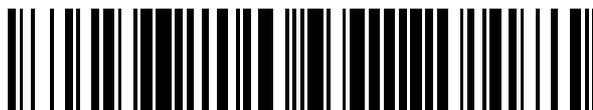


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 957**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4025 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/42 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10770393 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2424530**

54 Título: **Método y composición para el tratamiento de la cetoacidosis diabética**

30 Prioridad:

30.04.2009 US 174283 P

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

09.03.2016

73 Titular/es:

**MIDWESTERN UNIVERSITY (100.0%)
555 31st St.
Downers Grove, IL 60515, US**

72 Inventor/es:

GULATI, ANIL

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 562 957 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y composición para el tratamiento de la cetoacidosis diabética

5 **Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE.UU. N.º 61/174.283, presentada el 30 de abril de 2009.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de la cetoacidosis diabética usando un antagonista del receptor de la endotelina. Más particularmente, la presente invención se refiere a un antagonista de la endotelina A para su uso en el tratamiento de la cetoacidosis diabética.

15

Antecedentes de la invención

La diabetes afecta a 23,6 millones de personas cada año, con un coste total estimado de 174 mil millones de dólares. De ese coste, el 50 % está relacionado con la atención hospitalaria. La diabetes mellitus I (DMTI) insulino dependiente puede ser controlada mediante insulina exógena. Sin embargo, el control insuficiente de la DMTI, el fallo de la bomba de insulina para administrar insulina o antes de un diagnóstico de DMTI, las concentraciones de glucosa pueden elevarse drásticamente dando lugar a un trastorno denominado cetoacidosis diabética (CAD).

20

La CAD representa la mayor parte de las hospitalizaciones debido a la diabetes, especialmente en los niños y representa el 20 % de todas las muertes relacionadas con la diabetes (Krane, 1988). La CAD se caracteriza por hiperglucemia (concentraciones de glucosa en sangre superiores a 250 mg/dl), acidosis (pH inferior a 7,3) y la presencia de cetonas en la orina. Los pacientes suelen presentar deshidratación, como se demuestra por la hipotensión y disminución de la turgencia, la sed extrema debido a la alta osmolaridad de la sangre y en las últimas etapas, vómitos y dolor abdominal.

25

El diagnóstico de la CAD incluye la evaluación del nivel de consciencia, la medición en muestras de sangre o plasma de las concentraciones de glucosa, electrolitos, bicarbonato, pCO₂, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina, pH, hemoglobina y hematocrito (Wolfsdorf et al., 2007). También se realiza un análisis de orina para detectar cetonas y un ECG para detectar anomalías cardíacas debidas a la alteración de las concentraciones de iones potasio (K⁺) (Wolfsdorf et al., 2007). El tratamiento de la CAD incluye una corrección de la deshidratación mediante una solución salina normal (NaCl 0,9 %) durante más de cuarenta y ocho horas, una infusión de insulina a 0,1 U/kg/h y terapia cardiovascular y respiratoria de apoyo, según necesidad.

35

Aunque estos tratamientos son generalmente efectivos, aproximadamente el 0,5-3 % de los pacientes pediátricos desarrollan edema cerebral (EC), que tiene una tasa de mortalidad de hasta el 20 % (Krane, 1988). Por razones desconocidas, el EC solo se produce en los pacientes pediátricos. Determinados factores de riesgo están asociados con el desarrollo del EC, incluyendo una edad de menos de cinco años, acidosis grave tal como se define por un pH de menos de 7,1, bajo pCO₂ y BUN alto (Wolfsdorf et al., 2007). Una vez identificados por los síntomas de dolor de cabeza, bradicardia, cambios en el estado neurológico, hipertensión y disminución de la saturación de O₂, el tratamiento del EC inducido por la CAD debe comenzar inmediatamente (Vanelli y Chiarelli 2003; Lam et al., 2005). El tratamiento incluye manitol intravenoso 0,5-1 g/kg durante más de veinte minutos, la reducción de la administración de fluidos en una tercera parte, la administración de una solución salina hipertónica al 3 % (5-10 ml/kg durante más de treinta minutos), elevación de la cabecera de la cama y medidas de apoyo para mantener la respiración. Una vez remitido el EC, se debe realizar una TC para descartar secuelas neurológicas que puedan dar lugar a efectos a largo plazo, tales como déficits motores, del habla y del aprendizaje (Wolfsdorf et al., 2007).

50

Se desconoce cuál es el mecanismo para el desarrollo del EC, aunque se han propuesto varias hipótesis incluyendo un desequilibrio osmótico entre el cerebro y el plasma, el exceso de hidratación y la hiponatremia, la acidosis intracerebral inducida por terapia alcalina (bicarbonato) y alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral (Krane, 1988; Silver et al., 1997; Lam et al, 2005; Wolfsdorf et al, 2007; Yuen et al, 2008). Otra teoría posible es la implicación de la insulina rápida y la terapia de rehidratación que conduce al desarrollo de EC y sus complicaciones, incluyendo edema pulmonar neurogénico y efectos secundarios cardiovasculares perjudiciales, tales como la hipertensión y el aumento de la frecuencia cardíaca (Sherry y Levitsky, 2008).

60

La endotelina (ET), un péptido vasoconstrictor de veintinueve aminoácidos, provoca una amplia gama de actividades en el cuerpo. La ET contribuye a la regulación fisiológica de los sistemas cardíacos, pulmonar, renal y endocrino, así como al control del flujo sanguíneo a diversos órganos del cuerpo, como el cerebro. Existen tres isoformas de ET: ET-1, ET-2 y ET-3, cada una de las cuales se une a uno de los dos receptores acoplados a la proteína G, ET_A o ET_B (Yanagisawa et al, 1988a; Yanagisawa et al, 1988b; Gulati et al, 1997b). Todas las isoformas se unen con la misma afinidad a ET_B, el cual se localiza en las células endoteliales. ET_A también se une a todas las isoformas de ET; sin

65

embargo ET-1 y ET-2 se unen por igual y preferentemente sobre ET-3. Este subtipo de receptor se encuentra localizado en las células del músculo liso vascular (Said et al, 2005; Sasser et al., 2007).

Las tres isoformas actúan sobre los diferentes sistemas fisiológicos y los efectos de la ET-1 se han estudiado ampliamente en los estados diabéticos. Algunos estudios describen concentraciones más bajas de ET-1 en los niños con DMTI tratada en comparación con los controles no diabéticos, pero otros estudios muestran un aumento de ET-1 en pacientes con DMTI (Malamitsi-Puchner et al, 1996; Vázquez et al, 1999). Existen muchos datos contradictorios sobre el papel del aumento o disminución de la ET-1 y el desarrollo de las complicaciones asociadas con la DMTI, incluyendo la hipertensión, la nefropatía diabética y el ictus. Algunos estudios asocian las concentraciones elevadas de ET-1 con la hipertensión, la reducción de la función renal, la edad, y la duración del estado diabético, lo que sugiere que en estas complicaciones comunes que se observan en los pacientes diabéticos pueden estar implicados concentraciones elevadas de ET-1 (Haak et al., 1992). Sin embargo, otros estudios muestran una concentración elevada de ET-1 que no se correlaciona con la hipertensión y la duración de la enfermedad (Takahashi et al, 1990; Schneider et al, 2002). Se ha demostrado que la insulina, de manera exógena o endógena, aumenta las concentraciones de ET-1 (Kirilov et al, 1994; Morise et al, 1995; Ferri et al., 1996). Aunque los estudios de ET-1 en los estados diabéticos arrojan resultados contradictorios con respecto a si las concentraciones plasmáticas de ET-1 están aumentadas o disminuidas, está claro que la ET-1 tiene un efecto sobre la regulación de la insulina.

Además del sistema endocrino, la ET-1 tiene diversos efectos sobre el cerebro y la vasculatura cerebral porque el aumento de las concentraciones de ET-1 están asociadas con la vasoconstricción en el cerebro (Zhang et al., 2008). Varios estudios han demostrado que la isquemia cerebral resultante de un aumento en el tono de la vasculatura cerebral se correlaciona positivamente con un aumento de ET-1. El aumento de la presión intracraneal (PIC) también está asociado con altas concentraciones de ET-1, como se ve en los modelos de ictus de ratas. La administración de un agente de bloqueo de ET_A disminuye la PIC, lo que demuestra la existencia de una correlación directa entre el desarrollo de PIC y la ET (Lo et al., 2005). Además, los receptores ET_A ha mostrado un aumento de la actividad durante la hemorragia subaracnoidea, lo que provoca un aumento de la PIC (Lo et al., 2005). El bloqueo de estos receptores durante el aumento de la PIC tiene como resultado un efecto neuroprotector durante la isquemia cerebral (Zhang et al., 2008). De nuevo, esto es compatible con la observación de que ET, específicamente, la ET-1 y los receptores ET_A, están implicados en la mediación del flujo sanguíneo cerebral.

Las concentraciones elevadas de ET-1 también se han asociado con edema pulmonar neurogénico, que se pueden invertir con BQ123, un antagonista del receptor ET_A (Bonvallet et al., 1994). En las ratas inducidas con edema pulmonar neurogénico y los efectos secundarios resultantes, como acidosis metabólica, disminución de pO₂, aumento de pCO₂ e hipertensión sistémica, se observaron concentraciones elevadas de ET-1 durante un lavado broncoalveolar. Tras la administración de BQ123, la hipoxia y la hipercapnia mejoraron (Herbst et al., 1995). Otro estudio demostró que la inyección intratecal (IT) de ET-1 en ratas dio como resultado una vasoconstricción pulmonar intensa, edema pulmonar (EP) y en algunos casos la muerte. El pre-tratamiento con BQ123 impidió el edema pulmonar y redujo la tasa de mortalidad en un 50 % (Poulat y Couture, 1998). La modificación de las propiedades fisiológicas eléctricas en miocitos de rata con resultado de arritmias cardíacas se ha observado en ratas con DMTI inducida por estreptozocina (STZ) (Ding et al., 2006). Estos estudios apoyan la teoría de que el aumento de ET-1 está implicado tanto en el EC como en el EP y que la administración de un antagonista de ET reducirá sus efectos secundarios resultantes de hipertensión sistémica, hipercapnia e hipoxia.

Los antagonistas de ET se están utilizando actualmente en la investigación y en la aplicación clínica. Muchos antagonistas de ET utilizados en el ámbito de laboratorio, incluidos BQ-123, BMS-182874 y PD-156707, son antagonistas del receptor ET_A. BQ-788 y BQ-3020 son antagonistas de ET_B selectivos. TAK-044 es un antagonista no selectivo de ET, que bloquea los efectos tanto de los receptores ET_A como ET_B. Bosentan, un antagonista no selectivo de ET-1, bloquea los receptores ET_A y ET_B y actualmente está siendo utilizado para tratar la hipertensión pulmonar. Chakrabarti et al., 2000, es un artículo de revisión que resume los estudios previos y divulga el efecto de antagonistas de la endotelina en el tratamiento de diversas complicaciones de la diabetes distintas a la cetoacidosis diabética.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un antagonista de la endotelina A para su uso en el tratamiento de la cetoacidosis diabética. La presente memoria muestra la participación de la ET-1 en la CAD y muestra que un antagonista de ET se puede utilizar en un tratamiento mejorado para la CAD.

Un aspecto de la presente invención, por lo tanto, es proporcionar un antagonista de la endotelina A para su uso en el tratamiento de la cetoacidosis diabética, a la vez que se reduce la aparición o la gravedad de los efectos secundarios adversos y las complicaciones asociadas con los actuales tratamientos de la cetoacidosis diabética. En otra realización, un antagonista de la endotelina se administra en combinación con una segunda terapia para el tratamiento de la cetoacidosis diabética o la diabetes.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar un artículo manufacturado para su uso farmacéutico humano, que comprende (a) un prospecto con instrucciones para el tratamiento de la cetoacidosis diabética, (b) un

envase y (c) una composición envasada que comprende un antagonista de la endotelina.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención.

5

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 contiene gráficos de barras que muestran el peso corporal (en gramos) de ratas tratadas y no tratadas durante un periodo de tratamiento de cuatro días;

10

La Figura 2 contiene gráficos de barras que muestran el contenido de cetona sanguínea (en mg/dl) de ratas tratadas y no tratadas durante un periodo de tratamiento de cuatro días;

15

La Figura 3 contiene gráficos de la presión arterial media (mmHg) frente al tiempo para las ratas tratadas y no tratadas;

La Figura 4 contiene gráficos de la presión de pulso media (mmHg) frente al tiempo para las ratas tratadas y no tratadas;

20

La Figura 5 contiene gráficos de la frecuencia cardiaca (latidos/minuto) frente al tiempo para las ratas tratadas y no tratadas;

La Figura 6 contiene gráficos del cambio porcentual en la perfusión sanguínea cerebral frente al tiempo para las ratas tratadas y no tratadas;

25

La Figura 7 contiene gráficos de barras que muestran el contenido de agua pulmonar (%) para las ratas tratadas y no tratadas;

La Figura 8 contiene gráficos de barras que muestran el contenido de agua cerebral (%) para las ratas tratadas y no tratadas;

30

La Figura 9 contiene gráficos de barras que muestran (a) las concentraciones de ET-1 (pg/ml) debido a la inducción de la cetoacidosis diabética (Fig. 9A), (b) las concentraciones de ET-1 (pg/ml) como resultado de un tratamiento con insulina (Fig. 9B) y (c) el cambio porcentual en los resultados de las concentraciones de ET-1 de tres tratamientos diferentes (Fig. 9C).

35

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Para los fines de la invención divulgados en la presente memoria, el término "tratamiento" incluye la eliminación, reducción o mejora de la cetoacidosis diabética y de los síntomas asociados con la misma.

40

El término "envase" significa, por lo tanto, cualquier receptáculo y cierre adecuado para el almacenamiento, transporte, administración y/o manipulación de un producto farmacéutico.

45

El término "prospecto" significa la información que acompaña a un producto farmacéutico que proporciona una descripción de cómo administrar el producto, junto con los datos de seguridad y eficacia requeridos para que el médico, farmacéutico y el paciente puedan tomar una decisión informada acerca del uso del producto. El prospecto es considerado generalmente como la "etiqueta" de un producto farmacéutico.

50

La ET es un factor de vasoconstricción derivado del endotelio extremadamente potente (Hickey et al., 1985) que fue aislado, secuenciado y clonado (Yanagisawa et al., 1988). Las endotelinas son péptidos vasoconstrictores constituidos por 21 aminoácidos muy potentes que tienen dos enlaces disulfuro. Las endotelinas se producen biológicamente por escisión enzimática de la preproendotelina en proendotelina y posteriormente en endotelina por las enzimas convertidoras de endotelina. La ET ejerce efectos biológicos mediante la unión a receptores de superficie celular, que son 7 receptores transmembrana acoplados a proteínas G. Hay dos tipos distintos de receptores de endotelina: (a) los receptores ET_A selectivos de la ET-1 que se encuentran principalmente en el músculo liso vascular y que son responsables de la vasoconstricción y (b) los receptores ET_B no selectivos que se encuentran principalmente en el endotelio vascular y son responsables de la vasodilatación.

55

60

Los efectos vasoconstrictores de la ET-1 están mediados predominantemente por los receptores ET_A acoplados a la proteína G. La ET-1 también se produce en altas concentraciones por la próstata, en los cánceres metastásicos y en el SNC. La ET en el SNC es producida por células endoteliales y células no endoteliales, tales como neuronas, astrocitos y células gliales.

65

La distribución global de la ET y de sus sitios de unión en el cerebro sugiere que, además de ser un vasoconstrictor, la ET puede actuar como un neuropéptido importante en el SNC (Gulati et al., 1992). Los antagonistas del receptor

de la endotelina (ET), en particular los antagonistas selectivos de ET_A o los antagonistas equilibrados de ET_A/ET_B, representan un área terapéutica para enfermedades, como la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) y la hipertensión pulmonar. BQ-123 y BMS-182874 son antagonistas específicos de los receptores ET_A (Stein et al., 1994). Los antagonistas de la endotelina tienen profundos efectos sobre la vasculatura pulmonar y el corazón derecho, mientras que los inhibidores de la ECA afectan principalmente el vaso periférico y al corazón izquierdo.

Varios estudios indican que los receptores centrales de ET son predominantemente del subtipo ET_B. Se ha observado que los astrocitos cerebrales de rata expresan principalmente el tipo ET_B de receptores y también se ha observado que las células gliales expresan intensamente el ARNm del receptor ET_B. Sin embargo, la administración central de un agonista del receptor ET_B altamente selectivo, IRL-1620, no produce ningún efecto sobre el sistema cardiovascular, habiéndose demostrado que los efectos circulatorios sistémicos y regionales de la administración central de ET-1 están mediados a través de los receptores ET_A (Gulati et al., 1995; Rebello et al., 1995).

La administración intracerebroventricular de ET-1 produce un aumento transitorio seguido por una caída sostenida de la presión arterial (PA) media. El efecto presor fue acompañado por un aumento en la actividad del nervio simpático renal y de las concentraciones plasmáticas de catecolaminas y arginina-vasopresina.

También se ha demostrado que los efectos de la administración central de ET-1 están mediados a través de la activación del sistema nervioso simpático, ya que estos efectos se vieron atenuados por los bloqueadores ganglionares. La administración intracisternal de ET-1 provocó un aumento transitorio de la presión arterial, de la actividad del nervio simpático renal y de la actividad del nervio frénico. Una posterior reducción de la presión arterial estuvo acompañada de una disminución de la actividad nerviosa simpática renal y de la actividad del nervio frénico. La observación de que el aumento inducido por ET-1 en la respuesta presora era suprimida mediante el pretratamiento con fenoxibenzamina (Ouchi et al., 1989), implica además la participación activa del sistema nervioso simpático en la fase presora inicial.

