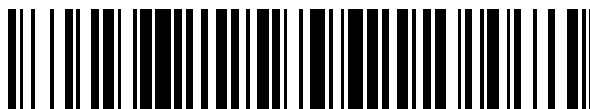


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 757 846**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122	(2006.01) A61K 31/55	(2006.01)
A61K 31/138	(2006.01) A61K 31/7004	(2006.01)
A61K 31/16	(2006.01) A61P 5/48	(2006.01)
A61K 31/197	(2006.01) A61K 31/422	(2006.01)
A61K 31/216	(2006.01) A61K 31/137	(2006.01)
A61K 31/437	(2006.01) A61K 31/4164	(2006.01)
A61K 31/44	(2006.01) A61K 31/42	(2006.01)
A61K 31/445	(2006.01) A61K 31/495	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01) A61K 31/155	(2006.01)
A61K 31/53	(2006.01) A61K 31/164	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2013 PCT/EP2013/072728**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068007**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2013 E 13788927 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2914252**

54 Título: **Composiciones, métodos y sus usos para el tratamiento de la diabetes y afecciones relacionadas al controlar el nivel de glucosa en sangre**

30 Prioridad:

30.10.2012 EP 12306354
30.10.2012 US 201261720156 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2020

73 Titular/es:

PHARNEXT (100.0%)
11-13 Rue René Jacques
92130 Issy-les-Moulineaux, FR

72 Inventor/es:

COHEN, DANIEL;
CHUMAKOV, ILYA;
NABIROCHKIN, SERGUEI y
HAJJ, RODOLPHE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 757 846 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

Composiciones, métodos y sus usos para el tratamiento de la diabetes y afecciones relacionadas al controlar el nivel de glucosa en sangre

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones para el uso en el control de la glucemia en un mamífero que lo necesite. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevas terapias o terapias combinadas de la diabetes y trastornos relacionados, basadas en composiciones que controlan el nivel de glucosa en sangre.

Antecedentes de la invención

- 10 Diabetes mellitus se refiere a un grupo de enfermedades metabólicas en las que los pacientes tienen un alto nivel de azúcar en sangre. Es un importante problema de salud pública debido al alto número de pacientes afectados ya que 171 millones de personas en el mundo correspondientes a 2,8% de la población en 2000 son diabéticos. Actualmente, la diabetes se considera epidémica: el número de pacientes casi se duplicará para 2030. Existen dos tipos principales de diabetes. La diabetes de tipo 1 se caracteriza principalmente por pacientes insulino dependientes, se sabe que es autoinmunitaria, a veces desencadenada por factores infecciosos. Habitualmente, comienza en pacientes menores de 30 años y representa aproximadamente 5-10% de todos los casos de diabetes [1]. La diabetes de tipo 2, caracterizada principalmente por insulino independencia, tiene un inicio posterior que la diabetes tipo 1 y por lo tanto se denomina diabetes de inicio en la edad adulta. Representa aproximadamente 90-95% de todos los casos de diabetes. Potencialmente, muchos factores pueden dar lugar a o exacerbar la diabetes de tipo 2. Estos incluyen hipertensión, colesterol elevado, síndrome metabólico y sobrepeso/obesidad. Como un ejemplo, aproximadamente 90% de los 20 pacientes con diabetes de tipo 2 tienen sobrepeso/obesidad [2]. Otras formas de diabetes incluyen diabetes gestacional, diabetes congénita, diabetes relacionada con la fibrosis quística, diabetes esteroidea y varias formas de diabetes monogénica. Los tratamientos actuales consisten en la administración de insulina para la diabetes de tipo 1 y/o medicamentos reductores de la glucosa o sensibilizadores insulínicos para la diabetes de tipo 2. La insulina es una hormona implicada en la homeostasis de glucosa, junto con el glucagón. En respuesta a la elevación de los niveles 25 de glucosa en sangre, la insulina es producida por células beta pancreáticas situadas en los islotes de Langerhans. Así, la glucosa es recogida de la sangre por los hepatocitos, las células musculares y los adipocitos usada como fuente de energía o para el almacenamiento como glucógeno y triglicéridos. También inhibe la lipólisis, evitando la liberación de ácidos grasos de los tejidos grasos. Por el contrario, los bajos niveles de glucosa en sangre dan como resultado tanto una producción como una liberación reducidas de insulina. Junto con la acción del glucagón, da como resultado 30 la liberación de glucosa en la corriente sanguínea. En situaciones patológicas, la producción de insulina por las células beta no es suficiente (diabetes de tipo 1) y/o las células responden escasamente a ella (resistencia a insulina: diabetes de tipo 2), conduciendo a altos niveles de glucosa en sangre persistentes. Los mecanismos precisos implicados en estas patologías todavía no se entienden completamente.

- 35 La disminución en la producción de insulina que caracteriza la diabetes de tipo 1 se debe a una destrucción de células beta mediante un proceso autoinmunitario que consiste en producción de autoanticuerpos, activación de linfocitos autoactivos e infiltración del páncreas para destruir las células beta. La diabetes mellitus de tipo 2 se considera un trastorno metabólico complejo. Resulta de la combinación de un deterioro de la secreción pancreática de insulina debido a la disfunción de las células beta, resistencia a insulina así como un daño en la secreción de glucagón. El deterioro de la producción de insulina estimulada por glucosa implica la pérdida progresiva de células beta pancreáticas así como una disminución en la función de las células de los islotes. La resistencia a insulina consiste, 40 por ejemplo, en la supresión o reducción de los efectos de la insulina en órganos/tejidos periféricos (hígado, músculos y tejidos grasos) o un aumento de la lipólisis en adipocitos que conduce a un incremento en la circulación de ácidos grasos libres. Esos episodios dan como resultado un incremento en la producción de glucosa endógena por el hígado junto con una disminución en la captación de glucosa debida a una reducción en la expresión de receptores de insulina, defectos en las acciones posreceptoras de la insulina [3], sobreproducción de glucosa hepática o bloqueo de rutas de señalización de insulina [4]. La resistencia a insulina es un rasgo distintivo de un síndrome más complejo, llamado síndrome metabólico, que es un conjunto de factores de riesgo para la cardiopatía coronaria y la diabetes mellitus que incluye obesidad abdominal, niveles elevados de triglicéridos, niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad, presión sanguínea elevada y niveles elevados de glucosa en plasma [5]. 75% de los pacientes con diabetes de tipo 2 50 tienen síndrome metabólico.

- La glucosa en sangre alta persistente conduce a complicaciones tanto agudas como crónicas que pueden ser muy incapacitantes, incluso letales, para los pacientes diabéticos, tales como cardiopatía y apoplejía que son las consecuencias más potencialmente mortales de la diabetes mellitus. La glucosa en sangre elevada persistente a largo plazo daña los vasos sanguíneos, conduciendo a angiopatía microvascular y macrovascular que representa la mayoría 55 de la morbilidad y mortalidad incrementadas asociadas con la enfermedad. Las complicaciones microvasculares son responsables de la cardiomiopatía diabética, la nefropatía, conduciendo ambas a veces a insuficiencia del órgano, retinopatía que puede conducir a pérdida de visión grave, y neuropatía. Las complicaciones macrovasculares tratan en cambio de deterioros cardiovasculares que son responsables de arteriopatía coronaria que al final provoca angina o infarto de miocardio, mionecrosis diabética, vasculopatía periférica y apoplejía. Las complicaciones macrovasculares

son más comunes y hasta 80% de los pacientes con diabetes de tipo 2 desarrollarán o morirán de una enfermedad macrovascular.

Desgraciadamente, los tratamientos existentes no son satisfactorios para restaurar la normoglucemia a largo plazo, ya que la función de las células beta disminuye con el tiempo [6]. Por otra parte, actualmente no existe un fármaco individual capaz de invertir todos los aspectos de la enfermedad.

El control de la glucemia en la diabetes de tipo 1 se consigue casi exclusivamente con inyecciones de insulina exógena, puesto que los pacientes ya no producen insulina. También se puede administrar insulina en pacientes con diabetes de tipo 2, cuando los fármacos reductores de glucosa y la dieta fallan en el control de la glucemia [7]. Hoy en día, se administra más frecuentemente a estos pacientes, ya que retrasa el desarrollo y el avance de las complicaciones. Sin embargo, el uso de insulina comprende efectos secundarios incluyendo la hipoglucemia cuando la dosificación no es apropiada, un incremento del riesgo de desarrollar cáncer colorrectal [8] y aumento de peso, que no está recomendado para los pacientes diabéticos, particularmente los obesos.

La naturaleza progresiva de la diabetes de tipo 2 implica que muchos pacientes requieran finalmente una combinación de antidiabéticos, posiblemente junto con insulina [9]. Los antidiabéticos se han desarrollado a fin de contrarrestar los mecanismos principales implicados en la diabetes de tipo 2: resistencia a insulina (biguanidas y tiazolidinodionas) y secreción de insulina (sulfonilureas, glinidas, inhibidores de dipeptidilpeptidasa-4, antagonistas de receptores de péptido glucagonoide 1), además de mecanismos particulares que se ocupan de la absorción retardada de glucosa por el tracto gastrointestinal. Sin embargo, se ha mostrado que la mayoría de estos medicamentos tienen efectos secundarios perjudiciales tales como aumento de peso, edema periférico o insuficiencia cardíaca congestiva y a pérdida de eficacia en un uso a largo [9].

A pesar del número creciente de opciones terapéuticas relacionadas con la diabetes, ninguna es capaz de invertir todos los aspectos de esta enfermedad incluyendo la pérdida progresiva de la función de las células beta y el tratamiento de todas las complicaciones. Así, existe una necesidad de medicamentos alternativos y mejorados para el tratamiento de la diabetes y afecciones relacionadas.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona nuevas composiciones para el uso en el tratamiento de la diabetes y trastornos relacionados, particularmente diabetes de tipo 2, según se definen en las reivindicaciones.

La presente invención también proporciona composiciones para el uso en la normalización de la glucemia en un sujeto mamífero que lo necesite.

La invención también se refiere a composiciones para el uso en el control del nivel de glucosa en sangre en sujetos mamíferos, particularmente en sujetos mamíferos que tienen diabetes o un trastorno relacionado.

La invención también se refiere a composiciones para el uso en el incremento o la estimulación de la captación de glucosa en adipocitos y/o células musculares en sujetos mamíferos, particularmente en sujetos mamíferos que tienen diabetes o un trastorno relacionado.

La invención también se refiere a composiciones para el uso en la disminución de la resistencia a insulina en sujetos mamíferos que tienen diabetes de tipo 2 o un trastorno relacionado.

La invención también se refiere a composiciones para el uso en la disminución de la apoptosis de células beta pancreáticas en sujetos mamíferos, particularmente en sujetos mamíferos que tienen diabetes o un trastorno relacionado.

La presente invención divulga la identificación y validación, por los inventores, de fármacos que, solos o en combinaciones, afectan eficazmente bien a una o bien a varias rutas pertinentes implicadas en el control del nivel de glucosa en sangre y representan terapias nuevas y eficaces para el tratamiento de la diabetes y trastornos relacionados. Por lo tanto, la invención divulga nuevas terapias de la diabetes (tipo 1 o tipo 2) y afecciones relacionadas, así como nuevos fármacos y combinaciones de fármacos que son particularmente eficaces para estas afecciones. La invención es aplicable a cualquier mamífero, particularmente un sujeto humano. La invención es particularmente adecuada para tratar la diabetes de tipo 2, que está asociada con niveles anormalmente elevados de glucosa en sangre. Los tratamientos según la invención se pueden usar en combinación o alternamente con otras terapias de estas afecciones.

El objetivo de esta invención se refiere a una composición según se define en las reivindicaciones. También se describe en la presente memoria una composición que comprende al menos un, preferiblemente al menos dos compuesto(s) seleccionado(s) de acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dextrometorfenamina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, para el uso en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado.

También se describe en la presente memoria una composición que comprende al menos un, preferiblemente al menos dos, compuesto(s) seleccionado(s) de acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno.

- 5 En una realización particular, esta invención se refiere a una composición que comprende ifenprodilo, para el uso en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado.

Según se ilustra en los ejemplos, los compuestos anteriores proporcionan un efecto sustancial cuando se usan individualmente y son más particularmente eficaces en combinaciones. Los ejemplos muestran en efecto que las terapias combinadas se prefieren más aún para regular los niveles de glucosa en sangre, en particular la captación de glucosa y la producción de glucosa, así como para disminuir la resistencia a insulina, y proporcionan el beneficio clínico más eficaz.

También se describe en la presente memoria una composición que comprende al menos:

- 15 - un primer compuesto seleccionado de acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno, y

- 20 - un segundo compuesto, distinto del primer compuesto, seleccionándose el segundo compuesto de acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado.

25 También se describe en la presente memoria una composición que comprende al menos dos compuestos seleccionados de acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

30 Se describe en la presente memoria una composición que comprende al menos dos compuestos seleccionados de acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno.

Las composiciones de fármacos de esta invención también se pueden usar en combinación adicional con otros agentes antidiabéticos o tratamientos a fin de proporcionar un efecto clínico mejorado y/o para aliviar efectos secundarios potenciales de estos fármacos antidiabéticos o tratamientos.

También se describen en la presente memoria composiciones que comprenden:

- 35 - un compuesto seleccionado de acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno; y

- 40 - un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acarbosa, acetohexamida, alogliptina, berberina, bezafibrato, bromocriptina, buformina, carbutamida, cloropropamida, picolinato de cromo, ciprofibrato, clofibrato, colessevelam, dexfenfluramina, dutogliptina, exenatida, fenofibrato, gemfibrozilo, gemigliptina, glibenclamida, glibornurida, glicetaniolo, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisentida, glicopiramide, imidapril, insulina, inulina, ácido lipoico, linagliptina, liraglutida, mecobalamina, metformina, miglitol, mitiglinida, nateglinida, orlistat, fenformina, pioglitazona, pramlintida, repaglinida, rosiglitazona, saxagliptina, sitagliptina, tolazamida, tolbutamida, vildagliptina y voglibosa;

- 45 así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

50 También se describen en la presente memoria composiciones que comprenden un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno, en combinación con metformina así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las combinaciones de fármacos reivindicadas. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden uno o varios excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. Además, los compuestos en las composiciones de la invención se pueden

usar como tales o en la forma de una sal, un hidrato, un éter, un éster, un ácido, una amida, un racemato o un isómero. También se pueden usar en la forma de formulaciones de liberación sostenida.

En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende una combinación seleccionada de:

- ifenprodilo y acamprosato,
- 5 - ifenprodilo y baclofeno,
- ifenprodilo y nicergolina,
- ifenprodilo y fenspirida,
- ifenprodilo y ácido tolfenámico,
- ifenprodilo y torasemida, o
- 10 - ifenprodilo y triamtereno,

así como a esta composición para el uso en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

- 15 En otra realización, la invención se refiere a una combinación de metformina con al menos una de las combinaciones de compuestos anteriores, así como a esta combinación para el uso en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

Como se divulgará adicionalmente en la presente solicitud, los compuestos en una composición o terapia combinada según la invención se pueden formular para la administración combinada, separada o secuencial, posiblemente a través de diferentes rutas y protocolos. En una realización preferida, las composiciones de la invención se administran repetidamente al sujeto.

- 20 También se describen en la presente memoria métodos para tratar la diabetes o un trastorno relacionado, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesite un fármaco o una composición de fármaco o fármaco(s) como la divulgada anteriormente. En una realización particular, los métodos comprenden además una etapa de medida del nivel de glucosa en sangre en una muestra de sangre procedente del sujeto mamífero, bien antes o bien después de la administración del fármaco o los fármacos.
- 25 También se describe en la presente memoria un método para tratar la diabetes o un trastorno relacionado, comprendiendo el método administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente a un sujeto que lo necesite una combinación de fármacos como la divulgada anteriormente.

También se describe en la presente memoria el uso de las composiciones descritas anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado,

- 30 La invención se puede usar en cualquier sujeto mamífero, particularmente un sujeto humano.

Breve descripción de las figuras

Para todas las figuras, los fármacos probados inducen un efecto significativamente diferente de la referencia (prueba de la t. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

- 35 Figura 1: Efecto del pretratamiento con D-manosa contra la apoptosis de células beta (densidad óptica). La apoptosis se evita significativamente mediante D-manosa a dosis tan bajas como 10 nM (129%).

Figura 2: Efecto del pretratamiento a corto plazo con triamtereno sobre la secreción de insulina en células INS-1. La secreción de insulina se mejora significativamente mediante triamtereno (+37%).

Figura 3: Efecto del pretratamiento a largo plazo con cinacalcet sobre la secreción de insulina en células INS-1. La secreción de insulina se mejora significativamente mediante cinacalcet (+55%) a dosis tan bajas como 1 μ M.

- 40 Figura 4: Efecto del pretratamiento a corto plazo con acamprosato sobre la captación de glucosa en células H-2Kb. La captación de glucosa se mejora significativamente mediante acamprosato (+45%) a dosis tan bajas como 0,1 μ M.

Figura 5: Efecto del pretratamiento a corto plazo con almitrina sobre la captación de glucosa en células H-2Kb. La captación de glucosa se mejora significativamente mediante almitrina (+80%) a dosis tan bajas como 1 μ M.

- 45 Figura 6: Efecto del pretratamiento a largo plazo con nicergolina sobre la captación de glucosa en células H-2Kb. La captación de glucosa se mejora significativamente mediante nicergolina (+28%).

- Figura 7: Efecto del pretratamiento a corto plazo con carbetapentano sobre la captación de glucosa en células 3T3-L1. La captación de glucosa se mejora significativamente mediante carbetapentano (+58%) a dosis tan bajas como 100 nM.
- 5 Figura 8: Efecto del pretratamiento a largo plazo con almitrina sobre la captación de glucosa en células 3T3-L1. La captación de glucosa se mejora significativamente mediante almitrina (+69%) a dosis tan bajas como 1 µM.
- Figura 9: Efecto del pretratamiento a corto plazo con D-manosa sobre la producción de glucosa por células hepáticas. La producción de glucosa se reduce significativamente mediante D-manosa (-22%).
- Figura 10: Efecto del pretratamiento a largo plazo con ifenprodilo sobre la producción de glucosa por células hepáticas. La producción de glucosa se reduce significativamente mediante ifenprodilo (-22%) a dosis tan bajas como 10 nM.
- 10 Figura 11: Efecto del pretratamiento a largo plazo con azelastina sobre la producción de glucosa por células hepáticas. La producción de glucosa se reduce significativamente mediante azelastina (-36%).
- Figura 12: Efecto del pretratamiento a corto plazo con piribedilo sobre la captación de glucosa en células 3T3-L1. La captación de glucosa se mejora significativamente mediante piribedilo (+68%) a dosis tan bajas como 10 nM.
- 15 Figura 13: Efecto del pretratamiento con torasemida sobre la captación de glucosa en miotubos diabéticos primarios humanos. La captación de glucosa se mejora significativamente (+24%, +18% y +14%, respectivamente) a dosis tan bajas como 0,01 µM, 0,1 µM y 1 µM.
- Figura 14: Efecto del pretratamiento con fenspirida sobre la captación de glucosa en miotubos diabéticos derivados de un paciente diabético. La captación de glucosa se mejora significativamente (+34%, +30%, +27%, respectivamente) a dosis tan bajas como 0,01 µM, 0,1 µM y 1 µM.
- 20 Figura 15: Efecto del pretratamiento con ácido tolfenámico sobre la captación de glucosa en miotubos primarios humanos derivados de un paciente diabético. La captación de glucosa se mejora significativamente (+13%, +13% y +12%, respectivamente) a dosis tan bajas como 0,01 µM, 0,1 µM y 1 µM.
- Figura 16: Efecto del pretratamiento con ifenprodilo sobre la captación de glucosa en miotubos diabéticos primarios humanos. La captación de glucosa se mejora (+48%) a dosis tan bajas como 0,01 µM.
- 25 Figura 17: Efecto del pretratamiento con triamtereno sobre la captación de glucosa en miotubos diabéticos primarios humanos. La captación de glucosa se mejora significativamente (+13%) a dosis tan bajas como 0,01 µM.
- Figura 18: Efecto del pretratamiento con torasemida sobre la captación de glucosa por adipocitos diferenciados 3T3L1, bajo una condición de resistencia a insulina inducida por TNF-α. La captación de glucosa se mejora significativamente (+121%, +123% y +129%), respectivamente, a dosis tan bajas como 0,37 nM, 1 nM y 3,3 nM, cuando se compara con células resistentes a insulina no tratadas (TNFα).
- 30 Figura 19: Efecto del pretratamiento con ifenprodilo sobre la captación de glucosa por adipocitos diferenciados 3T3L1, bajo una condición de resistencia a insulina inducida por TNF-α. La captación de glucosa se mejora significativamente (+140%) a dosis tan bajas como 1 µM, cuando se compara con células resistentes a insulina no tratadas (TNFα).
- Figura 20: Efecto del pretratamiento con fenspirida sobre la captación de glucosa por adipocitos diferenciados 3T3L1, bajo una condición de resistencia a insulina inducida por TNF-α. La captación de glucosa se mejora significativamente (+130%) a una dosis tan baja como 1 nM, cuando se compara con células resistentes a insulina no tratadas (TNFα).
- 35 Figura 21: Efecto del pretratamiento con ácido tolfenámico sobre la captación de glucosa por adipocitos diferenciados 3T3L1, bajo una condición de resistencia a insulina inducida por TNF-α. La captación de glucosa se mejora significativamente (+127%) a una dosis tan baja como 10 nM, cuando se compara con células resistentes a insulina no tratadas (TNFα).
- 40 Figura 22: Efecto de la combinación de baclofeno - acamprosato sobre la concentración de CRP en plasma en ratas macho ZDF después de un tratamiento de 4 semanas. La concentración de CRP se reduce significativamente mediante la combinación de baclofeno - acamprosato en ratas ZDF tratadas cuando se comparan con ratas ZDF no tratadas.
- 45 Figura 23: Efecto del tratamiento a corto plazo con una combinación de D-manosa - baclofeno - metformina (respectivamente, 5 mg/kg y 2 mg/kg dos veces al día, y 150 mg/kg una vez al día) sobre la homeostasis de glucosa en ratones db/db. La glucemia en ayunas (mg/dl) se disminuye significativamente en ratones db/db tratados, cuando se comparan con ratones db/db no tratados.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos enfoques terapéuticos para controlar el nivel de glucosa en sangre. La invención divulga nuevos fármacos, combinaciones de fármacos y métodos, que permiten un control eficaz del nivel de glucosa en sangre y se pueden usar para el tratamiento de pacientes.

