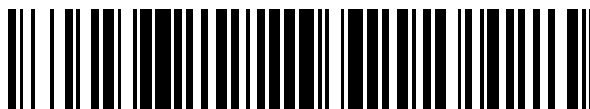


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 976**

51 Int. Cl.:

A61K 31/53 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2011 PCT/EP2011/059590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11154497**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2011 E 11726105 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2579880**

54 Título: **Prevención de diabetes de tipo 2**

30 Prioridad:

09.06.2010 EP 10305612

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

15.04.2020

73 Titular/es:

**POXEL (100.0%)
200 avenue Jean Jaurès
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**FOUQUERAY, PASCALE;
CRAVO, DANIEL;
HALLAKOU-BOZEC, SOPHIE y
BOLZE, SÉBASTIEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 753 976 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

Prevención de diabetes de tipo 2

La presente invención se refiere a derivados de triazina para su uso en el tratamiento de diabetes mellitus de tipo 2, para retrasar el comienzo de la diabetes de tipo 2.

5 ANTECEDENTES

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico crónico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglucemia crónica con alteración del metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas, que resulta de defectos en la secreción de insulina, de la acción de la insulina, o de ambos. El efecto de la diabetes mellitus incluye daño a largo plazo, disfunción e insuficiencia de diversos órganos. La diabetes mellitus se divide habitualmente en dos categorías principales:

- 10 - Diabetes de tipo 1 (anteriormente diabetes mellitus dependiente de insulina) abarca la mayoría de casos que son principalmente debido a destrucción de células beta de los islotes pancreáticos, habitualmente se desarrolla en la infancia o adolescencia y son propensos a cetosis y acidosis. La diabetes de tipo 1 representa alrededor del 10% de toda la diabetes.
- 15 - Diabetes de tipo 2 (anteriormente diabetes mellitus no dependiente de insulina) incluye la forma principal común de diabetes, que resulta de defectos en la secreción de insulina, casi siempre con una contribución importante de resistencia a la insulina. La diabetes de tipo 2 representa alrededor del 90% de toda la diabetes.

Se supone ahora que el progenitor principal de la diabetes de tipo 2 es la disfunción progresiva de células betas, que aparece pronto en el curso clínico (tal vez antes, y que incluso contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina) y empeora progresivamente incluso bajo tratamiento. La fisiología de la homeostasis de la glucosa requiere la estrecha cooperación de un número de sistemas orgánicos, secreciones humorales, y complejos de señalización neural; la interrupción de cualquiera de estos procesos puede llevar al desarrollo de diabetes de tipo 2. Los factores de riesgo que predisponen para la diabetes de tipo 2 incluyen sobrepeso y obesidad, dieta pobre, y falta de ejercicio. Los factores genéticos, muchos de los cuales aún requieren elucidación, también pueden elevar el riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2. La resistencia a la insulina ha sido reconocida durante mucho tiempo como una causa principal, si no la principal, de la diabetes de tipo 2. La investigación reciente en patogénesis de la enfermedad sugiere que la resistencia a la insulina no es necesaria ni una condición suficiente para el desarrollo y progreso de la diabetes de tipo 2. Aunque la resistencia a la insulina se correlaciona altamente con la diabetes de tipo 2, muchos individuos con resistencia a la insulina no llegarán a desarrollar la enfermedad; además, la enfermedad puede presentarse en individuos no marcadamente resistentes a la insulina. Entre los mecanismos de la disfunción de células beta en la diabetes de tipo 2 está la reducción o anulación del “efecto de incretina”. Las incretinas son hormonas del intestino, péptido-1 similar a glucagón (GLP-1) y polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), que en individuos sanos potencian la secreción de insulina dependiente de glucosa. Además, estas hormonas, y particularmente GLP-1, tienen un número de efectos protectores sobre las células beta, incluyendo la reducción en apoptosis y la promoción de la proliferación de células beta y de la neogénesis.

35 Puesto que estos beneficios se pierden en la diabetes, “reparar” el efecto de incretina se ha convertido en una diana de tratamiento importante. Los tratamientos que mantienen la célula beta podrían ofrecer control glucémico duradero y reducir potencialmente las complicaciones micro- y macrovasculares asociadas con diabetes de tipo 2 (Campbell RK. Fate of the beta cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. J Am Pharm Assoc (2003). Sept-Oct 2009; 49 Suppl 1:S10-5).

