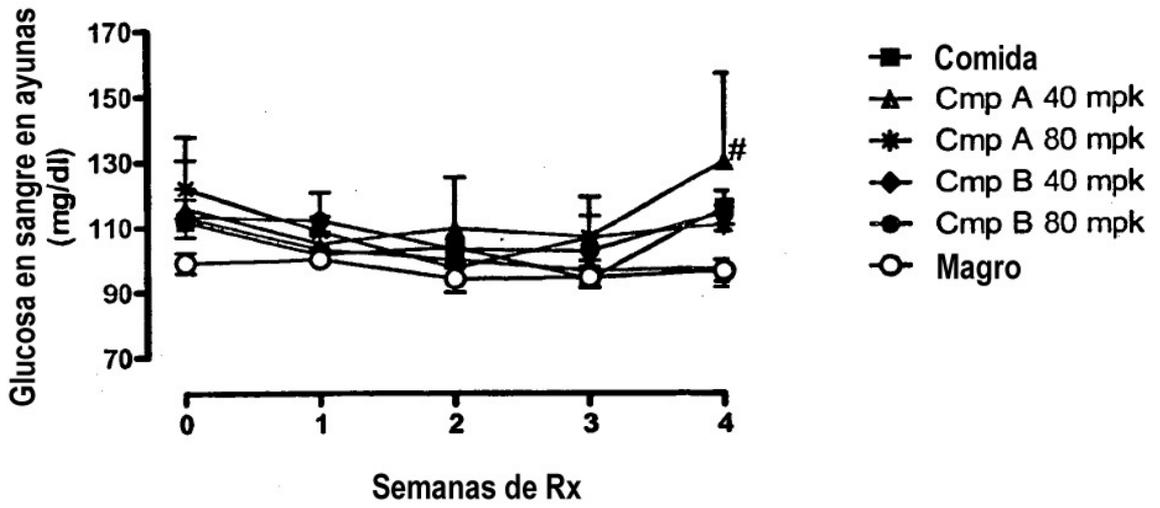


Figura 11

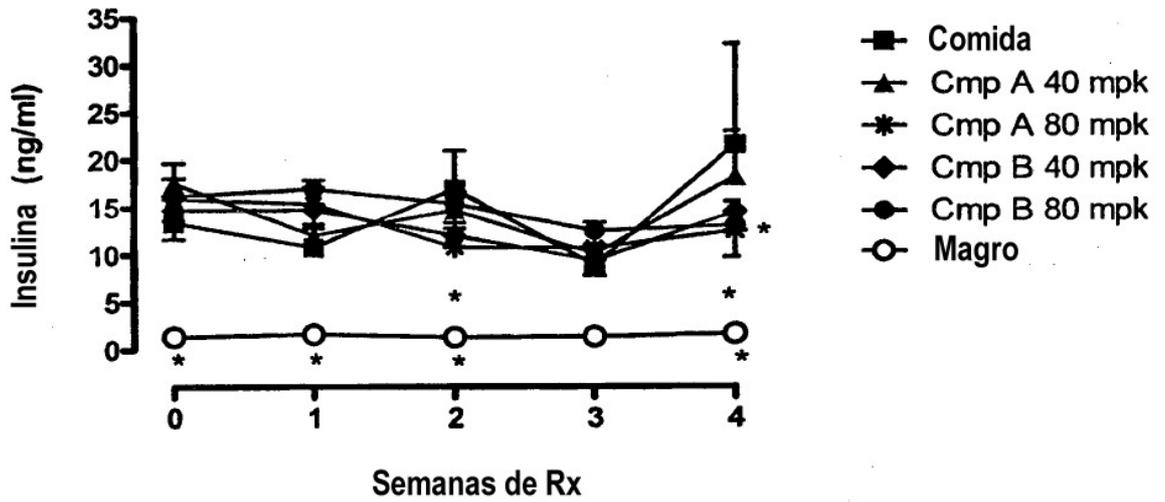