- 5 Por lo tanto, la invención se refiere a composiciones para el tratamiento de la diabetes y trastornos relacionados.

Definiciones

Dentro del contexto de la invención, el término "tratamiento" incluye el tratamiento preventivo o curativo. El término tratamiento indica en particular la corrección, el retardo o la reducción de una homeostasis de glucosa deteriorada. El nivel de glucosa en sangre fluctúa a lo largo del día. Habitualmente, los niveles de glucosa son inferiores por la mañana, antes de la primera comida del día y ascienden después de las comidas durante algunas horas. Por consiguiente, el término tratamiento incluye el control del nivel de glucosa en sangre al incrementar o disminuir el nivel de glucosa en sangre dependiendo de la condición del sujeto mamífero y el momento del día a fin de alcanzar niveles de glucosa normales. El término tratamiento incluye más particularmente una reducción temporal o persistente del nivel de glucosa en sangre en un sujeto que tenga diabetes o un trastorno relacionado. El término "tratamiento" también indica una mejora en la liberación de insulina (p. ej., por células β pancreáticas), la liberación de glucagón (p. ej., por células pancreáticas α), la utilización y/o la captación de glucosa (p. ej., captura de glucosa por células musculares o adipocitos) y/o la neoglucogénesis hepática.

Dentro del contexto de la invención, los términos "controlar el nivel de glucosa en sangre" o "el control del nivel de glucosa en sangre" se refieren a la normalización o la regulación del nivel de glucosa en sangre o plasma en un sujeto mamífero que tenga niveles anormales (es decir, niveles que estén por debajo o por encima de un valor de referencia, mediano o medio conocido para un sujeto mamífero correspondiente con una homeostasis de glucosa normal).

El término "diabetes" se refiere en la presente memoria a un grupo de enfermedades metabólicas en las que los pacientes tienen altos niveles de glucosa en sangre, incluyendo diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, diabetes gestacional, diabetes congénita, diabetes relacionada con la fibrosis quística, diabetes esteroidea y varias formas de diabetes monogénica.

El término "trastorno relacionado" indica cualquier enfermedad asociada a un nivel de glucosa en sangre o plasma fuera del intervalo normal, preferiblemente hiperglucemia. Por consiguiente, el término "trastorno relacionado" incluye deterioro de la tolerancia a la glucosa (IGT, por sus siglas en inglés), deterioro de la glucosa en ayunas (IFG, por sus siglas en inglés), resistencia a insulina, síndrome metabólico, hiperglucemia posprandial y sobrepeso/obesidad. Estos trastornos relacionados también se pueden caracterizar por un nivel anormal de insulina en sangre y/o plasma.

Los términos "combinación" o "terapia combinada" o "tratamiento combinado" indican un tratamiento en el que al menos dos compuestos se coadministran a un sujeto para provocar un efecto biológico. En una terapia combinada según esta invención, los al menos dos fármacos se pueden administrar conjuntamente o separadamente, al mismo tiempo o secuencialmente. No se requiere la administración simultánea, con la condición de que los fármacos produzcan un efecto combinado o sinérgico en el organismo para mejorar las condiciones del paciente. Además, los al menos dos fármacos se pueden administrar a través de diferentes rutas y protocolos. Como resultado, aunque se pueden formular conjuntamente, los fármacos de una combinación también se pueden formular separadamente.

Dentro del contexto de la invención, los términos "compuesto" o "fármaco", que se identifican por su nombre o número CAS, están destinados a indicar el compuesto químico según se nombra o identifica específicamente con su número CAS correspondiente, así como cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, isómeros o conjugados, de cualquier pureza química.

El término "derivado" incluye cualquier compuesto funcionalmente y estructuralmente relacionado, tal como derivados de ácido, derivados de amida, derivados de éster, derivados de éter, profármacos y metabolitos.

El término "profármaco", según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier derivado (o precursor) de un compuesto que, cuando se administra a un sistema biológico (p. ej., un organismo humano), genera dicho compuesto como resultado de, p. ej., una reacción o reacciones químicas espontáneas), una reacción o reacciones químicas catalizadas enzimáticamente y/o una reacción o reacciones químicas metabólicas. Típicamente, los profármacos tienen la estructura X-fármaco en donde X es un resto portador inerte y fármaco es el compuesto activo. Habitualmente, el profármaco carece de actividad o es menos activo que el fármaco y el fármaco se libera del portador *in vivo*. Habitualmente, los profármacos son inactivos o menos activos que el fármaco resultante y se pueden usar, por ejemplo, para mejorar las propiedades fisicoquímicas del fármaco, para dirigir el fármaco a un tejido específico, para mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco y/o para reducir efectos secundarios no deseables. Algunos de los grupos funcionales comunes que se pueden someter a diseño de profármacos incluyen, pero no se limitan a, grupos carboxílicos, hidroxilo, amina, fosfato/fosfonato y carbonilo. Profármacos producidos típicamente a través de la modificación de estos grupos incluyen, pero no se limitan a, ésteres, carbonatos, carbamatos, amidas y fosfatos. Una guía técnica específica para la selección de profármacos adecuados es de conocimiento común general [11-15]. Por otra parte, la preparación de profármacos se puede realizar mediante

métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Métodos que se pueden usar para sintetizar profármacos se describen en numerosas revisiones sobre la materia [12; 16-21].

El término "metabolito" de un fármaco según se usa en la presente memoria se refiere a una molécula que resulta de la modificación o las modificaciones (bioquímicas) o el procesamiento de dicho fármaco después de la administración a un organismo, habitualmente a través de sistemas enzimáticos especializados, y que exhibe o retiene una actividad biológica del fármaco. Se ha divulgado que los metabolitos son responsables de la mayoría de la acción terapéutica del fármaco original.

El término "sal" se refiere a una sal por adición de ácido inorgánico u orgánico o básica farmacéuticamente aceptable y relativamente atóxica de un compuesto de la presente invención. La formación de sales farmacéuticas consiste típicamente en emparejar una molécula de fármaco ácida, básica o dipolar con un ion conjugado para crear una versión salina del fármaco. Se puede usar una amplia variedad de especies químicas en la reacción de neutralización. Aunque la mayoría de las sales de un principio activo dado son bioequivalentes, algunas pueden tener, entre otras cosas, propiedades de solubilidad o biodisponibilidad incrementadas. La selección de la sal es ahora una operación estándar común en el procedimiento de desarrollo de fármacos según se enseña por H. Stahl y C.G Wermuth en su manual [22].

En una realización preferida, se entiende que la denominación de un compuesto indica el compuesto de por sí, así como cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, isómeros, racematos, ésteres o éteres.

En una realización más preferida, se entiende que la denominación de un compuesto indica el compuesto según se indica específicamente de por sí, así como cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización particular, se usa una formulación de liberación sostenida del compuesto.

Composiciones y métodos para tratar la diabetes y trastornos relacionados

Mediante una integración exhaustiva de datos experimentales que cubren los resultados de estudios de biología celular, experimentos de perfilado de la expresión y estudios de asociación genética, los inventores han podido seleccionar un pequeño número de fármacos que, solos y/o en combinación o combinaciones, alteran eficazmente rutas pertinentes para el control de la glucemia y representan nuevos enfoques terapéuticos para tratar la diabetes y trastornos relacionados. Estos fármacos o combinaciones se pueden usar para normalizar el nivel de glucosa en sangre al actuar, p. ej., sobre la liberación de insulina, la liberación de glucagón, la utilización de glucosa y/o la producción de glucosa, y ofrecen nuevas terapias potentes de la diabetes y trastornos relacionados. Según se divulga en los ejemplos, estos fármacos y combinaciones tienen un fuerte efecto sobre funciones pertinentes de la diabetes: están implicados en la protección de células beta contra la apoptosis, el incremento de la captación de glucosa en tejidos musculares y en adipocitos, el incremento de la secreción de insulina por las células β pancreáticas y/o en el control de la producción de glucosa en tejidos hepáticos.

Por lo tanto, estos fármacos y combinaciones representan nuevos enfoques terapéuticos para el control del nivel de glucosa en sangre en un mamífero que lo necesite. También representan nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la diabetes o trastornos relacionados en un mamífero que lo necesite.

Se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, amlexanox, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisone, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona y rilmenidina, para el uso en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite. También se divulga en la presente memoria el uso de al menos un compuesto como los listados anteriormente para la fabricación de un medicamento para tratar la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

También se divulga en la presente memoria un método para tratar la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite, que comprende administrar al mamífero al menos un compuesto como los listados anteriormente.

En la tabla 1 a continuación se proporcionan números CAS ilustrativos para cada uno de los compuestos seleccionados:

Tabla 1

Nombre del fármaco	Número CAS
acamprosato	77337-76-9; 77337-73-6
almitrina	27469-53-0; 29608-49-9
amlexanox	68302-57-8 ;
azelastina	58581-89-8; 79307-93-0
baclofeno	1134-47-0; 66514-99-6;

	69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3
carbetapentano	77-23-6; 23142-01-0; 1045-21-2
cimetidina	51481-61-9; 70059-30-2
cinacalcet	226256-56-0; 364782-34-3
dexbromofeniramina	86-22-6; 980-71-2; 2391-03-9
dietilcarbamazina	90-89-1; 1642-54-2
diprolina	479-18-5
D-manosa	10030-80-5; 3458-28-4
fenspirida	5053-06-5; 5053-08-7
fexofenadina	83799-24-0; 138452-21-8; 153439-40-8; 139965-10-9; 139965-11-0
idebenona	58186-27-9
ifenprodilo	23210-56-2; 23210-58-4
levosimendano	141505-33-1
mexiletina	5370-01-4; 31828-71-4
nicergolina	27848-84-6
piribedilo	3605-01-4
rilmenidina	54187-04-1; 85409-38-7
ácido tolfenámico	13710-19-5
tolperisona	728-88-1; 3644-61-9
torasemida	56211-40-6; 72810-59-4
triamtereno	396-01-0

Según se menciona en los ejemplos, los compuestos anteriores, cuando se prueban individualmente, son activos para mejorar los niveles de glucosa al alterar distintas rutas importantes de homeostasis de glucosa.

Por otra parte, los inventores han encontrado sorprendentemente que acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida y triamtereno son particularmente eficaces para proteger a las células beta contra la apoptosis, para mejorar la captación de glucosa por tejidos musculares y/o la liberación de insulina. Por lo tanto, estos compuestos representan la realización más preferida para el uso en la presente invención.

Por consiguiente, las composiciones de la invención pueden comprender 1, 2, 3, 4 o 5 fármacos anteriores distintos, más preferiblemente 2, 3 o 4 fármacos distintos para el tratamiento combinado de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto que lo necesite. Por otra parte, las composiciones de fármacos anteriores también se pueden usar en combinación adicional con uno o varios fármacos o tratamientos adicionales beneficiosos para sujetos que sufran diabetes o un trastorno relacionado.

También se divulga en la presente memoria una composición para el uso en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado, comprendiendo la composición un compuesto seleccionado de acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno. Las moléculas anteriores se usan preferiblemente en terapias combinadas para proporcionar el beneficio clínico más eficaz. Las combinaciones de fármacos son particularmente ventajosas debido a que pueden afectar a diferentes rutas y así son más eficaces. Además, debido a su eficacia y modo de acción, las combinaciones de fármacos se pueden usar a bajas dosificaciones, lo que es una ventaja adicional muy sustancial. Así, las composiciones de fármacos más preferidas comprenden 2, 3, 4 o 5 fármacos distintos, aún más preferiblemente 2, 3 o 4 para un tratamiento combinado de la diabetes o trastornos relacionados en un sujeto que lo necesite. En una realización preferida, los fármacos de la invención se formulan en una combinación o combinaciones para la administración combinada, separada o secuencial, a fin de proporcionar el efecto más eficaz.

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden una combinación de al menos dos compuestos elegidos del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprolina, idebenona y rilmenidina, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden una combinación de al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina,

nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida y triamtereno, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

También se divulga en la presente memoria una composición que comprende:

5 - al menos un compuesto seleccionado de acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno, y

10 - al menos un compuesto distinto que se selecciona de acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado. Un objetivo de esta invención se refiere a composiciones que comprenden (i) ifenprodilo y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como estas composiciones para el uso en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

20 También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) acamprosato y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

25 También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) azelastina y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

30 También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) torasemida y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

35 También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) fenspirida y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

40 También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) ácido tolfenámico y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

45 También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) triamtereno y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

50 También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) piribedilo, y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona o rilmenidina, así como el uso de esta composición en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un mamífero que lo necesite.

En la realización más preferida, las composiciones de esta invención comprenden al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos, formuladas para la administración combinada, separada o secuencial:

- ifenprodilo y acamprosato,
 - ifenprodilo y baclofeno,
 - 5 - ifenprodilo y nicergolina,
 - ifenprodilo y fenspirida,
 - ifenprodilo y torasemida,
 - ifenprodilo y triamtereno, o
 - ifenprodilo y ácido tolfenámico
 - 10 Otro objetivo de esta invención reside en el uso de una composición como la definida anteriormente para controlar el nivel de glucosa en sangre o plasma en un mamífero que lo necesite.
- También se divulga en la presente memoria el uso de una composición como la definida anteriormente para la fabricación de un medicamento para controlar el nivel de glucosa en sangre o plasma en un mamífero que lo necesite.
- También se divulga en la presente memoria el uso de una composición como la definida anteriormente para la
- 15 fabricación de un medicamento para tratar la diabetes o un trastorno relacionado.
- Según se indica previamente, en una a composición o terapia combinada de esta invención, los compuestos o fármacos se pueden formular para la administración agrupada, separada o secuencial.
- La invención está particularmente adaptada para corregir desregulaciones de los niveles de glucosa en pacientes humanos que tienen diabetes, prediabetes (también denominada IGT o IFG), obesidad o una enfermedad
- 20 cardiovascular que implique una predisposición a la diabetes,
- También se divulga en la presente memoria un método para tratar la diabetes o un trastorno relacionado, comprendiendo el método administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un fármaco o una combinación de fármacos como los definidos anteriormente.
- También se divulga en la presente memoria un método para tratar la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto
- 25 que lo necesite, que comprende administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente al sujeto una cantidad eficaz de al menos una de las siguientes combinaciones de fármacos:
- ifenprodilo y acamprosato,
 - ifenprodilo y baclofeno,
 - baclofeno y acamprosato,
 - 30 - mexiletina y cinacalcet,
 - mexiletina y torasemida,
 - sulfisoxazol y torasemida,
 - azelastina y nicergolina,
 - idebenona y nicergolina,
 - 35 - carbetapentano y nicergolina,
 - almitrina y nicergolina,
 - cimetidina y nicergolina,
 - dietilcarbamazina y nicergolina,
 - ifenprodilo y nicergolina,
 - 40 - azelastina y idebenona,
 - acamprosato y nicergolina,

- azelastina y carbetapentano,
- azelastina y almitrina,
- idebenona y carbetapentano,
- idebenona y almitrina,
- 5 - triamtereno y nicergolina,
- D-manosa y nicergolina,
- idebenona y dietilcarbamazina,
- ifenprodilo y fenspirida,
- ifenprodilo y torasemida,
- 10 - ifenprodilo y triamtereno,
- ifenprodilo y ácido tolfenámico,
- fenspirida y torasemida,
- fenspirida y triamtereno,
- fenspirida y ácido tolfenámico,
- 15 - torasemida y triamtereno,
- torasemida y ácido tolfenámico,
- triamtereno y ácido tolfenámico, o
- D-manosa y baclofeno.

20 También se divulgan en la presente memoria métodos para tratar la diabetes o un trastorno relacionado que comprende además una etapa de medida del nivel de glucosa en sangre en una muestra de sangre procedente del sujeto mamífero, antes y/o después de la administración del fármaco o los fármacos.

También se divulga en la presente memoria un método para controlar el nivel de glucosa en sangre, comprendiendo el método las etapas de:

- 1) medir el nivel de glucosa en sangre en una muestra de sangre procedente de un sujeto mamífero,
- 25 2) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición como la divulgada anteriormente.

En estos métodos, la etapa de medición del nivel de glucosa se puede repetir durante el transcurso del tratamiento, p. ej., para determinar o verificar la eficacia del tratamiento y/o para ajustar el régimen de tratamiento.

30 Típicamente, las composiciones de la invención comprenden uno o varios portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Además, para el uso en la presente invención, habitualmente, los fármacos o compuestos se mezclan con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

También se divulga en la presente memoria un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo el método mezclar los compuestos anteriores en un excipiente o portador adecuado.

Según las realizaciones preferidas de la invención, que se indican anteriormente, los compuestos se usan como tales o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable o una de sus formulaciones de liberación sostenida.

35 Aunque muy eficaces *in vitro* e *in vivo*, dependiendo del sujeto o la afección específica, las composiciones o terapias combinadas anteriores se pueden usar además junto o en asociación o combinación con fármacos o tratamientos adicionales.

40 Otras terapias para la diabetes adicionales usadas junto con el fármaco o los fármacos o la combinación o las combinaciones de fármaco o fármacos según la presente invención pueden comprender uno o más fármacos que regulen el nivel de glucosa en sangre, uno o más fármacos usados para el tratamiento de la hiperlipidemia o la hipercolesterolemia, uno o más fármacos que se podrían usar, o actualmente evaluar en el marco de estudios clínicos, para tratar la diabetes o un trastorno relacionado. Preferiblemente, dichos uno o más fármacos se seleccionan de acarbosa, acetohexamida, alogliptina, berberina, bezafibrato, bromocriptina, buformina, carbutamida, cloropropamida, picolinato de cromo, ciprofibrato, clofibrato, colessevelam, dexfenfluramina, dutogliptina, exenatida, fenofibrato,

gemfibrozilo, gemigliptina, glibenclamida, glibornurida, glicetanilo, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisentida, gliclopiramida, imidapril, insulina, inulina, ácido lipoico, linagliptina, liraglutida, mecobalamina, metformina, miglitol, mitiglinida, nateglinida, orlistat, fenformina, pioglitazona, pramlintida, repaglinida, rosiglitazona, saxagliptina, sitagliptina, tolazamida, tolbutamida, vildagliptina y voglibosa.

