(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 791 301**

(51) Int. CI.:

A61K 38/13 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/IB2016/001582**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17077378**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16802132 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3370756**

(54) Título: **Combinación de canrenoato y exenatida**

(30) Prioridad:

06.11.2015 GR 20150100486

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2020

(73) Titular/es:

GENESIS PHARMA SA (100.0%)
270 Kifissias Avenue
15232 Athens, GR

(72) Inventor/es:

VOGIATZIS, GEORGE

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Combinación de canrenoato y exenatida

Campo de la invención

La presente invención proporciona una nueva combinación que comprende al menos: (i) un modulador de insulina, específicamente exenatida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) un antagonista de aldosterona, específicamente canrenoato de potasio. Dichas combinaciones son adecuadas para cardioprotección y/o para tratar y/o prevenir la isquemia y/o la lesión por reperfusión.

Otros aspectos se refieren a productos farmacéuticos y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas combinaciones según la invención, y productos farmacéuticos y composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento.

Antecedentes

El infarto agudo de miocardio (IAM) es una causa importante de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Cada año, se estima que 785.000 personas (IMEST 500.000) tendrán un nuevo IAM solo en los Estados Unidos y aproximadamente cada minuto un estadounidense sucumbirá a uno (Roger *et al*., Circulation, 2012, 125: e2-e220). Uno de cada seis hombres y una de cada siete mujeres en Europa morirán de infarto de miocardio (Directrices ESC para el tratamiento del IM agudo en pacientes que presentan elevación del segmento ST, Eur. Heart J., 2012, 33: 2569-2619).

En la actualidad, la reperfusión miocárdica oportuna usando terapia trombolítica o intervención coronaria percutánea primaria (PPCI) es la terapia elegida para pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IMEST) (Worner *et al*., Rev Exp Cardiol., 2013, 66: 5-11). Estas intervenciones limitan el infarto de miocardio (IM), conservan la función sistólica del ventrículo izquierdo y reducen la aparición de insuficiencia cardíaca.

Sin embargo, la mortalidad sigue siendo considerable en estos pacientes con una mortalidad hospitalaria que varía entre 6 y 14 % (Mandelzweig *et al*., Eur. Heart J., 2006, 27: 2285-2293). Asimismo, la morbilidad sigue siendo considerable: el IM es la principal causa de insuficiencia cardíaca crónica, teniendo de aproximadamente 5 a 6 % de los pacientes un acontecimiento cardiovascular antes de los 30 días y rehospitalización al cabo de 1 año, aproximadamente 2,7 %. (Lagerqvist *et al*., N. Engl. J. Med., 2014, 371: 1111-20).

Paradójicamente, aunque la reperfusión miocárdica es esencial para el rescate miocárdico, proporcionar oxígeno y nutrientes al área isquémica tiene un precio, ya que puede en sí mismo inducir lesiones miocárdicas y muerte de cardiomiocitos, un fenómeno denominado "lesión por reperfusión miocárdica", cuyas consecuencias irreversibles incluyen obstrucción microvascular e infarto de miocardio (Yellow y Hausenloy, N. Engl. J. Med., 2007, 357: 1121-1135). Se estima que la lesión por isquemia-reperfusión es responsable de aproximadamente 50 % del área de infarto final (Yetgin *et al*., Neth. Heart J., 2010; 28, 389-392). Los intentos anteriores de traducir las terapias cardioprotectoras (es decir, antioxidantes, bloqueadores de los canales de calcio y agentes antiinflamatorios) para reducir la lesión por reperfusión en la clínica no han tenido éxito (Frohlich *et al*., Eur. Heart J., 2013, 34: 1714-1724). Actualmente no existe ninguna terapia eficaz aprobada para prevenir la lesión por reperfusión miocárdica en pacientes con IMEST reperfundido, lo que la hace una diana residual importante para cardioprotección.

El trabajo pionero en la década de 1990 implicó por primera vez el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) como un mediador crítico de la lesión por reperfusión miocárdica letal. La apertura del PTPM (un canal no selectivo de la membrana mitocondrial interna) en los primeros minutos de reperfusión conduce a sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, estrés oxidativo, restauración de un pH fisiológico y agotamiento de ATP (Heusch *et al*., Basic Res Cardiol, 2010, 105: 151-154). Estos acontecimientos inducen la muerte de cardiomiocitos al desacoplar la fosforilación oxidativa.

Las alteraciones en las proteínas de membrana por radicales libres se encuentran entre los factores importantes en la evolución del daño por reperfusión miocárdica. Grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) conducen a la superación de las defensas celulares antioxidantes endógenas. Esto provoca, entre otros efectos, la peroxidación de las membranas lipídicas y la pérdida de la integridad de membrana que da como resultado necrosis y muerte celular (Zweier y Talukder, Cardiovasc Res, 2006, 70: 181-190). La reintroducción de oxígeno abundante al inicio de la reperfusión induce una explosión de derivados tóxicos de oxígeno adicionales, incluyendo anión superóxido, radical hidroxilo y peroxinitrito, durante los primeros minutos de reflujo. Por otro lado, el estrés oxidativo también reduce la biodisponibilidad del óxido nítrico (compuesto vasodilatador) en la reperfusión y la administración de donantes de NO es cardioprotectora en modelos animales.

Actualmente existe la necesidad de un tratamiento eficaz de la lesión por reperfusión, en particular lesión por reperfusión miocárdica.

Declaración de invención

La presente invención proporciona nuevas combinaciones que son cardioprotectoras y adecuadas para la prevención y/o el tratamiento de la lesión por reperfusión. Las combinaciones y otros aspectos de la invención proporcionan un tratamiento que es más eficaz y proporciona resultados clínicos superiores en comparación con las terapias que emplean un único agente farmacéutico activo.

El primer aspecto se refiere a una combinación que comprende un modulador de insulina, en donde el modulador de insulina es exenatida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un antagonista de aldosterona, en donde el antagonista de aldosterona es canrenoato de potasio.

Un segundo aspecto se refiere a una combinación según el primer aspecto que comprende al menos otro ingrediente farmacéutico activo (IFA) seleccionado de un betabloqueante, un inhibidor de renina-angiotensina, una estatina (inhibidor de la HMG-CoA reductasa), un inhibidor de la activación o agregación plaquetaria, un inhibidor de la fosfodiesterasa-3, un sensibilizador de calcio, un antioxidante y un agente antiinflamatorio.

Un tercer aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación según cualquier aspecto precedente y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un cuarto aspecto se refiere a una composición farmacéutica según el tercer aspecto en una forma adecuada para administración parenteral, preferentemente administración intravenosa.

Un quinto aspecto se refiere a un producto farmacéutico que comprende un modulador de insulina, en donde el modulador de insulina es exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un antagonista de aldosterona, en donde el antagonista de aldosterona es canrenoato de potasio.