Un antagonista de la endotelina utilizado en la presente invención puede ser cualquiera de los antagonistas del receptor de la endotelina conocidos en la técnica. La endotelina es un potente vasoconstrictor. Los antagonistas de la endotelina se utilizan para tratar la insuficiencia cardíaca aguda, la insuficiencia cardíaca congestiva/crónica, la hipertensión arterial pulmonar, el edema pulmonar, la hemorragia subaracnoidea, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el infarto de miocardio, la isquemia cerebral aguda, los síndromes coronarios agudos, la insuficiencia renal aguda, el tratamiento post-operatorio en las operaciones de hígado y el cáncer de próstata. No se esperan efectos adversos cuando a un paciente sano se le administra un antagonista de la endotelina.

En una realización, los antagonistas de ET preferidos son selectivos para los receptores de endotelina A (ET_A) o para los antagonistas equilibrados de la ET_A/endotelina B (ET_B). Tales antagonistas de la ET se exponen en los Apéndices A y B de la presente memoria, respectivamente. Los antagonistas de la endotelina B y los diversos antagonistas de la endotelina, se exponen en los Apéndices C y D de la presente memoria.

Otros antagonistas de la endotelina adicionales se pueden encontrar en las Publicaciones de solicitud de patente de los EE.UU. N.º 2002/0082285 y N.º 2003/0232787 y en Wu, Exp. Opn. Ther. Patents, 10(11):1653-1668 (2000).

Los ejemplos específicos de antagonistas de la endotelina útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, atrasentán, tezoseptán, bosentán, sitaxsentán, enrasentán, BMS-207940 (Bristol-Myers Squibb), BMS-193884, BMS-182874, J-104132 (Banyu Pharmaceutical), VML 588/Ro 61-1790 (Vanguard Medica), T-0115 (Tanabe Seiyaku), TAK-044 (Takeda), BQ-788, BQ123, YM-598, LU 135252, PD 145065, A-127722, ABT-627, A-192621, A-182086, TBC3711, BSF208075, S-0139, TBC2576, TBC3214, PD156707, PD180988, ABT-546, ABT-627, Z1611, RPR118031A, SB247083, SB217242, S-Lu302872, TPC10950, SB209670 y mezclas de los mismos.

BQ123 es un antagonista específico de la endotelina A y es la sal sódica del ciclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu). BQ-788 es un antagonista específico de la endotelina B y es la sal sódica del N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-gamma-metilleucil-D-1-metoxicarbonil-triptofanilo-DNle (ver Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, pp. 4892-4896 (1994)).

Además de un antagonista de la endotelina convencional, en la presente invención también se puede utilizar como el antagonista de la endotelina un compuesto que inhibe la formación de endotelina. Tales compuestos son útiles ya que impiden la formación de endotelina, y, por lo tanto, disminuyen la actividad de los receptores de endotelina. Una clase de tales compuestos son los inhibidores de la enzima convertidora de endotelina (ECE).

Inhibidores de la ECE útiles incluyen, pero no se limitan a, CGS34225 (es decir, N-((1-((2(S)-(acetiltio)-1-oxopentil)amino)-1-ciclopentil)carbonil-S-4 fenilfenil-alanina, éster metílico) y fosforamidón (es decir, N-(a-ramnopiranosiloxihidroxifosfinil)-Leu-Trp).

Uno o más antagonistas de endotelina se pueden administrar solos para el tratamiento de la cetoacidosis diabética o conjuntamente con otras terapias para la diabetes y la cetoacidosis diabética, como insulina, electrolitos, bicarbonato sódico, un diurético, bumetanida, manitol y/o solución salina hipertónica. El antagonista de la endotelina también se puede administrar con la terapia de fluidos para el tratamiento de la cetoacidosis diabética. El antagonista de la

endotelina se puede administrar antes, después o simultáneamente con insulina, electrolitos, bicarbonato sódico, diurético, bumetanida, manitol y/o solución salina hipertónica.

5 Las pruebas y los datos presentados en la presente memoria muestran que un antagonista de la endotelina se puede administrar a mamíferos en métodos de tratamiento de la cetoacidosis diabética. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “antagonista de la endotelina” significa uno o más antagonistas de la endotelina, es decir, la presente invención abarca la administración de un solo antagonista de la endotelina o de una mezcla de antagonistas de la endotelina. El antagonista de la endotelina puede ser formulado en excipientes adecuados para administración oral o para administración parenteral. Dichos excipientes son bien conocidos en la técnica. Un antagonista de la endotelina está presente generalmente en una composición de este tipo en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 75 % en peso.

15 Las composiciones farmacéuticas que contienen el antagonista de la endotelina son adecuadas para la administración a seres humanos u otros mamíferos. Generalmente, las composiciones farmacéuticas son estériles, y no contienen compuestos tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos que podrían causar una reacción adversa cuando se administran.

20 La invención se puede realizar usando el antagonista de la endotelina descrito anteriormente, o como una sal fisiológicamente aceptable o solvato del mismo. El antagonista de la endotelina, sales o solvatos se pueden administrar como compuestos puros o como una composición farmacéutica que contiene cualquiera o ambas entidades.

25 El antagonista de la endotelina se puede administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo por administración oral, bucal, inhalación, sublingual, rectal, vaginal, intracisternal a través de punción lumbar, transuretral, nasal, percutánea, es decir, transdérmica, o parenteral (incluyendo intravenosa, intramuscular, subcutánea e intracoronaria). La administración parenteral se puede realizar utilizando una aguja y una jeringa o utilizando una técnica de alta presión, como POWDERJECT™. La administración del antagonista de LA endotelina se puede realizar antes, durante o después de la aparición del dolor.

30 Las composiciones farmacéuticas incluyen aquellas en las que el antagonista de la endotelina se administra en una cantidad eficaz para conseguir su propósito previsto. Más específicamente, una “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad eficaz para aliviar o eliminar la cetoacidosis diabética y los síntomas asociados con la misma. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en la presente memoria.

35 Una “dosis terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad del antagonista de la endotelina que consigue lograr el efecto deseado. La toxicidad y la eficacia terapéutica del antagonista de la endotelina se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, determinando la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que se expresa como la relación entre DL₅₀ y DE₅₀. Se prefiere un alto índice terapéutico. Los datos obtenidos se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación del antagonista de la endotelina se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

50 La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación las determina un médico a la vista del trastorno del paciente. Las cantidades a administrar y los intervalos pueden ajustarse individualmente para proporcionar una concentración de antagonista de la endotelina que es suficiente para mantener los efectos terapéuticos o profilácticos.

La cantidad de antagonista de la endotelina administrada depende del sujeto a tratar, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la manera de administración y el juicio del médico prescriptor.

55 Específicamente, para la administración a un ser humano en el tratamiento curativo de la cetoacidosis diabética, las dosis orales de un antagonista de la endotelina es generalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg diarios para un paciente adulto medio (70 kg), por lo general divididos en dos a tres dosis por día. Por lo tanto, para un paciente adulto típico, los comprimidos o cápsulas individuales contienen de 0,1 a 50 mg de antagonista de la endotelina, en un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable para la administración en dosis únicas o múltiples, una o varias veces por día. Las dosis para administración intravenosa, bucal o sublingual son generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg por dosis única según se requiera. En la práctica, el médico determina la pauta posológica real que sea más adecuada para un paciente individual y la dosis varía con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosis anteriores son ilustrativas del caso más común, pero puede haber casos individuales en los que se requieran dosis mayores o menores y tales están dentro del alcance de esta invención.

El antagonista de la endotelina se puede administrar solo, o en mezcla con un vehículo farmacéutico seleccionado con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención por lo tanto se pueden formular de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento del antagonista de la endotelina en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente.

Estas composiciones farmacéuticas se pueden fabricar de una manera convencional, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida. Cuando se administra oralmente una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de la endotelina, la composición normalmente está en forma de un comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición puede contener adicionalmente un vehículo sólido, tal como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, la cápsula y el polvo contienen de 5 % a 95 % de un antagonista de la endotelina de la presente invención y preferiblemente del 25 % al 90 % de un antagonista de la endotelina de la presente invención. Cuando se administra en forma líquida, se puede añadir un vehículo líquido, tal como agua, petróleo o aceites de origen animal o vegetal. La forma líquida de la composición puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otras soluciones de sacáridos o glicoles. Cuando se administra en forma líquida, la composición contiene de 0,5 % a 90 % en peso de un antagonista de la endotelina y preferiblemente de 1 % a 50 % de un antagonista de la endotelina.

Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de la endotelina se administra por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la composición está en la forma de una solución acuosa libre de pirógenos, parenteralmente aceptable. La preparación de tales soluciones parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH, isotonicidad, estabilidad y similares, está dentro de la experiencia en la técnica. Una composición preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea contiene generalmente, además de un compuesto de la presente invención, un vehículo isotónico.

Un antagonista de la endotelina se puede combinar fácilmente con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que el antagonista de la endotelina se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para su uso oral pueden obtenerse mediante la adición del antagonista de la endotelina con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, cargas y preparaciones de celulosa. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes.

El antagonista de la endotelina se puede formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación, tales como de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas del antagonista de la endotelina en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones del antagonista de la endotelina se pueden preparar, dado el caso, como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos o ésteres de ácidos grasos sintéticos. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos y permiten la preparación de soluciones muy concentradas. Alternativamente, la presente composición puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

El antagonista de la endotelina también se puede formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales. Además de las formulaciones descritas previamente, el antagonista de la endotelina también puede ser formulado como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, el antagonista de la endotelina se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

En particular, el antagonista de la endotelina se puede administrar por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos que contienen excipientes, tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión. Un antagonista de la endotelina también se puede inyectar parenteralmente, por ejemplo, por vía

intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intracisternal o intracoronaria. Para la administración parenteral, el antagonista de la endotelina se utiliza mejor en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o monosacáridos, tales como manitol o glucosa, para hacer la solución isotónica con la sangre.

5 Para su uso veterinario, el antagonista de la endotelina se administra como una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente la pauta posológica y la vía de administración que sea más apropiada para un animal particular.

10 Se ha descubierto que el uso de un antagonista de la endotelina en combinación con insulina proporciona un tratamiento eficaz para la cetoacidosis diabética que evita los efectos adversos y las complicaciones asociadas con los actuales tratamientos actuales para la cetoacidosis diabética.

15 Se ha estudiado la implicación de la endotelina (ET) en un modelo de CAD en rata. La CAD fue producida por inyección intraperitoneal de estreptozotocina (150 mg/kg). La glucosa en sangre y las cetonas se incrementaron significativamente y el pH se redujo en el día 4, lo que indica el desarrollo de la cetoacidosis diabética. Todos los experimentos se llevaron a cabo en el día 4. Se determinó el peso corporal, glucosa en sangre, cetona urinaria, cetonas en sangre, gases en sangre arterial, electrolitos en sangre, presión arterial media, presión de pulso, frecuencia cardíaca, perfusión sanguínea cerebral, contenido de agua cerebral y pulmonar antes y después de los
20 siguientes tratamientos: no diabéticas no tratadas (control); diabéticas no tratadas (control positivo); diabéticas tratadas con solución salina; diabéticas tratadas con solución salina + insulina y diabéticas tratadas con BMS-182874 (antagonista del receptor ET_A) + solución salina + insulina. Un antagonista del receptor ET_A, BMS-182874, produjo una mejora en el pH de la sangre arterial (de 6,82 ± 0,02 a 6,91 ± 0,02), en las concentraciones sanguíneas de K⁺ (de 4,21 ± 0,33 a 2,75 ± 0,27 mmol/dl) y de las concentraciones de lactato en sangre (de 2,74 ± 0,64 a 1,57 ±
25 0,20 mg/dl). BMS-182874 también impidió el desarrollo de hipertensión inducida por la insulina y el aumento de la perfusión sanguínea cerebral. Los resultados muestran que los antagonistas de la endotelina, como los antagonistas del receptor ET_A son de uso terapéutico en el tratamiento de la cetoacidosis diabética.

30 **Materiales y métodos**

Animales

Ratas macho Sprague-Dawley con un peso de 300 a 350 g (Harlan, Indianapolis, IN) se alojaron durante al menos 4 días antes de ser usadas en una habitación con temperatura controlada (23 ± 1 °C), humedad (50 ± 10 %) y luz (6:00 AM a 6:00 PM). El alimento y el agua estaban disponibles de forma continua. El cuidado de los animales y el uso de los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (IACUC). Todos los procedimientos quirúrgicos y anestésicos estaban en conformidad con las directrices establecidas por el Comité de Cuidado de Animales.

40 *Medicamentos y sustancias químicas*

Estreptozotocina, uretano (Sigma-Aldrich St Louis, MO, EE.UU.); BMS-182874 clorhidrato (clorhidrato de 5-dimetilamino)-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1-naftaleno sulfonamida) y BQ123 Ciclo(D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu) un antagonista específico de ET_A (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, EE.UU.); endotelina-1 (Research Biochemicals International, Natick, MA, EE.UU.) y el kit de ensayo inmunométrico enzimático (EIA) de endotelina-1 (N.º de catálogo 900-020A, Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI, EE.UU.). Otros reactivos utilizados fueron de la más alta calidad disponible comercialmente.

50 **Inducción de la cetoacidosis diabética (CAD)**

Ratas Sprague Dawley normotensas se mantuvieron en ayunas durante 2 horas con acceso ilimitado al agua. Después de 2 horas de ayuno, se inyectó a las ratas por vía intraperitoneal 150 mg/kg de estreptozotocina en ácido cítrico 0,05 mol/l, pH 4,3 para inducir la diabetes (Lam et al, 2005; Yuen et al, 2008), mientras que las ratas no diabéticas recibieron una inyección intraperitoneal de tampón citrato 0,05 mol/l (Lam et al, 2005; Yuen et al., 2008).
55 Las ratas tuvieron libre acceso al agua corriente y a la comida. Las ratas se pesaron todos los días y las concentraciones de cetona en orina se estimaron mediante tiras reactivas de orina, parámetro 1K. Antes de la inyección de estreptozotocina o de tampón citrato, se evaluaron las concentraciones de glucosa en sangre basales mediante tiras para la medición de glucosa sanguínea One Touch Ultra de LifeScan, Milpitas, CA y las concentraciones de cetonas sanguíneas basales se estimaron utilizando el analizador de cetonas sanguíneas CardiocheK. La glucosa sanguínea y las cetonas se midieron de nuevo el día tres y cuatro para asegurar la aparición de hiperglucemia y cetoacidosis. Las concentraciones significativamente elevadas de (1) cetonas en la orina (> 160 mg/dl), (2) cetonas en sangre (> 20 mg/dl) y (3) glucosa en sangre (> 400 mg/dl) desarrolladas al cuarto día de la inyección de estreptozotocina indican el desarrollo de cetoacidosis diabética (CAD) en ratas. Se extrajeron muestras de sangre de la vena femoral para determinar la lectura basal antes de comenzar el tratamiento, después de la
65 primera hora de tratamiento y posteriormente, al final del tratamiento (quinta hora del experimento).

Determinación de los gases en sangre

Se controló el pH arterial de la sangre, pO₂, pCO₂, Na⁺, K⁺, lactato y hematocrito antes de, después de una hora y al final del tratamiento. Las muestras de sangre fueron extraídas de la cánula arterial utilizando jeringas para el muestreo de gases en sangre (Innovative Medical Technologies, Inc. Leawood, KS) y se analizaron utilizando una unidad GEM Premier 3000 (Instrument Laboratory, Lexington, MA). Las muestras de sangre fueron extraídas de la arteria femoral para determinar la lectura basal antes de comenzar el tratamiento, después de la primera hora de tratamiento, y posteriormente, al final del tratamiento (quinta hora del experimento).

Determinación de la perfusión sanguínea cerebral

Se perforó un agujero de trépano en el cráneo de la rata aproximadamente 2 milímetros (mm) a la izquierda de la línea media, teniendo cuidado de no afectar al propio tejido cerebral. Se midió la perfusión cerebrovascular a través de una sonda de fibra óptica (PF407) aplicada a la superficie del cerebro de la rata. La sonda se conectó a una unidad Periflux PF2b 4000 Laser Doppler Flowmetry (Perimed, Estocolmo, Suecia). La perfusión se determinó midiendo el paso de eritrocitos a través de los capilares.

Determinación de los parámetros cardiovasculares

Las ratas se anestesiaron con uretano (1,5 g/kg i.p.) y se prepararon para la determinación de los parámetros hemodinámicos (Gulati et al., 1997a.; Gulati et al, 1997b). Las ratas anestesiadas se rasuraron y se inmovilizaron para preparar la canulación. Se hizo una incisión de 2-3 centímetros (cm) por encima de la vena femoral y la arteria y los vasos se diseccionaron y se limpiaron. La vena femoral izquierda se canuló (tubos PE-50, Clay Adams, Parsipanny, NJ) y se fijaron para la administración del fármaco. Se insertó un transductor de la presión ultraminiatura SPR-320 (poliuretano 2F), con un único sensor de presión montado en la punta (Millar Instruments, Houston, TX) en la arteria femoral izquierda para adquirir las señales hemodinámicas. El transductor de presión se conectó al puente amplificador (ML221 Bridge Amp; AD Instruments, Mountain View, CA, EE.UU.) con el conector Viking (AEC-10C) y las señales se adquirieron de forma continua a una velocidad de muestreo de 1000 S⁻¹ utilizando el sistema de adquisición de datos Millar PowerLab 16/30 (AD Instruments, Mountain View, CA, EE.UU.). La presión arterial media (PAM), la frecuencia cardíaca (FC) y la presión de pulso (PP) se determinaron y se analizaron con el programa de software LabChart-5.00 (Millar Instruments). Después de finalizado el experimento, los animales fueron sacrificados con una alta dosis de uretano (3 g/kg).

Determinación del contenido de agua cerebral y pulmonar

El contenido de agua en el pulmón y el cerebro se determinó para evaluar el edema cerebral y pulmonar. La evaluación del contenido de agua cerebral y pulmonar se llevó a cabo como sigue. Al final del tratamiento, el animal fue sacrificado y la tráquea se ató inmediatamente y, a continuación, los pulmones se diseccionaron. El cráneo se abrió y el cerebro se diseccionó. El cerebro y los pulmones se lavaron con solución salina y se pesaron (peso húmedo). El cerebro y los pulmones se mantuvieron para el secado en un horno a una temperatura de 60 °C durante 72 horas, después se pesaron de nuevo (peso seco). El contenido de agua en porcentaje se calculó utilizando la fórmula: [(peso húmedo - peso seco)/peso húmedo x 100].