40 En la diabetes de tipo 2, las células beta del páncreas fracasan al producir suficiente insulina para satisfacer la demanda del cuerpo, en parte debido a una disminución adquirida en la masa de células beta. En adultos, la masa de células beta pancreática se controla por varios mecanismos, incluyendo replicación de células beta, neogénesis, hipertrofia, y supervivencia. Parece que el aumento de la apoptosis de células beta es un factor importante que contribuye a la pérdida de células beta y al comienzo de diabetes de tipo 2 (Rhodes CJ. Type 2 Diabetes-a matter of beta cell life and death, Science, 2005, Enero 21; 307 (57 08):380-4). En etapas tempranas de la diabetes de tipo 2, las células beta pancreáticas se adaptan a la resistencia a la insulina al incrementar la masa y función. Puesto que persiste el exceso de nutrientes, la hiperglucemia y los ácidos grasos libres elevados impactan negativamente sobre la función de células beta. Esto ocurre por numerosos mecanismos, incluyendo la generación de especies de oxígeno reactivas, alteraciones en rutas metabólicas, incrementos en calcio intracelular, y la activación de estrés del retículo endoplasmático. Estos procesos afectan adversamente a las células beta al perjudicar la secreción de insulina, disminuir la expresión del gen de insulina, y provocar finalmente apoptosis. Las células beta pancreáticas poseen el potencial para expandir enormemente su función y masa en estados tanto fisiológicos como patológicos de exceso de nutrientes y mayor demanda de insulina. La respuesta de las células beta para el exceso de nutrientes ocurre mediante varios mecanismos, incluyendo hipertrofia y proliferación de células beta existentes, producción y secreción incrementadas de insulina, y formación de nuevas células beta a partir de células progenitoras. El fracaso de células beta pancreáticas para expandirse adecuadamente en los marcos de mayor demanda de insulina da como resultado hiperglucemia y diabetes (Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E., Beta-cell failure as a complication of diabetes, Rev Endocr Metab Disord, 2008 Dic. 9(4):329-43).

La diabetes de tipo 2 puede afectar a muchos órganos principales, incluyendo corazón, vasos sanguíneos, nervios, ojos y riñones, conduciendo a diversas enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, neuropatía, úlceras, retinopatía y nefropatía. Los tratamientos que mantienen la célula beta podrían ofrecer control glucémico duradero y reducir potencialmente las complicaciones asociadas con la diabetes de tipo 2.

Los documentos WO 01/055122, WO 2004/089917 y FR 2 896 159 describen la administración de compuestos de triazina, incluyendo hidrocloreto de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina, a seres humanos diabéticos (o ratas en los ejemplos), que difieren de pacientes pre-diabéticos por su nivel de glucosa en plasma. Se han descritos otros compuestos estructuralmente diferentes para tratar diabetes de tipo 2, tales como el documento WO 2009/028891, que describe compuestos de 1,3,5-triazin-2,4,6-triamina. Sin embargo, no se sugiere administrar estos compuestos a apacientes pre-diabéticos. Además, se ha conocido el uso de metformina en la prevención (W. Knowler et al., New England Journal of Medicine, vol. 346, nº 6, 393-403 (2002)) o el tratamiento (P. Marchetti et al., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol.89, nº 11, 5535-5541 (2004)) de la diabetes.

SUMARIO DE LA INVENCION

En vista de lo anterior, sería ventajoso tener un tratamiento para diabetes de tipo 2 que pudiera mantener la función de las células beta o prevenir la disfunción de las células beta. En particular, sería especialmente ventajoso tener un tratamiento capaz de retrasar el comienzo de la diabetes de tipo 2, especialmente en etapas tempranas, en particular cuando la disfunción de las células beta no ha alcanzado aún el punto crítico.

Los inventores han descubierto inesperadamente que un derivado específico de triazina fue eficiente protegiendo las células beta frente a la muerte celular, y en consecuencia podría ser útil en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 al retrasar el comienzo de la diabetes de tipo 2. Esto ayudaría a prevenir o retrasar la disfunción de las células beta en una población en riesgo antes del comienzo de la diabetes de tipo 2, en particular para sujetos que tienen pre-diabetes.