Un sexto aspecto se refiere a una combinación según el aspecto 1 o 2, o una composición farmacéutica según el aspecto 3 o 4, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos.

Un séptimo aspecto se refiere a una combinación o una composición farmacéutica para su uso según el aspecto 6 en donde la lesión por isquemia y/o reperfusión es lesión por isquemia y/o reperfusión del cerebro, corazón, pulmón, riñón, preferentemente isquemia miocárdica, lesión por reperfusión miocárdica o infarto agudo de miocardio.

Un octavo aspecto se refiere a una combinación o una composición farmacéutica para su uso según el aspecto 6 o 7 en donde los componentes son para administración por vía intravenosa.

Un noveno aspecto se refiere a una combinación o una composición farmacéutica para su uso según uno cualquiera de los aspectos 6 a 8 en donde los componentes son para administración durante la reperfusión.

Un décimo aspecto se refiere a una combinación o una composición farmacéutica para su uso según uno cualquiera de los aspectos 6 a 8 en donde los componentes son para administración antes de la reperfusión.

Un undécimo aspecto se refiere a una combinación o una composición farmacéutica para su uso según uno cualquiera de los aspectos 6 a 8 en donde los componentes son para administración durante la reperfusión.

Un duodécimo aspecto se refiere a un producto farmacéutico según el aspecto 5 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de los siguientes: lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos, en donde los componentes son para administración simultánea, secuencial o por separado.

Un decimotercer aspecto se refiere a un producto farmacéutico para su uso según el aspecto 12 en donde la lesión por isquemia y/o reperfusión es lesión por isquemia y/o reperfusión del cerebro, corazón, pulmón, riñón, preferentemente isquemia miocárdica, lesión por reperfusión miocárdica o infarto agudo de miocardio.

Un decimocuarto aspecto se refiere a un producto farmacéutico para su uso según el aspecto 12 o aspecto 13 en donde los componentes son para administración parenteral, preferentemente administración intravenosa.

Un decimoquinto aspecto se refiere a un producto farmacéutico para su uso según uno cualquiera de los aspectos 12 a 14 en donde los componentes son para administración durante la reperfusión.

Un decimosexto aspecto se refiere a un producto farmacéutico para su uso según uno cualquiera de los aspectos 12 a 14 en donde los componentes son para administración antes de la reperfusión.

Un decimoséptimo aspecto se refiere a un producto farmacéutico para su uso según uno cualquiera de los aspectos

12 a 14 en donde los componentes son para administración después de la reperfusión.

Un decimoctavo aspecto se refiere a un producto farmacéutico para su uso según uno cualquiera de los aspectos 12 a 17 en donde los componentes son para administración simultánea.

Un decimonoveno aspecto se refiere al uso de una combinación que comprende un modulador de insulina, en donde el modulador de insulina es exenatida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un antagonista de aldosterona, en donde el antagonista de aldosterona es canrenoato de potasio, para tratar y/o prevenir la lesión por isquemia y/o reperfusión en un órgano *ex vivo* antes del trasplante.

Un vigésimo aspecto se refiere a un uso según el aspecto 19 en donde la lesión por isquemia y/o reperfusión es isquemia miocárdica, lesión por reperfusión miocárdica o infarto agudo de miocardio.

Un vigésimo primer aspecto se refiere a un uso según el aspecto 19 o el aspecto 20 en donde los componentes se administran antes del trasplante.

Descripción detallada

Las realizaciones preferidas expuestas a continuación son aplicables a cualquiera de los aspectos de la invención mencionados anteriormente según sea adecuado.

Modulador de insulina

La combinación de la invención comprende un modulador de insulina, específicamente exenatida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "modulador de insulina" se refiere a un agente que es capaz de aumentar o disminuir directa o indirectamente la actividad de la insulina, que a su vez puede aumentar o disminuir la respuesta fisiológica mediada por insulina.

La combinación, composiciones y usos comprenden un modulador de insulina, específicamente exenatida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma como elemento esencial.

Como se desvela en el presente documento, el modulador de insulina puede seleccionarse de agonistas de GLP-1, inhibidores de DPP-4, agonistas de PPAR, insulina y análogos de la misma.

Los ejemplos de agonistas de GLP-1 incluyen exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida y dulaglutida (LY2189265) y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Los ejemplos de inhibidores de DPP-4 incluyen sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptina anagliptina, teneligliptina, alogliptina, trelagliptina, gemigliptina, dutogliptina y omarigliptina (MK-3102) y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Los ejemplos de agonistas de PPAR incluyen clofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, bezafibrato, fenofibrato, saroglitazar, aleglitazar, muraglitazar y tesaglitazar y sales farmacéuticamente aceptables los mismos.

Los ejemplos de análogos de insulina incluyen insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina, insulina detemir, insulina degludec, insulina glargina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Como se desvela en el presente documento, el modulador de insulina se puede seleccionar de exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida, dulaglutida (LY2189265), sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, linagliptina anagliptina, teneligliptina, alogliptina, trelagliptina, gemigliptina, dutogliptina, omarigliptina (MK-3102), clofibrato, gemfibrozilo, ciprofibrato, bezafibrato, fenofibrato, saroglitazar, aleglitazar, muraglitazar tesaglitazar, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina, insulina detemir, insulina degludec, insulina glargina y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Como se desvela en el presente documento, el modulador de insulina es un agonista de GLP-1 seleccionado de exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida, dulaglutida (LY2189265) y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Preferentemente, el agonista de GLP-1 es exenatida.

Exenatida

El modulador de insulina es exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Como se usa en el presente documento, el término "exenatida" se refiere a un péptido de 39 unidades de la siguiente secuencia:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH_2

La exenatida (un sinónimo es exendina 4) fue aislado originalmente de la saliva del monstruo de Gila, *Heloderma suspectum*, por Eng en 1992. Es un secretagogo de insulina con efectos glucorreguladores similares al péptido humano péptido de tipo glucagón-1 (GLP-1).

La exenatida imita el péptido 1 de tipo glucagón humano (GLP-1), una hormona incretina intestinal que se libera en respuesta al consumo de nutrientes (Goke *et al*., J. Biol. Chem., 1993, 268: 19650-19655). Ejerce propiedades insulinotrópicas e insulinomiméticas a través del receptor de GLP-1. El receptor de GLP-1 se expresa ampliamente en muchos órganos, incluyendo el corazón y el endotelio vascular (Bullock *et al*., Endocrinology, 1996, 137: 2968-2978; Nystrom *et al*., Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 287: E1209-E1215). En la actualidad, la exenatida está aprobada como un fármaco antidiabético para el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus de tipo 2. La dosis recomendada en esta indicación es inicialmente de 5 mg (mcg) dos veces al día, aumentando a 10 mg dos veces al día después de 1 mes según la respuesta clínica.