- 5 En la tabla 2 a continuación se proporcionan números CAS ilustrativos para cada uno de estos compuestos (efectos secundarios principalmente de Sweetman S (Ed), Martindale: The complete drug reference. Londres: Pharmaceutical Press. Versión electrónica, (Edición 2011) y Nathan *et al.* (2009) [9]):

Tabla 2

Nombre del Fármaco	Número CAS	Efectos Secundarios
Análogos de amilina		
pramlintida	196078-30-5	Gastrointestinales Pérdida de peso
Antagonistas del receptor del péptido glucagonoide 1		
exenatida	141758-74-9	Gastrointestinales
liraglutida	204656-20-2	Pérdida de peso
Inhibidores de alfa-glucosidasa		
acarbosea	56180-94-0	Gastrointestinales
miglitol	72432-03-2	
voglibosa	83480-29-9	
Inhibidores de dipeptidil peptidasa 4		
alogliptina	850649-62-6	Infecciones respiratorias superiores
berberina	2086-83-1; 633-65-8; 633-66-9	
dutogliptina	852329-66-9	
gemigliptina	911637-19-9	
linagliptina	668270-12-0	
saxagliptina	361442-04-8	
sitagliptina	654671-78-0	
vildagliptina	274901-16-5	
Glinidas		
mitiglinida	145375-43-5	Aumento de peso
nateglinida	105816-04-4	Complicaciones cardiovasculares
repaglinida	135062-02-1	Hipoglucemia
Sulfonilureas		
acetohexamida	968-81-0	Aumento de peso Complicaciones cardiovasculares Hipoglucemia Pérdida de eficacia con el uso a largo plazo
carbutamida	339-43-5	
cloropropamida	94-20-2	
glibenclamida	10238-21-8	
glibornurida	26944-48-9	
glipizida	29094-61-9	
glimepirida	93479-97-1	
gliclazida	21187-98-4	
gliquidona	33342-05-1	
glisentida	32797-92-5	
gliclopiramida	631-27-6	
tolbutamida	64-77-7	
tolazamida	1156-19-0	
Fibrato		
bezafibrato	41859-67-0	Gastrointestinales Miopatía
ciprofibrato	52214-84-3	
clofibrato	637-07-0; 882-09-7; 39087-48-4; 14613-30-0	
fenofibrato	49562-28-9 (fenofibrato); 42017-89-0 (ácido fenofíbrico); 856676-23-8	

gemfibrozilo	25812-30-0	
Tiazolidinodionas		
rosiglitazona	122320-73-4; 302543-62-0; 155141-29-0; 397263-60-4	Edema periférico
pioglitazona	111025-46-8; 112529-15-4	Insuficiencia cardíaca congestiva
Biguanidas		
buformina	1190-53-0	Gastrointestinales Acidosis láctica
metformina	657-24-9; 1115-70-4	
fenformina	834-28-6	
Otros		
bromocriptina	22260-51-1	Gastrointestinales, hipotensión, complicaciones cardiovasculares
picolinato de cromo	14639-25-9	N/A
colesevelam	182815-44-7	Gastrointestinales Acidosis hiperclorémica Incremento de las concentraciones de triglicéridos en plasma
dexfenfluramina	3239-44-9	Complicaciones cardiovasculares
imidapril	89396-94-1	Hipotensión Complicaciones cardiovasculares Deterioro renal Síntomas del tracto respiratorio superior Pancreatitis
inulina	9005-80-5	N/A
ácido lipoico	62-46-4	N/A
mecobalamina	13422-55-4	N/A
orlistat	96829-58-2-	Gastrointestinales Riesgo de toxicidad hepática
Insulina		
insulina	9004-10-8; 11070-73-8; 12584-58-6; 11061-68-0; 8063-29-4; 9004-21-1; 68859-20-1; 8049-62-5; 53027-39-7; 9004-17-5; 116094-23-6; 9004-12-0; 51798-72-2; 11091-62-6 169148-63-4; 160337-95-1; 207748-29-6; 133107-64-9; 874442-57-6	Hipoglucemia Aumento de peso

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden:

- 5 - al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona y rilmenidina, y
- 10 - al menos un compuesto, seleccionado del grupo que consiste en acarbosa, acetohexamida, alogliptina, berberina, bezafibrato, bromocriptina, buformina, carbutamida, cloropropamida, picolinato de cromo, ciprofibrato, clofibrato, colesevelam, dexfenfluramina, dutogliptina, exenatida, fenofibrato, gemfibrozilo, gemigliptina, glibenclamida, glibornurida, glicetanilo, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisentida, glicopiramide, imidapril, insulina, inulina, ácido lipoico, linagliptina, liraglutida, mecobalamina, metformina, miglitol, mitiglinida, nateglinida, orlistat, fenformina, pioglitazona, pramlintida, repaglinida, rosiglitazona, saxagliptina, sitagliptina, tolazamida, tolbutamida, vildagliptina y voglibosa,
- así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un nivel de trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.
- 15 También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, triamtereno o torasemida, en combinación con (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acarbosa, acetohexamida, alogliptina, berberina, bezafibrato, bromocriptina, buformina, carbutamida,
- 20 cloropropamida, picolinato de cromo, ciprofibrato, clofibrato, colesevelam, dexfenfluramina, dutogliptina, exenatida,

fenofibrato, gemfibrozilo, gemigliptina, glibenclamida, glibornurida, glicetanilo, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisentida, gliclopiramida, imidapril, insulina, inulina, ácido lipoico, linagliptina, liraglutida, mecobalamina, metformina, miglitol, mitiglinida, nateglinida, orlistat, fenformina, pioglitazona, pramlintida, repaglinida, rosiglitazona, saxagliptina, sitagliptina, tolazamida, tolbutamida, vildagliptina y voglibosa, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno, en combinación con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en glibenclamida, repaglinida, metformina y pioglitazona, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno, en combinación con metformina, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden (i) al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, ifenprodilo, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona y rilmenidina, y un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acarbose, acetohexamida, alogliptina, berberina, bezafibrato, bromocriptina, buformina, carbutamida, cloropropamida, picolinato de cromo, ciprofibrato, clofibrato, colessevelam, dexfenfluramina, dutogliptina, exenatida, fenofibrato, gemfibrozilo, gemigliptina, glibenclamida, glibornurida, glicetanilo, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisentida, gliclopiramida, imidapril, insulina, inulina, ácido lipoico, linagliptina, liraglutida, mecobalamina, metformina, miglitol, mitiglinida, nateglinida, orlistat, fenformina, pioglitazona, pramlintida, repaglinida, rosiglitazona, saxagliptina, sitagliptina, tolazamida, tolbutamida, vildagliptina y voglibosa, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden:

- al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno,

- en combinación con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en acarbose, acetohexamida, alogliptina, berberina, bezafibrato, bromocriptina, buformina, carbutamida, cloropropamida, picolinato de cromo, ciprofibrato, clofibrato, colessevelam, dexfenfluramina, dutogliptina, exenatida, fenofibrato, gemfibrozilo, gemigliptina, glibenclamida, glibornurida, glicetanilo, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisentida, gliclopiramida, imidapril, insulina, inulina, ácido lipoico, linagliptina, liraglutida, mecobalamina, metformina, miglitol, mitiglinida, nateglinida, orlistat, fenformina, pioglitazona, pramlintida, repaglinida, rosiglitazona, saxagliptina, sitagliptina, tolazamida, tolbutamida, vildagliptina y voglibosa,

así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprende al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno, en combinación con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en glibenclamida, repaglinida, metformina y pioglitazona, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite. Otro objetivo preferido de esta invención se refiere a composiciones que comprenden al menos dos compuestos seleccionados del grupo que consiste en acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, ifenprodilo, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida o triamtereno, en combinación con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, gemfibrozilo, fenofibrato, orlistat, así como al uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.

También se divulgan en la presente memoria composiciones que comprenden baclofeno y acamprosato, en combinación con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en pioglitazona, rosiglitazona, bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, buformina, colessevelam, orlistat, así como el uso de estas composiciones en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite.

Un objetivo más preferido de esta invención se refiere a composiciones que comprenden metformina en combinación con al menos una de las siguientes combinaciones de compuestos:

- ifenprodilo y acamprosato,
- ifenprodilo y baclofeno,
- 5 - ifenprodilo y nicergolina,
- ifenprodilo y fenspirida,
- ifenprodilo y torasemida,
- ifenprodilo y triamtereno, o
- ifenprodilo y ácido tolfenámico

- 10 Otro objetivo más preferido de esta invención se refiere a estas composiciones para el uso en el tratamiento de la diabetes o un trastorno relacionado en un sujeto mamífero que lo necesite. Las combinaciones anteriores que comprenden uno o más fármacos de la invención y un fármaco conocido listado en la tabla 2, o una de sus combinaciones, permiten una disminución de la dosificación de estos fármacos para el tratamiento de la diabetes. Esta disminución permite evitar o retrasar la aparición de desventajas conocidas para estos fármacos (tabla 2; p. ej. resistencia al tratamiento creciente en el tiempo, aumento de peso, edema periférico, toxicidad renal debida a acidosis láctica).

Como ya se ha mencionado, en las terapias combinadas mencionadas anteriormente, los fármacos se pueden formular para ser administrados conjuntamente o separadamente, al mismo tiempo o secuencialmente dependiendo de las característica farmacocinéticas de cada fármaco a fin de producir un efecto combinado o sinérgico en el organismo.

- 20 Las combinaciones anteriores también se pueden usar junto con cualquier otra terapia usada para regular el nivel de glucosa en sangre; esta terapia puede ser, más particularmente, la muy conocida dieta específica para la diabetes (alta en fibra dietética, baja en grasa, baja en azúcar), un complemento natural como extractos o partes de *Cinnamomum cassia*, moringa, ginseng, gymnema, aloe vera, hoja de nuez, myrcia, ajo, *Grifola frondosa*, *Reishi*, *Agaricus blazei*, *Agrocibe cylindracea*, *Cordyceps*, agrimonia, alfalfa, cilantro, eucalipto, junípero, así como oligoelementos como cromo, vanadio, magnesio o cinc.

La terapia según la invención se puede proporcionar doméesticamente, en la consulta del médico, una clínica, un departamento ambulatorio de un hospital o un hospital, de modo que se puedan observar de cerca los efectos de la terapia y realizar cualesquiera ajustes que sean necesarios en función del nivel de glucosa en sangre medio.

- 30 La duración de la terapia depende del estadio de la enfermedad que se trate, la edad y el estado del paciente y de cómo responda el paciente al tratamiento. La dosificación, la frecuencia y el modo de administración de fármacos o cada componente de las combinaciones de fármacos de la invención se pueden controlar independientemente. Por ejemplo, un fármaco de una combinación se puede administrar oralmente mientras que el segundo fármaco se puede administrar intramuscularmente o en diferentes momentos a lo largo del día. Los fármacos también se pueden formular conjuntamente de modo que una administración aporte todos los fármacos.

- 35 El tratamiento de la invención se puede administrar durante períodos particulares del día, por ejemplo, a la vez o justo antes o justo después del momento en el que la concentración de glucosa alcanza su máximo en el plasma. La glucemia puede ser determinada fácilmente, incluso por los propios pacientes, usando diferentes glucómetros disponibles comercialmente. Por lo tanto, el momento y la dosificación del tratamiento se pueden adaptar en función de la glucemia medida. Si existe una administración secuencial, la administración puede depender de la concentración de glucosa en sangre, por ejemplo, el primer ingrediente activo se administra antes del máximo de glucosa mientras que el otro se administra después del máximo de glucosa. Habitualmente, la concentración de glucosa alcanza su máximo en el plasma de un sujeto después de las comidas.

- 40 La administración de cada fármaco de la combinación puede realizarse mediante cualquier medio adecuado que dé como resultado una concentración del fármaco que, combinado con el otro componente, sea capaz de controlar los niveles de glucosa en sangre.

Aunque es posible que el fármaco o los fármacos de la combinación se administren como el producto químico puro, es preferible presentarlos como una composición farmacéutica, también denominada en este contexto formulación farmacéutica. Posibles composiciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, tópica (incluyendo transdérmica, yugal y sublingual), o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

- 50 Más comúnmente, estas formulaciones farmacéuticas son prescritas al paciente en "envases para el paciente" que contienen un número de unidades de dosificación u otros medios para la administración de dosis unitarias medidas para el uso durante un período de tratamiento distinto en un solo envase, habitualmente un blíster. Los envases para el paciente tienen una ventaja sobre las prescripciones tradicionales, en las que un farmacéutico divide un suministro

para el paciente de un producto farmacéutico desde un suministro a granel, en que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el envase para el paciente, que normalmente se omite en las prescripciones tradicionales. Se ha mostrado que la inclusión de prospecto mejora el cumplimiento terapéutico del paciente con las instrucciones del médico. Así, la invención incluye además una formulación farmacéutica, según se describe anteriormente en la presente memoria, en combinación con un material de envasado adecuado para dichas formulaciones. En este envase para el paciente, el uso pretendido de una formulación para el tratamiento combinado se puede inferir mediante instrucciones, equipamientos, disposiciones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la formulación lo más adecuadamente para el tratamiento. Estas medidas hacen al envase para el paciente específicamente adecuado y adaptado para el uso para el tratamiento con las composiciones de la presente invención.

El fármaco puede estar contenido, en cualquier cantidad apropiada, en cualquier sustancia portadora adecuada. El fármaco puede estar presente en una cantidad de hasta 99% en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma de dosificación que es adecuada para la vía oral, parenteral (p. ej., intravenosamente, intramuscularmente), rectal, cutánea, nasal, vaginal, por inhalación, por la piel (parche) u ocular. Así, la composición puede estar en la forma de, p. ej., comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles incluyendo hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, emplastos, pociones, dispositivos de aporte osmótico, supositorios, enemas, productos inyectables, implantes, pulverizaciones o aerosoles.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional (véase, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular para liberar el fármaco activo sustancialmente inmediatamente tras la administración o en cualquier momento o período predeterminado después de la administración.

Las formulaciones de liberación controlada incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco o los fármacos dentro del cuerpo a lo largo de un período prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo transcurrido predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco o los fármacos dentro del cuerpo a lo largo de un período prolongado; (iii) formulaciones que retienen la acción del fármaco o los fármacos durante un período predeterminado al mantener un nivel de fármaco eficaz relativamente constante en el cuerpo con la minimización concomitante de efectos secundarios no deseables asociados con fluctuaciones en el nivel en plasma de la sustancia farmacológica activa; (iv) formulaciones que localizan la acción del fármaco o los fármacos, p. ej., mediante una colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente a o en el tejido u órgano enfermo; y (v) formulaciones que dirigen la acción del fármaco o los fármacos al usar portadores o derivados químicos para aportar el fármaco a un tipo de célula elegido particular.

La administración de fármacos en la forma de una formulación de liberación controlada se prefiere especialmente en casos en los que el fármaco tenga (i) un índice terapéutico estrecho (es decir, la diferencia entre la concentración en plasma que conduce a efectos secundarios perjudiciales o reacciones tóxicas y la concentración en plasma que conduce a un efecto terapéutico es pequeña: en general, el índice terapéutico, TI (por sus siglas en inglés) se define como la relación de dosis letal mediana (LD50, por sus siglas en inglés) a dosis eficaz mediana (ED50, por sus siglas en inglés)); (ii) un margen de absorción estrecho en el tracto gastrointestinal; o (iii) una semivida biológica muy corta de modo que se requiera una dosificación frecuente durante el día para mantener en nivel plasmático a un nivel terapéutico.

Se puede seguir cualquiera de un número de estrategias a fin de obtener una liberación controlada en la que la velocidad de liberación sobrepase la velocidad del metabolismo del fármaco en cuestión. Se puede obtener una liberación controlada mediante la selección apropiada de diversos parámetros e ingredientes de la formulación, incluyendo, p. ej., diversos tipos de composiciones y revestimientos de liberación controlada. Así, el fármaco se formula con excipientes apropiados como una composición farmacéutica que, tras la administración, libera el fármaco de un modo controlado (composiciones de comprimidos o cápsulas unitarias individuales o múltiples, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas).

Formas de dosificación sólidas para uso oral

Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen la composición de la invención en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables atóxicos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (p. ej., sacarosa, celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, carbonato cálcico, cloruro sódico, fosfato cálcico, sulfato cálcico o fosfato sódico); agentes granuladores y desintegradores (p. ej., derivados de celulosa incluyendo celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos o ácido alginico); agentes aglutinantes (p. ej., goma arábiga, ácido alginico, alginato sódico, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadherentes (p. ej., ácido esteárico, sílices o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes saborizantes, plastificantes, humectantes, agentes tamponadores, y similares.

Los comprimidos pueden no estar revestidos o se pueden revestir mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y de ese modo proporcionar una acción sostenida a lo largo de un período más prolongado. El revestimiento se puede adaptar para liberar la sustancia farmacológica activa en un patrón predeterminado (p. ej., a fin de conseguir una formulación de liberación controlada) o se puede adaptar para no liberar la sustancia farmacológica activa hasta después del paso del estómago (revestimiento entérico). El revestimiento puede ser un revestimiento de azúcar, un revestimiento pelicular (p. ej., basado en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un revestimiento entérico (p. ej., basado en un copolímero de ácido metacrílico, acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acetato-ftalato de vinilo), goma laca y/o etilcelulosa). Se puede emplear un material de retardo temporal tal como, p. ej., monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones para comprimidos sólidos pueden incluir un revestimiento adaptado para proteger a la composición de cambios químicos no deseados, (p. ej., degradación química antes de la liberación de la sustancia farmacológica activa). El revestimiento se puede aplicar sobre la forma de dosificación sólida de un modo similar al descrito en Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Los fármacos se pueden mezclar conjuntamente en el comprimido, o se pueden repartir. Por ejemplo, un primer fármaco está contenido en el interior del comprimido y un segundo fármaco está sobre el exterior, de modo que una porción sustancial del segundo fármaco se libere antes de la liberación del primer fármaco.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo está mezclado con un diluyente sólido inerte (p. ej., almidón de patata, celulosa microcristalina, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín), o como cápsulas de gelatina blandas en las que el ingrediente activo está mezclado con agua o un medio oleoso, por ejemplo, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y los granulados se pueden preparar usando los ingredientes mencionados anteriormente bajo los comprimidos y las cápsulas de un modo convencional.

Las composiciones de liberación controlada para uso oral se pueden construir, p. ej., para liberar el fármaco activo al controlar la disolución y/o la difusión de la sustancia farmacológica activa.

La liberación controlada por disolución o difusión se puede conseguir mediante el revestimiento apropiado de una formulación de fármacos en forma de comprimido, cápsula, pella o granulado, o al incorporar el fármaco en una matriz apropiada. Un revestimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de revestimiento mencionadas anteriormente y/o, p. ej., goma laca, cera de abejas, glicocera, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, dl-poli(ácido láctico), acetato-butilato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo), vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metacrilato de metilo, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de matriz también puede incluir, p. ej., metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, poli(cloruro de vinilo), polietileno y/o un fluorocarbono halogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o más de los fármacos de las combinaciones reivindicadas también puede estar en la forma de un comprimido o una cápsula flotante (es decir, un comprimido o una cápsula que, tras la administración oral, flota sobre el contenido gástrico durante un cierto período). Una formulación de comprimido flotante del fármaco o los fármacos se puede preparar al granular una mezcla del fármaco o los fármacos con excipientes y 20-75% p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. A continuación, los gránulos obtenidos se pueden comprimir como comprimidos. Al contacto con el jugo gástrico, el comprimido forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel toma parte en el mantenimiento de una densidad de menos de uno, permitiendo de ese modo que el comprimido permanezca flotando en el jugo gástrico.