La solicitud de patente internacional WO01/055122 describe derivados de triazina y sus propiedades hipoglucémicas. Según nuestro conocimiento, nunca se ha descrito la actividad de tales derivados de triazina en la protección de células beta frente a la destrucción o disfunción, y su uso en el tratamiento para retrasar el comienzo de la diabetes de tipo 2.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de incremento en apoptosis comparado con islotes de rata sin tratar (ajustado a 100%). Los valores representan la media +/-sem de cuatro experimentos independientes por duplicado. Para cada experimento, se reunieron islotes de seis ratas. $\$P<0,05$ y $\$\$P<0,001$. $\#\#\# P<0,001$ cuando se compara específicamente con control sin citocinas. $**\#P<0,001$ cuando se compara específicamente con control con citocinas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El primer objeto de la presente invención es un derivado de triazina escogido de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en un método para el tratamiento para retrasar el comienzo de diabetes de tipo 2 al proteger a las células beta frente a la muerte celular, en el que el sujeto a tratar tiene pre-diabetes.

En una realización preferida, el derivado de triazina es hidrocloreto de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina.

Se describen aquí profármacos de los compuestos definidos anteriormente.

El término "profármacos" significa compuestos que, cuando se administran al paciente, se convierten química y/o biológicamente en el cuerpo vivo en (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina.

El procedimiento para la preparación de los compuestos según la invención se describe especialmente en la solicitud de patente WO 2004/089917.

La presente descripción también se refiere a las formas polimórficas de los compuestos, como se obtienen según la solicitud de patente WO 2004/089917, por ejemplo la forma polimórfica A1 o H1 de sales de hidrocloreto de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina.

Se han mostrado que los derivados de triazina son eficientes protegiendo las células beta de la muerte celular.

Los derivados de triazina como se definen anteriormente se pueden usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de diabetes de tipo 2, en particular para retrasar el comienzo de la diabetes de tipo 2.

También se hace referencia aquí a una composición farmacéutica que comprende al menos un derivado de triazina como se define anteriormente y un soporte farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que comprende el derivado de triazina como se define anteriormente se puede preparar mezclando el derivado de triazina con un soporte, un excipiente, un aglutinante o un diluyente fisiológicamente aceptable.

También se hace referencia aquí a la composición farmacéutica como se define anteriormente para su uso en el tratamiento para retrasar el comienzo de la diabetes de tipo 2, y a un método de tratamiento para retrasar el comienzo de la diabetes de tipo 2, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz de un derivado de triazina como se define anteriormente o de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un derivado de triazina como se define anteriormente.

Los derivados de la invención se pueden administrar a aquellos que no tienen todos los síntomas de la diabetes de tipo 2 pero que desarrollarían normalmente la diabetes de tipo 2, o estarían en mayor riesgo para la diabetes de tipo 2. Tratamiento incluye retrasar el desarrollo de la enfermedad en un individuo que finalmente desarrollará todos los síntomas de la diabetes de tipo 2, o estaría en riesgo para la enfermedad debido a la edad, historia familiar, anomalías genéticas o cromosómicas, y/o debido a la presencia de uno o más marcadores biológicos para la enfermedad. Al retrasar el comienzo de la enfermedad, los derivados de la invención evitan que al individuo adquiera la enfermedad durante el periodo en el cual el individuo habría adquirido normalmente la enfermedad, o reducen la velocidad de desarrollo de la enfermedad o algunos de sus efectos. El tratamiento también incluye administración de los derivados de la invención a aquellos individuos que se piensa que están predispuestos a la diabetes de tipo 2. En el tratamiento de la diabetes tipo 2, los derivados de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Como se menciona anteriormente, la diabetes de tipo 2 puede afectar a muchos órganos principales, incluyendo corazón, vasos sanguíneos, nervios, ojos y riñones. Las complicaciones asociadas con diabetes de tipo 2 pueden corresponder a diversas enfermedades, tales como, por ejemplo, enfermedades cardiovasculares, neuropatía, úlceras (es decir, úlceras del pie), retinopatía o nefropatía.

Las enfermedades cardiovasculares incluyen más particularmente tensión arterial elevada, enfermedad de la arteria coronaria, cardiopatía y/o apoplejía.

El medicamento para tratar diabetes de tipo 2 que comprende un derivado de triazina según la invención se administra a un sujeto que lo necesita.