GLP-1 es ineficaz como agente terapéutico ya que tiene una semivida en circulación muy corta (menos de 2 minutos) debido a la rápida degradación por dipeptidil peptidasa-4. La exenatida es 50 % homóloga de GLP-1, pero tiene una semivida de 2,4 horas en seres humanos ya que el sitio de escisión de dipeptidil peprtidasa-4 está ausente.

La exenatida potencia la secreción de insulina dependiente de glucosa por las células beta pancreáticas, suprime la secreción inadecuadamente elevada de glucagón y ralentiza el vaciado gástrico. La exenatida es extremadamente potente, teniendo una concentración eficaz mínima de 50 pg/ml (12 pM) en seres humanos. Las terapias actuales con exenatida implican inyecciones dos veces al día (Byetta®). Además, se ha aprobado una formulación de liberación lenta (Bydureon®) para inyección una vez a la semana.

Como se usa en el presente documento, un análogo funcional de exenatida puede referirse a un compuesto que tiene una estructura similar, pero que difiere de ella con respecto a determinados aspectos (p. ej., puede diferir en uno o más átomos, grupos funcionales, restos de aminoácidos o subestructuras, que son reemplazados por otros). Los análogos funcionales presentan propiedades farmacológicas similares y pueden estar estructuralmente relacionados.

Un derivado funcional o análogo de exenatida es una forma de exenatida que se modifica para extender la semivida, por ejemplo, conjugados de exenatida.

Como se desvela en el presente documento, el derivado funcional o análogo de exenatida puede ser exenatida PEGilada. Por ejemplo, en una realización preferida, el derivado funcional o análogo es exenatida mono-PEGilada con PEG de 40 kDa. La exenatida PEGilada se puede preparar por métodos conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, se describen formas PEGiladas de exenatida en el documento WO 2013/059323 (Prolynx LLC). La exenatida también se puede conjugar con otras moléculas, p. ej., proteínas.

En una realización particularmente preferida, la exenatida es una forma de liberación prolongada, por ejemplo, que se comercializa con el nombre comercial Bydureon®. En otra realización preferida, la exenatida está en forma de nanopartículas multicapa para suministro sostenido, por ejemplo, como se describe en Kim JY *et al*., Biomaterials, noviembre de 2013; 34 (33): 8444-9.

En otra realización particularmente preferida, la exenatida está en forma inyectable, tal como la comercializada con el nombre comercial Byetta®.
Como se usa en el presente documento, un derivado funcional o análogo de exenatida puede referirse a agonistas del receptor de GLP. Los derivados funcionales o análogos adecuados de exenatida incluyen lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida y dulaglutida (LY2189265).

Un análogo funcional de exenatida significa exenatida modificada en donde uno o más restos de aminoácidos se han intercambiado por otro resto de aminoácido y/o en donde se han suprimido uno o más restos de aminoácidos y/o en donde se han añadido y/o insertado uno o más restos de aminoácidos.

El análogo de exenatida funcional puede comprender menos de 10 modificaciones de aminoácidos (sustituciones, supresiones, adiciones (incluyendo inserciones) y cualquier combinación de las mismas) en relación con exenatida, como alternativa menos de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 modificaciones en relación con exenatida.

Un análogo de exenatida funcional puede comprender 10 modificaciones de aminoácidos (sustituciones, supresiones, adiciones (incluyendo inserciones) y cualquier combinación de las mismas) en relación con exenatida, como alternativa

9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones en relación con exenatida.

Como se usa en el presente documento, los derivados funcionales de exenatida incluyen sales, isómeros, enantiómeros, solvatos, polimorfos, profármacos y metabolitos de la misma.

Agentes inmunosupresor

Las combinaciones desveladas en el presente documento pueden comprender además un agente inmunosupresor.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente inmunosupresor" se refiere a un agente capaz de suprimir parcial o totalmente la respuesta inmunitaria en un sujeto.

El agente inmunosupresor puede seleccionarse de un glucocorticoide, un agente citostático, una citocina (p. ej., interferones, interleucinas, quimiocinas), un anticuerpo inmunosupresor, un inhibidor de calcineurina y una proteína de unión a TNF.

El agente inmunosupresor puede seleccionarse de un antimetabolito, un inhibidor de calcineurina y una proteína de unión a TNF.

Los ejemplos de antimetabolitos incluyen metotrexato, azatioprina, mercaptopurina y fluorouracilo, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los ejemplos de inhibidores de calcineurina incluyen ciclosporina, ciclosporina G, *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina (también conocida como NIM811), tacrolimus y pimecrolimus, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los ejemplos de proteínas de unión a TNF incluyen infliximab, etanercept y adalimumab, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El agente inmunosupresor se puede seleccionar de metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, ciclosporina, ciclosporina G, *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina (también conocida como NIM811), tacrolimus, pimecrolimus, infliximab, etanercept y adalimumab, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El agente inmunosupresor puede ser un inhibidor de calcineurina. El inhibidor de calcineurina se puede seleccionar de ciclosporina, ciclosporina G, *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina (también conocida como NIM811), tacrolimus y pimecrolimus, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Preferentemente, el inhibidor de calcineurina es ciclosporina.

El inhibidor de calcineurina se puede seleccionar de ciclosporina, ciclosporina G y *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina (también conocida como NIM811) y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El inhibidor de calcineurina puede ser ciclosporina, o un derivado funcional o análogo, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La presente divulgación también abarca derivados funcionales y análogos de los agentes inmunosupresores anteriores, en particular los que se modifican para extender la semivida del agente, por ejemplo, conjugados del agente.

Ciclosporina

Como se usa en el presente documento, el término "ciclosporina" (también conocido como ciclosporina A) se refiere al péptido no ribosómico cíclico natural de *Tolypocladium inflatum* con el nombre sistemático (IUPAC) de: (3S,6S,9S,12R,15S,18S,21S,24S,30S,33S)-30-Etil-33-[(1R,2R,4E)-1-hidroxi-2-metil-4-hexeno-1-il]-6,9,18,24-tetraisobutil-3,21-diisopropil-1,4,7,10,12,15,19,25,28-nonametil-1,4,7,10,13,16,19,22,25,28,31-undecaazaciclotritriacontano-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-undecona.

La ciclosporina es un agente inmunosupresor que se usa ampliamente para prevenir el rechazo de órganos después de trasplantes alógenos. Para esta indicación, la dosis IV recomendada en esta indicación es inicialmente de 5 a 6 mg/kg/día. Sigue siendo una herramienta importante para controlar el trasplante de órganos a pesar de tener efectos perjudiciales sobre la estructura y función renal. También se ha mostrado que la ciclosporina es eficaz en el tratamiento de la psoriasis, dermatitis atópica, piodermia gangrenosa, urticaria autoinmunitaria crónica y artritis reumatoide. En estas indicaciones, la dosis inicial recomendada por vía oral es de 2,5 mg/kg/día dividida en dos administraciones diarias. Sin embargo, debido al alto grado de toxicidad asociada con el fármaco, la ciclosporina normalmente está indicada para casos graves de estas afecciones. Para los pacientes que han recibido trasplante, la ciclosporina se administra en general solo de manera intermitente o cíclica, con supervisión estrecha de la función renal.