Líquidos para administración oral

Los polvos, los polvos dispersables o los gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua son formas de dosificación convenientes para la administración oral. La formulación como una suspensión proporciona el ingrediente activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Agentes de suspensión adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, y similares.

Composiciones parenterales

La composición farmacéutica también se puede administrar parenteralmente mediante inyección, infusión o implantación (intravenosa, intramuscular, subcutánea, o similares) en formas de dosificación, formulaciones o a través de dispositivos o implantes de aporte adecuados que contienen portadores y adyuvantes farmacéuticamente aceptables atóxicos convencionales. La formulación y la preparación de estas composiciones son muy conocidas por los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

Las composiciones para uso parenteral se pueden proporcionar en formas de dosificación unitarias (p. ej., en ampollas de una sola dosis) o en viales que contienen varias dosis y en los que se puede añadir un conservante adecuado (véase posteriormente). La composición puede estar en la forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de aporte para implantación o se puede presentar como un polvo seco para ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Aparte del fármaco o los fármacos activos, la composición puede incluir portadores y/o excipientes parenteralmente aceptables adecuados. El fármaco o los fármacos activos se pueden incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas, o similares, para una liberación controlada. La composición puede incluir agentes de suspensión, solubilización, estabilización, ajuste del pH y/o agentes dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden estar en la forma adecuada para una inyección estéril. Para preparar esta composición, el fármaco o los fármacos activos adecuados se disuelven o suspenden en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, agua ajustada hasta un pH adecuado mediante la adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido sódico o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En los casos en los que uno de los fármacos sea solo poco o ligeramente soluble en agua, se puede añadir un agente mejorador de la disolución o solubilizador, o el disolvente puede incluir 10-60% p/p de propilenglicol o similares.

Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en la forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones oleosas, suspensiones oleosas o emulsiones. Alternativamente, el fármaco o los fármacos activos se pueden incorporar en portadores, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión biocompatibles. Materiales para el uso en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, p. ej., polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli(cianoacrilato de isobutilo), poli-(2-hidroxietil-L-glutamina). Portadores biocompatibles que se pueden usar cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son carbohidratos (p. ej., dextranos), proteínas (p. ej., albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para el uso en implantes pueden no ser biodegradables (p. ej., poldimetilsiloxano) o ser biodegradables (p. ej., poli(caprolactona), poli(ácido glicólico) o poli(ortoésteres)).

Vías alternativas

Aunque menos preferidas y menos convenientes, se pueden contemplar otras vías de administración y por lo tanto otras formulaciones. A este respecto, para la aplicación rectal, formas de dosificación adecuadas para una composición incluyen supositorios (de tipo emulsión o suspensión) y cápsulas de gelatina rectales (soluciones o suspensiones). En una formulación para supositorios típica, el fármaco o los fármacos activos se combinan con una base para supositorios farmacéuticamente aceptable apropiada tal como manteca de cacao, ácidos grasos esterificados, gelatina glicerina y diversas bases solubles o dispersables en agua como polietilenglicoles. Se pueden incorporar diversos aditivos, mejoradores o tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar tópicamente sobre la piel para absorción percutánea en formas de dosificación o formulaciones que contienen portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables convencionalmente atóxicos incluyendo microesferas y liposomas. Las formulaciones incluyen cremas, pomadas, lociones, linimentos, geles, hidrogeles, soluciones, suspensiones, barras, pulverizaciones, pastas, emplastos y otros tipos de sistemas de aporte de fármacos transdérmicos. Los portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes tamponadores, conservantes, humectantes, mejoradores de la penetración, agentes quelantes, agentes gelificantes, bases para pomadas, perfumes y agentes protectores de la piel.

Los conservantes, humectantes, mejoradores de la penetración pueden ser parabenos, tales como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo, cloruro de benzalconio, glicerina, propilenglicol, urea, etc.

Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para administración tópica sobre la piel también se pueden usar en relación con la administración tópica sobre o cerca de la parte que se va a tratar. Las composiciones se pueden adaptar para aplicación directa o para aplicación por medio de dispositivos de aporte de fármacos especiales tales como vendajes o alternativamente emplastos, cataplasmas, esponjas, tiras u otras formas de material flexible adecuado.

Dosificación y duración del tratamiento

La composición según la invención se administra a un sujeto oralmente o mediante inyecciones subcutáneas, intravenosas o intramusculares, en diferentes momentos del día, para alterar el nivel de glucosa en sangre. Al llevar a cabo este procedimiento, cuando se desee modificar, regular o normalizar el nivel de glucosa en sangre de un mamífero, para tratar la diabetes o un trastorno relacionado, o ambos, la composición de la invención se administra en una cantidad de dosificación suficiente para alterar, regular o normalizar el nivel de glucosa en la sangre del sujeto. La composición de la invención se puede administrar a un mamífero, particularmente un ser humano, que exhiba un nivel anormal de glucosa en sangre, en un período particular del día, por ejemplo, en el momento o justo antes o

- después del momento en el que la concentración de glucosa alcance su máximo en el plasma. El nivel de glucosa en la sangre del mamífero depende del momento del día y es cíclico. En nivel de glucosa en sangre se eleva y se reduce en diferentes momentos del día preferiblemente dependiendo del momento de las comidas y de la actividad física/el ejercicio. Habitualmente, la concentración de glucosa alcanza su máximo en el plasma de un sujeto después de las comidas, por lo tanto, composición de la invención se puede administrar, por ejemplo, preferiblemente de 2 horas antes de las comidas a 2 horas después de las comidas, más preferiblemente de una hora antes de las comidas a una hora después de las comidas y aún más preferiblemente durante las comidas para conseguir una eficacia terapéutica máxima.
- Se apreciará que los fármacos de la combinación se puede administrar concomitantemente, bien en la misma formulación farmacéutica o bien en una diferente, secuencialmente. Un requisito mínimo para una combinación según esta descripción es que la combinación debe estar destinada a un uso combinado con el beneficio del efecto eficaz de la combinación de los ingredientes activos. El uso pretendido de una combinación se puede inferir mediante equipamientos, disposiciones, adaptaciones y/u otros medios para ayudar a usar la combinación según la invención.
- Cantidades terapéuticamente eficaces de los fármacos en una combinación de esta invención incluyen, p. ej., cantidades que son eficaces para controlar los niveles de glucosa en sangre o plasma.
- La administración se puede realizar una o varias veces al día durante de varios días a varios años e incluso se puede realizar durante la vida del paciente. La administración crónica o al menos a largo plazo periódicamente repetida está indicada en la mayoría de los casos.
- El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas (tales como cápsulas, comprimidos, o cilindros de jeringa cargados) adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada de material o materiales activos calculada para producir el efecto terapéutico, en asociación con el portador farmacéutico requerido.
- La cantidad de cada fármaco en una composición de dosificación unitaria preferida depende de varios factores incluyendo el método de administración, el peso corporal y la edad del paciente, el estadio de la enfermedad, el riesgo de efectos secundarios potenciales considerando el estado de salud general de la persona que se vaya a tratar. Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o de eficacia de un agente terapéutico) acerca de un paciente particular también puede afectar a la dosificación usada.
- Excepto cuando responda a niveles de glucosa especialmente deteriorados en los que se pueden requerir dosificaciones superiores, la dosificación preferida de cada fármaco en la combinación habitualmente se encontrará dentro del intervalo de dosis no por encima de la dosificación habitualmente prescrita para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo o probada como segura en estudios clínicos en fase 3.
- Una ventaja destacable de la invención es que cada compuesto se puede usar en dosis bajas en una terapia combinada, mientras que produce, en combinación, un beneficio clínico sustancial al paciente. En efecto, la terapia combinada puede ser eficaz a dosis en las que los compuestos tienen individualmente un efecto bajo o nulo. Según esto, una ventaja particular de la invención reside en la capacidad para usar dosis insuficientes de cada compuesto, es decir, dosis que son inferiores a las dosis terapéuticas habitualmente prescritas, preferiblemente 1/2 de las dosis terapéuticas, más preferiblemente 1/3, 1/4, 1/5 o incluso más preferiblemente 1/10 de las dosis terapéuticas. En ejemplos particulares, se usan dosis tan bajas como 1/20, 1/30, 1/50, 1/100, o incluso inferiores, de las dosis terapéuticas.
- A estas dosificaciones subterapéuticas, los compuestos no exhibirán efectos secundarios o exhibirán menos, mientras que las combinaciones según la invención son totalmente eficaces para controlar los niveles de glucosa en sangre o plasma.
- Una dosificación preferida corresponde a cantidades de 1% hasta 50% de las prescritas habitualmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.
- La dosificación más preferida puede corresponder a cantidades de 1% hasta 10% de las prescritas habitualmente para el tratamiento de mantenimiento a largo plazo.
- Ejemplos específicos de dosificaciones de fármacos para el uso en la invención se proporcionan posteriormente:
- Acamprosato oralmente de aproximadamente 9 a 200 mg al día,
 - Almitrina oralmente de aproximadamente 0,5 a 10 mg al día,
 - Amlexanox oralmente de aproximadamente 0,75 a 15 mg al día,
 - Azelastina oralmente de aproximadamente 0,04 a 0,4 mg al día,
 - Baclofeno oralmente de aproximadamente 0,15 a 50 mg al día,

- Carbetapentano oralmente de aproximadamente 0,6 a 18 mg al día,
- Cimetidina oralmente de aproximadamente 4 a 160 mg al día,
- Cinacalcet oralmente de aproximadamente 0,3 a 36 mg al día,
- D-manosa oralmente de 0,01 a 1,6 g al día,
- 5 - Dexbromofeniramina oralmente de aproximadamente 0,06 a 1,2 mg al día,
- Dietilcarbamazina oralmente de aproximadamente 0,6 a 600 mg al día,
- Diprofilina oralmente de aproximadamente 9 a 320 mg al día,
- Fenspirida oralmente de 1,6 a 24 mg al día,
- Fexofenadina oralmente de 1,2 a 18 mg al día,
- 10 - Idebenona oralmente de aproximadamente 4,5 mg a 225 mg al día,
- Ifenprodilo oralmente de aproximadamente 0,4 a 6 mg al día,
- Levosimendano oralmente de aproximadamente 0,05 a 4 mg al día,
- Metformina oralmente de aproximadamente 1 mg a 2,5 mg al día,
- Mexiletina oralmente de aproximadamente 6 a 120 mg al día,
- 15 - Nicergolina oralmente de aproximadamente 0,6 a 6 mg al día,
- Piribedilo oralmente de aproximadamente 0,8 a 25 mg al día,
- Rilmenidina oralmente de aproximadamente 10 a 200 µg al día,
- Tolperisona oralmente de aproximadamente 1,5 a 4,5 mg al día,
- Ácido tolfenámico oralmente de aproximadamente 3 a 60 mg al día,
- 20 - Torasemida oralmente de aproximadamente 0,05 a 4 mg al día,
- Triamtereno oralmente de aproximadamente 1,5 a 25 mg al día,

En las combinaciones de la invención, la relación molar entre fármacos puede variar, p. ej., de 0,001 a 1000. Además, la relación del fármaco o los fármacos y el excipiente en una composición de la invención varía ventajosamente entre 0,001 y 1000.

- 25 Se entenderá que la cantidad del fármaco realmente administrada es determinada por un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes incluyendo la afección o afecciones que se vayan a tratar, la composición exacta que se vaya a administrar, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de administración elegida. Por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores están destinados a proporcionar una guía y un apoyo generales para las enseñanzas de la presente memoria, pero no pretenden limitar el alcance de la invención.
- 30

Los siguientes ejemplos se dan con propósitos de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

- 35 La diabetes es una enfermedad metabólica que afecta profundamente a la homeostasis energética y el alto nivel plasmático de glucosa observado en los pacientes puede tener múltiples causas. La diabetes de tipo 1 se caracteriza por la destrucción de células β de los islotes de Langerhans. La diabetes de tipo 2 se caracteriza, en parte, por una disminución de la producción de insulina por las células β pancreáticas, una muerte progresiva de células β, resistencia a insulina (es decir menor captura de glucosa por las células musculares y los adipocitos) o una elevación anormal de la gluconeogénesis hepática. De ahí que la determinación de la eficacia de los posibles compuestos se base en varios estudios *in vitro* e *in vivo* a fin de dirigirse a la mayoría de los deterioros metabólicos y fisiológicos que caracterizan esta patología compleja. En primer lugar, los fármacos se probaron individualmente, seguido por ensayos de su acción combinada. La actividad de los fármacos se determina sobre varios modelos que ilustran diferentes rasgos fisiológicos representativos de un nivel de glucosa en sangre anormal tales como los implicados en la diabetes o trastornos relacionados.
- 40

1. Estudios *in vitro*

1.1 Prevención de la apoptosis de células beta

Los fármacos de la invención se han probado con respecto a su eficacia para proteger a las células beta de la apoptosis. Esta actividad se podría considerar de utilidad en la diabetes de tipo 1 así como en la diabetes de tipo 2.

5 Cultivo celular y medio

Las células INS-1 pancreáticas beta se han seleccionado para este estudio. Las células se cultivan en medio completo, RPMI 1640 10 mM de glucosa complementado con piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 50 μ M, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, penicilina 100 IU/ml, estreptomicina 100 μ g/ml y de suero de ternero fetal (FCS) inactivado térmicamente al 10%, según se describe por Asfari *et al.* (23). Las células INS-1 se siembran ($4,5 \times 10^4$ células/pocillo) en placas de 96 pocillos revestidas con poliornitina y se cultivan a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire/5% de CO₂. El día después, las células se preincuban con las moléculas probadas durante 1 h. A continuación, después de un cambio de medio, las células se cultivan durante 24 h en un medio que contiene las moléculas probadas y glucosa 30 mM, ácido mirístico 0,05 mM, INF 25 ng/ml, TNF 25 ng/ml e IL 5 ng/ml.

Cuantificación de la apoptosis

15 A continuación, la eficacia de los compuestos para prevenir la apoptosis se evalúa mediante el estuche de detección de la apoptosis altamente eficaz de Chemicon (Ref. APT225). Este procedimiento se basa en la detección de ADN monocatenario (ADNss) que es un marcador específico de células apoptóticas (24).

Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica (OD) y % de reducción de la apoptosis inducida por una condición apoptótica. Siguiendo una prueba de la t de Dunnett, todos los compuestos que muestran una disminución significativa en % de las células apoptóticas en comparación con una condición de control apoptótico se consideran activos.

Resultados

Los resultados se muestran en la figura 1 y la tabla 3 y demuestran que los fármacos de la invención, cuando se prueban solos, inducen un efecto protector sustancial contra la apoptosis de células beta. En la figura 1, la D-manosa induce una protección significativa y completa de células beta contra la apoptosis cuando se compara con una célula no tratada en condiciones apoptóticas. La D-manosa confiere más de 129% de protección contra la apoptosis. De forma similar, la tabla 3 presenta el porcentaje de protección conferido por los fármacos de la invención.

Tabla 3

Fármacos	Porcentaje de reducción de la apoptosis
D-manosa	129%
Mexiletina	74%
Tolperisona	78%
Baclofeno	84%
Cinacalcet	167%
Dexbromofeniramina	76%
Dietilcarbamazina	44%
Nicergolina	112 %
Torasemida	67%
Triamtereno	64%
Almitrina	103 %
Azelastina	81 %
Acamprosato	49%
Carbetapentano	103%
Ifenprodilo	54%
Levosimendano	118%

1.2 Secreción de insulina en respuesta a la estimulación de glucosa

30 Cultivo celular y medio

Las células INS-1 pancreáticas beta se han seleccionado por su perfil de secreción de insulina en respuesta a glucosa y a otros secretagogos de insulina fisiológicos o farmacológicos tales como sulfonilureas y GLP-1. Las células se cultivan en medio completo, RPMI 1640 10 mM de glucosa complementado con piruvato sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 50 μ M, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, penicilina 100 IU/ml, estreptomicina 100 μ g/ml y suero de

ternero fetal (FCS) inactivado térmicamente al 10%, según se describe por Asfari *et al.* (23). Para el ensayo de secreción de insulina, las células INS-1 se siembran ($4,5 \times 10^4$ células/pocillo) y se cultivan en placas de 96 pocillos revestidas con poliornitina. Después de 3 días de cultivo a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire/5% de CO₂, el medio se retira y las células se cultivan durante 16 h en un medio que contiene glucosa 5 mM, FCS al 1% (y los fármacos se prueban para la evaluación a largo plazo).

El día de la prueba de secreción de insulina, las células se lavan con tampón bicarbonato-HEPES de Krebs-Ringer (KRBH; pH 7,4) albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% y se preincuban durante 30 min a 37°C en KRBH 0,1% de BSA que contiene glucosa 2,8 mM.

Las células se lavan de nuevo con KRBH y se incuban durante 1 h en KRBH 0,1% de BSA que contiene glucosa 3,5 mM y las moléculas probadas. Los sobrenadantes se recogen para la determinación de insulina y la medida de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH).

Cuantificación de insulina

La concentración de insulina en los sobrenadantes recogidos se mide mediante un estuche de ELISA según las recomendaciones del fabricante y usando un anticuerpo insulínico de rata (Insulin rat high range ELISA Alpco n.º Cat. 80-INSRTH-E10). Muy brevemente, anticuerpos monoclonales de rata específicos para insulina se inmovilizan en placas de 96 pocillos. Se añaden estándares, muestras y controles a los pocillos apropiados con un anticuerpo monoclonal marcado con enzima peroxidasa de rábano picante (conjugado). Después de la incubación, las microplacas se lavan para retirar conjugado no unido y se añade una solución de sustrato de TMB para reaccionar con el conjugado no unido. Finalmente, después de la adición de una solución de parada, la densidad óptica se mide a 450 nm usando una longitud de onda de referencia de 620 nm. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la cantidad de insulina dentro de las muestras.

La eficacia de los fármacos se demuestra al evaluar la cantidad de insulina (expresada en pmol/l) secretada en ausencia o presencia de fármacos de la invención en el medio.

Resultados

Los fármacos de la invención inducen una secreción de insulina en respuesta a la estimulación con glucosa. Por ejemplo, las figuras 2 y 3 muestran que el triamtereno (10 µM, +37%) y el cinacalcet (1 µM, +55%), respectivamente, pueden mejorar significativamente la secreción de insulina en respuesta a la estimulación con glucosa, después de, respectivamente, una incubación a corto plazo o largo plazo.

1.3 Captación de glucosa en músculos o adipocitos

1.3.1 Captación de glucosa en células musculares de ratón

Los fármacos de la invención se han probado en diversos modelos con respecto a la resistencia a insulina. Las capacidades de mejora de la captación de glucosa de las composiciones de la invención se midieron tanto en células musculares como en adipocitos en condiciones bien normales o bien patológicas. Dependiendo de las condiciones del cultivo, las células musculares bien exhiben mitosis continua o bien alternativamente se diferencian terminalmente en miotubos.

Cultivo celular y medio

Células musculares de ratón H-2Kb se hacen crecer durante 4 días en placas de 24 pocillos revestidas con Matrigel a una densidad de $0,8 \times 10^4$ células/pocillo bajo condiciones permisivas (33°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire/10% de CO₂; DMEM 5,5 mM de D-glucosa complementado con 20% de FCS, 10% de suero equino, 2% de glutamina, 0,5% de embrión de pollo, INFγ de ratón 20 mU/ml, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml) según se describe previamente por Fryer *et al.* (25). Para la diferenciación en mioblasto, las células se cambian por condiciones de cultivo no permisivas (37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire/5% de CO₂; DMEM 5,5 mM de D-glucosa complementado con 2% de FCS, 10% de suero equino, 2% de glutamina, 1% de embrión de pollo, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml).

Captación de glucosa

Para la evaluación del efecto a largo plazo, el día antes del ensayo de captación de glucosa, las células se incuban en DMEM 5,5 mM de D-glucosa complementado con 10% de suero equino, 2% de SVF, 1% de embrión de pollo, 2% de glutamina en presencia de las moléculas probadas durante 16 h. El día después, y antes de la prueba, las células se lavan y se incuban en presencia de las moléculas probadas durante 4 h más, en un medio libre de suero (DMEM) que contiene 5,5 mM de D-glucosa.