Los sujetos que necesitan de tal tratamiento pueden diagnosticarse al implementar los siguientes ensayos:

- Un ensayo de glucosa plasmática en ayunas (FPG) mide la glucosa en sangre en una persona que no ha comido nada durante varias horas, tales como durante al menos 8 horas. Este ensayo se usa para detectar diabetes y pre-diabetes.
- Un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) mide la glucosa en sangre después de que una persona ayuna al menos 8 horas, y 2 horas después la persona toma una bebida que contiene glucosa. Este ensayo se puede usar para diagnosticar diabetes y pre-diabetes.
- Un ensayo de glucosa plasmática al azar, también denominado ensayo de glucosa plasmática casual, mide la glucosa en sangre sin tener en cuenta cuándo la persona que está siendo ensayada ha tenido su última comida. Este ensayo, junto con una evaluación de síntomas, se usa para diagnosticar diabetes pero no pre-diabetes.

Los resultados del ensayo que indican que un sujeto tiene diabetes podrían confirmarse con un segundo ensayo en un día diferente.

Dependiendo de los resultados del ensayo obtenidos, los sujetos se pueden diagnosticar como sujetos normales, pre-diabéticos, o diabéticos. La pre-diabetes precede el comienzo de la diabetes de tipo 2. Generalmente, los sujetos que tienen pre-diabetes tienen niveles de glucosa en sangre en ayunas que son mayores que los normales, pero aún no suficientemente altos para ser clasificados como diabetes. La pre-diabetes aumenta enormemente el riesgo de diabetes.

Uno objetivo del tratamiento de la invención está en estos grupos de pacientes para retrasar el comienzo o progreso de la diabetes de tipo 2.

En la presente invención, los sujetos que necesitan del tratamiento de la invención son sujetos que tienen pre-diabetes.

La cantidad de derivado de triazina como se define anteriormente a administrar puede evolucionar en un alcance grande, dependiendo del paciente, del modo de administración y del efecto esperado. En particular, la cantidad de derivado de triazina a administrar está comprendida entre 200 mg y 4000 mg, preferiblemente entre 500 y 3000 mg, en particular entre 1000 y 2000 mg, por día.

El derivado según la invención se puede administrar oralmente o no oralmente, por ejemplo por vía parenteral, intravenosa, cutánea, nasal o rectal.

La composición farmacéutica puede presentar diferentes formas, incluyendo gránulos, polvos, comprimidos, cápsulas de gel, jarabes, emulsiones, suspensiones, y formas usadas para administración no oral, por ejemplo inyecciones, pulverizaciones o supositorios. Estas formas farmacéuticas se pueden preparar por medio de técnicas convencionales conocidas.

La preparación de una forma farmacéutica sólida administrada oralmente se puede realizar, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento: se añade al principio activo un excipiente (por ejemplo lactosa, sacarosa, almidón o manitol), un disgregante (por ejemplo carbonato de calcio, carboximetilcelulosa de calcio, ácido algínico, carboximetilcelulosa de sodio, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, Crospovidona, goma guar, silicato de aluminio y magnesio, celulosa microcristalina, polvo de celulosa, almidón pregelatinizado, alginato de sodio o glicolato de almidón), un aglutinante (por ejemplo alfa-almidón, goma arábica, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, ácido algínico, carbómero, dextrina, etilcelulosa, alginato de sodio, maltodextrina, glucosa líquida, silicato de aluminio y magnesio, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa o goma guar) y un lubricante (por ejemplo talco, estearato de magnesio o polietileno 6000), y la mezcla obtenida se convierte entonces en comprimido. Si es necesario, el comprimido se puede recubrir por medio de las técnicas conocidas, con objeto de enmascarar el sabor (por ejemplo con polvo de cacao, menta, borneol o polvo de canela) o para permitir la disolución entérica o la liberación sostenida de los principios activos. Los productos de revestimiento que se pueden usar son, por ejemplo, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, polioxietilenglicol, acetofalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, y Eudragit® (copolímero de ácido acrílico-ácido metacrílico), Opadry® (hidroxipropilmetilcelulosa + macrogol + óxido de titanio + lactosa monohidratada). Se pueden añadir colorantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo óxido de hierro amarillo, óxido de hierro rojo, o laca amarilla de quinolina).