Las combinaciones desveladas en el presente documento pueden comprender además un derivado funcional o

análogo de ciclosporina. El derivado funcional o análogo de ciclosporina es una forma de ciclosporina que se modifica para extender la semivida, por ejemplo, conjugados de ciclosporina.

Como se usa en el presente documento, los derivados funcionales de ciclosporina incluyen sales, isómeros, enantiómeros, solvatos, polimorfos, profármacos y metabolitos de la misma.

Como se usa en el presente documento, un análogo funcional de ciclosporina puede referirse a un compuesto que tiene una estructura similar, pero que difiere de ella con respecto a determinados aspectos (p. ej., puede diferir en uno o más átomos, grupos funcionales, restos de aminoácidos o subestructuras, que son reemplazados por otros). Los análogos funcionales presentan propiedades farmacológicas similares y pueden estar estructuralmente relacionados.

El derivado funcional o análogo de ciclosporina puede seleccionarse de ciclosporina G, *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina (también conocida como NIM811), tacrolimus y pimecrolimus, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En otra realización, el derivado funcional o análogo de ciclosporina se selecciona de ciclosporina G y *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina (también conocida como NIM811) y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

La ciclosporina G difiere de ciclosporina A en la posición del aminoácido 2, donde una L-norvalina reemplaza el ácido α-aminobutírico. (Véase, en general, Wenger, R.M. 1989, Synthesis of cyclosporine and analogues: structural and conformational requirements for immunosuppressive activity. Progress in Allergy, 38: 46-64).

Antagonista de aldosterona

La combinación de la invención comprende un antagonista de aldosterona, específicamente canrenoato de potasio.

La combinación, composiciones y usos de la invención comprenden un antagonista de aldosterona, específicamente canrenoato de potasio como elemento esencial.

El infarto agudo de miocardio y sus posteriores cambios hemodinámicos conducen a activación neurohormonal compleja. La ruta de renina-angiotensina-aldosterona es una piedra angular de dicha activación neurohormonal. Se ha informado de que la aldosterona, que está en sus niveles más altos en el momento de presentación después de infarto agudo de miocardio, promueve un amplio espectro de efectos cardiovasculares perjudiciales, incluyendo disfunción endotelial aguda, inhibición de la actividad de NO, aumento del estrés oxidativo endotelial, aumento del tono vascular, inhibición de la recuperación de catecolaminas por tejidos, aparición rápida de necrosis de células vasculares de músculo liso y miocitos cardíacos, deposición de colágeno en vasos sanguíneos, hipertrofia de miocardio y fibrosis (Struthers, Am Heart J, 2002, 144: S2-S7; Zannad y Radauceanu, Heart Fail Rev, 2005, 10: 71-78). Asimismo, se ha descubierto que predice malos resultados (Beygui *et al*., Circulation, 2006, 114: 2604-2610).

Un antagonista de aldosterona o un antimineralocorticoide, es un fármaco diurético que antagoniza la acción de la aldosterona en receptores de mineralocorticoides. Este grupo de fármacos se usa con frecuencia para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica. Los miembros de esta clase también se usan en el tratamiento del hiperaldosteronismo (incluyendo síndrome de Conn) y el hirsutismo femenino (debido a acciones antiandrógenas adicionales). La mayoría de los antimineralocorticoides son espirolactonas esteroideas.

El antagonismo de los receptores de mineralocorticoides inhibe la reabsorción de sodio en el túbulo colector de la nefrona en los riñones. Esto interfiere con el intercambio de sodio/potasio, reduciendo la excreción urinaria de potasio y aumentando débilmente la excreción de agua (diuresis). En la insuficiencia cardíaca congestiva, se usan antagonistas de aldosterona además de otros fármacos para el efecto diurético aditivo, que reduce el edema y la carga de trabajo cardíaca.

Las pautas actuales recomiendan el uso de antagonistas de los receptores de mineralocorticoides, en pacientes con insuficiencia cardíaca posterior a infarto de miocardio, en función de los resultados del ensayo EPHESUS.

Varios estudios en modelos animales de infarto agudo de miocardio y en la clínica han mostrado el beneficio del bloqueo de la aldosterona en la prevención de la lesión por reperfusión y en la mejora de la función cardíaca en pacientes con IMEST.

Los ejemplos de antagonistas de aldosterona incluyen espironolactona (el primer miembro de esta clase y el más usado), eplerenona (mucho más selectiva que la espironolactona en la diana, pero algo menos potente y eficaz), canrenona y canrenoato de potasio, finerenona (no esteroidea y más potente y selectiva que la eplerenona o la espironolactona) y prorenona.

Algunos fármacos también tienen efectos antimineralocorticoides secundarios a su principal mecanismo de acción. Los ejemplos incluyen progesterona, drospirenona, gestodeno y benidipino.

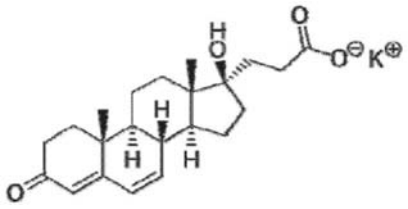
Esta divulgación también abarca derivados funcionales y análogos de los antagonistas de aldosterona, en particular

los que se modifican para extender la semivida del agente, por ejemplo, conjugados de antagonistas de aldosterona.

Canrenoato de potasio

El canrenoato de potasio o canrenoato potásico también conocido como la sal de potasio del ácido canrenoico, es un antagonista de aldosterona del grupo de la espirolactona. Como la espironolactona, es un profármaco, que se metaboliza a canrenona en el cuerpo. El canrenoato de potasio normalmente se administra por vía intravenosa a dosis que oscilan entre 200 mg/día y 600 mg/día para el tratamiento del hiperaldosteronismo o la hipocaliemia.

El canrenoato de potasio tiene el nombre sistemático (IUPAC) 3-[(8R,9S,10R,13S,14S,17R)-17-hidroxi-10,13-dimetil-3-oxo-2,8,9,11,12,14,15,16 octahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]propanoato de potasio, fórmula $C_{22}H_{29}KO_4$ y la siguiente estructura química:



Esta divulgación también abarca derivados funcionales y análogos de canrenoato de potasio, en particular los que se modifican para extender la semivida del agente, por ejemplo, conjugados de canrenoato de potasio.