Figura 12

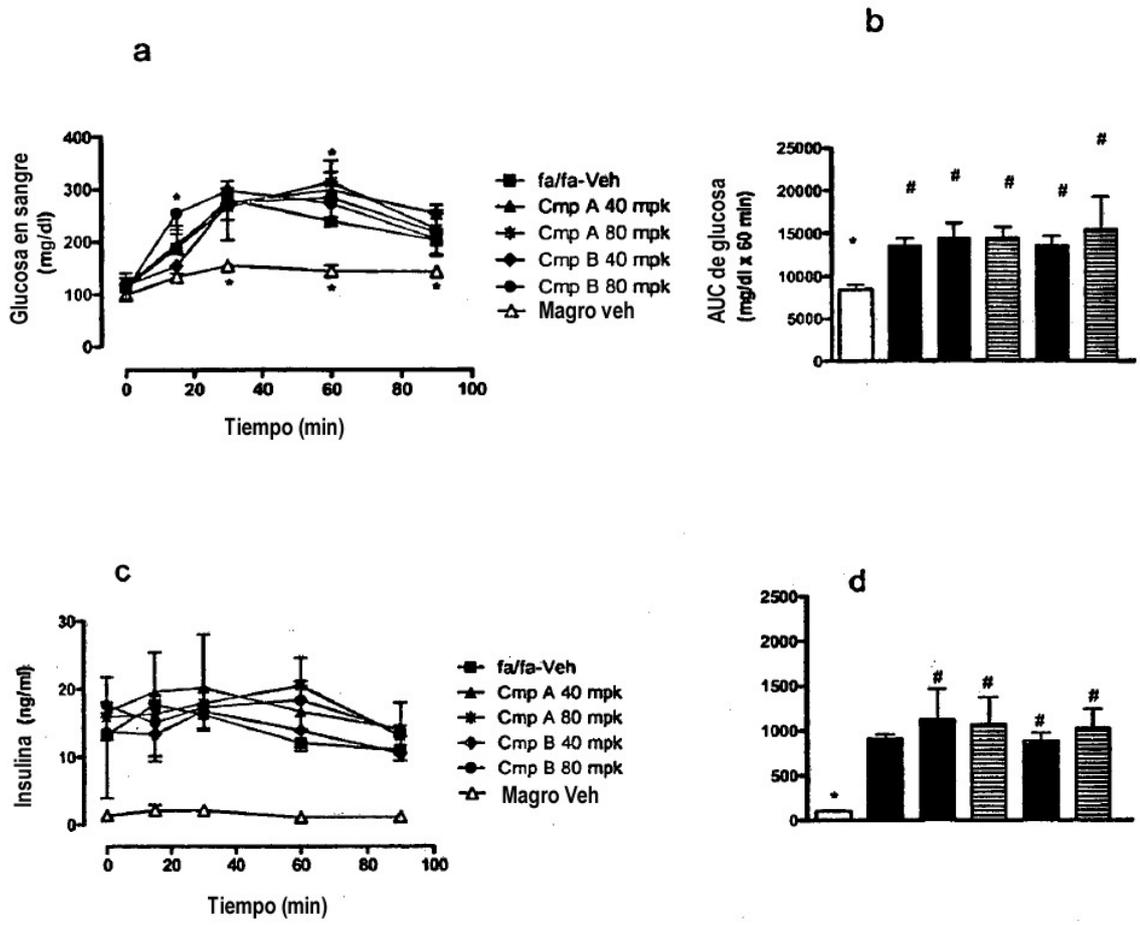


Figura 13