Determinación de la concentración de ET-1 en plasma

Con el fin de analizar el cambio en la concentración plasmática de ET-1 durante el tratamiento, se extrajeron muestras de sangre a través de la arteria femoral derecha de las ratas antes y al final del experimento y se recogieron en tubos EDTA refrigerados (1 mg/ml de sangre) que contiene aprotinina (500 KUI/ml de sangre). Las muestras de sangre se centrifugaron a 1600 x g durante 15 minutos a 0 °C y el plasma separado se conservó a -70 °C hasta su análisis. La concentración de ET-1 se estimó utilizando el Kit de ensayo inmunométrico enzimático de endotelina-1 de Assay Design (Nowicki et al, 2005; Brondani et al., 2007). Brevemente, se añadieron muestras de plasma y patrones a los pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal específico de ET-1. La placa se lavó luego después de 24 horas de incubación, dejando solo unido ET-1 en la placa. A continuación se añadió una solución de anticuerpo monoclonal marcado con peroxidasa de rábano (HRP) contra ET-1, el cual se une a la ET-1 capturada en la placa. La placa se incubó durante 30 min, a continuación se lavó para eliminar el exceso de anticuerpo marcado con HRP. Se añadió una solución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que genera un color azul cuando se catalizaba por la HRP. Se añadió ácido clorhídrico (1 N) para parar la reacción del sustrato y el color amarillo resultante se leyó a 450 nm usando un detector DTX 800 multimodo. Los datos se analizaron con el software de detección multimodo (Beckman Coulter, Fullerton, CA). La densidad óptica medida es directamente proporcional a la concentración de ET-1 en cualquiera de los patrones/plasma. Las muestras de sangre de todos los grupos se recogieron antes del comienzo y al final del tratamiento.

Diseño del estudio

Los animales se dejaron estabilizar durante al menos 20 minutos después de los procedimientos quirúrgicos. Se determinó el peso corporal, glucosa en sangre, cetonas urinarias, cetonas en sangre, gases en sangre arterial,

electrolitos en sangre, presión arterial media, presión de pulso, frecuencia cardíaca, perfusión sanguínea cerebral, contenido de agua cerebral y pulmonar en los siguientes grupos

5 Grupo 1: No diabéticas no tratadas (No D-no tratadas): A las ratas se les inyectó tampón citrato (1 ml/kg ip) el día uno y los estudios se realizaron el día cuatro.

Grupo 2: Diabéticas no tratadas (D-no tratadas): Las ratas fueron inyectadas con estreptozotocina en tampón citrato (150 mg/kg ip) para inducir la diabetes y la cetoacidosis. A las ratas no se les dio ningún tratamiento.

10 Grupo 3: Diabéticas tratadas con solución salina (D-Tratadas con solución salina): Las ratas fueron inyectadas con estreptozotocina en tampón citrato (150 mg/kg ip) para inducir la diabetes y la cetoacidosis. Las ratas se trataron con solución salina. La solución salina se infundió mediante el uso de una bomba de infusión (Bomba de infusión/extracción Harvard Apparatus, Millis, MA) a través de la vena femoral canulada con solución salina (NaCl 0,9 %; Hospira, Incorporated, Lake Forest, IL) a 80 ml/kg/h durante una hora. Durante las siguientes dos a cuatro horas, a las ratas se les administró solución salina a 40 ml/kg/h (Yuen et al., 2008).

15 Grupo 4: Diabéticas tratadas con solución salina/insulina (D-Tratadas con solución salina+insulina): Las ratas fueron inyectadas con estreptozotocina en un tampón citrato (150 mg/kg ip) para inducir diabetes y cetoacidosis. Al tercer día, las ratas fueron tratadas con 1,5 U/kg de insulina regular (Humulin® R (insulina regular humana, origen ADNr). Al cuarto día, se llevó a cabo el tratamiento con solución salina e insulina. A las ratas se les infundió a través de la vena femoral canulada solución salina, NaCl al 0,9 % a 80 ml/kg/h y 1,5 U/kg/h de insulina regular durante una hora. Durante las siguientes dos a cuatro horas, las ratas fueron infundidas con solución salina, NaCl al 0,9 % a 40 ml/kg/hora y 1,5 U/kg/h de insulina regular (Yuen et al., 2008).

20 Grupo 5: Diabéticas tratadas con BMS-182874/solución salina/insulina (D-Tratadas con BMS+solución salina+insulina): Las ratas fueron inyectadas con estreptozotocina en un tampón citrato (150 mg/kg ip) para inducir diabetes y cetoacidosis. Al tercer día, las ratas se trataron con 1,5 U/kg de insulina regular. En el cuarto día, a las ratas se les administró una dosis de bolo de antagonista selectiva del receptor ET_A, BMS-182874 (9 mg/kg), a continuación, se llevó a cabo el tratamiento con solución salina e insulina. A las ratas se les infundió a través de la vena femoral canulada solución salina, NaCl al 0,9 % a 80 ml/kg/h y 1,5 U/kg/h de insulina regular durante una hora. Durante las siguientes dos a cuatro horas las ratas fueron infundidas con solución salina, NaCl al 0,9 % a 40 ml/kg/hora y 1,5 U/kg/h de insulina regular.

25 Grupo 6: Diabéticas tratadas con BQ123/solución salina/insulina (D-Tratadas con BQ+solución salina+insulina): Igual que para el Grupo 5, excepto que BQ123 (1 mg/kg de peso corporal) se utiliza como un sustituto de BMS-182874 (9 mg/kg).

30 Los datos se presentan como media ± EEM. La significación de las diferencias se estimó por análisis de varianza (comparación intra-grupo con respecto a los datos de línea de base) unilateral y análisis de la varianza bilateral (comparación inter-grupo con respecto a los correspondientes puntos temporales de cada grupo), seguido de la aplicación de las comparaciones múltiples de Dunnett y la prueba de Bonferroni respectivamente. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró significativo. El análisis estadístico fue procesado con el software GraphPad Prism versión 5.00.

45 Resultados

La Tabla 1 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre las concentraciones de glucosa en sangre (mg/dl) en varios grupos de ratas.*P<0,05 en comparación con el día 1 y # P<0,05 en comparación con el pretratamiento del día 4. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina aumentó las concentraciones de glucosa en sangre, y que el tratamiento con insulina produjo una disminución significativa de la glucosa en sangre. También se observó que los procedimientos quirúrgicos aumentaron significativamente las concentraciones de glucosa en sangre. El tratamiento con BMS-182874 o BQ123 no afectó significativamente a la glucosa en sangre.

Grupos de estudio	Día 1	Día 3	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (final del trat)
ND-No tratadas (N = 4)	86 ± 2	94 ± 1	97 ± 3	258 ± 66	223 ± 51
D-No tratadas (N = 5)	94 ± 3	404 ± 8*	525 ± 20	523 ± 25*	521 ± 20*
D-Sol. salina (N = 5)	85 ± 3	369 ± 10*	480 ± 27	383 ± 23*	344 ± 21*
D-Sol. salina + Insulina (N = 5)	92 ± 6	428 ± 10*	530 ± 20	444 ± 26*	200 ± 20*#
D-BMS + Sol. salina + Insulina (N = 7)	87 ± 3	429 ± 12*	522 ± 18*	446 ± 36*	263 ± 32*#
D-BQ123 + Sol. salina + Insulina (N = 5)	94 ± 5	434 ± 19*	484 ± 17*	462 ± 55*	312 ± 55*#

55 La Tabla 2 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento de las concentraciones de cetona en sangre (mg/dl) en varios grupos de ratas.*P<0,05 en comparación con el día 1 y # P<0,05 en comparación

con el pretratamiento del día 4. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina aumentó las concentraciones de cetona en sangre, y que el tratamiento con insulina con y sin BMS-182874/BQ123 produjo una disminución significativa de las cetonas en sangre. El tratamiento con BMS-182874 no afectó significativamente a las cetonas en sangre. El tratamiento con BQ123 afectó significativamente a las cetonas en sangre. Véase la Figura 2.

5

Grupos de estudio	Día 1	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (final del trat)
ND-No tratadas (N = 8)	3,16 ± 0,25	3,47 ± 0,34	4,43 ± 0,49
D-No tratadas (N = 5)	2,86 ± 0,16	37,28 ± 1,39*	33,62 ± 2,66*
D-Sol. salina (N = 5)	2,76 ± 0,30	41,64 ± 2,27*	32,04 ± 4,16*
D-Sol. salina + Insulina (N = 4)	2,65 ± 0,27	31,925 ± 5,28*	12,8 ± 4,04*#
D-BMS + Sol. salina + Insulina (N = 7)	2,85 ± 0,19	31,01 ± 2,29*	14,65 ± 2,70*#
D-BQ123 + Sol. salina + Insulina (N = 4)	2,9 ± 0,25	28,22 ± 3,14*	5,2 ± 0,36*#

La Tabla 3 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre las concentraciones de cetonas en orina (mg/dl) en varios grupos de ratas. *P<0,05 en comparación con el día 1. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina aumentó las concentraciones de cetona en orina. Debido a que las cetonas en orina se determinaron antes del inicio de cualquier tratamiento, en este estudio no se observó el efecto del tratamiento.

10

Grupos de estudio	Día 1	Día 3	Día 4 (pre-trat)
ND-No tratadas (N = 8)	3,125 ± 0,91	3,75 ± 0,81	4,37 ± 0,62
D-No tratadas (N = 5)	2,00 ± 1,22	160 ± 0*	160 ± 0*
D-Sol. salina (N = 5)	3,00 ± 1,22	160 ± 0*	160 ± 0*
D-Sol. salina + Insulina (N = 4)	6,00 ± 0,00	104 ± 19,64*	160 ± 0*
D-BMS + Sol. salina + Insulina (N = 7)	6,42 ± 1,12	125,71 ± 16,13*	160 ± 0*
D-BQ123 + Sol. salina + Insulina (N = 5)	3,00 ± 1,03	80 ± 0*	160 ± 0*

La Tabla 4 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre las concentraciones plasmáticas de ET-1 (pg/ml) en varios grupos de ratas. *P <0,05 en comparación con el pretratamiento y #P<0,05 en comparación con el grupo No-D-No tratadas. Se puede concluir que (1) la inducción de la cetoacidosis diabética y (2) el tratamiento con insulina aumentó las concentraciones plasmáticas de ET-1. También se observó que los procedimientos quirúrgicos aumentaron significativamente las concentraciones plasmáticas de ET-1. El tratamiento con BMS-182874 o BQ123 no afectó significativamente a la concentración plasmática de ET-1.

15

20

Grupos de estudio	Día 4 (pre-tratamiento)	Día 4 (fin del tratamiento)
No D-No tratadas	6,79 ± 1,77	14,94 ± 2,22*
D-No tratadas	9,15 ± 1,03#	17,82 ± 2,02*
D-Tratadas con Sol. salina	8,34 ± 0,65	11,86 ± 1,04*
D-Tratadas con Sol. salina/Insulina	11,76 ± 1,94#	22,17 ± 2,7*#
D-Tratadas con BMS/Sol. salina/Insulina	11,93 ± 2,01#	20,40 ± 3,23*#
D-Tratadas con BQ123/Sol. salina/Insulina	15,78 ± 4,11#	26,53 ± 5,52*#

La Tabla 5 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre el pH de la sangre arterial en varios grupos de ratas. *P <0,05 en comparación con ratas no diabéticas no tratadas y #P<0,05 en comparación con ratas diabéticas tratadas con solución salina+insulina. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina redujo el pH, lo que indica el desarrollo de acidosis severa. El tratamiento con solución salina o solución salina + insulina no produjo ninguna mejora significativa en la acidosis. Sin embargo, el tratamiento con BQ123 o BMS-182874 + solución salina + insulina produjo una mejora significativa en el pH de la sangre arterial. Los resultados indican que un antagonista del receptor ET_A, por ejemplo, BMS-182874 o BQ123, se puede utilizar para mejorar la acidosis durante el tratamiento de la cetoacidosis diabética. El aparato no pudo registrar las lecturas de pH por debajo de 6,80.

25

30

Grupos de estudio	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (fin del trat)
No D-No tratadas (N = 7)	7,31 ± 0,02	7,26 ± 0,02	7,17 ± 0,04
D-No tratadas (N = 5)	6,80 ± 0,00*	6,80 ± 0,00*	6,80 ± 0,00*
D-Tratadas con Sol. salina (N = 5)	6,85 ± 0,02*	6,84 ± 0,02*	6,84 ± 0,02*
D-Tratadas con Sol. salina-Insulina (N = 5)	6,81 ± 0,01*	6,80 ± 0,01*	6,81 ± 0,04*
D-Tratadas con BMS-Sol. salina-Insulina (N = 7)	6,82 ± 0,02*	6,81 ± 0,01*	6,91 ± 0,02* #
D-Tratadas con BQ123-Sol. salina-Insulina (N = 5)	6,82 ± 0,02*	6,81 ± 0,01*	6,91 ± 0,01* #

La Tabla 6 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre la pCO₂ (mmHg) en la sangre arterial en varios grupos de ratas. *P <0,05 en comparación con ratas no diabéticas no tratadas. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina disminuyó la pCO₂ en sangre arterial. No hay ningún cambio en la pCO₂ en la sangre arterial durante los diferentes tratamientos.

5

Grupos de estudio	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (fin del trat)
No D-No tratadas (N = 7)	43,66 ± 5,68	45,85 ± 2,35	61,28 ± 3,78
D-No tratadas (N = 5)	24,80 ± 1,77*	20,80 ± 3,16*	19,80 ± 1,83*
D-Tratadas con Sol. salina (N = 5)	22,00 ± 3,44*	24,60 ± 3,51*	21,80 ± 2,31*
D-Tratadas con Sol. salina-Insulina (N = 5)	30,40 ± 2,46*	29,00 ± 2,30*	27,60 ± 2,21*
D-Tratadas con BMS-Sol. salina-Insulina (N = 7)	28,71 ± 2,08*	30,57 ± 1,94*	30,57 ± 2,23*
D-Tratadas con BQ123-Sol. salina-Insulina (N = 5)	25,00 ± 3,7*	23,6 ± 2,17*	23,2 ± 1,95*

La Tabla 7 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre la pO₂ en la sangre arterial (mmHg) en varios grupos de ratas. *P<0,05 en comparación con ratas no diabéticas no tratadas. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina aumentó la pO₂ en la sangre arterial. No se produjo ningún cambio en la pO₂ en la sangre arterial durante los diversos tratamientos.

10

Grupos de estudio	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (fin del trat)
No D-No tratadas (N = 7)	107,66 ± 5,67	108,00 ± 7,25	101,00 ± 9,62
D-No tratadas (N = 5)	161,20 ± 7,47*	173,60 ± 12,64*	145,60 ± 9,79*
D-Tratadas con Sol. salina (N = 5)	148,20 ± 4,40*	150,80 ± 8,45*	154,40 ± 5,83*
D-Tratadas con Sol. salina-Insulina (N = 5)	145,00 ± 10,84*	160,20 ± 11,36*	155,60 ± 11,43*
D-Tratadas con BMS-Sol. salina-Insulina (N = 7)	156,71 ± 7,11*	135,57 ± 6,37*	143,85 ± 6,59*
D-Tratadas con BQ123-Sol. salina-Insulina (N = 5)	130,2 ± 14,04*	128,4 ± 11,006*	141,2 ± 4,6*

La Tabla 8 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre la concentración de Na⁺ (mmol/l) en sangre en varios grupos de ratas. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina no produjo ningún cambio en las concentraciones de ion sodio (Na⁺) en sangre. No se produjo ningún cambio en las concentraciones de Na⁺ en sangre durante varios tratamientos.

15

Grupos de estudio	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (fin del trat)
No D-No tratadas (N = 7)	142,50 ± 2,02	141,57 ± 1,39	137,85 ± 1,65
D-No tratadas (N = 5)	133,80 ± 1,80	138,60 ± 1,97	131,40 ± 4,12
D-Tratadas con Sol. salina (N = 5)	138,80 ± 2,66	141,40 ± 2,50	144,60 ± 1,91
D-Tratadas con Sol. salina-Insulina (N = 5)	135,00 ± 2,17	141,60 ± 1,21	148,60 ± 0,51
D-Tratadas con BMS-Sol. salina-Insulina (N = 7)	135,71 ± 2,06	143,42 ± 1,84	146,14 ± 1,14
D-Tratadas con BQ123-Sol. salina-Insulina (N = 5)	140,00 ± 2,87	147 ± 1,3	150,04 ± 2,43

La Tabla 9 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre las concentraciones de K⁺ (mmol/l) en sangre en varios grupos de ratas. *P<0,05 en comparación con ratas no diabéticas no tratadas y #P<0,05 en comparación con ratas diabéticas no tratadas. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina produce un aumento en las concentraciones de K⁺ (ion potasio) en sangre. El tratamiento con solución salina + insulina o BMS-182874 + solución salina + insulina o BQ123-solución salina-insulina redujo significativamente el cambio en las concentraciones de K⁺ en sangre inducido por la cetoacidosis diabética. Frecuentemente se observa hiperpotasemia en los casos de CAD (Fulop, 1979), lo que provoca la redistribución de K⁺ desde el fluido intracelular hasta el fluido extracelular, pudiendo provocar ondas U y ondas T aplanadas en el ECG (Malone y Brodsky, 1980). Cuando se infunde insulina se puede producir hipopotasemia, lo que está asociado a un gran riesgo de arritmias. Se ha observado que BMS-182874 y BQ123 producen estabilidad hemodinámica y se pueden utilizar para prevenir acontecimientos cardiovasculares adversos.