Combinación

Un primer aspecto se refiere a una combinación que comprende un modulador de insulina, en donde el modulador de insulina es exenatida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un antagonista de aldosterona, en donde el antagonista de aldosterona es canrenoato de potasio.

Se aplican las realizaciones preferidas que se describen a continuación, haciendo los cambios necesarios, a otros aspectos de la invención, incluyendo usos, productos y composiciones.

Se desvelan en el presente documento combinaciones que comprenden al menos dos de los siguientes componentes: (i) al menos una de exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida y dulaglutida (LY2189265), o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, (ii) al menos uno de ciclosporina A, ciclosporina G, *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina, tacrolimus y pimecrolimus, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y (iii) al menos uno de canrenoato de potasio, canrenona, espironolactona, eplerenona, finerenona y prorenona, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde corresponda (p. ej., sales farmacéuticamente aceptables de canrenona, espironolactona, eplerenona, finerenona y prorenona).

Se desvelan en el presente documento combinaciones que comprenden (i) al menos una de exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida y dulaglutida (LY2189265), o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, y (iii) al menos uno de canrenoato de potasio, canrenona, espironolactona, eplerenona, finerenona y prorenona, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde corresponda.

Se desvelan en el presente documento combinaciones que comprenden al menos dos de los siguientes componentes: (i) al menos una de exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida y dulaglutida (LY2189265), o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, (ii) al menos una de ciclosporina A, ciclosporina G y *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas y (iii) al menos uno de canrenoato de potasio, canrenona, espironolactona, eplerenona, finerenona y prorenona, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde corresponda.

Se desvelan en el presente documento combinaciones de (i) exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) al menos uno de ciclosporina A, ciclosporina G, *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina, tacrolimus y pimecrolimus, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Se desvelan en el presente documento combinaciones de (i) exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) al menos una de ciclosporina A, ciclosporina G y *N*-metil-4-isoleucina ciclosporina, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

Se desvelan en el presente documento combinaciones de (i) al menos una de exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida y dulaglutida (LY2189265), o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, y (ii) ciclosporina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Se desvelan en el presente documento combinaciones de (i) exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, (ii) ciclosporina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (iii) canrenoato de potasio.

En una realización, las combinaciones de los agentes activos de la presente invención producen un efecto mejorado en comparación con cada fármaco administrado por sí solo.

Asimismo, en otra realización, las combinaciones de los agentes activos de la presente invención producen efectos sinérgicos inesperados, por ejemplo, en el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión, en particular lesión por reperfusión miocárdica.

Una combinación de dos o más fármacos puede conducir a diferentes tipos de interacción farmacológica. Se dice que una interacción farmacológica es aditiva cuando el efecto combinado de dos fármacos es igual a la suma del efecto de cada agente administrado por sí solo. Se dice que una interacción farmacológica es sinérgica si el efecto combinado de los dos fármacos supera los efectos de cada fármaco administrado por sí solo (Goodman and Gilmans' "The Pharmacological Basis of Therapeutics", 12ª edición).

La terapia combinada es una modalidad de tratamiento importante en muchos entornos de enfermedad, incluyendo enfermedad cardiovascular, cáncer y enfermedades infecciosas. Los avances científicos recientes han aumentado la comprensión de los procesos fisiopatológicos que subyacen en estas y otras enfermedades complejas. Esta mayor comprensión ha dado un mayor impulso al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos usando combinaciones de fármacos dirigidos a múltiples dianas terapéuticas para mejorar la respuesta al tratamiento, minimizar el desarrollo de resistencia o minimizar los acontecimientos adversos. En entornos en los que la terapia combinada proporciona ventajas terapéuticas significativas, existe cada vez mayor interés en el desarrollo de nuevas combinaciones de dos o más fármacos.

Provechosamente, una combinación sinérgica puede permitir la presencia de dosis menores de cada componente, disminuyendo de este modo la toxicidad de la terapia, produciendo y/o manteniendo al mismo tiempo el mismo efecto terapéutico o un efecto terapéutico mejorado. Por tanto, en una realización particularmente preferida, cada componente está presente en una cantidad subterapéutica.

La expresión "cantidad subterapéuticamente eficaz" significa una cantidad que es menor que la necesaria normalmente para producir un efecto terapéutico con respecto al tratamiento con cada agente por sí solo.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación sinérgica que comprende (i) un modulador de insulina, específicamente exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (ii) un antagonista de aldosterona, específicamente canrenoato de potasio.

En una realización, el modulador de insulina se define según cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente de un modulador de insulina.

En una realización, el antagonista de aldosterona se define según cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente de un antagonista de aldosterona.

Se desvelan en el presente documento combinaciones sinérgicas de (i) al menos una de exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida y dulaglutida (LY2189265), o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, y (iii) al menos uno de canrenoato de potasio, canrenona, espironolactona, eplerenona, finerenona y prorenona, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, donde corresponda.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación sinérgica de (i) exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) canrenoato de potasio.

Se desvelan en el presente documento combinaciones sinérgicas de (i) al menos una de exenatida, lixisenatida, albiglutida, liraglutida, taspoglutida y dulaglutida (LY2189265), o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas, y (iii) canrenoato de potasio.

Ingredientes farmacéuticos activos adicionales

En un ejemplo, las combinaciones descritas anteriormente comprenden al menos un ingrediente farmacéutico activo (IFA) adicional.

En una realización, las combinaciones descritas anteriormente pueden comprender además al menos un IFA adicional seleccionado de un betabloqueante, un inhibidor de renina-angiotensina, una estatina (inhibidor de la HMG-CoA reductasa), un inhibidor de la activación o agregación plaquetaria, un inhibidor de la fosfodiesterasa-3, un sensibilizador de calcio, un antioxidante y un agente antiinflamatorio.

Los ejemplos de betabloqueantes incluyen propranolol, metoprolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol,

oxprenolol, penbutolol, pindolol, sotalol y timolol. Los inhibidores de la renina-angiotensina incluyen inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, inhibidores del receptor de la angiotensina AT_1 e inhibidores de la renina.

Los ejemplos de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina incluyen captoprilo, zofenoprilo, enalaprilo, ramiprilo, quinaprilo, perindoprilo, lisinoprilo, benazepril, imidaprilo, trandolaprilo, cilazaprilo y fosinoprilo.

Los ejemplos de antagonistas del receptor de angiotensina AT_1 incluyen losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán, valsartán, fimasartán y telmisartán.
Los ejemplos de inhibidores de renina incluyen remikireno y aliskireno.

Los ejemplos de sensibilizadores de calcio incluyen levosimendán y análogos del mismo.

Los ejemplos de estatinas incluyen atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina.