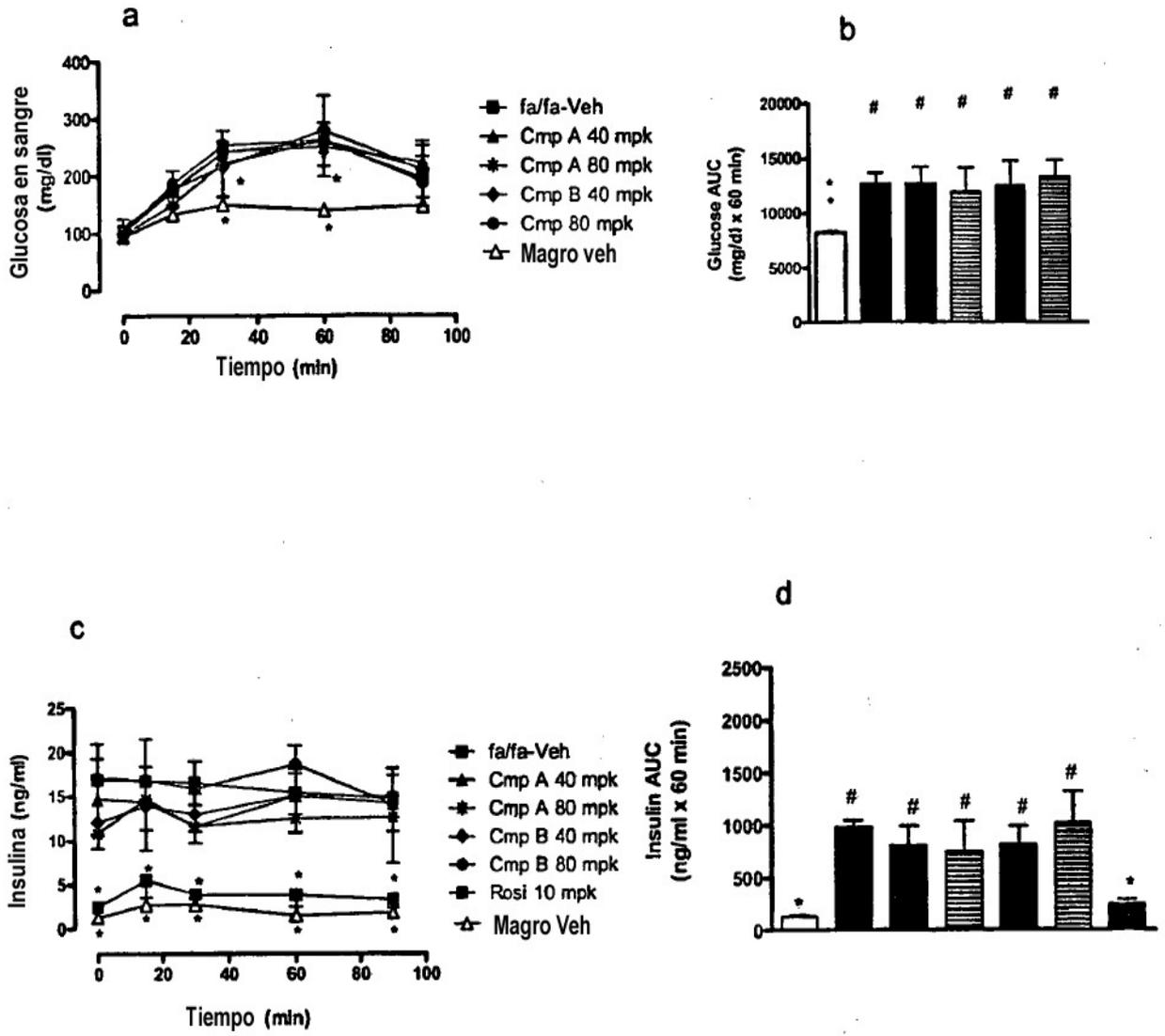


Figura 14

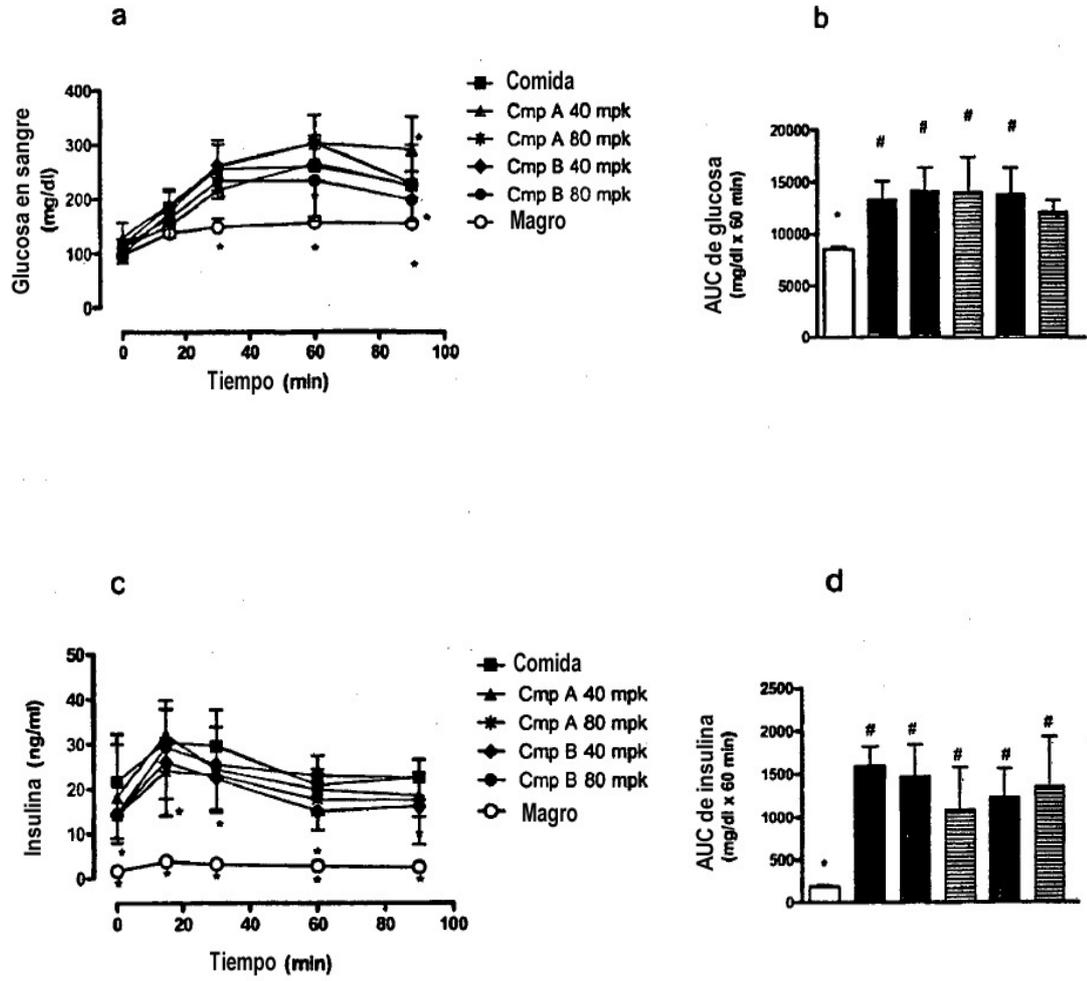