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones. Las disoluciones acuosas se pueden obtener disolviendo el principio activo en agua, seguido de la adición de saborizantes, colorantes, estabilizantes y/o espesantes, si es necesario. Con objeto de mejorar la solubilidad, es posible añadir etanol, propilenglicol o cualquier otro disolvente no acuoso farmacéuticamente aceptable. Las suspensiones acuosas para uso oral se pueden obtener dispersando en agua con un producto viscoso el principio activo finamente dividido, tal como una goma o resina natural o sintética, metilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio.

Las formas farmacéuticas para inyección se pueden obtener, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento. El principio activo se disuelve, suspende o emulsiona en un medio acuoso (por ejemplo agua destilada, disolución salina fisiológica o disolución de Ringer) o en un medio oleoso (por ejemplo aceite de oliva, aceite de semilla de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, o propilenglicol), con un dispersante (por ejemplo Tween 80, HCO 60 (Nikko Chemicals), polietilenglicol, carboximetilcelulosa, o alginato de sodio), un agente conservante (por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, alcohol bencílico, clorobutanol, o fenol), un agente de isotonicidad (por ejemplo cloruro de sodio, glicerol, sorbitol o glucosa) y opcionalmente otros aditivos, tales como, si se desea, un agente solubilizante (por ejemplo salicilato de sodio o acetato de sodio) o un estabilizante (por ejemplo seroalbúmina humana).

Las formas farmacéuticas para uso externo se pueden obtener de una composición sólida, semi-sólida o líquida que contiene el principio activo. Por ejemplo, para obtener una forma sólida, el principio activo se puede tratar con excipientes (por ejemplo lactosa, manitol, almidón, celulosa microcristalina, o sacarosa) y un espesante (por ejemplo gomas naturales, derivados de celulosa, o polímeros acrílicos) a fin de convertirlos en polvos. Las composiciones farmacéuticas líquidas se preparan sustancialmente de la misma manera como las formas para inyección, como se indica previamente. Las formas farmacéuticas semi-sólidas están preferiblemente en forma de geles acuosos u oleosos, o en forma de pomadas. Estas composiciones pueden contener opcionalmente un regulador del pH (por ejemplo ácido carbónico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido clorhídrico o hidróxido de sodio) y un agente conservante (por ejemplo un éster del ácido p-hidroxibenzoico, clorobutanol o cloruro de benzalconio).

En una realización, el derivado de triazina es el único principio activo usado según la invención, o es el único principio activo en la composición.

El derivado de triazina según la invención se puede co-administrar con al menos algún otro compuesto activo. Preferiblemente, el al menos algún otro compuesto activo se escoge entre los tratamientos usados actualmente para tratar pre-diabetes o diabetes de tipo 2. El término "co-administración" (o "co-administrado") significa la administración simultánea, separada o secuencial de uno o más compuestos al mismo paciente, durante un periodo que puede ser de hasta 2 horas, o incluso de hasta 12 horas. Por ejemplo, el término co-administración incluye (1) una administración simultánea de ambos compuestos, (2) una administración del primero, seguido 2 horas después de la administración del segundo compuesto, (3) una administración del primero, seguido 12 horas después de la administración del segundo compuesto.

Los ejemplos a continuación se dan como ilustraciones no limitantes de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Estudio del efecto protector de un derivado de triazina sobre la muerte de células beta

Se cultivaron islotes pancreáticos de rata durante 24 horas con o sin un cóctel de citocinas (TNF-alfa, 1L-Ibeta y INF-gamma, cada una a 2 ng/ml), creando estrés inflamatorio, con objeto de cuantificar las propiedades protectoras de hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina. Ambas dosis de hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina protegieron completamente las islotes frente al estrés de citocina.

Estos resultados permiten concluir que el hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina tiene propiedades protectoras frente a la apoptosis basal y similar a la inflamación en islotes de rata cultivados.