Para la evaluación a corto plazo, 4 horas antes de la prueba de la glucosa, las células se lavan y se incuban en un medio libre de suero (DMEM) que contiene 5,5 mM de D-glucosa y las moléculas probadas. A continuación, se mide la captación de glucosa mediante la incubación de las células durante 5-10 min con 2-desoxi-D-[1,2 ³H]glucosa radiomarcada en tampón de HEPES de Krebs-Ringer (KRBH; pH 7,4) 0,1% de la fracción V de albúmina sérica bovina

(BSA, por sus siglas en inglés) (Sigma_A-4503). La captación de glucosa se detiene mediante dos etapas de lavado en NaCl 0,9% enfriado con hielo. A continuación, las células se solubilizan en NaOH 0,1 N durante 30 min. A continuación, se cuenta la radiactividad asociada a las células y se determina la cuantificación de proteínas usando el método colorimétrico de Lowry. La captación de glucosa se estima al medir la radiactividad incorporada a las células mediante un contador MicroBeta después de añadir 600 µl por pocillo de centelleador (Optiphase SuperMix3).

La cuantificación de proteínas se realiza mediante un ensayo colorimétrico derivado del método de Lowry.

Los resultados se expresan en nmol de glucosa incorporada / 5 min / mg de proteína y en % de la condición de control o basal (100%).

Resultados

- 10 Los fármacos de la invención, probados solos, pueden mejorar la captación de glucosa en células musculares. Por ejemplo, las figuras 4, 5 y 6 muestran que la captación de glucosa por células musculares H-2Kb se mejora significativamente después de una incubación a corto plazo con acamprosato (0,1 µM, +45%) y almitrina (1 µM, +80%) o después de la incubación a largo plazo mediante nicergolina (10 µM, +28%), respectivamente, cuando se comparan con células musculares no tratadas.

15 1.3.2 Captación de glucosa en cultivos primarios de miotubos diabéticos humanos

A fin de tener un modelo que sea el que mejor refleje las condiciones patológicas diabéticas, se probó la eficacia de fármacos para mejorar la captación de glucosa en miotubos diabéticos. En efecto, se demostraba que el fenotipo diabético se conserva en miotubos establecidos a partir de sujetos diabéticos.

Cultivo celular y medio

- 20 Los miotubos procedentes de un paciente diabético se hicieron crecer sobre medio basado en F10 de HAM (Sigma, ref N6908) complementado con 15% de suero bovino fetal, glutamina 1 mM.

Los mioblastos se sembraron en placa en 380000 células/pocillo en placas de 12 pocillos. Después de 2 días de proliferación, las células se pusieron en condiciones de suero reducidas (2% de suero equino) para inducir la diferenciación. Los miotubos se usaron después de 5 días de diferenciación.

- 25 Medio basado en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) (Gibco, ref 31053-028) complementado con 2% de suero equino inactivado térmicamente, 2% de Glutamax (Gibco, 35050) y se lavó para ensayos de captación de glucosa. Los compuestos se disolvieron en DMSO para alcanzar la concentración final deseada antes del uso.

Los miotubos diferenciados se trataron durante 24 h con las composiciones de la invención, antes del ensayo.

30 Ensayo de captación de glucosa

Antes del inicio de la captación de glucosa, las células se privaron de suero y glucosa. Una privación se realizó en primer lugar en medio DMEM que contenía glucosa reducida (1 g/l) y no contenía suero. Después de añadir los compuestos a las concentraciones deseadas, las células se incubaron a 37°C durante 2 h 30. El control con insulina permite la medida de la inducción de la captación de glucosa a través de la ruta insulínica. El tratamiento con insulina (100 nM) se realizó durante 30 min a 37°C. Una privación de glucosa y suero posterior se realizó en tampón de HBS a 37°C durante 2 horas. Las células se trataron con una mezcla de 2-[³H]desoxiglucosa 10 Ci/mM + 2-desoxi-D-glucosa a 10 µM durante 30 min. Las células se enjuagaron dos veces con 1 ml de PBS fría. La lisis se realizó en 500 µl de NaOH 0,05 N durante 20 minutos. Los lisados celulares se transfirieron a viales de centelleo para la medida de la radiactividad con un contador MicroBeta.

40 Resultados

Las composiciones de la invención pueden mejorar la captación de glucosa en miotubos primarios humanos.

Por ejemplo, las figuras 13, 14, 15, 16 y 17 muestran que la captación de glucosa en miotubos diabéticos se mejora después de la preincubación mediante torasemida (+24%, 18%, respectivamente, a 0,01 µM y 0,1 µM p<0,01; y +14% a 1 µM p<0,05), fenspirida (+34%, +30%, respectivamente, a 0,01 µM y 0,1 µM p<0,01; y +27% a 1 µM, p<0,05), ácido tolfenámico (+13%, +13% y +12%, respectivamente, a 0,01 µM, 0,1 µM y 1 µM, p<0,05), ifenprodilo (+48% a 0,01 µM, p=0,07; y mejora a 0,1 µM y 1 µM) y triamtereno (0,01 µM, +13%, p<0,05).

1.3.3 Captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1

Las células 3T3-L1 son fibroblastos que, bajo condiciones apropiadas, se diferencian en células adipocíticas. Estas células se usan para mostrar que las composiciones de la invención incrementan la captación de glucosa en adipocitos, cuando se comparan con controles.

Cultivo y diferenciación celulares

Las células preadipocíticas 3T3-L1 se cultivaron en DMEM que contenía 1% de penicilina-estreptomicina (PS) y 10% de suero de ternero a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Para inducir la diferenciación, preadipocitos posconfluentes de 2 días se cultivaron en medio de diferenciación MDI I (DMEM que contiene 1% de PS, 10% de FBS, IBMX 0,5 mM, dexametasona 1 µM, insulina 0,5 µg/ml) durante 2 días. La diferenciación, según se mide mediante la expresión de marcadores adipogénicos y la aparición de gotículas lipídicas, alcanza habitualmente la terminación entre los días 4 y 8.

Ensayo de actividad de captación de glucosa

La actividad de captación de glucosa se analizó al medir la captación de glucosa radiomarcada. Adipocitos 3T3-L1 diferenciados desarrollados en placas de 12 pocillos se lavaron dos veces con DMEM libre de suero y se incubaron durante 2 h a 37°C con 1 ml de DMEM que contiene 0,1% de BSA. Las células se lavaron tres veces con tampón de Krebs-Ringer-HEPES (KRH) (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 136 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,25 mM, CaCl₂ 1,25 mM, albúmina sérica bovina 2 mg/ml) y se incubaron a 37°C durante 30 min con 0,9 ml de tampón de KRH. A continuación, las células se incubaron con o sin fármacos a lo largo de una duración diferente a fin de evaluar su efecto a corto plazo y a largo plazo.

Para evaluar su efecto a corto plazo, las células se incubaron con fármacos de la invención durante 4 horas a 37°C. Para evaluar el efecto a largo plazo de fármacos de la invención, el día antes de la prueba, las células se preincubaron con o sin fármacos durante 16 h. El día después, y antes de la prueba, las células se lavaron y se incubaron en presencia de las moléculas probadas durante 4 h más.

La captación de glucosa se inició mediante la adición de 0,1 ml de tampón de KRH que contiene 2-desoxi-D-[³H]glucosa (37 MBq/l) y glucosa (1 mM). Después de 20 min, la captación de glucosa se terminó al lavar las células tres veces con PBS fría. Las células se sometieron a lisis a través de incubación durante 20 min a 37°C con 0,7 ml de Triton X-100. El nivel de radiactividad en los lisados celulares se determinó usando un contador de centelleo.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante un ensayo colorimétrico derivado del método de LOWRY.

Los resultados se expresan en nmol de glucosa incorporada / 5 min / mg de proteína y en % de condición de control o basal (100%).

Resultados

Los fármacos de la invención pueden mejorar la captación de glucosa en adipocitos. Por ejemplo, las figuras 7, 12 y 8 muestran que la captación de glucosa por adipocitos 3T3-L1 diferenciados se puede mejorar después de la incubación a corto plazo mediante carbetapentano (0,1 µM, +58%) y piribedilo (10 nM, +68%) o después de la incubación a largo plazo mediante almitrina (1 µM, +69%), respectivamente.

1.3.4 Captación de glucosa en adipocitos diferenciados 3T3-L1 resistentes a insulina inducidos por TNFα

Para evaluar las capacidades de fármacos de la invención para mejorar la captación de glucosa por adipocitos en condiciones resistentes a insulina, las células se pretratan mediante TNF-α. Tras la exposición a TNF-α, se espera una disminución en la captación de glucosa en respuesta a insulina. En contraste, se espera un incremento en la captación de glucosa en respuesta a insulina después del tratamiento de las células 3T3-L1 con TNF-α y ácido acetilsalicílico (control positivo).

Cultivo y diferenciación celulares

Los fibroblastos 3T3L1 se mantuvieron en DMEM 4,5 g/l de glucosa complementado con 5% de donante de suero fetal, 5% de suero de ternero recién nacido, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml a 37°C bajo una atmósfera de 10% de CO₂. Las células se hicieron crecer sobre placas de 24 pocillos a una densidad de 2560 células/pocillo en 0,5 ml de medio de crecimiento (DMEM 4,5 g/l de glucosa complementado con 10% de FCS, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml). Cinco días después de la siembra (90% de confluencia), se llevó a cabo la inducción de la diferenciación de adipocitos en DMEM 4,5 g/l de glucosa que contiene 10% de FBS, IBMX 100 µM, dexametasona 0,25 µM e insulina 170 nM. Dos días después, se retiró el medio de inducción y se cambió por DMEM 4,5 g/l de glucosa que contenía 10% de FBS e insulina 170 nM. El medio reciente se reemplazó después de dos días. Tres días después, los adipocitos se incubaron durante la noche en medio de ayuno (DMEM 4,5 g/l de glucosa que contiene 0,2 SVF, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml). A continuación, las células se tratan con H₂O o 5 ng/ml de TNF-α de rata (Peprotech, 400-14) durante 48 h en DMEM 4,5 g/l de glucosa que contiene 10% de FBS. El medio se reponía cada día. La captación de glucosa se ensayó en diferentes condiciones: los adipocitos se trataron durante las 24 h adicionales con 0,1% de DMSO con o sin 5 ng/ml de TNF-α, o con 5 ng/ml de TNF-α y 5 mM de ácido acetilsalicílico, o con 5 ng/ml de TNF-α y 100 nM de insulina, o los compuestos probados con 5 ng/ml de TNF-α en presencia o ausencia de insulina (100 nM) según se describe posteriormente.

Ensayo de actividad de captación de glucosa

La captación de glucosa se midió mediante la cuantificación de glucosa radiomarcada incorporada, después de una etapa de incubación con 2-desoxi-D[1,2³H]glucosa durante 5 min. La captación de glucosa se detuvo mediante dos etapas de lavado en PBS enfriada con hielo 1X. A continuación, se solubilizaron en NaOH 0,1 N durante 30 min. La radiactividad asociada a células se ha contado a continuación al usar un contador MicroBeta después de añadir 600 µl por pocillo de centelleador (Optiphase SuperMix3).

En paralelo, la cuantificación de proteínas se determinó mediante un ensayo colorimétrico derivado del método de LOWRY. Los resultados se expresan en nmol de glucosa incorporada / 5 min / mg de proteína y en % de la condición de control o basal (100%).

Para ensayar la viabilidad celular, se realizó una medida de la actividad de LDH sobre los sobrenadantes al usar un método UV con el estuche comercial (ABS pentra LDH IFCC CP, ref A11A01871). Muy brevemente, la LDH reduce NAD⁺ en NADH mediante la oxidación de lactato en piruvato. El NADH producido se evaluó mediante la medida de la absorbancia a 340 nm. La cantidad de NADH producida es proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio de cultivo como resultado de la citotoxicidad. Los resultados de viabilidad celular se expresan en % de la condición de control o basal (100%).

Resultados

Los fármacos de la invención, probados solos, mejoran la captación de glucosa en adipocitos en condiciones de simulación de resistencia a insulina. Por ejemplo, las figuras 18, 19, 20 y 21 muestran que la captación de glucosa por adipocitos 3T3-L1 con resistencia a insulina inducida por TNF-α se mejora significativamente después de la incubación a largo plazo mediante torasemida (+121% a 0,37 nM, p<0,05; +123% y +129%, respectivamente, a 1 nM y 3,3 nM, p<0,01), ifenprodilo (+140% at 1 µM, p<0,01; y mejora a 10 nM y 100 nM, no mostrada), fenspirida (+130% at 1 nM, p<0,01; y mejora a 0,37 nM y 3,3 nM, no mostrada) y ácido tolfenámico (+127% a 10 nM, p<0,01; y mejora a 100 nM y 1 µM, no mostrada).

Los resultados de la sección 1.3 muestran que los fármacos de la invención son eficaces en la mejora de la captación de glucosa en células musculares y adipocitos normales así como en condiciones de simulación de resistencia a insulina.

1.4 Producción de glucosa por células hepáticas

Cultivo y diferenciación celulares

Se aíslan hepatocitos de ratas Wistar macho en ayunas durante 24 h (200-250 g de peso corporal) mediante perfusión hepática ex situ en presencia de collagenasa. La viabilidad celular se valida mediante una prueba de exclusión con azul de tripano. A continuación, las células se suspenden en medio de William complementado con insulina y se sembraron sobre placas de seis pocillos (8 10⁵ células/pocillo) y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire/5% de CO₂. Después de la siembra en placa, el medio se retira y las células se cultivan durante 16 h en medio RPMI sin glucosa (complementado con los fármacos probados para una evaluación a largo plazo). Al día siguiente, se determina la producción hepática de glucosa en tampón de bicarbonato-HEPES de Krebs-Ringer (KRBH; pH 7,4) en presencia de los sustratos neoglucogénicos (lactato 10 mM y piruvato 1 mM) y las moléculas se probaron durante 4 h (corto plazo).

Cuantificación de glucosa

Los sobrenadantes se recogen y las concentraciones de glucosa se determinan usando un estuche de glucosa oxidasa (Instrumentation laboratory 0018250840). En paralelo, la cuantificación de proteínas se realiza usando el método colorimétrico de Lowry.

Los resultados se expresan en nmol de glucosa / mg de proteína y % de la condición de control (KLP: KRBH que contiene lactato y piruvato).

Resultados

Los fármacos de la invención, probados solos, pueden reducir la producción de glucosa por células hepáticas. Por ejemplo, las figuras 9, 10 y 11 muestran que la producción de glucosa por hepatocitos se reduce significativamente después del tratamiento a corto plazo mediante D-manosa (10 µM, -22%) o después del tratamiento a largo plazo de ifenprodilo (0,01 µM, -22%) o azelastina (10 µM, -36%).

1.5 Órganos aislados

1.5.1 Secreción de insulina y glucagón en islotes de Langerhans aislados

Islotes aislados incubados con un intervalo de concentraciones de glucosa muestran un patrón dependiente de la dosis de liberación de insulina. Así, el uso de islotes aislados es un modo fisiológico de investigar los efectos de posibles compuestos como iniciadores y potenciadores de secreción de insulina.

Preparación de tejidos

- 5 Las ratas se anestesian mediante inyección de ketamina/xilasina intraperitoneal (ip). La cavidad peritoneal se expone y el conducto pancreático principal al intestino se pinza. A continuación, el páncreas se canula a través del conducto biliar común, se distiende con colagenasa y se extirpa. Los islotes se extraen, se lavan y se hacen pasar a través de una pantalla estéril de acero inoxidable antes de centrifugarse. A continuación, los islotes se limpian y se colocan en medio CMRL que contiene 2 mM de glutamina, 10% de suero bovino fetal y 1 % de solución de antibiótico/antimicótico y se ponen en una cámara de cultivo a 37°C que contiene 5% de CO₂.

Perfusión de islotes

- 15 Los islotes se preincuban durante 90 min en medio RPMI 1640 que contiene 10% de FBS y 3 mM de glucosa a 37°C con 5% de CO₂. A continuación, los islotes de control y los grupos tratados se incuban en el sistema de perfusión de glucosa con un caudal constante (500 µl/min) a 37°C durante 90 min. Se ponen durante 30 min en las condiciones basales (3 mM de glucosa), durante 30 min en un medio concentrado con alto contenido de glucosa (20 mM) y finalmente durante 30 min de nuevo en las condiciones basales (3 mM de glucosa). A través de la perfusión, las muestras de medio se recogen de la fracción de salida y se congelan a -80°C. Al final de la perfusión, los islotes se recogen y se congelan a -80°C. La proteína total de los islotes se extrae mediante etanol ácido (0,18 M de HCl en etanol al 95%). Las cuantificaciones de la insulina y el glucagón intracelulares o liberados en las fracciones de salida recogidas se realizan mediante ELISA.

1.5.2 Captación de glucosa en músculos aislados

Procedimiento de incubación de músculo

- 25 Epitrocleares cortados se incuban a 29°C durante 50 min en 3 ml de medio de preincubación continuamente gasificado (95% de O₂, 5% de CO₂), que consiste en tampón de bicarbonato de Krebs-Henselheit (KHB), 8 mM de glucosa, 32 mM de manitol y 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA). Después de la preincubación, el músculo se transfiere a otro vial y se incuba a 29°C durante 10 min en 3 ml de medio de lavado continuamente gasificado, que consiste en KHB, 2 mM de piruvato, 38 mM de manitol y 0,1% de BSA.

- 30 Finalmente, el músculo se incuba a 29°C durante 20 min en 3 ml de medio de captación, que consiste en KHB, 2 mM de piruvato, 6 mM de glucosa y 32 mM de manitol, 0,1% de BSA, con o sin 280 µCi/mmol de [³H] 2-desoxiglucosa (2-DG) y 10 µCi/mmol de [¹⁴C]-manitol y el tratamiento indicado.

Inmediatamente después de la incubación, los músculos se pasan brevemente por una gasa humedecida con solución salina al 0,9% y se congelan pinzados en nitrógeno líquido.

Medidas de la captación muscular de glucosa

- 35 La captación de glucosa se calcula a partir de la velocidad de incorporación de 2-DG en las fibras musculares durante los 20 min de incubación en el medio de captación. Las muestras de músculo congeladas se digieren en 1 ml de KOH 1 M a 60°C durante 20 min. Los homogenados musculares se neutralizan con 1 ml de HCl 1 M y se añaden 300 µl en un cóctel de centelleo. Se cuentan muestras duplicadas con respecto a ³H y ¹⁴C en un espectrofotómetro de centelleo de líquidos LS-6000.

- 40 La captación muscular de 2-DG se calcula como la diferencia entre 2-DG muscular total y 2-DG en el espacio extracelular. La concentración de 2-DG en el espacio extracelular se determina mediante la cantidad de [¹⁴C]-manitol en el tejido.

1.5.3 Producción de glucosa a partir de hígado perfundido aislado

El modelo del modelo de rata perfundida aislada permite estudiar los efectos directos del órgano intacto sin la influencia de hormonas extrahepáticas y otras alteraciones sistémicas de flujos metabólicos.

- 45 Preparación del tejido

- 50 Las ratas se anestesian mediante inyección ip de tiopental (50 mg/kg). Se realiza una perfusión no recirculatoria libre de hemoglobina. Después de la canulación de las venas portal y cava, el hígado se sitúa en una cámara de plexiglás. El fluido de perfusión es tampón de bicarbonato de Krebs/Henseleit (pH 7,4), se satura con una mezcla de oxígeno y dióxido de carbono (95:5) por medio de un oxigenador de membrana con ajuste simultáneo de temperatura a 37°C. El flujo, proporcionado por una bomba peristáltica, está entre 30 y 33 ml/min. Los posibles compuestos o vehículo se añaden al fluido de perfusión después de haber complementado el tampón de bicarbonato de Krebs/Henseleit con albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos para asegurar la disolución total de los fármacos. Para todas las concentraciones de los fármacos, la relación molar de albúmina/fármaco era igual a 2,4.