Figura 15

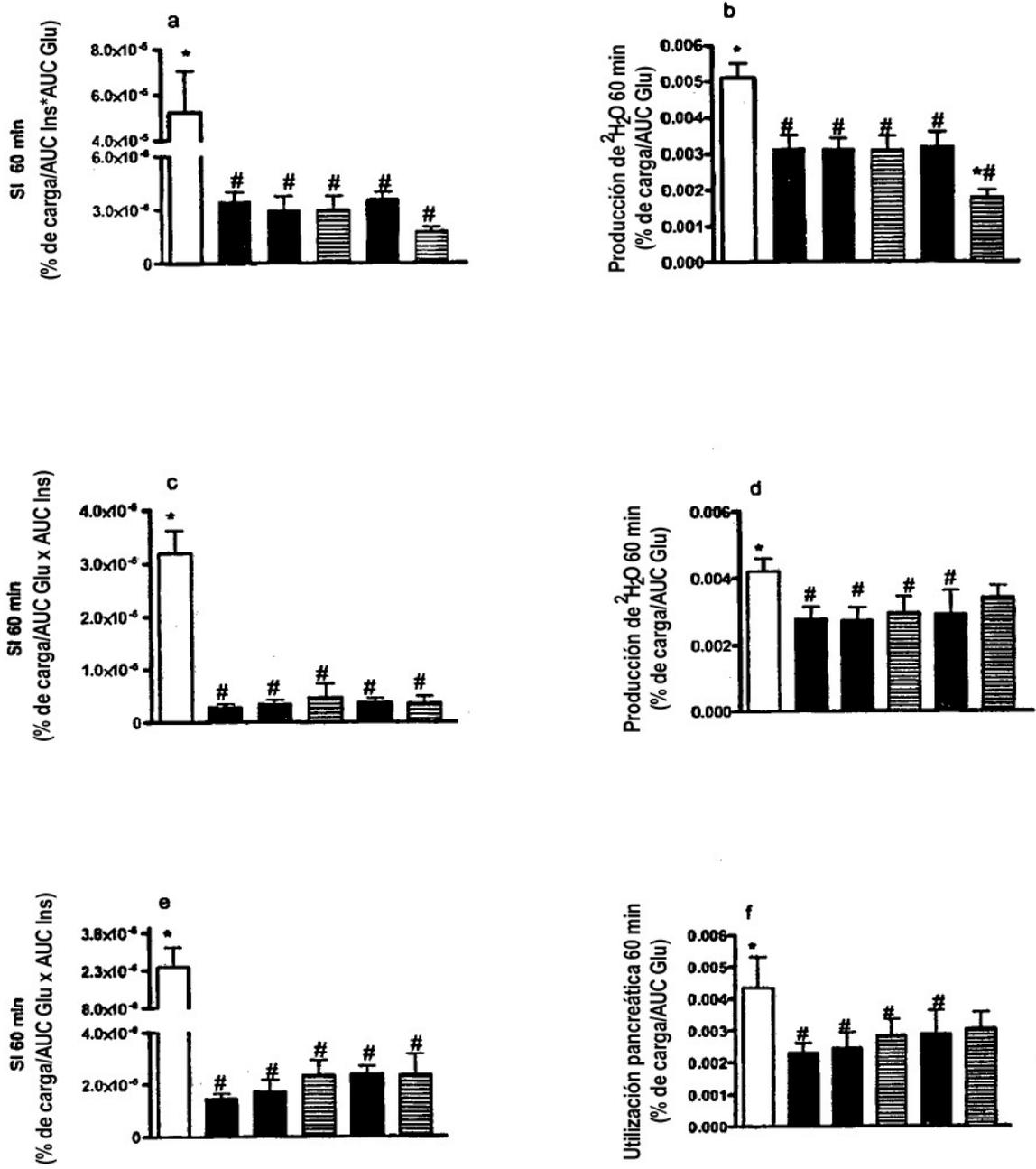


Figura 16