20

25

30

Grupos de estudio	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (fin del trat)
No D-No tratadas (N = 7)	3,28 ± 0,17	3,64 ± 0,26	4,5 ± 0,21
D-No tratadas (N = 5)	5,12 ± 0,23 *	6,08 ± 0,88*	6,96 ± 0,77
D-Tratadas con Sol. salina (N = 5)	5,02 ± 0,83*	5,04 ± 0,80*	5,74 ± 0,74*
D-Tratadas con Sol. salina-Insulina (N = 5)	3,82 ± 0,29	2,92 ± 0,16#	2,48 ± 0,24#
D-Tratadas con BMS-Sol. salina-Insulina (N = 7)	4,21 ± 0,33	2,62 ± 0,29#	2,75 ± 0,27#

Grupos de estudio	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (fin del trat)
D-Tratadas con BQ123-Sol. salina-Insulina (N = 5)	3,4 ± 0,45	2,04 ± 0,29#	2,38 ± 0,34#

5 La Tabla 10 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre la concentración de lactato en sangre (mg/dl) en varios grupos de ratas. *P <0,05 en comparación con ratas no diabéticas no tratadas y #P<0,05 en comparación con ratas diabéticas no tratadas. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina produce un aumento en las concentraciones de lactato en sangre. El tratamiento con solución salina, solución salina + insulina, o BMS-182874 + solución salina + insulina o BQ123 + solución salina + insulina redujo significativamente el cambio en las concentraciones de lactato en sangre inducido por la cetoacidosis diabética.

Grupos de estudio	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (fin del trat)
No D-No tratadas (N = 7)	2,11 ± 0,35	1,84 ± 0,20	1,88 ± 0,37
D-No tratadas (N = 5)	1,66 ± 0,23	2,30 ± 0,41*	3,78 ± 0,37*
D-Tratadas con Sol. salina (N = 5)	1,88 ± 0,28	1,56 ± 0,29	1,26 ± 0,40#
D-Tratadas con Sol. salina-Insulina (N = 5)	2,50 ± 0,47	1,54 ± 0,47	1,00 ± 0,20#
D-Tratadas con BMS-Sol. salina-Insulina (N = 7)	2,74 ± 0,64	1,21 ± 0,13#	1,57 ± 0,20#
D-Tratadas con BQ123-Sol. salina-Insulina (N = 5)	2,7 ± 0,92	1,48 ± 0,45#	1,8 ± 0,3#

10 La Tabla 11 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre el hematocrito sanguíneo (Hct; %) en varios grupos de ratas. #P<0,05 en comparación con ratas diabéticas no tratadas. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina no produce ningún cambio en el hematocrito. El tratamiento con solución salina + insulina o BMS + solución salina + insulina o BQ123 + solución salina + insulina redujo significativamente el hematocrito.

Grupos de estudio	Día 4 (pre-trat)	Día 4 (1 hora del trat)	Día 4 (fin del trat)
No D-No tratadas (N = 7)	40,66 ± 4,07	39,71 ± 2,08	43,14 ± 2,46
D-No tratadas (N = 5)	51,80 ± 1,65	47,00 ± 1,58	46,40 ± 0,92
D-Tratadas con Sol. salina (N = 5)	46,40 ± 1,33	41,20 ± 3,23	39,80 ± 1,11
D-Tratadas con Sol. salina-Insulina (N = 5)	49,80 ± 2,27	38,80 ± 1,80	30,20 ± 3,12#
D-Tratadas con BMS-Sol. salina-Insulina (N = 7)	45,71 ± 1,48	33,28 ± 1,52#	29,28 ± 2,22#
D-Tratadas con BQ123-Sol. salina-Insulina (N = 5)	42,6 ± 4,81	31,4 ± 2,97#	31,8 ± 2,21#

20 La Figura 1 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre el peso corporal (gramos) en diferentes grupos de ratas. Los resultados muestran que, durante el período de 4 días, el peso corporal aumentó en las ratas de control sin cetoacidosis diabética. La inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina produjo una disminución similar en el peso corporal durante un período de 4 días en todos los grupos de tratamiento.

25 La Figura 2 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre las concentraciones de cetona en sangre (mg/dl) en varios grupos de ratas. Los resultados muestran que la inducción de la cetoacidosis diabética por estreptozotocina aumentó las concentraciones de cetona en sangre. El tratamiento con solución salina + insulina, así como el tratamiento con BQ123 o BMS + solución salina + insulina, produjo una disminución significativa en las cetonas en sangre. El tratamiento con BQ123 + solución salina + insulina produjo una disminución particularmente marcada de las cetonas en sangre de ratas con CAD.

30 La Figura 3 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento de la presión arterial media (mmHg) en varios grupos de ratas. La presión arterial en ratas no diabéticas no tratadas fue mayor en comparación con las ratas con cetoacidosis diabética. Las ratas diabéticas no tratadas mostraron una disminución en la presión arterial hasta el final del experimento. El tratamiento con solución salina, solución salina + insulina, así como BQ123 + solución salina + insulina o BMS + solución salina + insulina, produjo una disminución mucho menor de la presión arterial en comparación con las ratas no tratadas. El tratamiento con solución salina + insulina, BQ123 + solución salina + insulina o BMS + solución salina + insulina no provocó ningún descenso de la presión arterial en comparación con el valor basal. Se concluye por lo tanto que BQ123 y BMS-182874 estabilizan la presión arterial durante el tratamiento de la cetoacidosis diabética.

40 La Figura 4 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre la presión de pulso (mmHg) en varios grupos de ratas. La presión de pulso en las ratas no diabéticas no tratadas fue mayor en comparación con el de las ratas con cetoacidosis diabética. Las ratas diabéticas no tratadas mostraron una disminución en la presión de pulso hasta el final del experimento. El tratamiento con solución salina, solución salina

+ insulina, así como BQ123 + solución salina + insulina o BMS + solución salina + insulina, produjo una disminución mucho menor en la presión de pulso en comparación con las ratas no tratadas. Sin embargo, el tratamiento con BQ123 + solución salina + insulina produjo un aumento en la presión de pulso en comparación con el basal. Se concluye por lo tanto que BQ123 y BMS-182874 estabilizan la presión de pulso durante el tratamiento de la

5

La Figura 5 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre la frecuencia cardíaca (latidos/min) en varios grupos de ratas. La frecuencia cardíaca en ratas no diabéticas no tratadas fue mayor en comparación con las ratas con cetoacidosis diabética. Las ratas diabéticas no tratadas mostraron una

10

15

disminución en la frecuencia cardíaca hasta el final del experimento. El tratamiento con solución salina produjo una disminución de la frecuencia cardíaca similar a la observada en el grupo no tratado. El tratamiento con solución salina + insulina o BMS + solución salina + insulina o BQ123 + solución salina + insulina no produjo ninguna disminución de la frecuencia cardíaca en comparación con el valor basal y fue significativamente (* $P < 0,05$) más alta que la de las ratas no tratadas o tratadas con solución salina. La frecuencia cardíaca fue similar en los grupos tratados con solución salina + insulina o BMS + solución salina + insulina o BQ123 + solución salina + insulina.

La Figura 6 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre la perfusión sanguínea cerebral (cambio porcentual) en varios grupos de ratas. La perfusión sanguínea cerebral fue similar en las ratas no diabéticas no tratadas en comparación con ratas con cetoacidosis diabética. El tratamiento con solución salina no produjo ningún efecto significativo sobre la perfusión sanguínea cerebral. Sin embargo, el tratamiento con solución salina + insulina produjo un aumento marcado ($\#P < 0,05$) de la perfusión sanguínea cerebral. Este aumento de la perfusión sanguínea cerebral pudo ser bloqueado de manera significativa por BMS-182874 o BQ123. El tratamiento con BQ o BMS + solución salina + insulina produjo una atenuación significativa (* $P < 0,05$) del aumento de la perfusión sanguínea cerebral en comparación con las ratas tratadas con solución salina + insulina. Se concluyó por lo tanto que BQ o BMS-182874 estabilizaron la circulación sanguínea cerebral durante el tratamiento de la cetoacidosis diabética. El riesgo potencialmente mortal que existe durante el tratamiento de la cetoacidosis diabética es el desarrollo de edema cerebral. Un aumento de la perfusión sanguínea cerebral puede ser un factor importante que contribuye al desarrollo de edema cerebral. Los presentes resultados muestran por primera vez que BQ o BMS-182874 puede prevenir un aumento inducido por insulina de la perfusión sanguínea cerebral en un modelo de cetoacidosis diabética en rata.

20

25

30

La Figura 7 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre el contenido de agua pulmonar (edema pulmonar) en varios grupos de ratas. El contenido de agua pulmonar se redujo significativamente (* $P < 0,05$) en ratas con cetoacidosis diabética en comparación con las ratas no diabéticas no tratadas. El tratamiento con solución salina, solución salina + insulina o BQ o BMS + solución salina + insulina mejoró el contenido de agua pulmonar y fue significativamente ($\#P < 0,05$) mayor en comparación con las ratas con cetoacidosis diabética, pero similar a la observada en ratas no diabéticas no tratadas. Se sabe que la cetoacidosis diabética produce una deshidratación grave y, por lo tanto, se observó una disminución en el contenido de agua pulmonar. La infusión de solución salina, solución salina + insulina o BQ o BMS + solución salina + insulina restauró el contenido de agua pulmonar, no observándose edema pulmonar en ningún grupo.

35

40

La Figura 8 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre el contenido de agua cerebral (edema cerebral) en varios grupos de ratas. El contenido de agua cerebral se redujo significativamente (* $P < 0,05$) en ratas con cetoacidosis diabética en comparación con las ratas no diabéticas no tratadas. El tratamiento con solución salina, solución salina + insulina o BQ123 o BMS + solución salina + insulina produjo una mejora en el contenido de agua cerebral y fue significativamente ($\#P < 0,05$) mayor en comparación con las ratas con cetoacidosis diabética, pero similar a la observada en las ratas no diabéticas no tratadas. Se sabe que la cetoacidosis diabética produce una deshidratación grave y, por lo tanto, se observó una disminución en el contenido de agua cerebral. La infusión de solución salina + solución salina + insulina o BQ o BMS + solución salina + insulina restauró el contenido de agua cerebral, no observándose edema cerebral en ningún grupo.

45

50

La Figura 9 muestra el efecto de la inducción de la cetoacidosis diabética y el tratamiento sobre las concentraciones plasmáticas de ET-1 (pg/ml) en varios grupos de ratas. * $P < 0,05$ en comparación con el valor basal. Se puede concluir que el tratamiento con insulina aumentó las concentraciones plasmáticas de ET-1 y todos los tratamientos producían un incremento similar en las concentraciones plasmáticas de ET-1.

55

Los ensayos y datos anteriores muestran que la CAD se indujo con éxito en ratas, como se demuestra por el aumento de las concentraciones de glucosa en sangre, cetonas y cetonas en la orina y la disminución del pH de la sangre. El tratamiento con solución salina e insulina produjo una reducción significativa de la glucosa y cetonas en sangre y un aumento del flujo sanguíneo cerebral. Un antagonista del receptor ET_A , por ejemplo, BQ123 o BMS182874, impidió el aumento inducido por la insulina de la perfusión sanguínea cerebral en un modelo de CAD en rata.

60

El riesgo potencialmente mortal que existe durante el tratamiento de la CAD es el desarrollo de EC. Un aumento de la perfusión sanguínea cerebral puede ser un factor importante que contribuye al desarrollo de la EC. Se ha demostrado por primera vez que un antagonista del receptor ET_A , por ejemplo, BQ123 o BMS182874, puede evitar

65

el aumento inducido por la insulina de la perfusión sanguínea cerebral. La administración de un antagonista del receptor ET_A en el tratamiento de la CAD reducirá significativamente la morbilidad y la mortalidad de los pacientes.

5 Estos hallazgos vienen respaldados además por el hecho de que el tratamiento crónico con un antagonista selectivo del receptor ET_A, en rata Goto Kakizaki (un modelo de diabetes de tipo II), redujo considerablemente la hiperglucemia y restauró las tasas de aclaramiento de glucosa en plasma hasta la normalidad, lo que podría mejorar la sensibilidad a la insulina (Balsiger et al., 2002). Por otra parte, se determinó la participación de la ET-1 en las complicaciones diabéticas de los pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente, no observándose ninguna diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas de ET-1 entre todos los pacientes diabéticos, con o sin angiopatía, con o sin hipertensión en comparación con sujetos sanos (Bertello et al., 1994).

15 La cetoacidosis diabética es el resultado del aumento de las concentraciones de cetonas, acetoacetato y β -hidroxibutirato. Inicialmente el β -hidroxibutirato excede el acetoacetato en una proporción de 3:1, probablemente debido a la falta de utilización del β -hidroxibutirato (Nosadini et al., 1985), pero el β -hidroxibutirato disminuye durante el tratamiento de la cetoacidosis diabética (Stephens et al., 1971). El β -hidroxibutirato y el acetoacetato atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) mediante el sistema de transporte de ácido monocarboxílico (Poole y Halestrap, 1993). La concentración de cetonas en la sangre influye en el paso a través de la BHE y son utilizadas por regiones específicas del cerebro (Hawkins y Biebuyck, 1979; Kreis y Ross, 1992). Se ha demostrado que las cetonas tienen un efecto potencialmente perjudicial agudo en los vasos sanguíneos cerebrales, que podría ser debido a la producción de ET-1 inducida por acetoacetato (Isales et al., 1999).

25 Se ha demostrado que ET-1 aumentaba la permeabilidad del endotelio cerebrovascular humano (Stanimirovic et al., 1994). Varios estudios demuestran que ET-1 regula la BHE. La aplicación de ET-1 en la corteza isquémica después de la oclusión de la arteria cerebral media en la rata podría reducir el coeficiente de transferencia de moléculas pequeñas a través de la BHE (Chi et al., 2001). La glicoproteína P es un elemento crítico de la BHE y se observó que la ET-1 reducía rápidamente el transporte mediado por la glicoproteína P en la BHE (Hartz et al., 2004). En otro estudio se observó que, aunque la ET-1 no tenía ningún efecto sobre la expresión de la glicoproteína P, esta modula la actividad de transporte en las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (Hembury y Mabondzo, 2008). Los ratones transgénicos que sobreexpresan la ET-1 endotelial mostraban una mayor expresión de las metaloproteinasas de matriz-2, un mayor contenido de agua y extravasación de inmunoglobulina y un menor nivel de oclusión, lo que indica la descomposición de la BHE (Leung et al., 2009). La administración repetida intracisternal de ET-1 en perros y ratas aumenta notablemente la permeabilidad de la BHE, lo cual podía bloquearse con un antagonista del receptor ET_A, S-0139 (Narushima et al., 2003). La ET-1 se ha asociado con el desarrollo de edema cerebral en pacientes con ictus isquémico agudo tratados con t-PA y se ha sugerido como un marcador diagnóstico para el desarrollo de edema cerebral grave (Moldes et al., 2008). Los estudios realizados en un modelo de ictus embólico en rata donde se utilizaba tratamiento con rtPA, el tratamiento con S-0139 proporcionó neuroprotección mediante la supresión de la descomposición de la BHE producida por rtPA (Zhang et al., 2008).

40 En vista de los datos anteriores, la administración de un antagonista selectivo del receptor ET_A en el tratamiento de la cetoacidosis diabética debería reducir significativamente la morbilidad y la mortalidad de los pacientes.

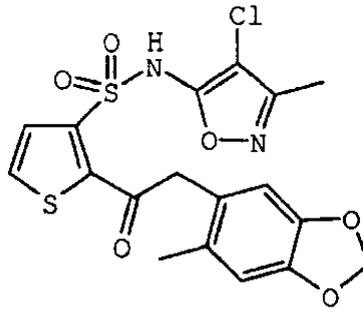
Referencias

- 45 B Balsiger et al. Clin Sci (Lond) 103 Suppl 48:430S-433S (2002).
 P Bertello et al. Diabetes Care 17:574-577 (1994).
 ST Bonvallet et al. Am J Physiol 266:H1327-1331 (1994).
 R Brondani et al. Clin Biochem 40:282-284 (2007).
 OZ Chi et al. Exp Brain Res 141:1-5 (2001).
 Y Ding et al. Endocrine 30:121-127 (2006).
 50 C Ferri et al. Diabetes Care 19:504-506 (1996).
 M Fulop N Engl J Med 300:1087-1089 (1979).
 A Gulati et al. Neuropeptides 31:301-309 (1997a).
 A Gulati et al. Am J Physiol 273:H1177-1186 (1997b).
 T Haak et al. Am J Hypertens 5:161-166 (1992).
 55 AM Hartz et al. Mol Pharmacol 66:387-394 (2004).
 RA Hawkins et al. Science 205:325-327 (1979).
 A Hembury et al. Cell Mol Neurobiol 28:915-921 (2008).
 C Herbst et al. Br J Pharmacol 115:753-760 (1995).
 CM Isales et al. J Diabetes Complications 13:91-97 (1999).
 60 G Kirilov et al. Horm Metab Res 26:119-120 (1994).
 EJ Krane Crit Care Med 16:100 (1988).
 R Kreis et al. Radiology 184:123-130 (1992).
 TI Lam et al. Diabetes 54:510-516 (2005).
 JW Leung et al. Brain Res 1266:121-129 (2009).
 65 AC Lo et al. J Cereb Blood Flow Metab 25:998-1011 (2005).
 A Malamitsi-Puchner et al. J Pediatr Endocrinol Metab 9:463-468 (1996).