La viabilidad celular del hígado perfundido se juzga a partir tanto de las velocidades de captación de oxígeno como de la fuga de fluido por perfusión desde su superficie. Los hígados se descartan cuando la captación de oxígeno caía hasta $0,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ o cuando la fuga de fluido superficial sobrepasaba 2,5% del flujo portal. Muestras del fluido de perfusión efluente se recogen y se analizan con respecto a sus contenidos de metabolito. Los siguientes compuestos se ensayan por medio de procedimientos enzimáticos estándar: glucosa, lactato y piruvato. La concentración de oxígeno en el perfundido desbordado se comprueba continuamente, empleando un electrodo de platino protegido con Teflon adecuadamente situado en una cámara de plexiglás a la salida del perfundido. Las velocidades metabólicas se calculan a partir de las diferencias de entrada-salida y los caudales totales y se refieren al peso en húmedo del hígado.

10 1.6 Síntesis de resultados

La Tabla 4 reúne los resultados que se obtenían en todos los modelos descritos previamente (véanse los puntos de 1.1 a 1.5 anteriores). Se atribuye un valor a cada posible compuesto dependiendo de su efecto en los diferentes modelos *in vitro* en comparación con el vehículo. Los resultados se normalizan y se pesan a fin de generar un valor de comportamiento relativo para cada posible compuesto. Un valor alto refleja un potencial alto del compuesto para la normalización del nivel de glucosa y así una eficacia significativa para controlar niveles de glucosa y/o para el tratamiento de la diabetes o trastornos relacionados.

Tabla 4

Nombre del Fármaco	Valor relativo de comportamiento
acamprosato	15
almitrina	38
azelastina	30
baclofeno	16
carbetapentano	33
cimetidina	31
cinacalcet	32
dexbromofeniramina	21
dietilcarbamazina	32
dipofilina	11
D-manosa	18
idebenona	53
ifenprodilo	28
levosimendano	20
mexiletina	10
nicergolina	40
piribedilo	24
ácido tolfenámico	9
tolperisona	19
torasemida	16
triamtereno	18
rilmenidina	16

La eficacia de las combinaciones de fármacos de la invención también se determina en los modelos *in vitro* anteriores. El protocolo usado en estos ensayos es el mismo que se describe en la sección 1 anterior. Las combinaciones de fármacos listadas en la tabla 5 posterior muestran un valor relativo de comportamiento particularmente alto (determinado como anteriormente).

Resultados:

Todas las combinaciones de fármacos detalladas en la tabla 5 conducían a un efecto positivo global para la normalización del nivel de glucosa en sangre y así se consideran tan eficaces en el tratamiento de la diabetes.

Tabla 5

Combinaciones de fármacos con un valor relativo alto	Eficacia en la diabetes
Ifenprodilo y acamprosato	+
Ifenprodilo y baclofeno	+
baclofeno y acamprosato	+
mexiletina y cinacalcet	+

mexiletina y torasemida	+
sulfisoxazol y torasemida	+
azelastina y nicergolina	+
idebenona y nicergolina	+
carbetapentano y nicergolina	+
almitrina y nicergolina	+
cimetidina y nicergolina	+
dietilcarbamazina y nicergolina	+
ifenprodilo y nicergolina	+
azelastina y idebenona	+
acamprosato y nicergolina	+
azelastina y carbetapentano	+
azelastina y almitrina	+
idebenona y carbetapentano	+
idebenona y almitrina	+
triamtereno y nicergolina	+
D-manosa y nicergolina	+
idebenona y dietilcarbamazina	+
baclofeno y D-manosa	+
baclofeno y metformina	+
D-manosa y metformina	+
baclofeno y D-manosa y metformina	+
ifenprodilo y fenspirida	+
ifenprodilo y torasemida	+
ifenprodilo y triamtereno	+
ifenprodilo y ácido tolfenámico	+
fenspirida y torasemida	+
fenspirida y triamtereno	+
fenspirida y ácido tolfenámico	+
torasemida y triamtereno	+
torasemida y ácido tolfenámico	+
triamtereno y ácido tolfenámico	+
metformina y ifenprodilo y fenspirida	+
metformina y ifenprodilo y torasemida	+
metformina y ifenprodilo y triamtereno	+
metformina y ifenprodilo y ácido tolfenámico	+
metformina y fenspirida y torasemida	+
metformina y fenspirida y triamtereno	+
metformina y fenspirida y ácido tolfenámico	+
metformina y torasemida y triamtereno	+
metformina y torasemida y ácido tolfenámico	+
metformina y triamtereno y ácido tolfenámico	+

2. Estudios *in vivo*

2.1 Efecto antiinflamatorio de combinaciones en el modelo de ratas grasas diabéticas de Zucker (ZDF)

5 La eficacia de las composiciones de fármaco de la invención que comprenden el compuesto o los compuestos de las Tablas 4 y 5 se confirma en el modelo en ratas grasas diabéticas de Zucker (ZDF). La rata grasa diabética de Zucker (ZDF) es un modelo exacto para la diabetes de tipo 2 basándose en la tolerancia a la glucosa deteriorada provocada por la mutación génica de obesidad heredada que conduce a resistencia a insulina. La mutación fa, que se produce en la rata ZDF, da como resultado una proteína receptora de leptina acortada que no interactúa eficazmente con la leptina. Esta mutación se expresa fenotípicamente como obesidad con altos niveles de leptina normal en sangre.

10 Se sabe que la inflamación representa un papel en la etiología de la diabetes de tipo 2 y el síndrome metabólico. Los niveles plasmáticos altos anormales de proteína reactiva C (CRP) se asocian con la diabetes y el síndrome metabólico. Se han usado ratas ZDF para estudiar el efecto de las composiciones de la invención sobre el componente inflamatorio de la diabetes de tipo 2. Las ratas ZDF muestran un incremento en el nivel de CRP plasmático.

Gestión y tratamiento crónico

Las ratas se alojaron individualmente y se mantuvieron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los animales tenían acceso a alimento (Purina 5008) y agua a voluntad. Mientras que un grupo recibía el vehículo, los otros grupos se trataron con los posibles compuestos listados en las tablas 5 y 6 durante 4 semanas. Las administraciones se realizaron dos veces al día mediante la vía oral.

Muestras de sangre

Se recogieron muestras de sangre de las colas anestesiadas tópicamente de ratas en ayuno nocturno en todos los grupos.

Medida del nivel de CRP en plasma

La concentración de CRP en el plasma de todas las ratas (ratas magras, vehículo y ratas ZDF tratadas con baclofeno-acamprosato) se midió mediante un estuche de ELISA según las recomendaciones del fabricante (ref CYT294 de Millipore). El estuche de proteína reactiva C de rata (CRP) es un inmunoensayo enzimático (EIA) de tipo sándwich de anticuerpos policlonales dobles, que mide la CRP en ratas. Los estándares, los controles de calidad y las muestras de plasma se incubaron durante 30 min en pocillos de microvaloración revestidos con anticuerpo policlonal anti-CRP de rata. Después de un lavado a fondo, se añadió a los pocillos anticuerpo policlonal anti-CRP de rata marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubó durante 30 minutos con complejo anticuerpo-CRP inmovilizado. Después de otra etapa de lavado, el restante anticuerpo conjugado a HRP se dejó reaccionar con el sustrato y tetrametilbenzidina (TMB). La reacción (5-10 min) se detuvo mediante la adición de una solución ácida, y la absorbancia del producto de color amarillo resultante se midió espectrofotométricamente a 450 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de CRP. Se construyó una curva estándar al representar valores de absorbancia frente a concentraciones de CRP de los estándares, y las concentraciones de muestras desconocidas se determinaron usando esta curva estándar.

Resultados

Las composiciones de la invención son eficaces para reducir la concentración de CRP en el plasma de ratas ZDF. Por ejemplo, la figura 22 muestra que la concentración de CRP se reduce significativamente mediante tratamiento con acamprosato y baclofeno (7,5 mg/kg y 0,5 mg/kg, respectivamente) cuando se compara con ratas ZDF tratadas con vehículo, y alcanza el nivel de CRP de ratas magras. Esos resultados sugieren un efecto antiinflamatorio sistémico de las combinaciones de la invención.

2.2 Control de la homeostasis de glucosa en el modelo de ratones db/db

El ratón de la cepa db/db, deficiente en receptor de leptina, es un modelo de ratón muy conocido y caracterizado usado para evaluar compuestos que se dirigen a la diabetes. Se usó como control un ratón heterocigótico db/+.

Períodos de preaclimatación y preestudio

Se adquirieron 85 ratones (8 semanas de edad, 75 db/db y 10 db/+) de Janvier (Francia). Los animales se alojaron en 28 jaulas ventiladas ($530\text{ cm}^2 \times 20\text{ cm}$) a través de la fase experimental. Los lechos de los animales se renovaron dos veces por semana. Se pusieron en las jaulas pequeños dispositivos para el enriquecimiento del ambiente (alojamientos para ratones y tacos de celulosa). Los ratones se alojaron en grupos de 2 animales con un ciclo de luz de 12 horas normal (luces apagadas a las 07:00 pm), $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y $55 \pm 10\%$ de humedad relativa. Los ratones tenían al menos 14 días de aclimatación durante los cuales los ratones eran alimentados con una dieta de comida estándar R04 (SAFE-Augy Francia) y tenían libre acceso a agua.

Después de 12 días de aclimatación y 2 días (D0) antes del inicio de los tratamientos, todos los ratones se pesaron y se tuvieron en ayunas durante 6 horas de 08:00 am a 02:00 pm. Posteriormente, el peso corporal se ha medido diariamente a lo largo de todo el estudio.

Se recogió sangre (200 μl /EDTA) del seno retrobulbar bajo anestesia con isoflurano. La glucosa en plasma y la insulina en plasma se cuantificaron usando métodos enzimáticos y e inmunoenzimáticos, respectivamente, a fin de aleatorizar a los animales en grupos homogéneos.

El Día 0, justo antes de la sonda, se recogió una gota de sangre de la vena caudal para medir la glucosa en sangre sin ayunas usando un glucómetro (SmartCheck®).

Grupos de prueba

Los ratones se situaron en grupos según su peso corporal y glucosa en sangre en ayunas (N=8 ratones/grupo):

- Controles magros (ratones db/+) tratados con vehículo (por vía oral, dos veces al día).
- Controles negativos obesos (ratones db/db) tratados con vehículo (por vía oral, dos veces al día).

- Controles positivos obesos (ratones db/db) tratados con metformina en 300 mg/kg (por vía oral, una vez al día).
- Animales obesos (ratones db/db) tratados con compuestos o composiciones de la invención.

Tratamiento

5 La duración del estudio de tratamiento era 6 semanas. Los ratones se trataron dos veces al día a las 08:00 am y a las 04:00 pm mediante sonda con vehículo, compuesto de referencia o compuestos de PXT con respecto a la siguiente relación: 10 ml/kg de dosificación (hasta 20 ml/kg/día máx). Los volúmenes de la sonda se han ajustado individualmente al peso corporal registrado por la mañana.

10 Durante el período de tratamiento, se comprobaron y se registraron el consumo de alimento y agua. La toma de alimento se midió y se registró diariamente (diferencia entre dos días consecutivos). La toma de alimento media expresada como gramos de alimento consumidos por animal al día se asignó a todos los ratones de la jaula considerada. La toma de agua se evaluó dos veces a la semana usando el mismo método.

Una vez a la semana, los Días D7, D13, D21, D27, D35 y D41 justo antes de la sonda, se recogió una gota de sangre de la vena caudal para medir la glucosa en sangre sin ayunas usando un glucómetro (SmartCheck®).

15 Los Días D14, D28 y D42, el alimento se retiró a las 08:00 am. Se recogió sangre (200 µl/EDTA) del seno retrobulbar bajo anestesia a las 02:00 pm (después de 6 horas de ayuno) para medir la glucosa en plasma en ayunas.

Cuantificación de la glucosa

20 La concentración de glucosa en plasma se determinó mediante un método colorimétrico basado en la oxidación enzimática de glucosa en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno producido reacciona con fenol y 4-aminofenazona en una reacción catalizada por peroxidasa para formar un colorante de quinonaimina rojo – violeta como indicador. La densidad del color final es directamente proporcional a la concentración de glucosa y se midió a 505 nm.

Resultados

25 Las composiciones de la invención reducen la glucemia en el plasma de ratones db/db tan pronto como el D28 de tratamiento (no mostrado). La Figura 23 muestra que el D42, la concentración de glucosa se reduce significativamente mediante la administración de una combinación de D-manosa (5 mg/kg), (RS)-baclofeno (6 mg/kg) y metformina (150 mg/kg) cuando se compara con los animales administrados con vehículo ($p < 0,001$).

30 Notablemente, los fármacos, cuando se usan solos, no inducen una disminución significativa de la glucemia. Más notablemente, los compuestos de la invención se pueden considerar mejoradores potentes del tratamiento para la diabetes conocido actualmente, permitiendo de ese modo la reducción de las dosificaciones y esperando así una disminución de los efectos secundarios.

Referencias

1. van Belle, T.L., K.T. Coppieters, y M.G. von Herrath, Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*, 2011. 91(1): pág. 79-118.
- 35 2. Maggio, C.A. y F.X. Pi-Sunyer, The prevention and treatment of obesity. Application to type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1997. 20(11): pág. 1744-66.
3. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, y T.W. van Haeften, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 2005. 365(9467): pág. 1333-46.
4. Boden, G., Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 1997. 46(1): pág. 3-10.
- 40 5. Goldstein, B.J., Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, 2002. 90(5A): pág. 3G-10G.
6. Bessac, L., Unmet medical needs and therapeutic goals in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003. 4(10): pág. 1173-8.
- 45 7. Rolla, A.R., Starting insulin strategies for patients with an inadequate response to oral therapy. *Diabetes Obes Metab*, 2009. 11 Suppl 5: pág. 6-9.
8. Yang, Y.X., S. Hennessy, y J.D. Lewis, Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients. *Gastroenterology*, 2004. 127(4): pág. 1044-50.

9. Nathan, D.M., *et al.*, Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, 2009. 32(1): pág. 193-203.
- 5 10. Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. y Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* 47, 2393-2404 (2004).
11. Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I. y Dack, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* 4, 461-485 (2003).
12. Heimbach, T. *et al.* Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int. J. Pharm.* 261, 81-92 (2003).
- 10 13. Yang, C. Y., Dantzig, A. H. y Pidgeon, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res.* 16, 1331-1343 (1999).
14. Steffansen, B. *et al.* Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 3-16 (2004).
15. Stella, V. *et al.* Prodrugs: Challenges and Rewards (AAPS, New York, 2007).
- 15 16. Wermuth, CG. The Practice of Medicinal Chemistry. (Hardbound, 2003). Parte VI, Cap 33: Designing prodrugs and bioprecursors.
17. Pezron, I. *et al.* Prodrug strategies in nasal drug delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.*, Vol. 12, N.º 3, 331-340 (2002).
18. Stella, V. J. Prodrugs as therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 277-280 (2004).
- 20 19. Stella, V. J. y Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 677-694 (2007).
20. Higuchi, T.; Stella, V. eds. Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems. ACS Symposium Series. American Chemical Society: Washington, DC (1975). 31.
21. Roche, E. B. Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs. American Pharmaceutical Association: Washington, DC (1977).
- 25 22. Stahl H., Wermuth C. G. (Eds.) Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use. Wiley-VCH; 2ª edición (29 de marzo, 2011).
23. Asfari M., Janjic D., Meda P., Li G., Halban P.A., y Wollheim C.B. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130: 167-78; (1992)
- 30 24. Frankfurt O.S. y Krishan A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening. *J Immunol Methods* 253:133-144 (2001)
25. Fryer L.G., Hajdуч E., Rencurel F., Salt I.P., Hundal H.S., Hardie D.G., Carling D. Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes. Dec*;49(12):1978-85. (2000)

REIVINDICACIONES

1. Ifenprodilo, o una sal o formulación de liberación sostenida del mismo, para su uso en el tratamiento de la diabetes o de un trastorno relacionado seleccionado de deterioro de la tolerancia a la glucosa, deterioro de la glucosa en ayunas, resistencia a insulina, hiperglucemia posprandial y sobrepeso/obesidad en un sujeto mamífero que lo necesite.
- 5 2. Ifenprodilo, o una sal o formulación de liberación sostenida del mismo, para su uso según la reivindicación 1, en combinación con un compuesto adicional seleccionado de acamprosato, almitrina, amlexanox, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, fexofenadina, mexiletina, nicergolina, tolperisona, torasemida, triamtereno, ácido tolfenámico, piribedilo, levosimendano, cimetidina, diprofilina, idebenona y rilmenidina, o una sal o sales o una formulación o formulaciones de liberación sostenida del mismo.
- 10 3. La combinación para su uso según la reivindicación 2, en donde dicho compuesto adicional se selecciona de acamprosato, almitrina, azelastina, baclofeno, carbetapentano, cinacalcet, dexbromofeniramina, dietilcarbamazina, D-manosa, fenspirida, levosimendano, mexiletina, nicergolina, ácido tolfenámico, tolperisona, torasemida y triamtereno, o una sal o sales o una formulación o formulaciones de liberación sostenida del mismo.
- 15 4. La combinación para su uso según la reivindicación 2 o 3, en donde los compuestos se formulan en la misma composición o composiciones o por separado, para su administración combinada, por separado o secuencial.
5. La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende al menos:
 - ifenprodilo y acamprosato,
 - ifenprodilo y baclofeno,
 - ifenprodilo y nicergolina,
 - 20 - ifenprodilo y fenspirida,
 - ifenprodilo y torasemida,
 - ifenprodilo y triamtereno, o
 - ifenprodilo y ácido tolfenámico,
 o una sal o sales o una formulación o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.
- 25 6. El compuesto o la combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además al menos un agente antidiabético.
7. El compuesto o la combinación para su uso según la reivindicación 6, en donde el al menos un agente antidiabético adicional se selecciona de acarbosa, acetohexamida, alogliptina, berberina, bezafibrato, bromocriptina, buformina, carbutamida, cloropropamida, picolinato de cromo, ciprofibrato, clofibrato, colessevelam, dexfenfluramina, dutogliptina,
 - 30 exenatida, fenofibrato, gemfibrozilo, gemigliptina, glibenclamida, glibornurida, glicetanilo, gliclazida, glimepirida, glipizida, gliquidona, glisentida, glicopiramida, imidapril, insulina, inulina, ácido lipoico, linagliptina, liraglutida, mecobalamina, metformina, miglitol, mitiglinida, nateglinida, orlistat, fenformina, pioglitazona, pramlintida, repaglinida, rosiglitazona, saxagliptina, sitagliptina, tolazamida, tolbutamida, vildagliptina o voglibosa, o una sal o sales o una formulación o formulaciones de liberación sostenida del mismo.
- 35 8. La combinación para su uso según la reivindicación 7, que comprende al menos:
 - ifenprodilo y metformina,
 - ifenprodilo y acamprosato y metformina,
 - ifenprodilo y baclofeno y metformina,
 - ifenprodilo y nicergolina y metformina,
 - 40 - ifenprodilo y fenspirida y metformina,
 - ifenprodilo y torasemida y metformina,
 - ifenprodilo y triamtereno y metformina, o
 - ifenprodilo y ácido tolfenámico y metformina,
 o una sal o sales o una formulación o formulaciones de liberación sostenida de los mismos.

9. El compuesto o la combinación para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el control del nivel de glucosa en sangre en un sujeto mamífero que lo necesite.
10. El compuesto o la combinación para el uso según la reivindicación 9, en donde el sujeto mamífero padece diabetes o un trastorno relacionado seleccionado de deterioro de la tolerancia a la glucosa, deterioro de la glucosa en ayunas, resistencia a insulina, hiperglucemia posprandial y sobrepeso/obesidad.
- 5 11. El compuesto o la combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el compuesto o los compuestos incrementan o estimulan la captación de glucosa en adipocitos y/o células musculares en dicho sujeto mamífero.
- 10 12. El compuesto o la combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el compuesto o los compuestos disminuyen la apoptosis de células beta pancreáticas en dicho sujeto mamífero.
13. El compuesto o la combinación para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en la disminución de la resistencia a insulina en un sujeto mamífero que lo necesite.
14. El compuesto o la combinación para su uso según las reivindicaciones 1, 9 y 13, en donde el sujeto padece diabetes de tipo 2.
- 15 15. El compuesto o la combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
16. El compuesto o la combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se administra repetidamente al sujeto.