Los ejemplos de activación plaquetaria o inhibidores de la agregación incluyen prostaciclina (epoprostenol) y análogos y derivados del mismo (p. ej., treprostinilo, iloprost), inhibidores irreversibles de la ciclooxigenasa (p. ej., aspirina, triflusal), inhibidores del receptor de adenosina difosfato (ADP) (p. ej., clopidogrel), prasugrel, ticagrelor, ticlopidina), inhibidores de la fosfodiesterasa (p. ej., cilostazol), antagonistas del receptor 1 activado por proteasa (PAR-1) (p. ej., vorapaxar), inhibidores de la glucoproteína IIB/IIIA (p. ej., abciximab, eptifibatida, tirofibán), inhibidores de la recaptación de adenosina (p. ej., dipiridamol) e inhibidores del tromboxano, incluyendo inhibidores de la tromboxano sintasa y antagonistas de los receptores de tromboxano (p. ej., terutrobán).

Los ejemplos de inhibidores de la fosfodiesterasa-3 (PDE-3) incluyen amrinona, milrinona y análogos de las mismas.

Los ejemplos de antioxidantes incluyen ácido ascórbico, ácido lipoico, glutatión y melatonina.

Los ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen inhibidores de COX-2 (p. ej., celecoxib), glucocorticoides (p. ej., hidrocortisona) y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (p. ej., ibuprofeno).

En una realización, las combinaciones anteriores comprenden al menos un IFA adicional seleccionado de propranolol, metoprolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, sotalol, timolol, captoprilo, zofenoprilo, enalaprilo, ramiprilo, quinaprilo, perindoprilo, lisinoprilo, benazepril, imidaprilo, trandolaprilo, cilazaprilo, fosinoprilo, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán, valsartán, fimasartán, telmisartán, remikireno y aliskireno.

En otra realización, las combinaciones anteriores comprenden al menos un IFA adicional seleccionado de carvedilol, metoprolol, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán, valsartán, fimasartán, telmisartán, captoprilo, zofenoprilo, enalaprilo, ramiprilo, quinaprilo, perindoprilo, lisinoprilo, benazepril, imidaprilo, trandolaprilo, cilazaprilo, fosinoprilo, remikireno y aliskireno.

En otra realización, las combinaciones anteriores comprenden al menos un IFA adicional seleccionado de carvedilol y metoprolol.

Sales farmacéuticamente aceptables

Los agentes farmacéuticos activos de la presente invención pueden estar presentes como sales farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes de la invención incluyen sales de adición de ácidos o bases adecuadas de los mismos. Se puede encontrar una revisión de sales farmacéuticas adecuadas en Berge *et al*., J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Se forman sales, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes tales como ácidos minerales, p ej., ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácidos hidrohálicos; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que están sin sustituir o sustituidos (p. ej., por halógeno), tales como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo, oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo, ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos (C1-C4)-alquil- o aril-sulfónicos que no están sustituidos o están sustituidos (por ejemplo, por un halógeno) tales como ácido metano o p-toluenosulfónico.

Enantiómeros/tautómeros

La invención también incluye, cuando sea adecuado, todos los enantiómeros y tautómeros de los agentes farmacéuticos activos. El experto en la materia reconocerá compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros y/o tautómeros correspondientes pueden aislarse/prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

Estereoisómeros e isómeros geométricos

Algunos de los agentes farmacéuticos activos de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, p. ej., pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos y, por lo tanto, pueden existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de esos agentes inhibidores, y mezclas de los mismos. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas conserven la actividad funcional adecuada (aunque no necesariamente en el mismo grado).

La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas de los agentes farmacéuticos activos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se define como una en la que al menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la masa atómica que se encuentra habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse al agente y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro tales como 2H, 3H, 13C, 14C, 15N, 17O, 18O, 31P, 32P, 35S, 18F y 36Cl, respectivamente. Determinadas variaciones isotópicas del agente y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, por ejemplo, en las que se incorpora un isótopo radiactivo tal como 3H o 14C, son útiles en estudios de distribución en tejidos de fármacos y/o sustratos. Se prefieren en particular isótopos tritiados, es decir, 3H y carbono-14, es decir, 14C, por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, es decir, 2H, puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que dan lugar a mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o menores requisitos de dosificación y, por lo tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias. Pueden prepararse variaciones isotópicas del agente de la presente invención y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas de la presente invención en general mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados.

Solvatos

La presente invención también incluye formas de solvato de los agentes farmacéuticos activos de la presente invención. Los términos usados en las reivindicaciones abarcan estas formas.

Polimorfos

La invención se refiere asimismo a agentes farmacéuticos activos de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas hidratadas o anhidras. Está bien establecido dentro de la industria farmacéutica que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de dichas formas variando ligeramente el método de purificación y/o aislamiento de los disolventes usados en la preparación sintética de dichos compuestos.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación que comprende: (i) un modulador de insulina, específicamente exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, (ii) un antagonista de aldosterona, específicamente canrenoato de potasio; y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Aunque los compuestos de la presente invención (incluyendo sus sales farmacéuticamente aceptables) pueden administrarse solos, en general se administrarán en mezcla con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico, en particular para terapia humana. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso en seres humanos o animales en medicina humana y veterinaria, respectivamente.

Pueden encontrarse ejemplos de dichos excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª Edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

Se conocen bien en la técnica farmacéutica vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral (p. ej., intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea), oral, por inhalación, transdérmica (tópica), intraocular, iontoforética y transmucosa.

En una realización, la composición farmacéutica es para administración parenteral (p. ej., intravenosa, intraarterial, intratecal, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea). Preferentemente, las composiciones se preparan a partir de soluciones estériles o esterilizables.

En otra realización, la composición farmacéutica es para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea.
En otra realización, la composición farmacéutica es para administración intravenosa.

Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles (en los casos donde sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, una composición para administración parenteral debe ser estéril y debería ser fluida en la medida en que exista fácil inyectabilidad. Debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los compuestos activos en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos habituales de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, lo que puede producir un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución esterilizada por filtración de los mismos. La invención también abarca formulaciones liposómicas y en nanoparticulas que comprenden los agentes activos. Una persona experta habitual en la materia estará familiarizada con dichas formulaciones, junto con métodos para su preparación.

Productos farmacéuticos

Se desvela en el presente documento un producto farmacéutico que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona.

La presente invención se refiere a un producto farmacéutico que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (iii) canrenoato de potasio.

En una realización, el producto farmacéutico es un equipo de herramientas que contiene todo el material necesario (p. ej., viales de fármaco, viales de diluyente, jeringas y agujas) para un ciclo de tratamiento.

En una realización, el equipo comprende recipientes separados para cada agente activo. Dichos recipientes pueden ser ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis.

En otra realización, el equipo comprende un recipiente que comprende una preparación combinada de cada agente activo.

El equipo puede comprender además instrucciones para el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión.

Usos médicos

Se desvela en el presente documento una combinación que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos.