- JI Malone et al. Diabetes Care 3:543-547 (1980).
 O Moldes et al. Stroke 39:2006-2010 (2008).
 T Morise et al. Diabetes Care 18:87-89 (1995).
 I Narushima et al. Pharmacol Toxicol 92:21-26 (2003).
 5 R Nosadini et al. Am J Physiol 248:R611-620 (1985).
 PT Nowicki et al. J Pediatr 146:805-810 (2005).
 RC Poole et al. Am J Physiol 264:C761-782 (1993).
 P Poulat et al. Eur J Pharmacol 344:251-259 (1998).
 SA Said et al. Pharmacol Res 51:107-115 (2005).
 10 JM Sasser et al. J Am Soc Nephrol 18:143-154 (2007).
 JG Schneider et al. Am J Hypertens 15:967-972 (2002).
 NA Sherry et al. Paediatr Drugs 10:209-215 (2008).
 SM Silver et al. Kidney Int 51:1237-1244 (1997).
 DB Stanimirovic et al. Acta Neurochir Suppl (Wien) 60:71-75 (1994).
 15 JM Stephens et al. Diabetes 20:485-489 (1971).
 K Takahashi et al. Diabetologia 33:306-310 (1990).
 M Vanelli M and Chiarelli F (2003) Acta Biomed 74:59-68.
 LA Vazquez et al. J Diabetes Complications 13:325-331 (1999).
 J Wolfsdorf et al. Pediatr Diabetes 8:28-43 (2007).
 20 M Yanagisawa et al. J Hypertens Suppl 6:S188-191 (1988a).
 M Yanagisawa et al. Nature 332:411-415 (1988b).
 N Yuen et al. Diabetes 57:2588-2594 (2008).
 RL Zhang et al. Stroke 39:2830-2836 (2008).

25 **APÉNDICE A**

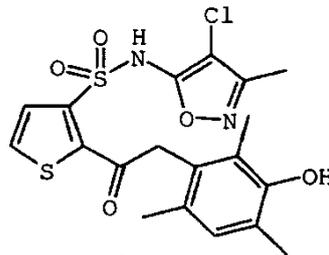
ANTAGONISTAS SELECTIVOS DE ET_A



1

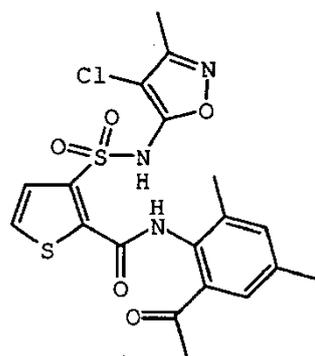
sitaxsentán

30

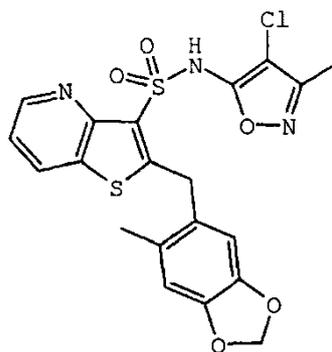


2

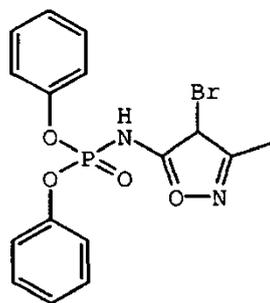
TBC2576



3
TBC3214

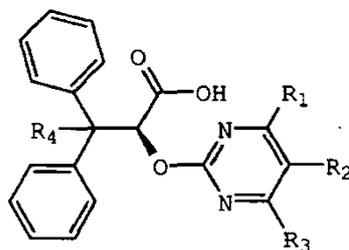


4



5

5

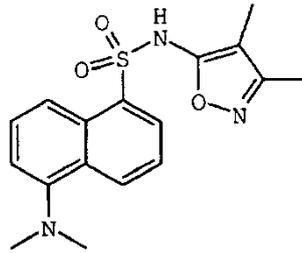


6 $R_1=R_3=R_4=CH_3$, $R_2=H$

7 $R_1=R_3=R_4=OCH_3$, $R_2=F$

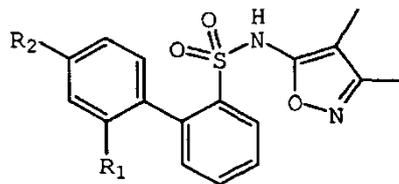
8 $R_1=OCH_3$, $R_2=H$, $R_3=CH_3$, $R_4=-OCH_2CON(CH_3)C_6H_5$

10



9

BMS 182,874

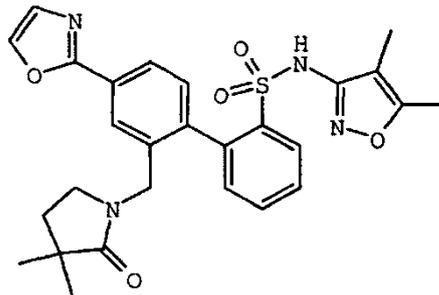


5

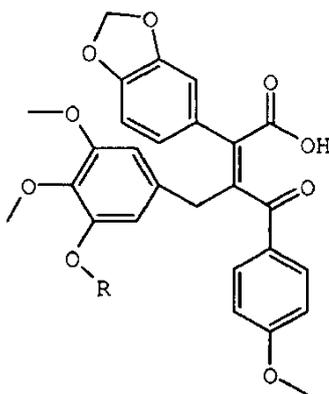
- 10 R₁=CH₂OH, R₂=H
- 11 R₁=H, R₂=2-oxazolil
- 12 R₁=H, R₂=2-pirimidinil
- 13 R₁=H, R₂=4-metoxietoximetil-4-oxo-1,2,4-triazol-2-il

10

- 14 R₁=H, R₂=1,3-diazo-2-butil-4-oxospiro(4,4)-1-nonen-3-ilmetil

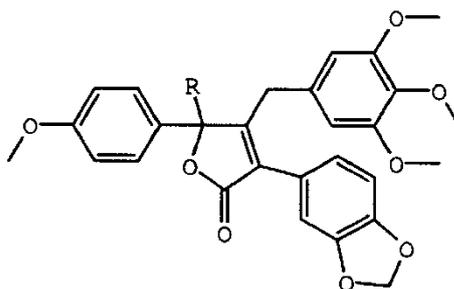


15

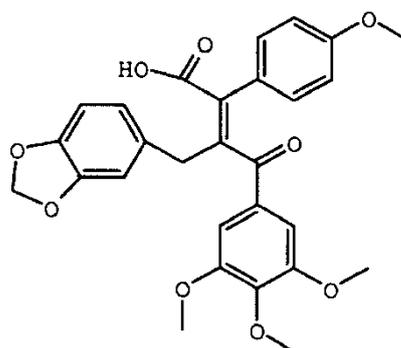


15

- 16 R=CH₃ (PD156707)
- 17 R=CH₂CH₂CH₂SO₃H

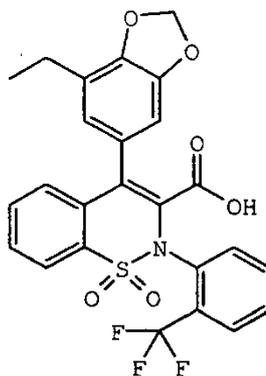


18 R=OCH₂CH₂CH₂SO₃H
 19 R=OCONHCH₂CO₂C₂H₅



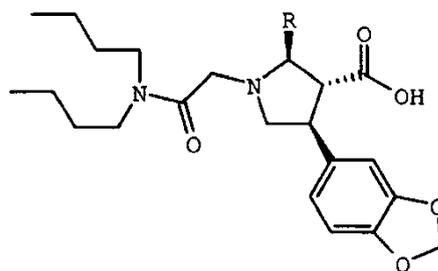
20

5



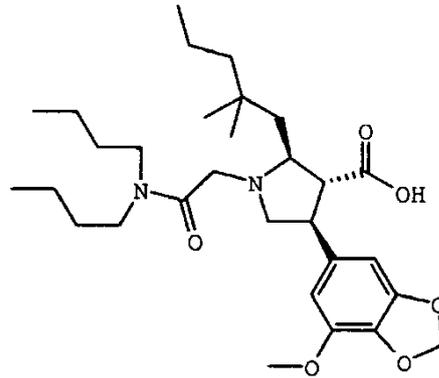
21

PD180988

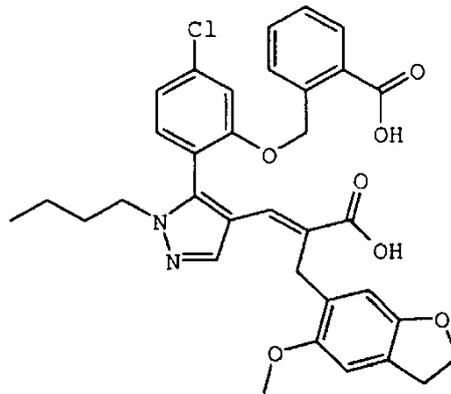


10

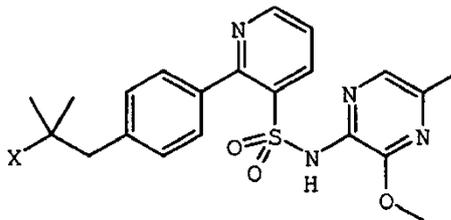
22 R=C₆H₄-4-OCH₃ (ABT-627)
 23 R=CH₂CH₂-2-piridil