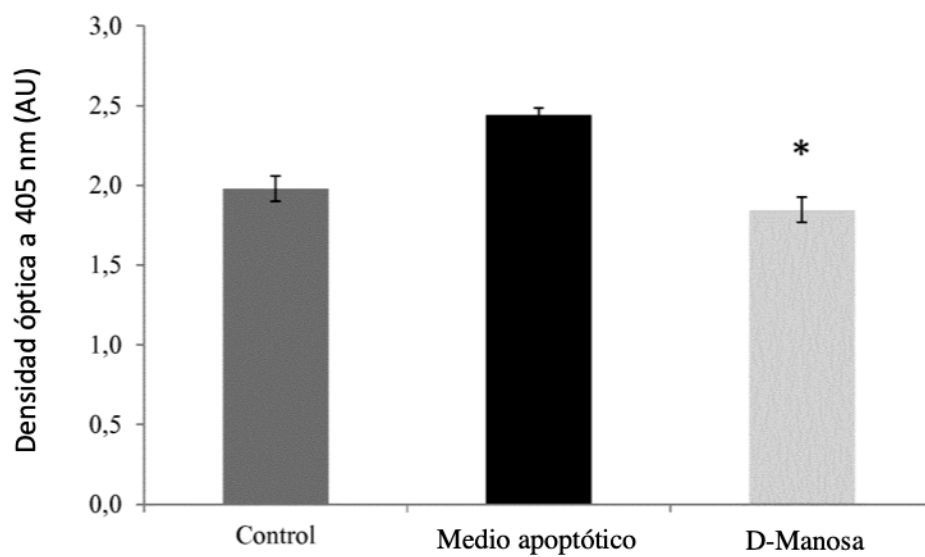


Figura 1

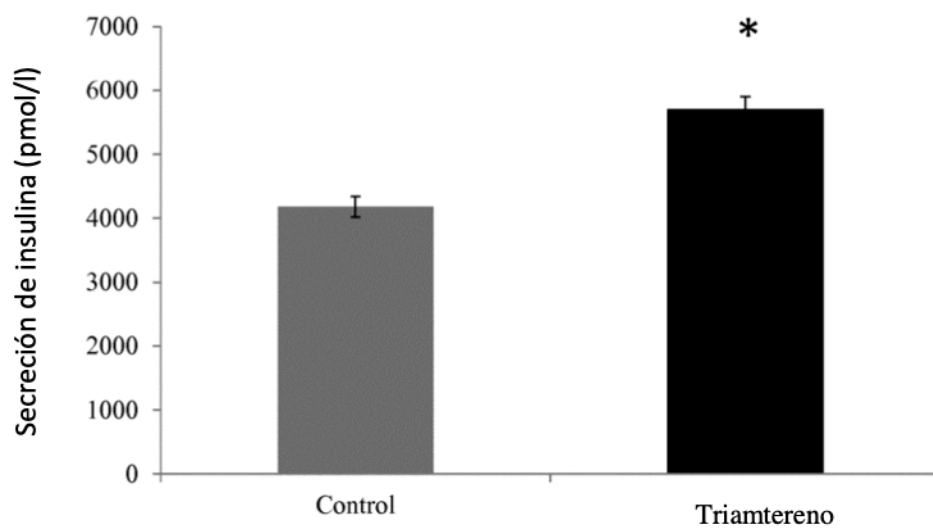


Figura 2

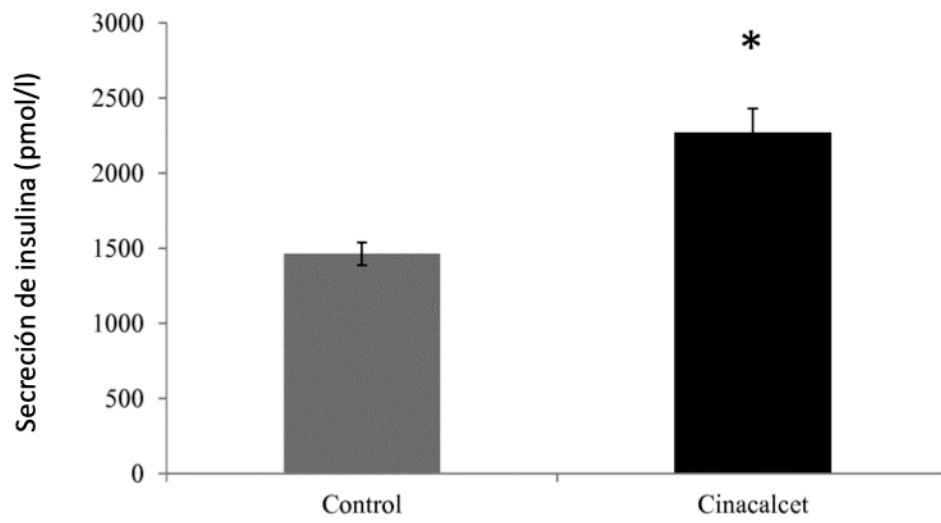


Figura 3

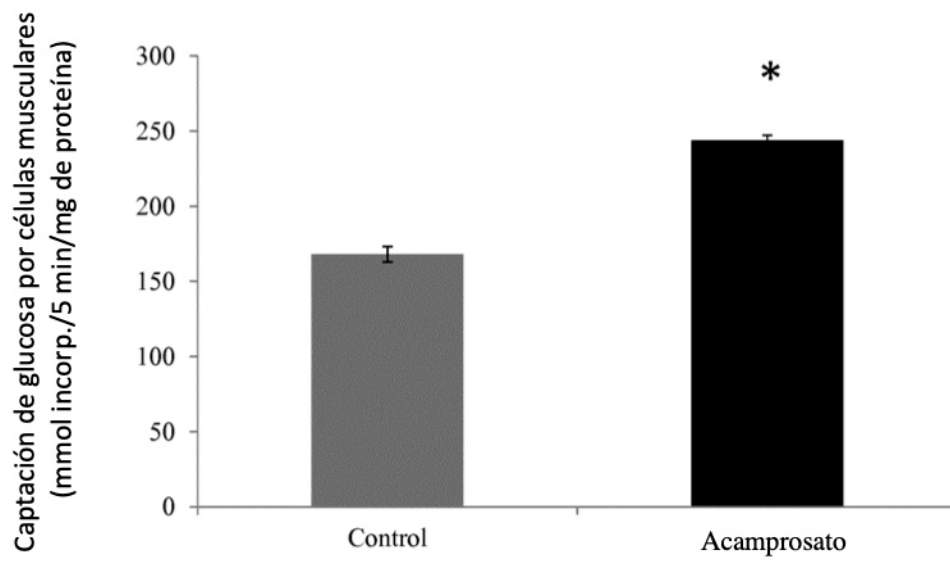


Figura 4

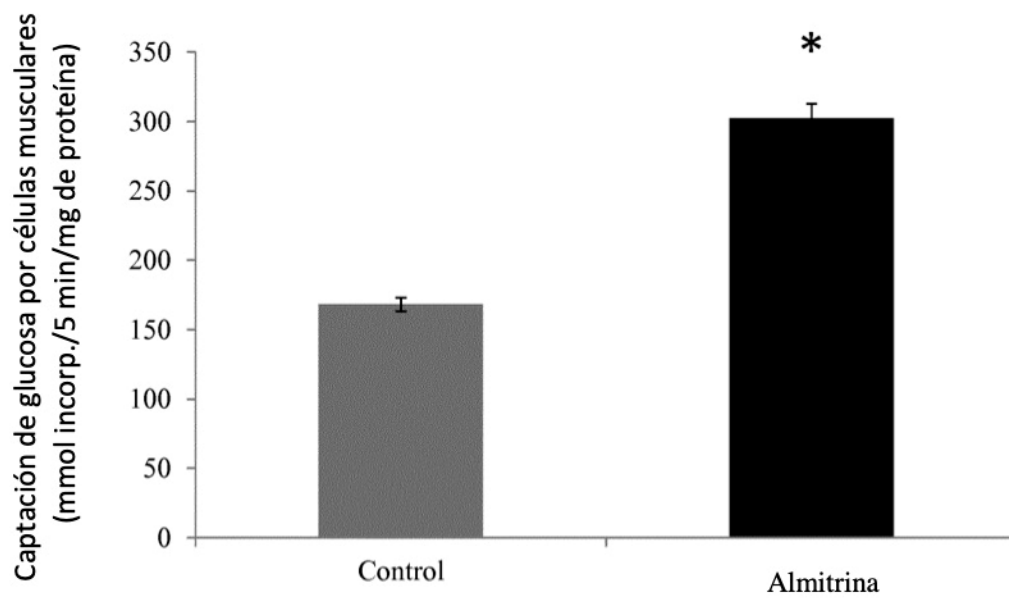


Figura 5

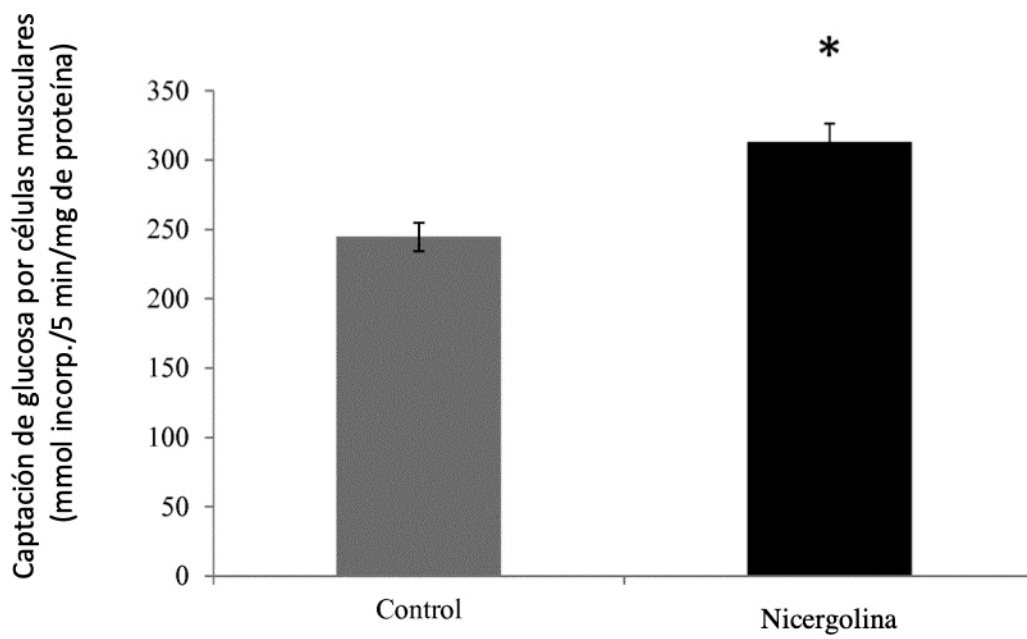


Figura 6

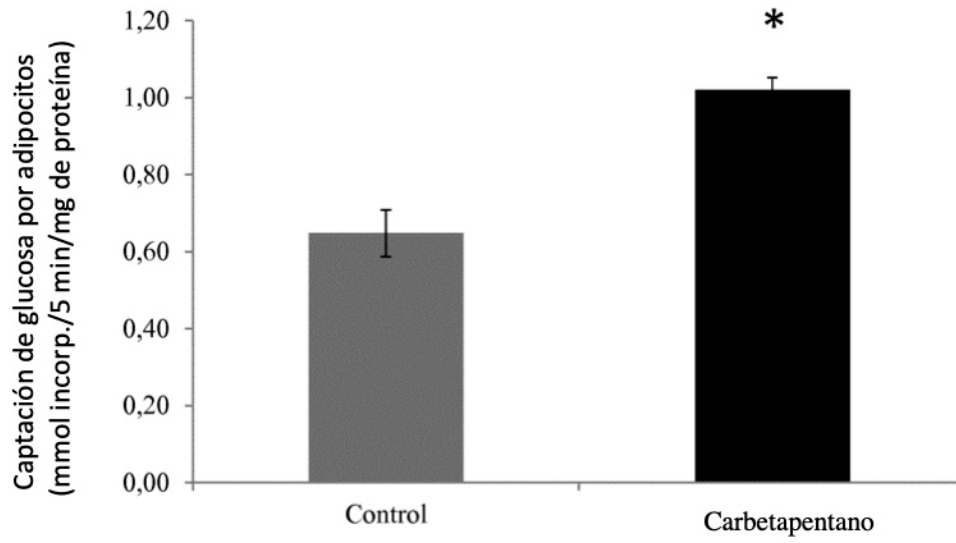


Figura 7

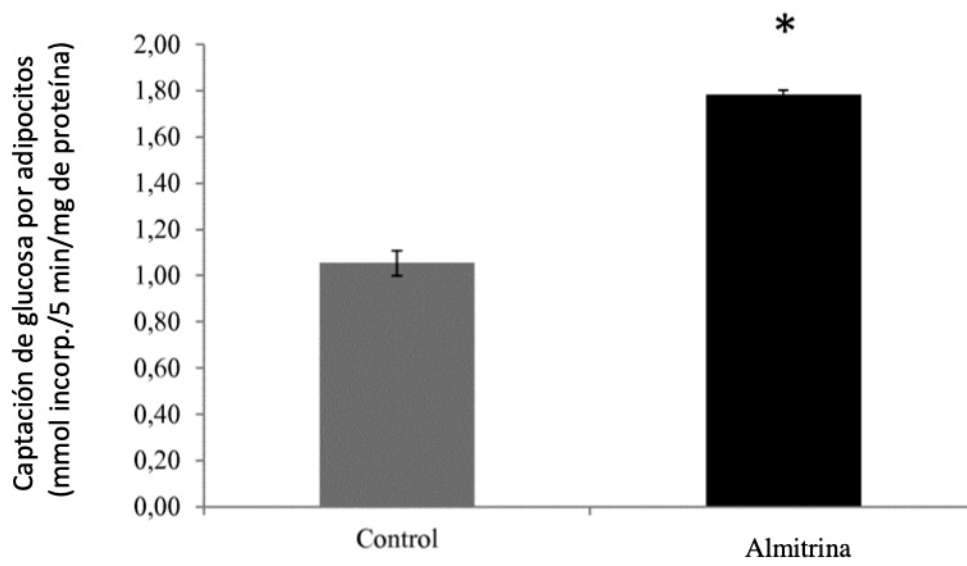


Figura 8

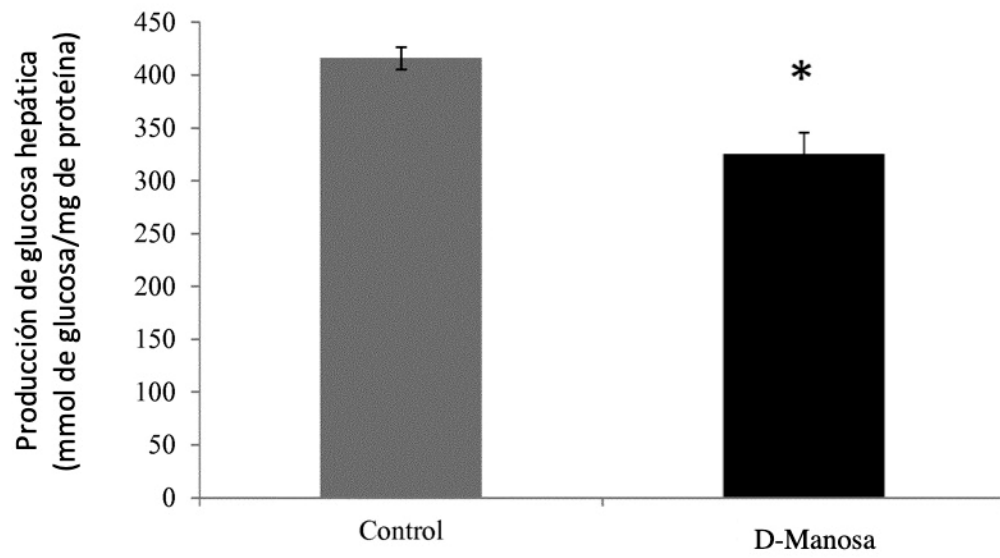


Figura 9

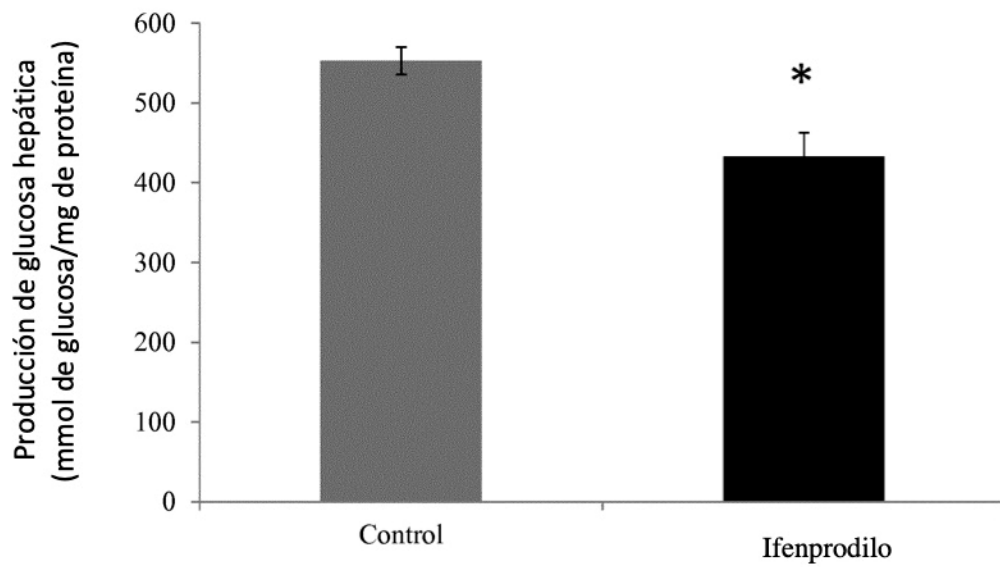


Figura 10

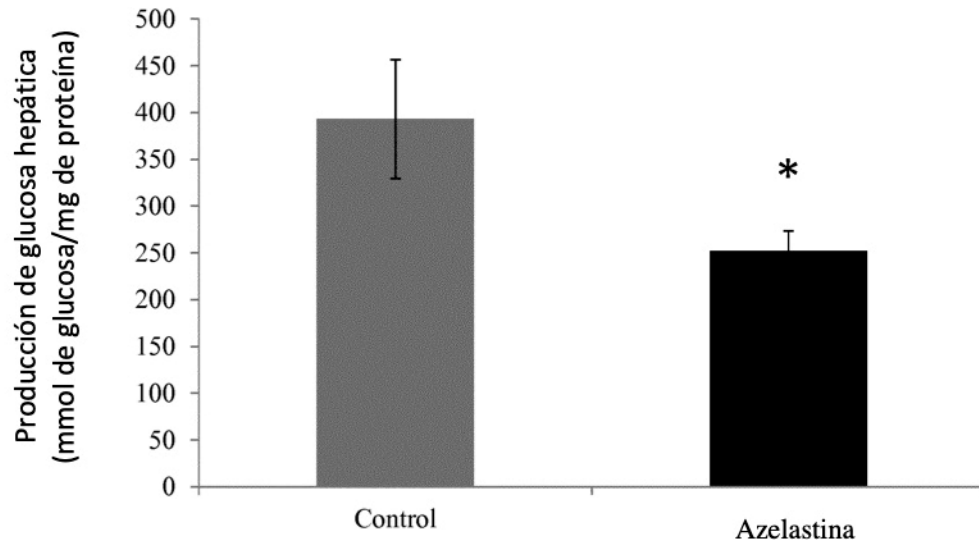


Figura 11

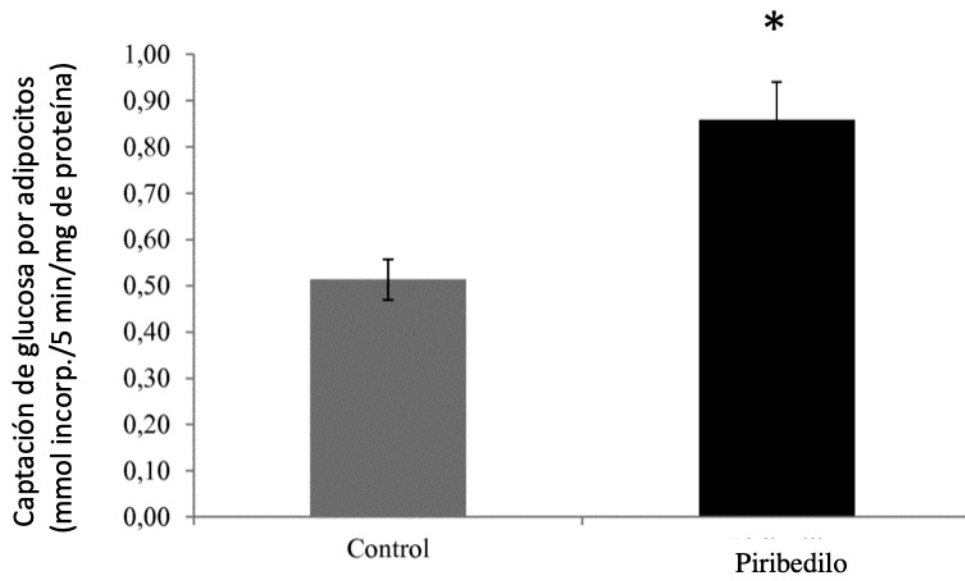