Se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una combinación que comprende: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro

cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos.

Se desvela en el presente documento un producto farmacéutico que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos, en donde los componentes son para administración simultánea, secuencial o por separado.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto farmacéutico que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos, en donde los componentes son para administración simultánea, secuencial o por separado.

Se desvela en el presente documento el uso de al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina y (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno o para el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos.

Se desvela en el presente documento el uso de al menos dos de los siguientes componentes: (i) exenatida, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) ciclosporina, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma y (iii) canrenoato de potasio, o un derivado funcional o análogo del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos.

Se desvela en el presente documento una combinación que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para su uso en el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión.

Se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una combinación que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para su uso en el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión.

Se desvela en el presente documento un producto farmacéutico que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para su uso en el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión, en donde los componentes son para administración simultánea, secuencial o por separado.

En otra realización, la presente invención se refiere a un producto farmacéutico que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión, en donde los componentes son para administración simultánea, secuencial o por separado.

Se desvela en el presente documento el uso de al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión.

Se desvela en el presente documento el uso de al menos dos de los siguientes componentes: (i) exenatida, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) ciclosporina, o un derivado funcional

o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (iii) canrenoato de potasio, o un derivado funcional o análogo del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de lesión por reperfusión.

Se desvela en el presente documento una combinación que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para su uso en el tratamiento y/o la prevención de isquemia.

En una realización, la presente invención se refiere a una combinación que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de isquemia.

Se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una combinación que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para su uso en el tratamiento y/o la prevención de isquemia.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de isquemia.

Se desvela en el presente documento un producto farmacéutico que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para su uso en el tratamiento y/o la prevención de isquemia, en donde los componentes son para administración simultánea, secuencial o por separado.

En otra realización, la presente invención se refiere a un producto farmacéutico que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de isquemia, en donde los componentes son para administración simultánea, secuencial o por separado.

Se desvela en el presente documento el uso de al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de isquemia.

Se desvela en el presente documento el uso de al menos dos de los siguientes componentes: (i) exenatida, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) ciclosporina, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (iii) canrenoato de potasio, o un derivado funcional o análogo del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de isquemia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "lesión por reperfusión" se refiere al daño al tejido provocado cuando el aporte sanguíneo regresa al tejido después de un periodo de isquemia. La ausencia de oxígeno y nutrientes de la sangre crea una condición en la que la restauración de la circulación da lugar a inflamación, disfunción mitocondrial y daño oxidativo a través de la inducción de estrés oxidativo en lugar de la restauración de la función normal. Puede producirse lesión por reperfusión después de un acontecimiento espontáneo, p. ej., bloqueo arterial, o un acontecimiento planificado, p. ej., cualquiera de varias intervenciones quirúrgicas. Puede producirse lesión por reperfusión miocárdica, por ejemplo, después de infarto de miocardio o como resultado de trasplante de corazón.

En una realización, la lesión por isquemia y/o reperfusión puede ser lesión por isquemia y/o reperfusión del cerebro, corazón, pulmón, riñón u otro órgano/tejido susceptible a lesión por isquemia y/o reperfusión.

En una realización, la lesión por isquemia y/o reperfusión es lesión por isquemia y/o reperfusión del corazón, preferentemente lesión por isquemia miocárdica y/o reperfusión miocárdica.
El modulador de insulina, el agente inmunosupresor y el antagonista de aldosterona pueden ser para administración simultánea, secuencial o por separado (como parte de un régimen de dosificación).

La exenatida, o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, ciclosporina, o derivados funcionales o análogos o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, y canrenoato de potasio, pueden ser para administración simultánea, secuencial o por separado (como parte de un régimen de dosificación).

Como se usa en el presente documento, se usa "simultáneamente" para indicar que los dos agentes se administran de manera concurrente.

Como se usa en el presente documento, se usa "secuencialmente" para indicar que los agentes activos no se administran de manera concurrente, sino uno detrás del otro. Por tanto, la administración "secuencial" puede permitir que se administre un agente en un intervalo de 5 minutos, 10 minutos o en cuestión de horas después del otro, siempre que la semivida circulatoria del primer agente administrado sea tal que ambos estén presentes simultáneamente en cantidades terapéuticamente eficaces. El retardo temporal entre administraciones de los componentes variará dependiendo de la naturaleza exacta de los componentes, la interacción entre ellos y sus respectivas semividas.

En contraste con "secuencialmente", "por separado" se usa en el presente documento para indicar que la distancia entre la administración de un agente y el otro es significativa, es decir, el primer agente administrado puede no estar ya presente en el torrente sanguíneo en una cantidad terapéuticamente eficaz cuando se administra el segundo agente.

En una realización, los componentes de la combinación son para administración simultánea.

Métodos de tratamiento

Se desvela en el presente documento un método para tratar y/o prevenir la lesión por isquemia y/o reperfusión, comprendiendo dicho método la administración simultánea, secuencial o por separado a un sujeto de al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona.

Se desvela en el presente documento un método para tratar y/o prevenir la lesión por isquemia y/o reperfusión, comprendiendo dicho método la administración simultánea, secuencial o por separado a un sujeto que lo necesite de al menos dos de los siguientes componentes: (i) exenatida, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma;
(ii) ciclosporina, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (iii) canrenoato de potasio, o un derivado funcional o análogo del mismo.

Se desvela en el presente documento un método para tratar y/o prevenir la lesión por reperfusión, comprendiendo dicho método la administración simultánea, secuencial o por separado a un sujeto que lo necesite de al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona.

Se desvela en el presente documento un método para tratar y/o prevenir la lesión por reperfusión, comprendiendo dicho método la administración simultánea, secuencial o por separado a un sujeto que lo necesite de al menos dos de los siguientes componentes: (i) exenatida, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) ciclosporina, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (iii) canrenoato de potasio, o un derivado funcional o análogo del mismo.

Se desvela en el presente documento un método para tratar y/o prevenir la isquemia, comprendiendo dicho método la administración simultánea, secuencial o por separado a un sujeto que lo necesite de al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona.

Se desvela en el presente documento un método para tratar y/o prevenir la isquemia, comprendiendo dicho método la administración simultánea, secuencial o por separado a un sujeto que lo necesite de al menos dos de los siguientes componentes: (i) exenatida, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) ciclosporina, o un derivado funcional o análogo, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (iii) canrenoato de potasio, o un derivado funcional o análogo del mismo.

Como se desvela en el presente documento, el método puede referirse a tratar y/o prevenir la lesión por isquemia y/o reperfusión del cerebro, corazón, pulmón, riñón u otro órgano/tejido susceptible a lesión por isquemia y/o reperfusión.

Como se desvela en el presente documento, el método puede referirse a tratar y/o prevenir la lesión por reperfusión del cerebro, corazón, pulmón, riñón u otro órgano/tejido susceptible a la lesión por reperfusión.