Procedimiento experimental:

Se aislaron islotes de ratas Wistar macho (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia) usando colagenasa (Serva, Heidelberg, Alemania), y se cultivaron en RPMI a 11 mM de glucosa (Invitrogen, CA, USA) suplementado con FCS (Suero Fetal de Ternera) al 10%, 100 Unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 100 µg/ml de gentamicina en placas de 24 pocillos de baja adhesión (Corning, NY, USA). Estos islotes se incubaron con un cóctel de citocinas de rata (TNF-alfa, IL-1beta e INF-gamma, cada una a 2 ng/ml) durante 24 horas (Brun T. et al., 2004 y 2007). 1 hora antes de la incubación con las citocinas, se añadió separadamente al medio hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina (Imeglimina) a 100 µM o 1 mM, Ciclosporina A (CsA) a 0,83 µM o Exendina-4 (Exe-4) a 10 nM (Sigma, MO, USA), para medir el efecto protector de cada fármaco sobre los islotes estresados o no estresados. Se usaron alícuotas del medio para medir la insulina acumulada durante el periodo de cultivo usando kits de inmunoensayo enzimático (Brunchwig, Basilea, Suiza). Además, la cuantificación de nucleosomas citoplásmicos, un indicador directo de la apoptosis, se realizó con el kit ELISA de Detección de Muerte Celular (Roche, Basilea, Suiza). Cada condición se ensayó con 50 islotes de rata por duplicado, y se realizaron cuatro experimentos independientes. Los resultados se proporcionan como media±sem, y se realizaron análisis estadísticos usando ANOVA de una vía con ensayos post-hoc de Bonferroni y Dunnett. Las diferentes condiciones se resumen en la tabla a continuación.

Condición #	1	2	3	4	5
Tratamiento de islotes	no tratados - citocinas	100 µM Imeglimina -citocinas	1 mM Imeglimina -citocinas	CsA 0,83 µM - citocinas	Exe-4 10 nM -citocinas
Nº de islotes por duplicado	50	50	50	50	50

Condición #	6	7	8	9	10
Tratamiento de islotes	no tratados + citocinas	100 µM Imeglimina + citocinas	1 mM Imeglimina + citocinas	CsA 0,83 µM + citocinas	Exe-4 10 nM + citocinas
Nº de islotes por duplicado	50	50	50	50	50

Resultados:

Para cuantificar el efecto protector de hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina sobre islotes pancreáticos de rata, se añadieron dos dosis del compuesto (100 µM y 1 mM) al medio, 1 hora antes de una incubación durante 24 horas con o sin un cóctel de citocinas de rata (TNF-alfa, IL-1beta e INF-gamma). Las condiciones sin citocinas permitieron el análisis del efecto específico del compuesto sobre los islotes, mientras que la combinación del fármaco con citocinas permitió el estudio del efecto de Imeglimina sobre los islotes bajo estrés inflamatorio. Para medir la muerte celular en islotes, se realizó la cuantificación de nucleosomas citoplásmicos en células de los islotes, una consecuencia de la fragmentación de ADN durante la apoptosis (Robertson et al., 2000). Para ser capaz de comparar los resultados con una referencia doble, se analizó el nivel de muerte celular en islotes no tratados, pero también en islotes incubados solamente con citocinas. Además, se añadió un control negativo y un control positivo a las condiciones con y sin citocinas, para evaluar la efectividad del protocolo. La ciclosporina A, reportada como tóxica en islotes pancreáticos (Hahn et al., 1986) pero protectora en otros tipos de células (Tharakan B. et al., 2009; Fauvel H. et al., 2002; Sullivan P.G. et al., 2000), se seleccionó como el control negativo, mientras que Exendina-4, con potentes propiedades protectoras contra la muerte celular (Li et al., 2003; Wang y Brubaker, 2002), se usó como el control positivo interno. Los resultados de la cuantificación de la muerte celular para cada condición se presentan en la figura 1.

Para las condiciones sin adición de citocinas, el hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina a 100 µM tuvo efectos protectores (10% menos apoptosis que los islotes no tratados). La ciclosporina A por sí misma indujo un incremento de 17% en la apoptosis. La Exendina-4 mostró el efecto opuesto, con una disminución del 16% en muerte celular. Estos resultados indican que el hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina es por sí mismo protector, con un nivel de protección que representa dos tercios del nivel de Exendina-4.

El tratamiento con citocinas provoca un incremento del 12% en la muerte celular, comparado con los islotes no tratados. En presencia de citocinas, el hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina a 100 μ M tiene un efecto protector aún mayor (37% menos apoptosis que los islotes estresados con citocinas, o 29% menos apoptosis que los islotes no tratados), mientras que el hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina a 1mM protegió en un 25% o 16% respectivamente. La ciclosporina A indujo un incremento de 8% o 22% respectivamente, y la Exendina-4 una caída de 29% o 20% en la apoptosis. Estos valores muestran un efecto protector del hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina. La menor concentración ensayada es casi 50% más potente que la Exendina-4.