Figura 12

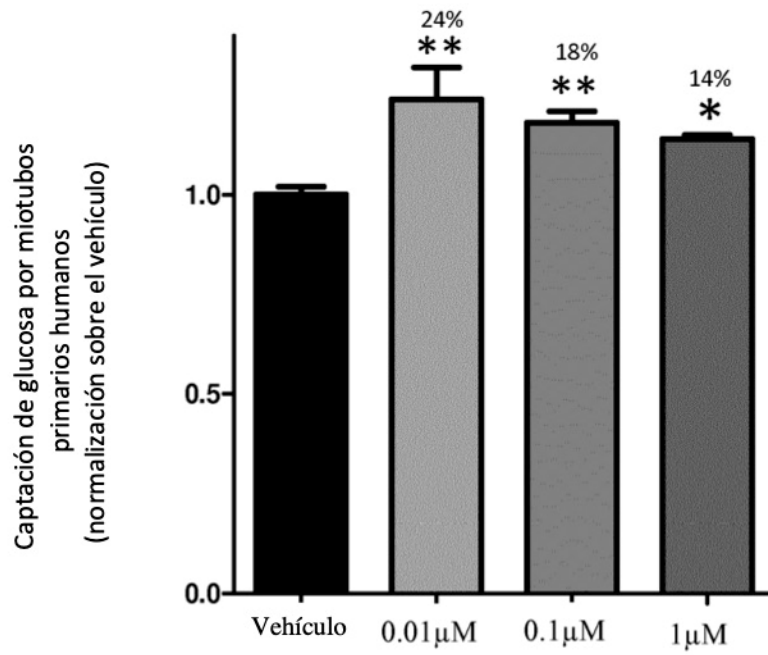


Figura 13

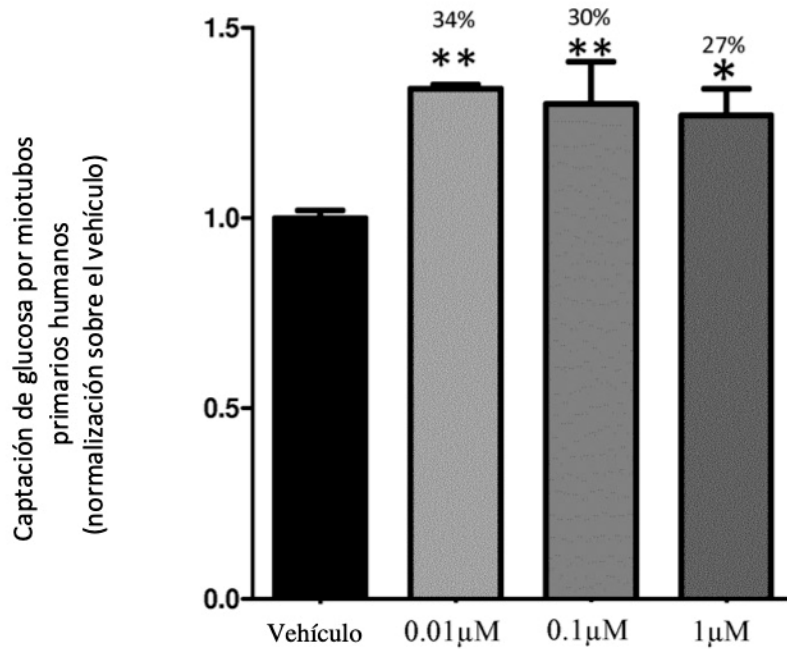


Figura 14

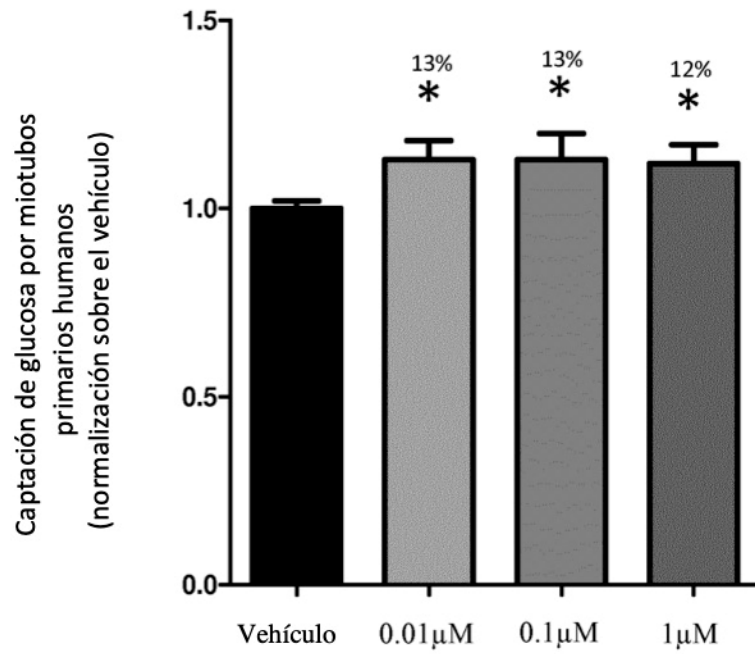


Figura 15

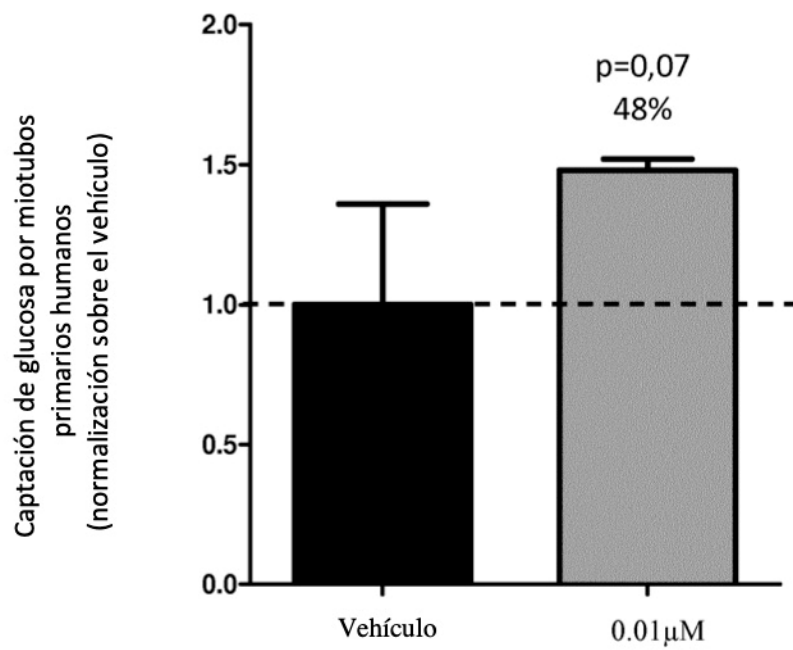


Figura 16

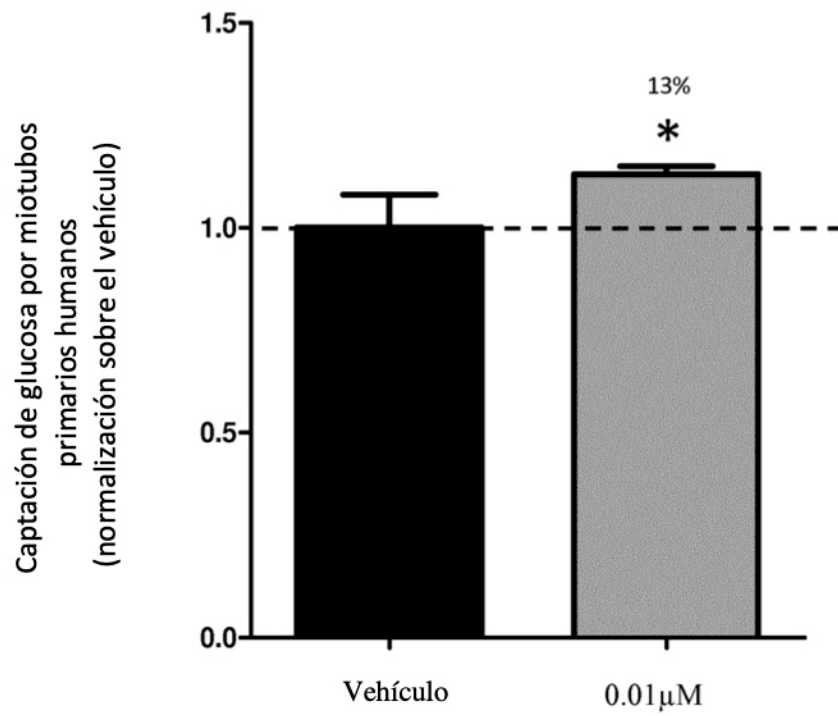


Figura 17

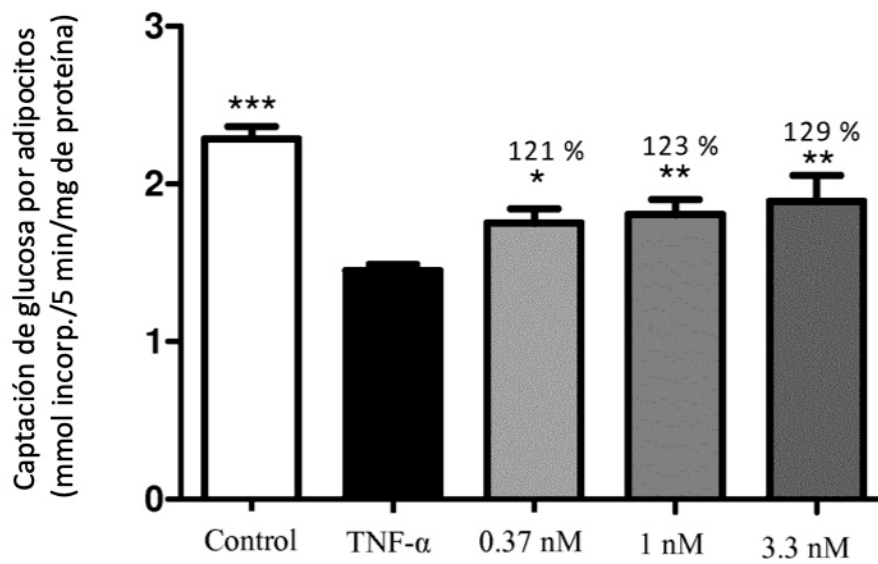


Figura 18

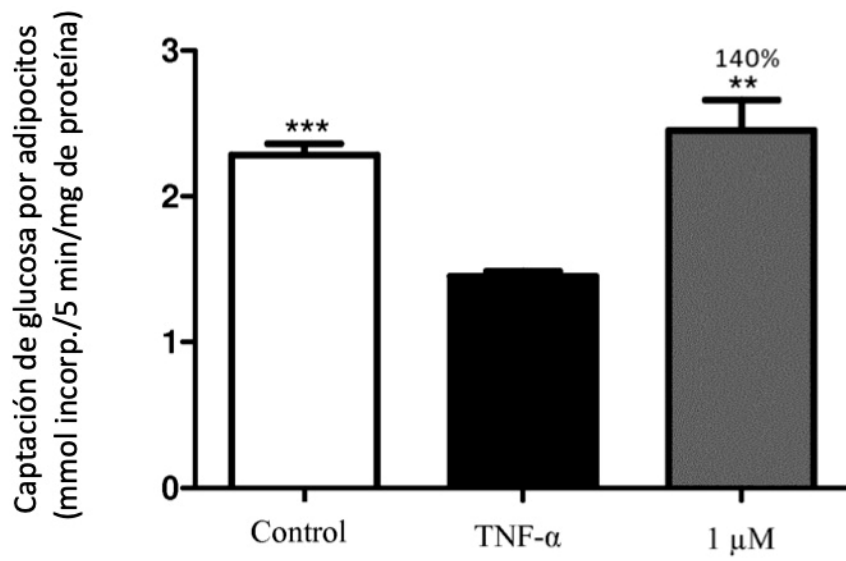


Figura 19

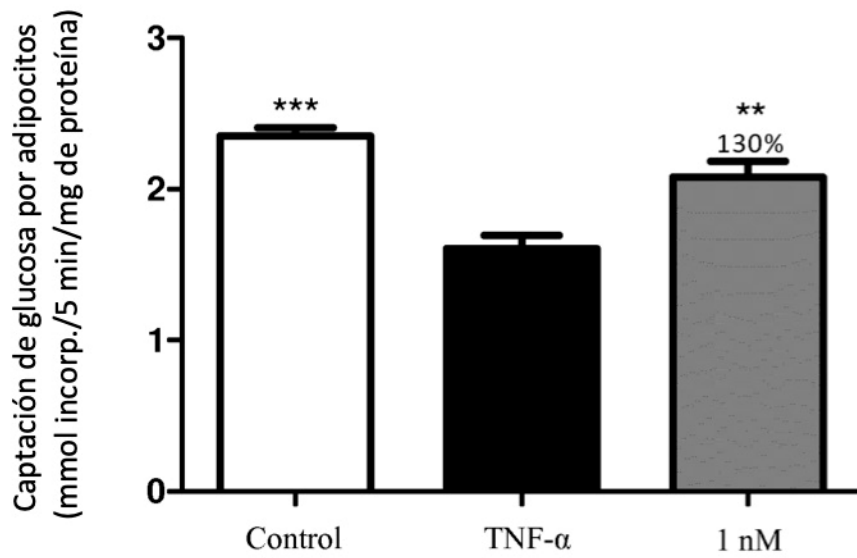


Figura 20

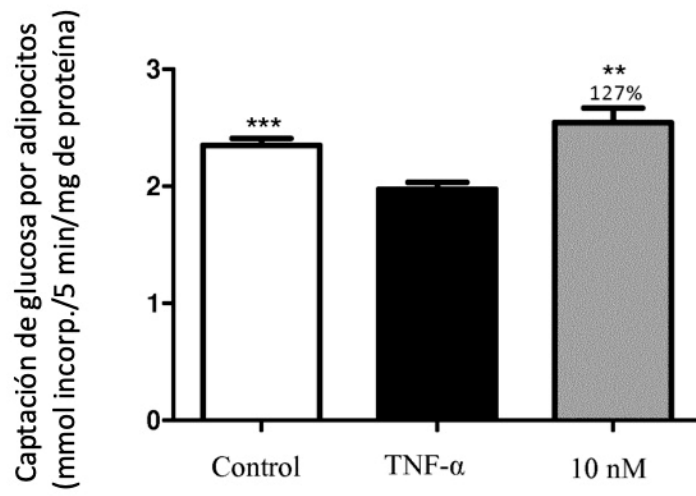


Figura 21

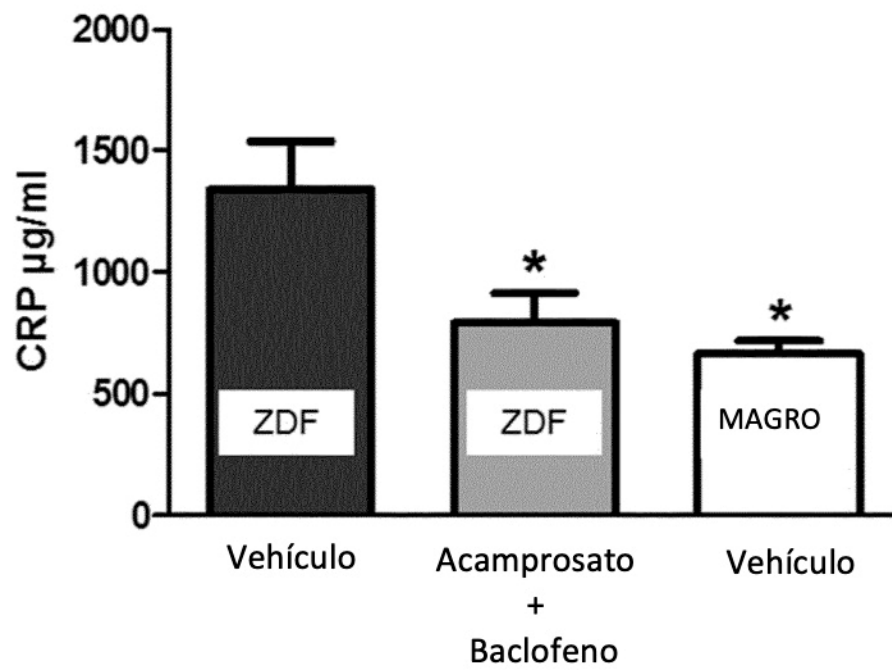


Figura 22

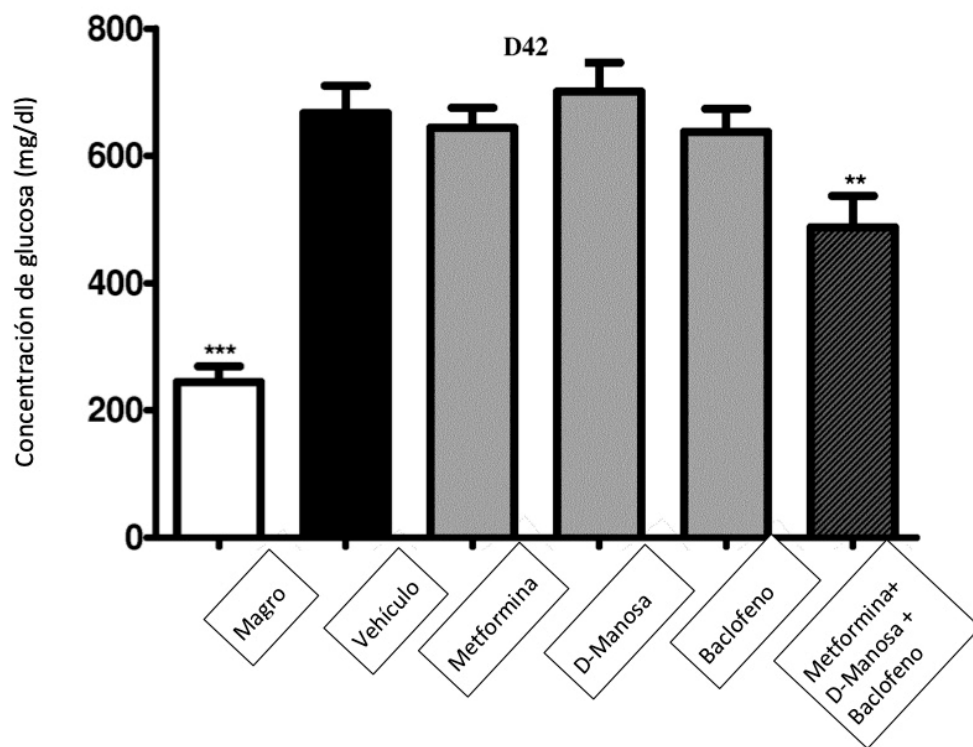


Figura 23