24
ABT-546

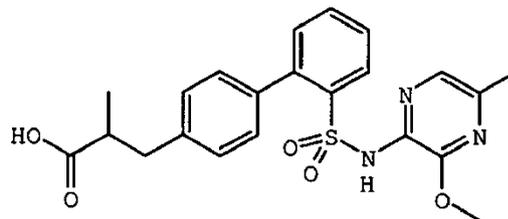


25
SB247083



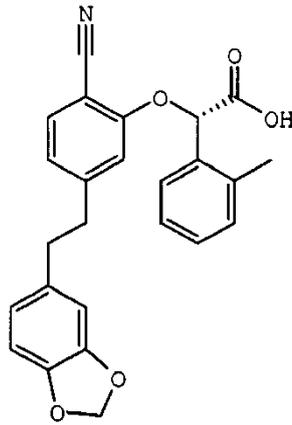
5

26 X=CO₂H (Z1611)
27 X=H

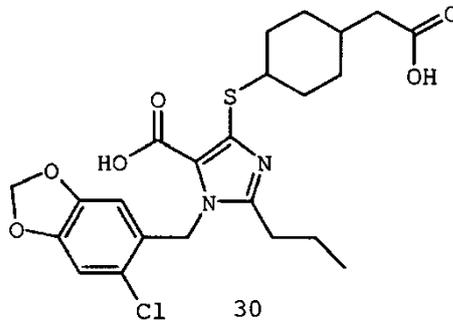


28

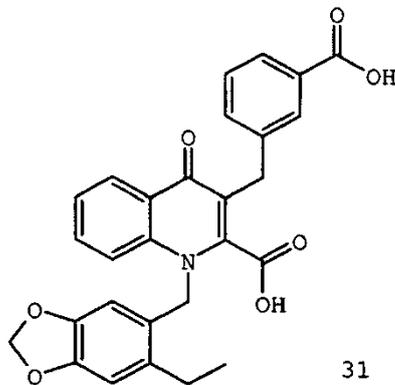
10



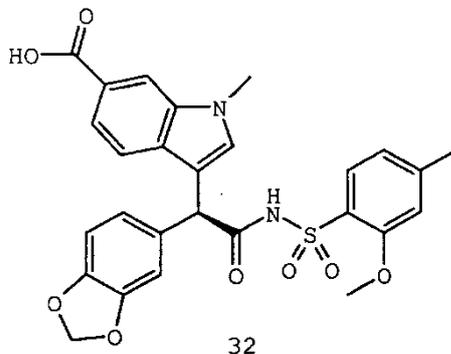
RPR118031A
29



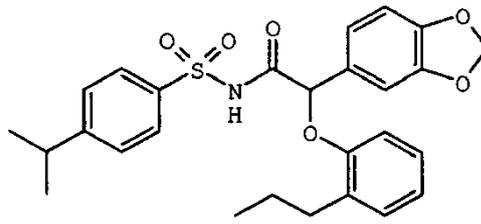
30



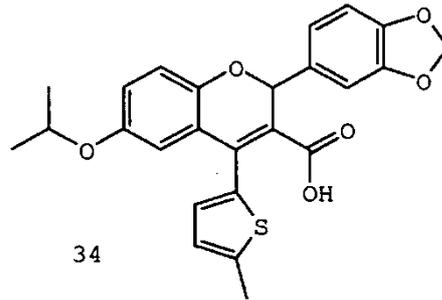
31



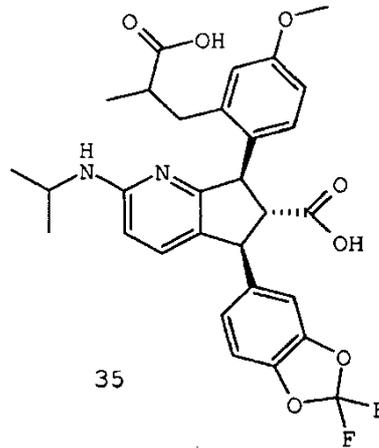
32



33



34

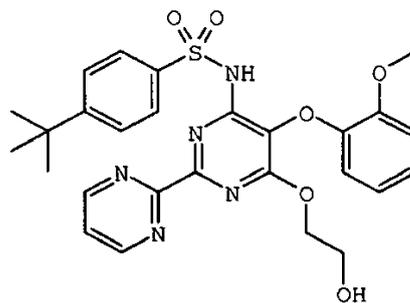


35

5

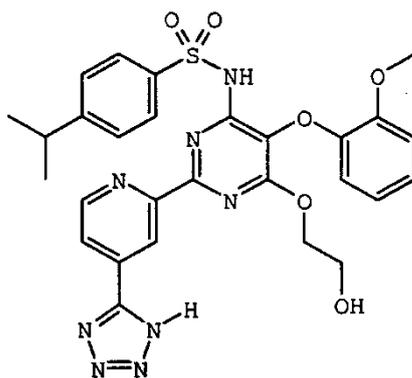
APÉNDICE B
ANTAGONISTAS EQUILIBRADOS DE ET_A/ET_B

10

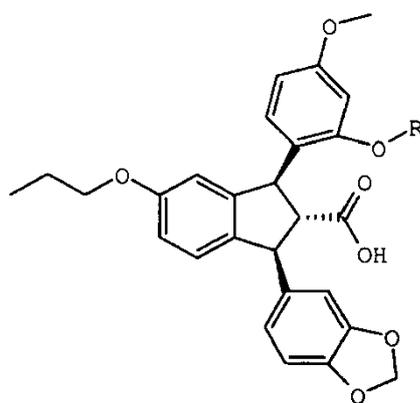


bosentan

46

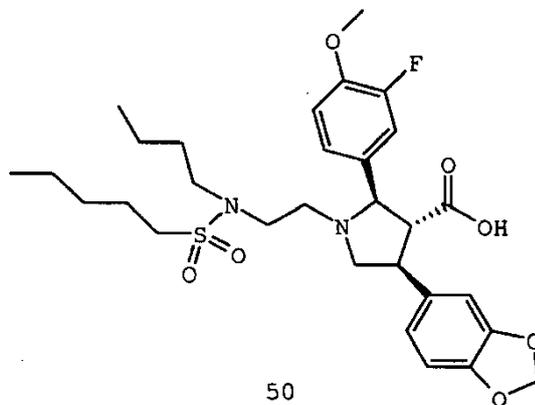


47

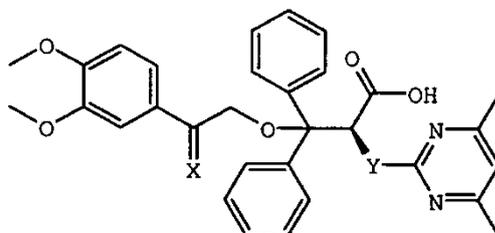


48 R=CH₂CO₂H SB209670
49 R=CH₂CH₂OH SB217242

5

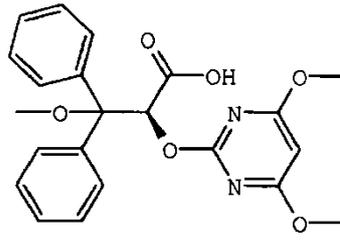


50

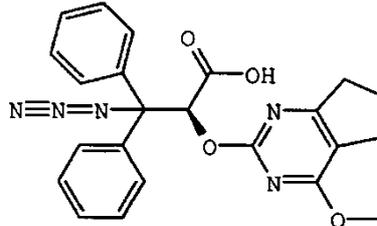


10

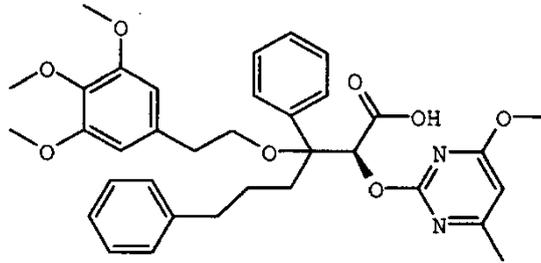
51 X=H₂, Y=CH₂ S-LU 302872
52 X=O, Y=O



53

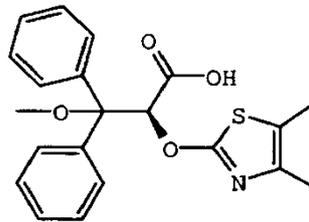


54

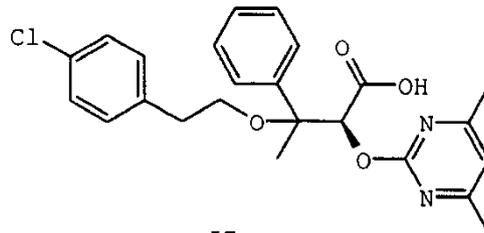


55

5

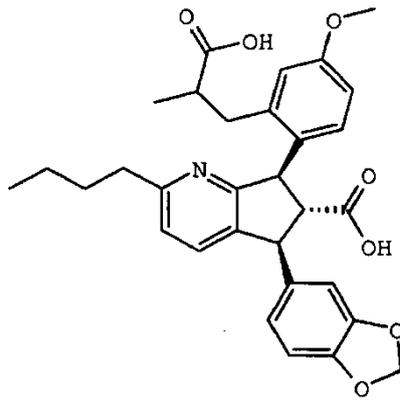


56



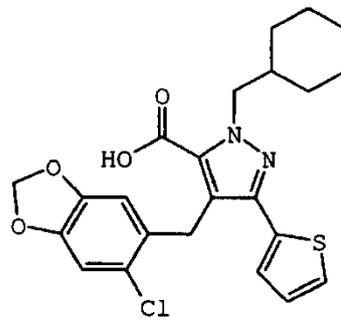
57

10

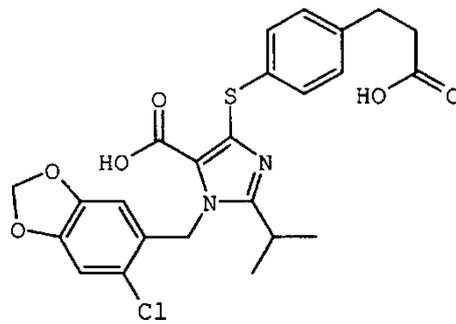


J-104132

58

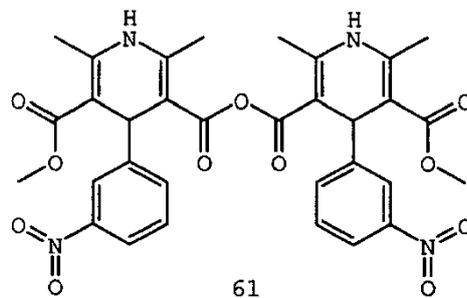


59

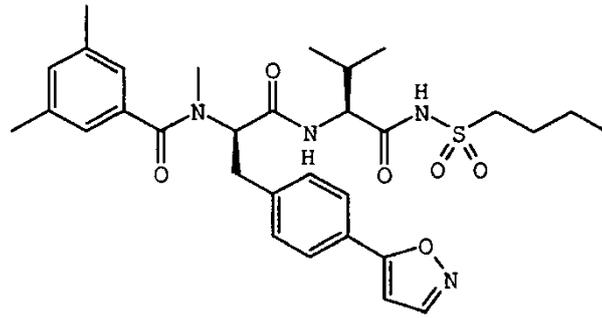


60

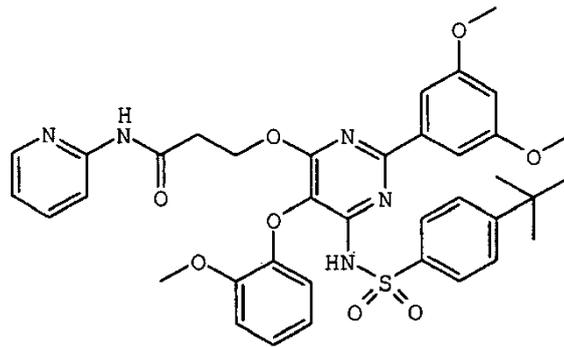
5



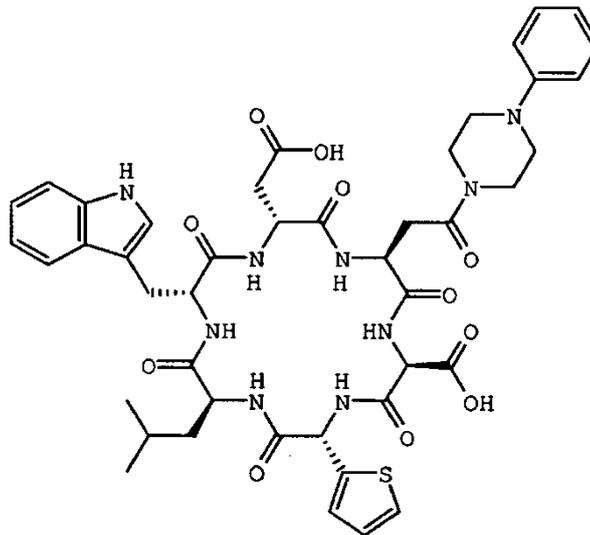
61



62

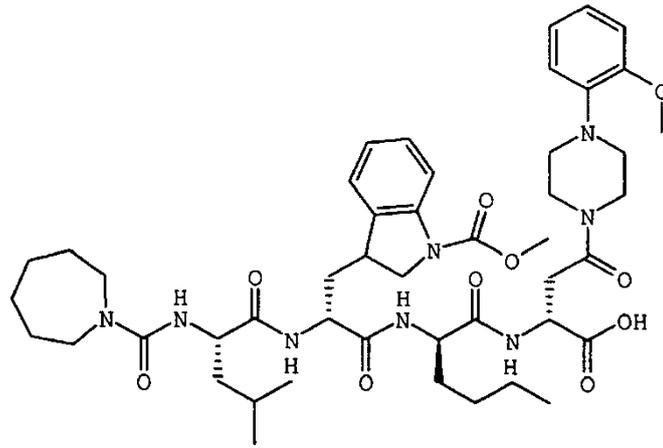


63

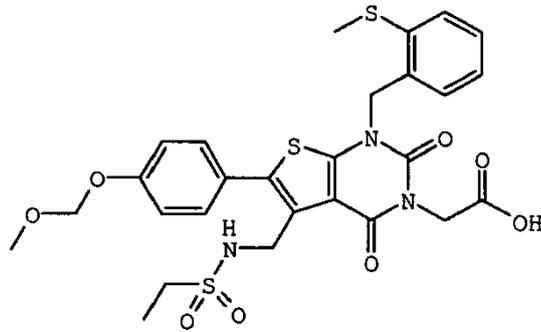


TAK-044

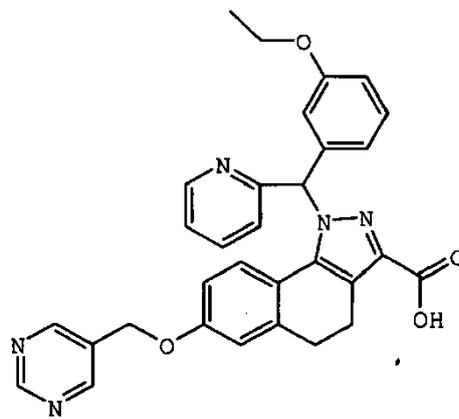
64



65



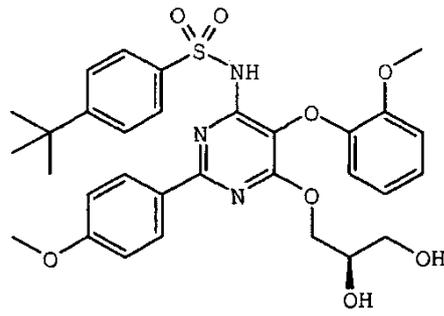
66



67

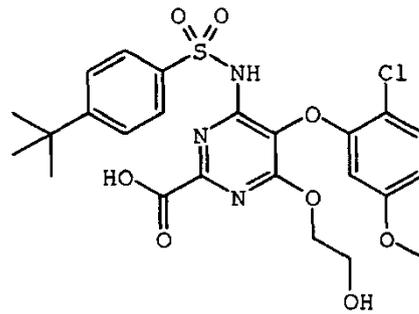
5

APÉNDICE C
ANTAGONISTAS SELECTIVOS DE ET_B

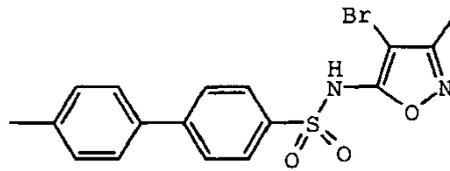


Ro 46-8443

36



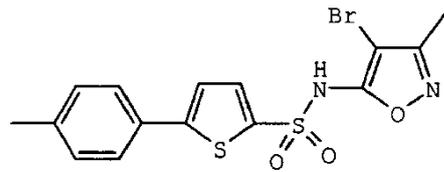
37



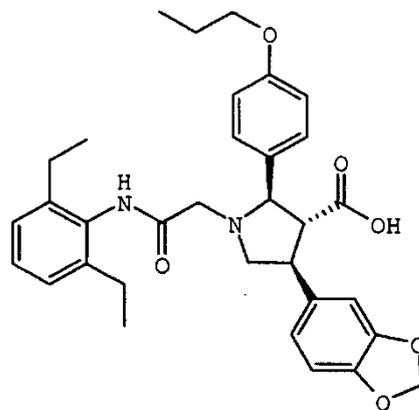
TBC10950

38

5



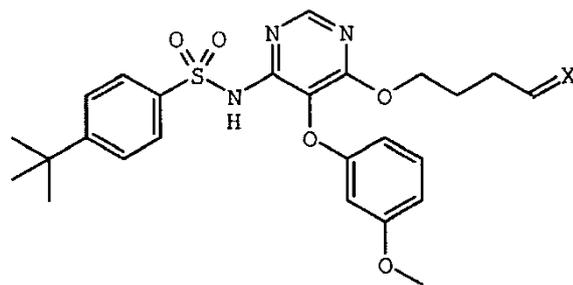
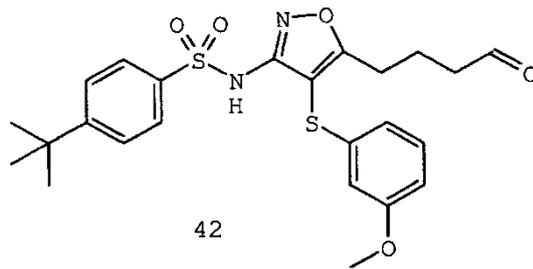
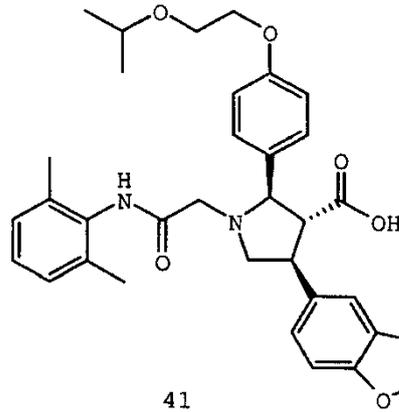
39