10 **Ejemplo.2: Composiciones según la invención**

Formulación 1:

Hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina: 1000 mg

Celulosa microcristalina: 114 mg

Croscarmelosa: 30 mg

15 Polivinilpirrolidona: 40 mg

Estearato de magnesio: 15 mg

Opadry®: 25 mg

Formulación 2:

Hidrocloreuro de (+) -2-amino-3, 6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina: 750 mg

20 Celulosa microcristalina: 110 mg

Croscarmelosa: 21 mg

Polivinilpirrolidona: 30 mg

Estearato de magnesio: 10,5 mg

Opadry®: 20 mg

25 Formulación 3:

Hidrocloreuro de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina: 1000 mg

Celulosa microcristalina: 150 mg

Croscarmelosa: 25 mg

Polivinilpirrolidona: 45 mg

30 Estearato de magnesio: 10 mg

Eudragit®: 25 mg.

REIVINDICACIONES

1. Derivado de triazina escogido de (+)-2-amino-3,6-dihidro-4-dimetilamino-6-metil-1,3,5-triazina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en un método para el tratamiento para retrasar el comienzo de diabetes de tipo 2 al proteger a las células beta frente a la muerte celular, en el que el sujeto a tratar tiene pre-diabetes.
- 5 2. Derivado de triazina para uso según la reivindicación 1, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es hidrocloreuro.

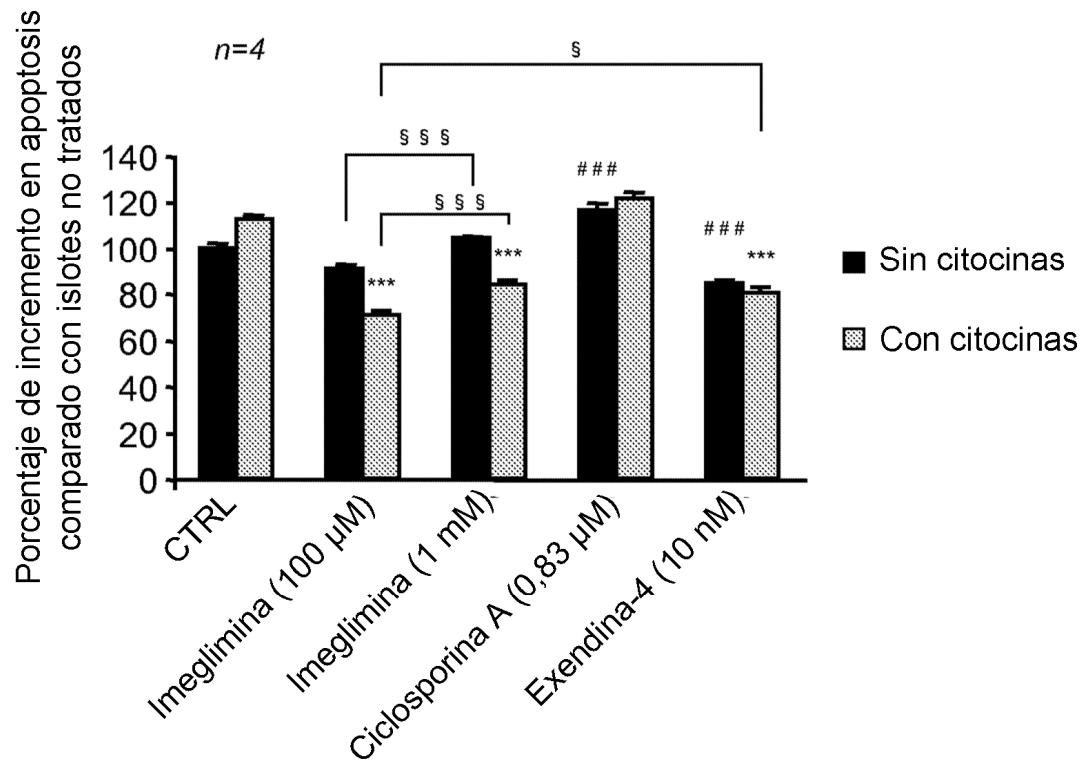


Figura 1