A192621

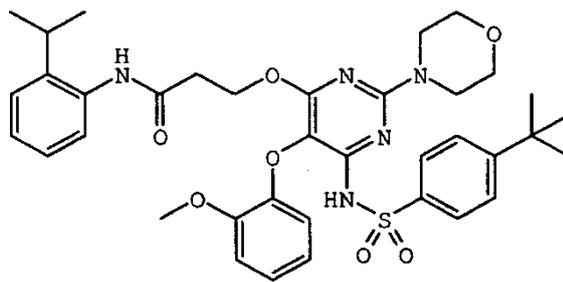
40

10



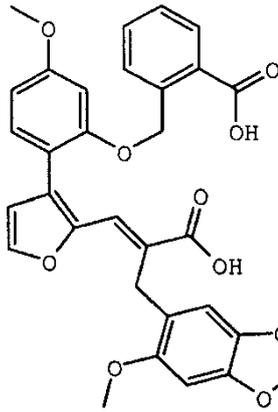
5

43 X=O
44 X=NNHCO-3-piridil

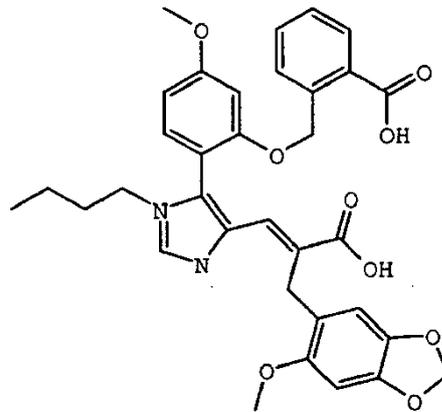


10

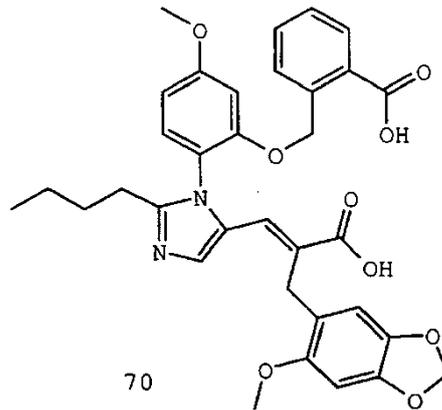
APÉNDICE D
MISCELÁNEA DE ANTAGONISTAS DE LA ET



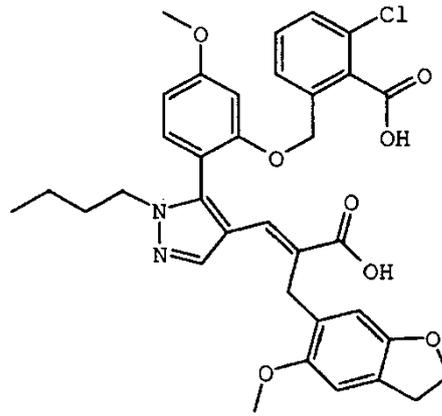
68



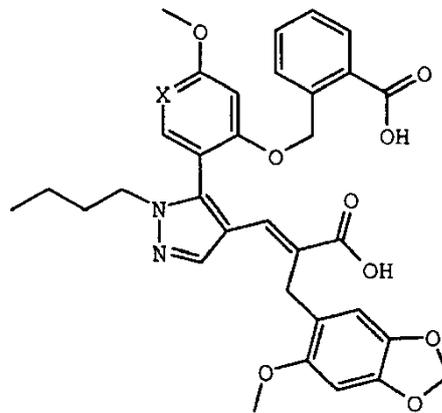
69



70

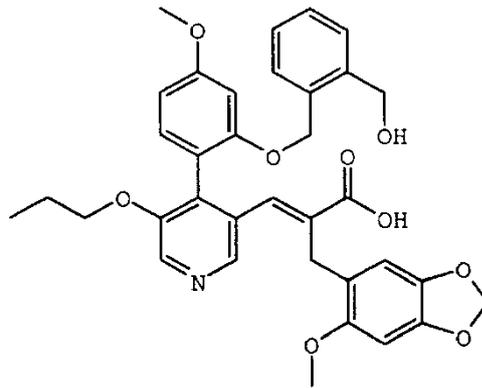


71

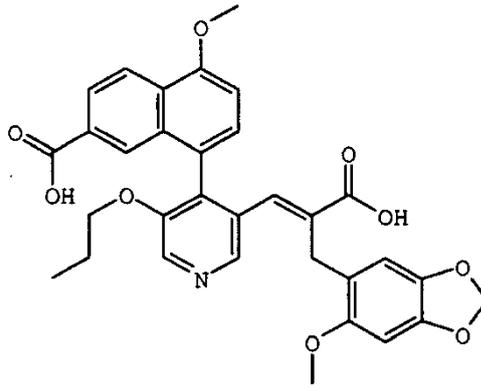


72 X=C
73 X=N

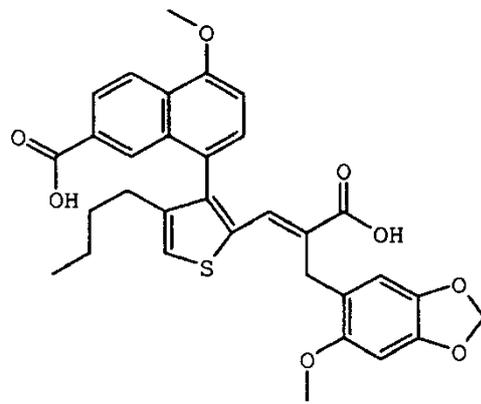
5



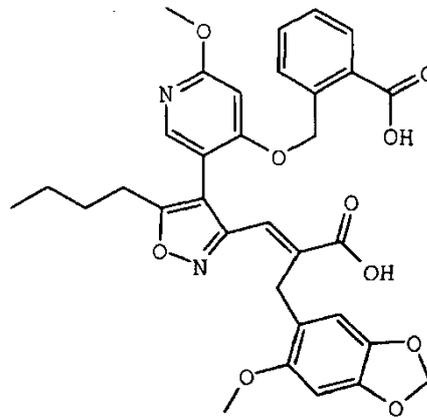
74



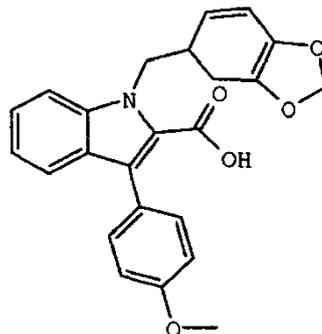
75



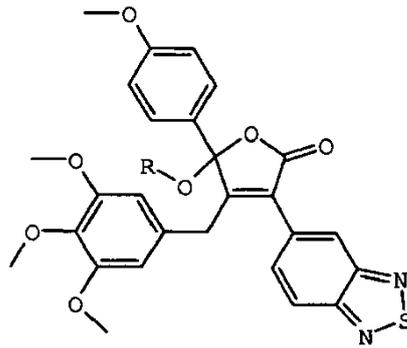
76



77

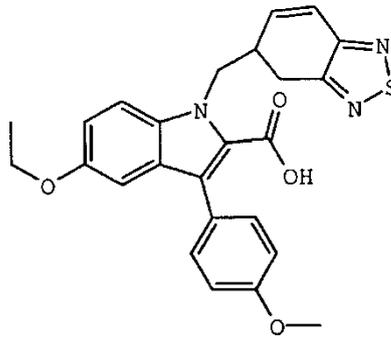


78

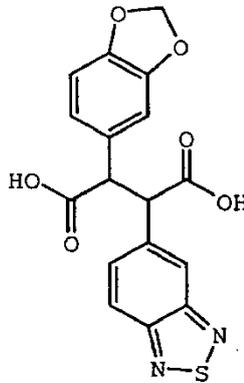


79 R=H
80 R=CONHCH₂CO₂C₂H₅

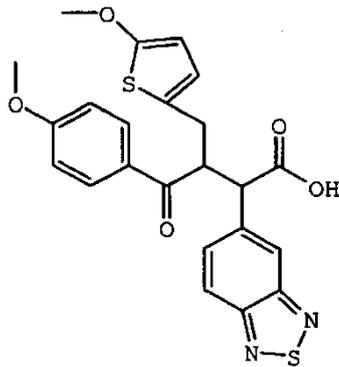
5



81

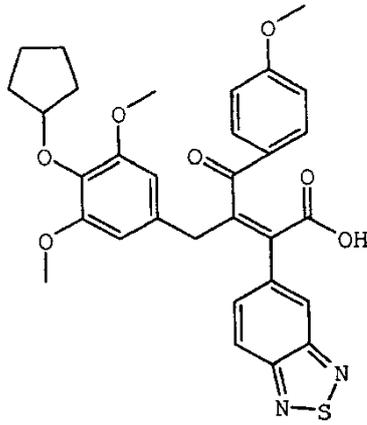


82

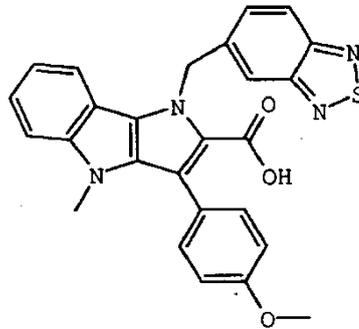


83

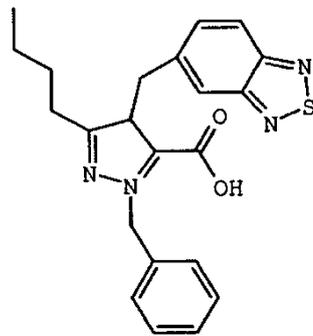
10



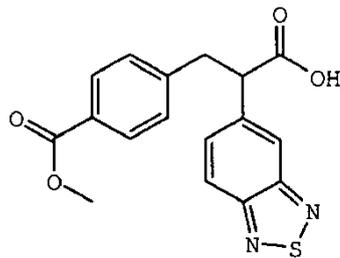
84



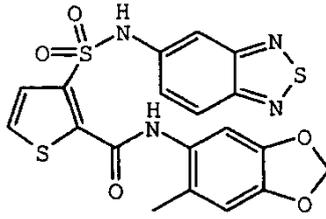
85



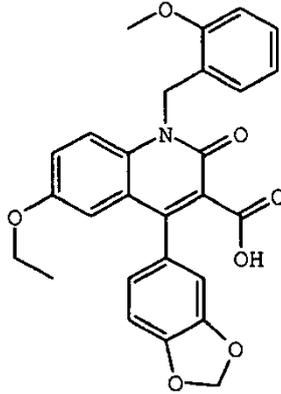
86



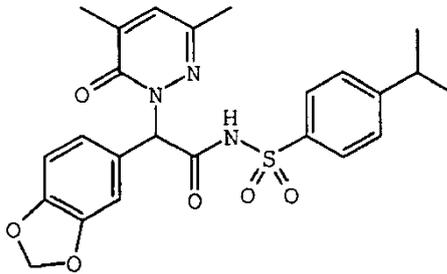
87



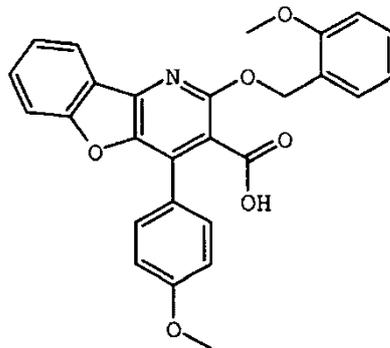
88



89

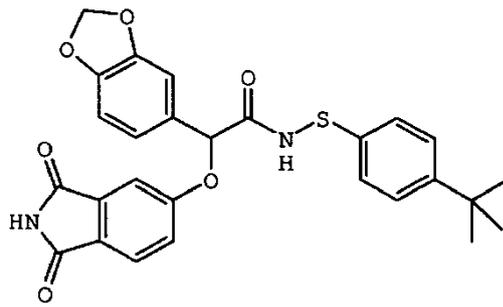


90

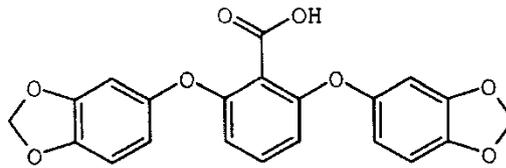


91

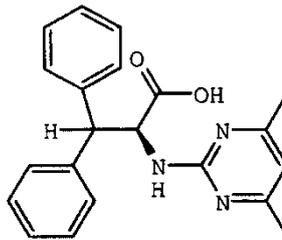
5



92

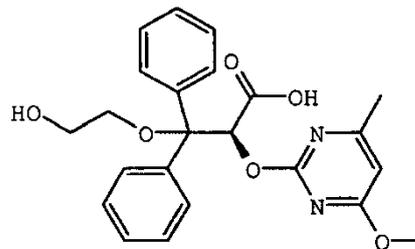


93

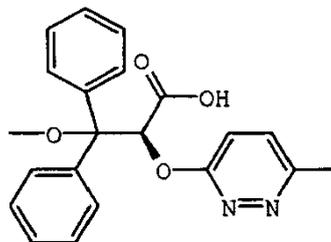


94

5

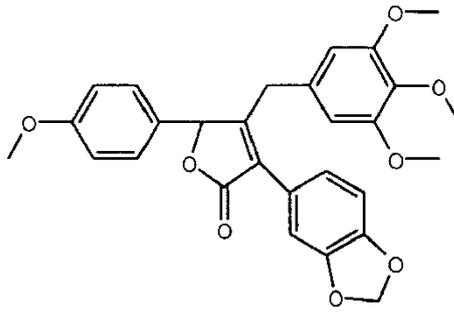


95

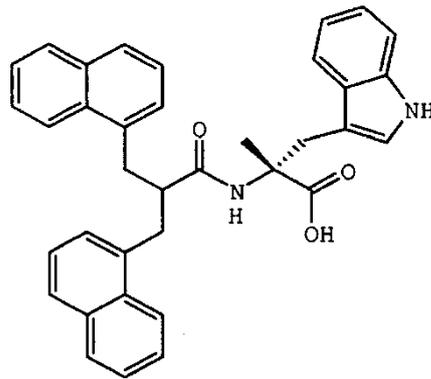


96

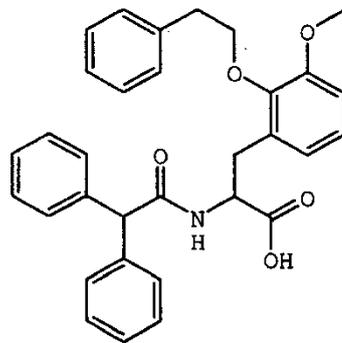
10



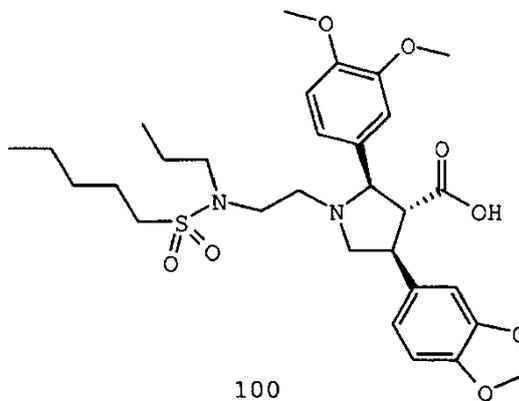
97



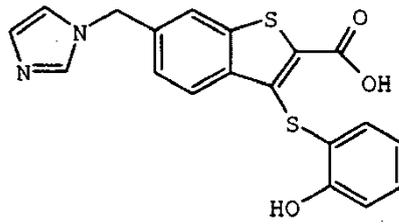
98



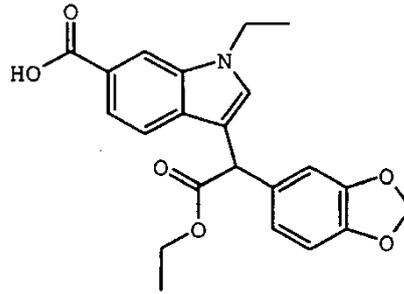
99



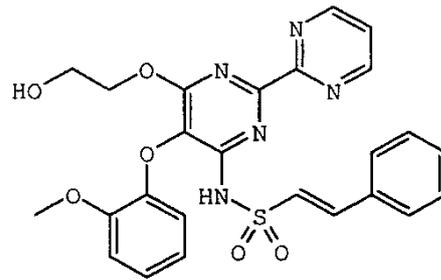
100



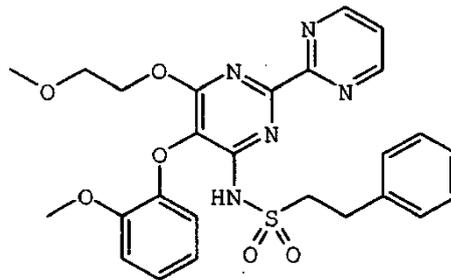
101



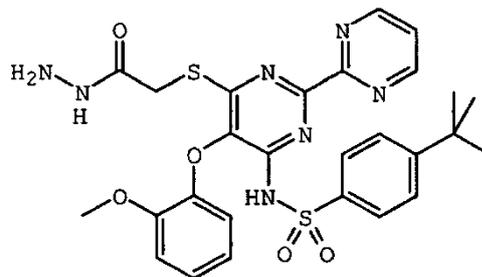
102



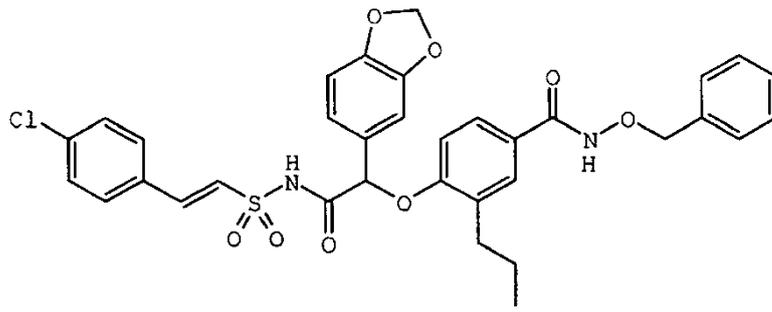
103



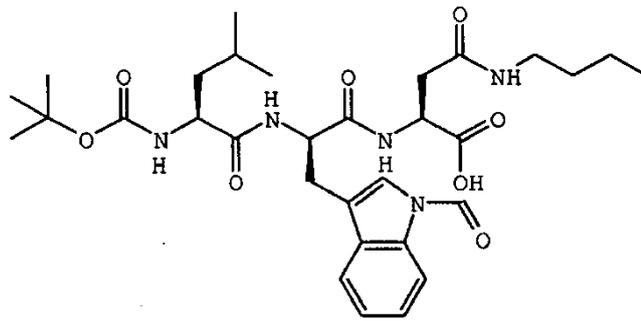
104



105

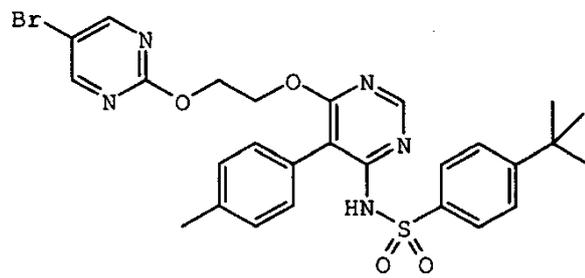


106

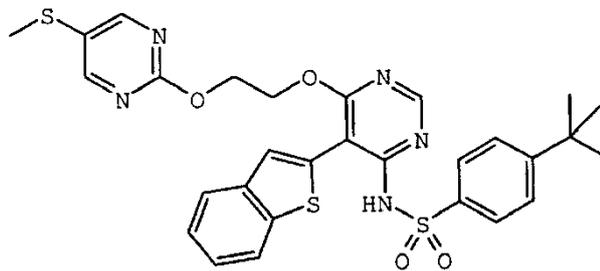


107

5



108



109

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de la endotelina A para su uso en el tratamiento de la cetoacidosis diabética mediante la administración a un mamífero en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de la endotelina A, en el que el antagonista de la endotelina se selecciona del grupo que consiste en atrasentán, tezosentán, bosentán, darnsentán, sitaxsentán, enrasentán, BMS-207940, BMS-193884, BMS-182874, J-104132, TAK-044, BQ123, LU 135252, A-182086, TBC2576, TBC3214, PD156707, PD180988, ABT-546, ABT-627, Z1611, RPRf 18031A, SB247083, SB217242, S-Lu302872, SB209670 y mezclas de los mismos.
2. Un antagonista de la endotelina A para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mamífero se somete a una terapia de insulina para tratar la diabetes.
3. Un antagonista de la endotelina A para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antagonista de la endotelina comprende BMS-182874, BQ123, o una mezcla de los mismos.
4. Un antagonista de la endotelina A para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mamífero es un humano.
5. Un antagonista de la endotelina A para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antagonista de la endotelina se administra como una única terapia para la cetoacidosis diabética.
6. Un antagonista de la endotelina A para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antagonista de la endotelina se administra en combinación con una terapia para el tratamiento de la diabetes y/o una segunda terapia para el tratamiento de la cetoacidosis diabética.
7. Un antagonista de la endotelina A para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la terapia para el tratamiento de la diabetes y la segunda terapia para el tratamiento de la cetoacidosis diabética se selecciona del grupo que consiste en insulina, electrolitos, bicarbonato sódico, un diurético, bumetanida, manitol, solución salina hipertónica y mezclas de los mismos.
8. Un antagonista de la endotelina A para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la segunda terapia para el tratamiento de la cetoacidosis diabética es una terapia de fluidos.
9. Un antagonista de la endotelina A para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el antagonista de la endotelina se administra antes, después o simultáneamente con la terapia para la diabetes y/o la segunda terapia para la cetoacidosis diabética.
10. Un artículo manufacturado que comprende:
- (a) una composición envasada que comprende un antagonista de la endotelina A;
 - (b) un prospecto que proporciona instrucciones para la administración de (a); y
 - (c) un envase para (a) y (b)
- para su uso en el tratamiento de la cetoacidosis diabética en un mamífero.

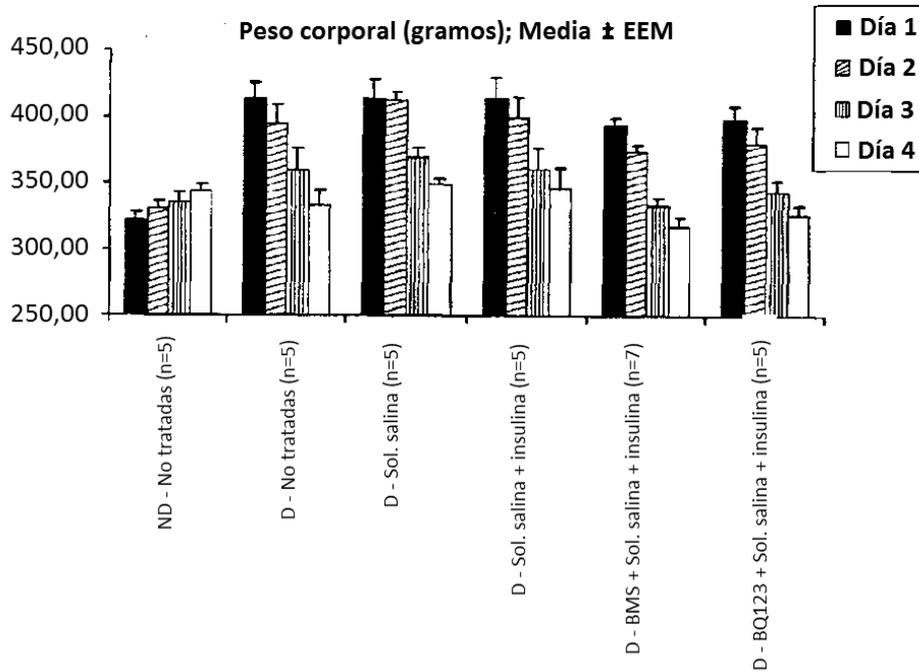


FIG. 1

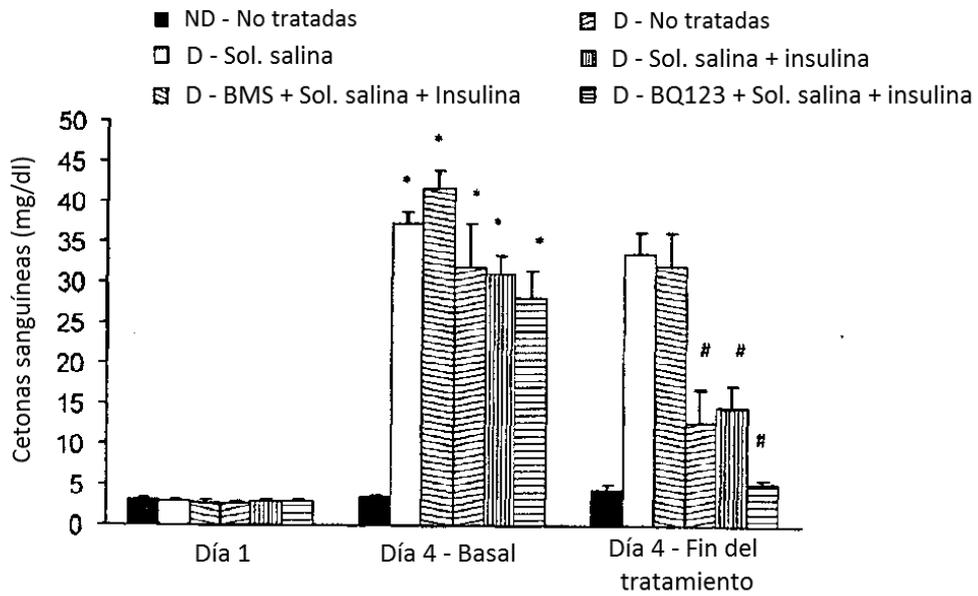


FIG. 2

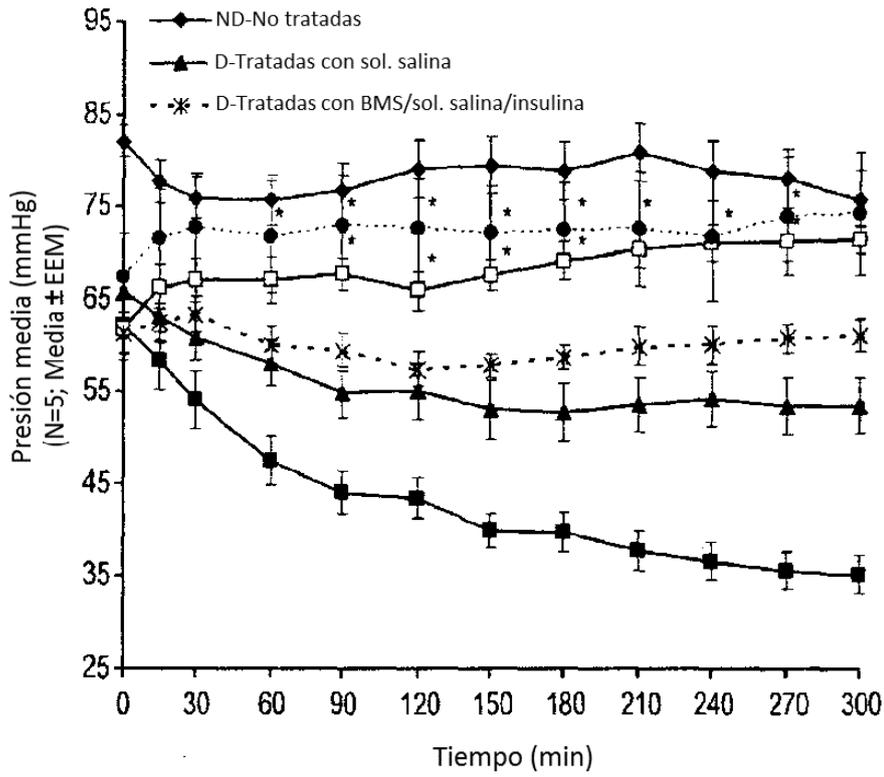


FIG. 3

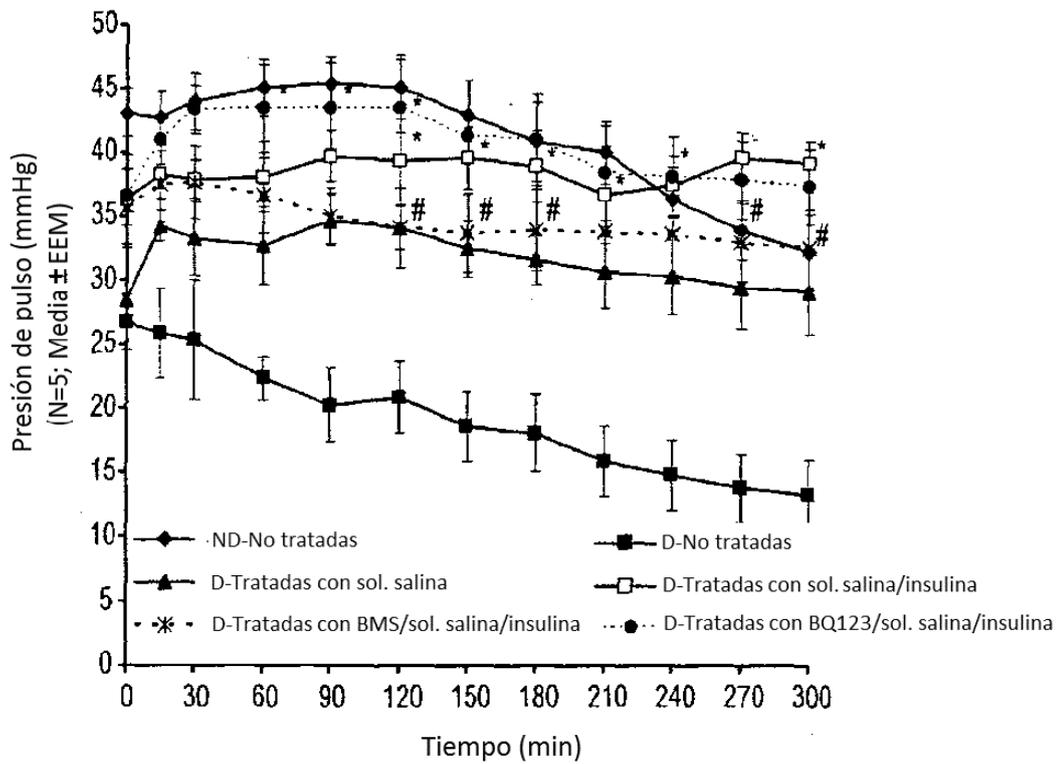


FIG. 4

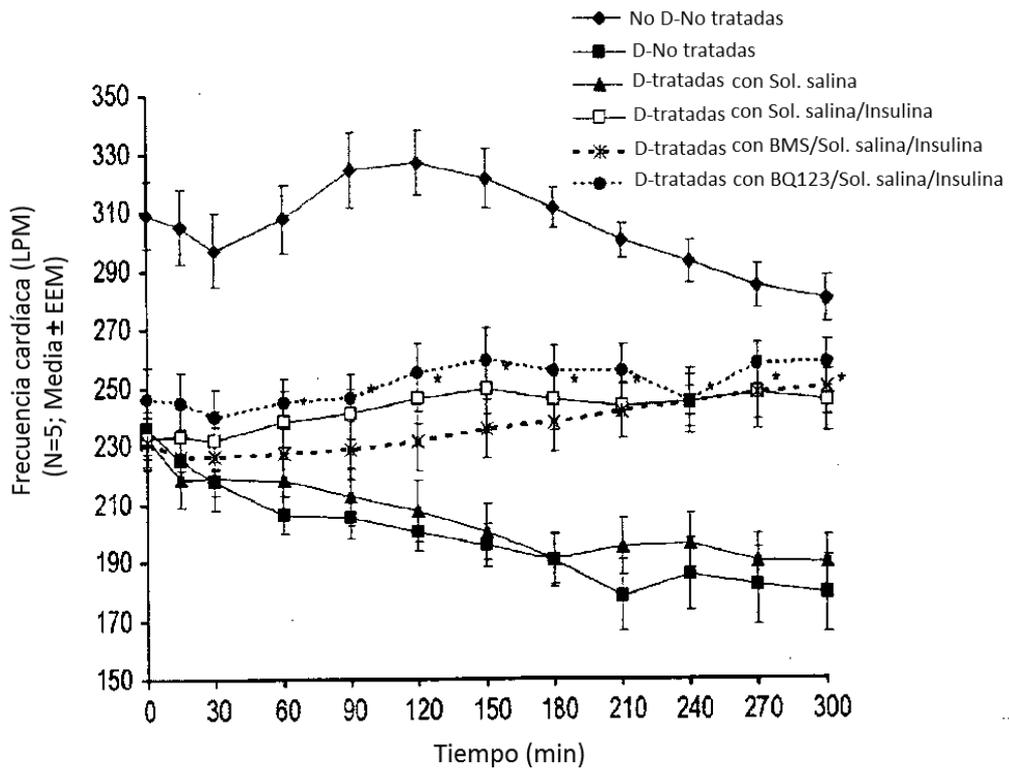


FIG. 5

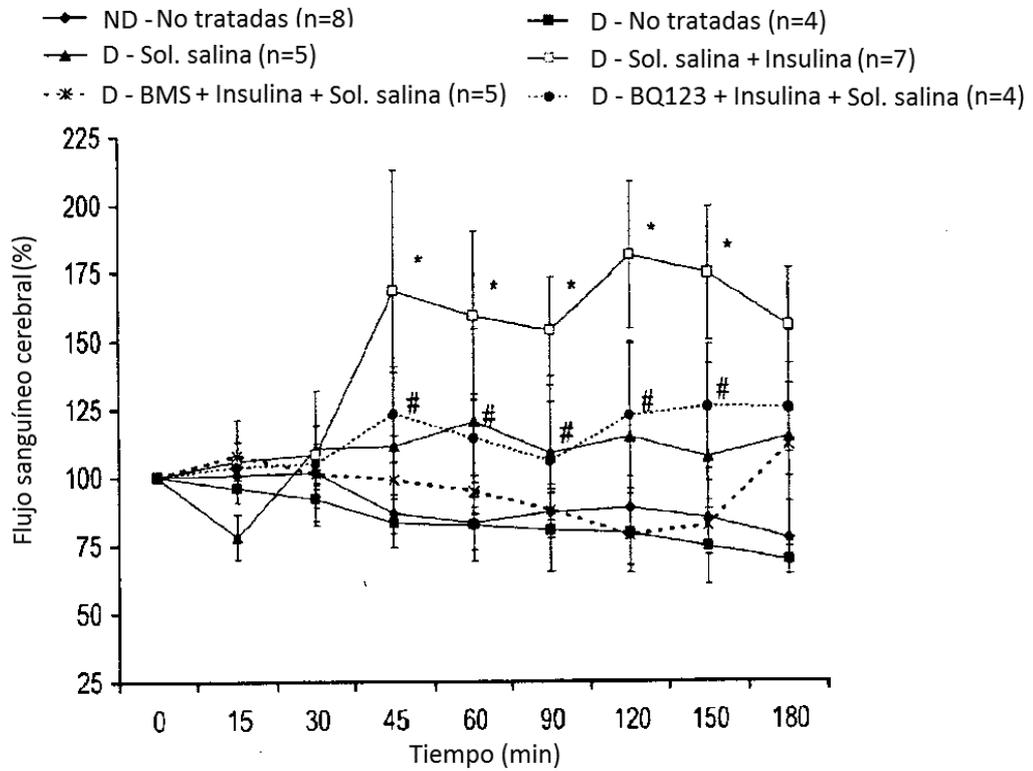


FIG. 6

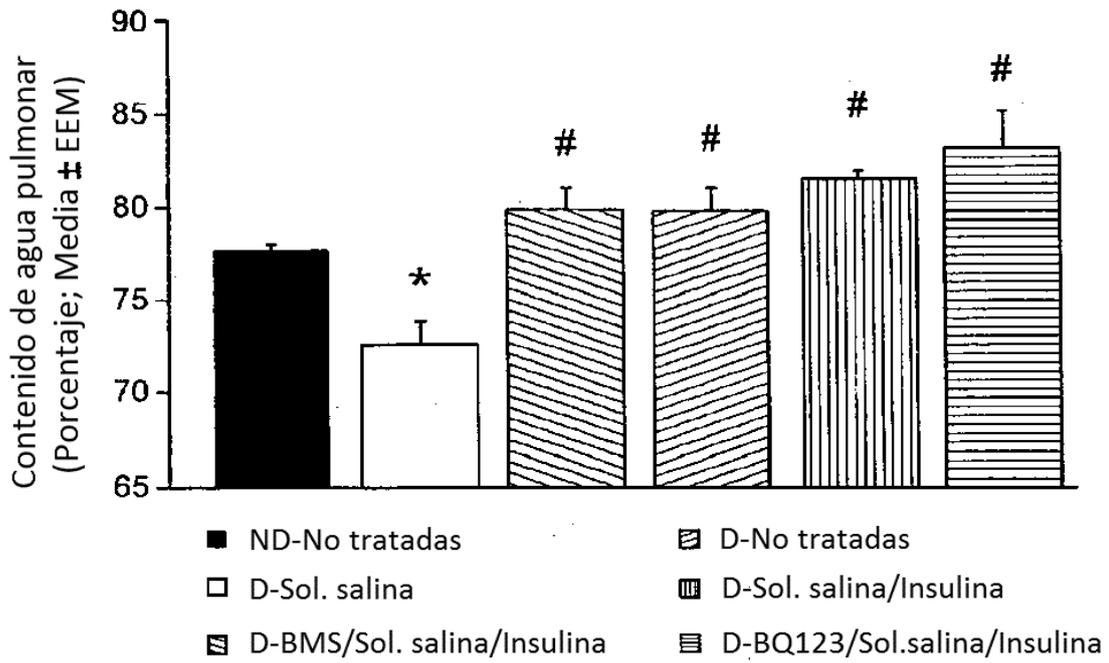


FIG. 7

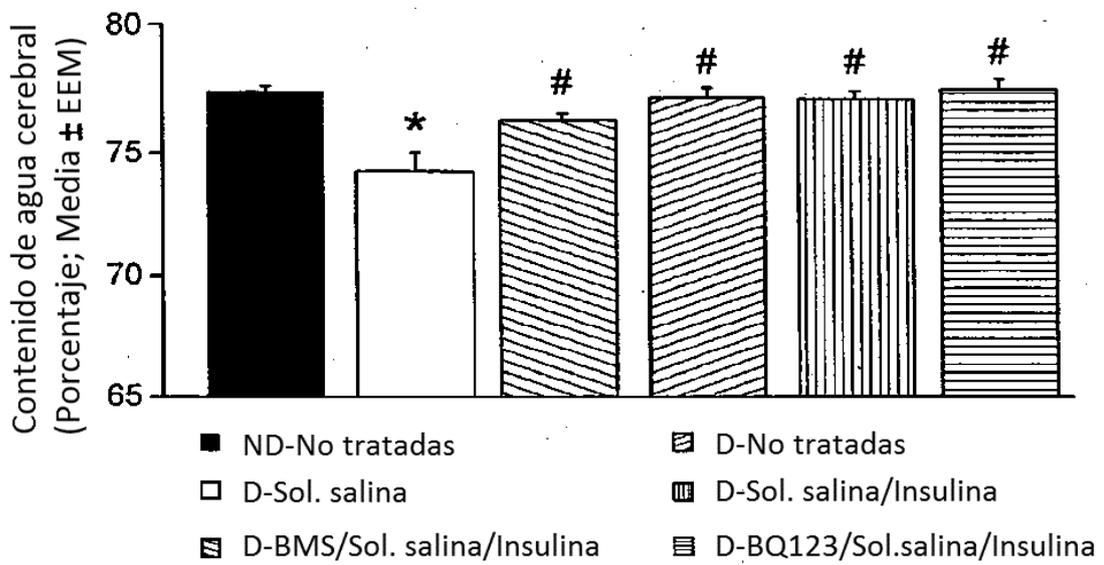


FIG. 8

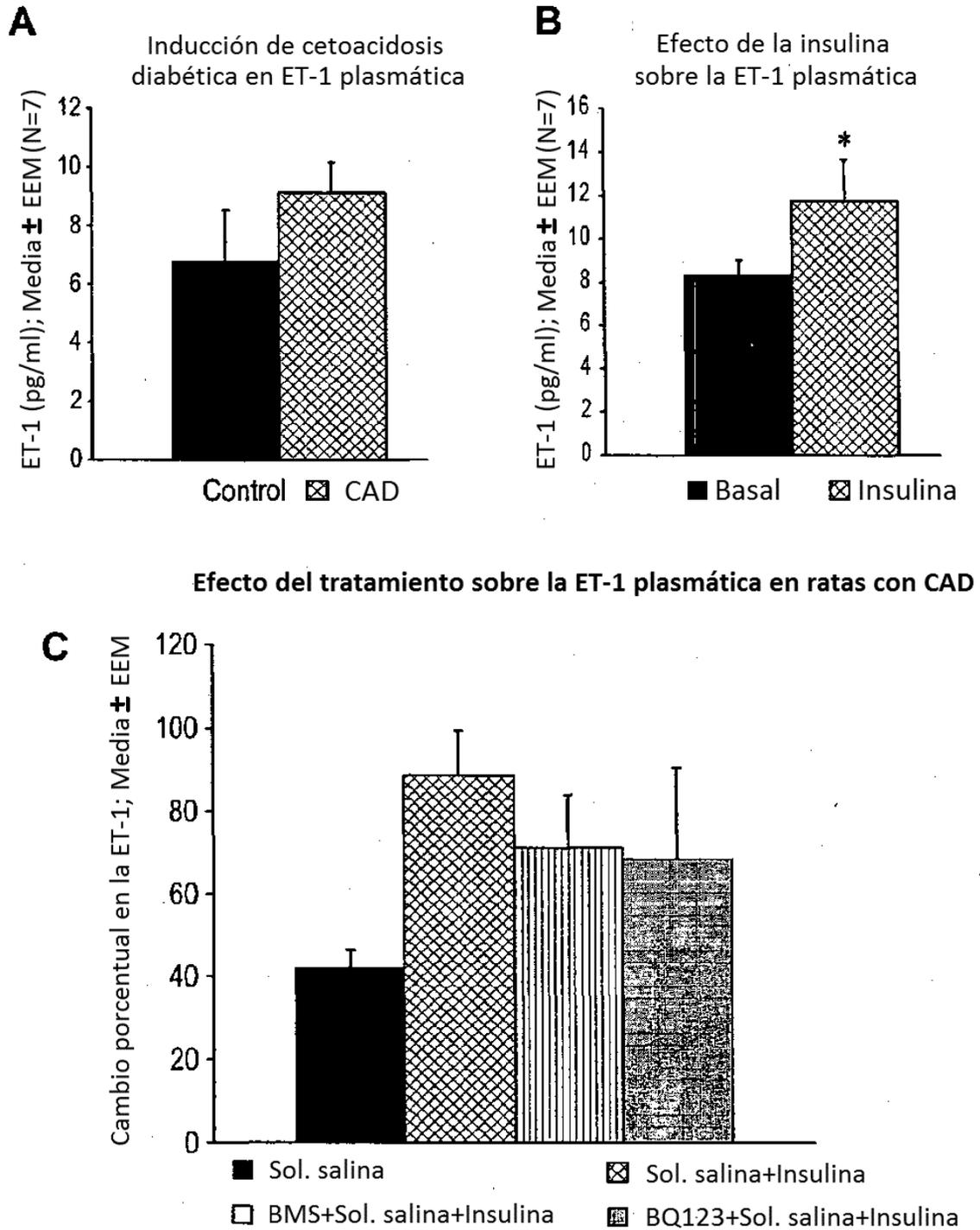


FIG. 9