Como se desvela en el presente documento, el método puede referirse a tratar y/o prevenir la isquemia del cerebro, corazón, pulmón, riñón u otro órgano/tejido susceptible a isquemia.

Como se desvela en el presente documento, el método puede referirse a tratar y/o prevenir la lesión por isquemia y/o reperfusión del corazón, preferentemente lesión por isquemia miocárdica y/o reperfusión miocárdica.

Como se desvela en el presente documento, el método puede referirse a tratar y/o prevenir la lesión por reperfusión del corazón, preferentemente lesión por reperfusión miocárdica.

Como se desvela en el presente documento, el método puede referirse a tratar y/o prevenir el infarto agudo de miocardio. El infarto agudo de miocardio es una de las indicaciones clínicas más comunes de lesión por reperfusión.

Como se desvela en el presente documento, el método puede referirse a tratar y/o prevenir la asfixia neonatal.

La asfixia neonatal (o asfixia perinatal) es la afección médica resultante de la privación de oxígeno a un recién nacido que dura lo suficiente durante el proceso del nacimiento para provocar daño físico, habitualmente al cerebro. La causa más habitual de asfixia neonatal es una disminución de la presión arterial materna u otra interferencia en el flujo

sanguíneo al cerebro del bebé durante el parto, por ejemplo, debido a circulación o perfusión inadecuada, esfuerzo respiratorio deteriorado o ventilación inadecuada.

La asfixia neonatal puede provocar daño hipóxico a la mayoría de los órganos del bebé (corazón, pulmones, hígado, intestino, riñones), pero el daño cerebral es lo más preocupante y quizás lo que tenga menos probabilidad de curarse rápida o completamente. En casos más acusados, un bebé sobrevivirá, pero con daño al cerebro manifestado como mental, tal como retraso del desarrollo neurológico o discapacidad intelectual, o física, tal como espasticidad. Un bebé que padece asfixia perinatal grave tiene habitualmente mal color (cianosis), perfusión, sensibilidad, tono muscular y esfuerzo respiratorio. Grados extremos de asfixia pueden provocar paro cardíaco y muerte. Se produce asfixia neonatal en 2 a 10 por cada 1000 recién nacidos que nacen a término y en más casos para los que nacen prematuros. La OMS estima que se producen 4 millones de muertes neonatales anualmente debido a asfixia al nacer, lo que representa 38 % de las muertes de niños menores de 5 años.

Como se desvela en el presente documento, el método puede referirse a tratar y/o prevenir la isquemia del corazón, preferentemente isquemia miocárdica.

Como se desvela en el presente documento, el sujeto puede ser un mamífero, más preferentemente, un ser humano.

Como se desvela en el presente documento, el método puede comprender administrar los componentes por vía parenteral (p. ej., intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea) al sujeto.

Como se desvela en el presente documento, el método puede comprender administrar los componentes por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea al sujeto.
Como se desvela en el presente documento, el método puede comprender administrar los componentes por vía intravenosa al sujeto.

Cada componente puede administrarse por una vía igual o diferente a los otros componentes. Preferentemente, los componentes se administran por la misma vía.

En una realización, las combinaciones reivindicadas son para su uso en un sujeto donante y/o sujeto receptor antes y/o después del trasplante de corazón. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la combinación puede administrarse a un primer sujeto del que se extraerá el corazón para trasplantarlo a un segundo sujeto. Adicionalmente, o como alternativa, en algunas realizaciones, la combinación se administra al corazón extraído, antes de su introducción en el segundo sujeto. Adicionalmente, o como alternativa, en algunas realizaciones, la terapia combinada se administra al segundo sujeto antes del trasplante de corazón.

En una realización, las combinaciones reivindicadas son para su uso en el tratamiento de un sujeto con choque cardiógeno. El choque cardiógeno es una afección médica potencialmente mortal que resulta de una circulación sanguínea inadecuada debido a insuficiencia primaria de los ventrículos del corazón para actuar eficazmente. La afección se produce en 2-10 % de los pacientes hospitalizados debido a infarto de miocardio y es la principal causa de muerte entre estos pacientes (Holmes *et al*., 1995, J Am Coll Cardiol, 26: 668-674). De manera más específica, el choque cardiógeno es el resultado de un proceso complejo con insuficiencia de suministro de oxígeno, deficiencia generalizada de ATP y disfunción multiorgánica iniciada por insuficiencia de bombeo cardíaco (Okuda, 2006, Shock, 25: 557-570). Ya que este es un tipo de choque circulatorio, la perfusión de tejido es insuficiente para satisfacer las demandas de oxígeno y nutrientes. La afección implica muerte celular cada vez más extendida por falta de oxígeno (hipoxia) y falta de nutrientes (p. ej., bajo nivel de azúcar en sangre). Debido a esto, puede conducir a un paro cardíaco (o paro circulatorio), que es una interrupción abrupta de la función de bombeo cardíaco (así como interrupción de la respiración y pérdida de consciencia). El choque cardiógeno se define por presión arterial baja sostenida con hipoperfusión tisular a pesar de la presión de llenado ventricular izquierdo adecuada. Los signos de hipoperfusión tisular incluyen baja producción de orina (<30 ml/hora), extremidades frías y alteración del nivel de consciencia. Varios ensayos grandes han demostrado que la revascularización coronaria es la estrategia más importante para mejorar la supervivencia del paciente (Hochman *et al*., 1999, N Engl J Med, 341: 625-634). Sin embargo, los pacientes que desarrollan choque cardiógeno a pesar de la revascularización aguda tienen un pronóstico desfavorable, probablemente debido a lesión por reperfusión, y se considera que está asociado con el tamaño del infarto resultante. De hecho, se ha mostrado que la hipotermia ofrece protección tisular en isquemia miocárdica y los estudios preclínicos han mostrado resultados beneficiosos en la reducción del tamaño del infarto en el infarto de miocardio inducido experimentalmente (Dae *et al*., 2002, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 282: H1584-H1591). En consecuencia, en un modelo porcino, la hipotermia terapéutica leve redujo la mortalidad aguda por choque cardiógeno y mejoró los parámetros hemodinámicos (Gotberg *et al*., 2010, Resuscitation, 81: 1190-1196).

En una realización, las combinaciones reivindicadas son para su uso en el tratamiento de un sujeto con paro cardíaco. El paro cardíaco es una interrupción repentina del flujo sanguíneo efectivo debido a que el corazón no se contrae de manera eficaz. La causa más habitual de paro cardíaco es enfermedad de las arterias coronarias. El tratamiento para el paro cardíaco es la reanimación cardiopulmonar (RCP) inmediata y, si está presente un ritmo desfibrilable, desfibrilación. En los Estados Unidos, se produce paro cardíaco fuera del hospital en aproximadamente 13 de cada 10.000 personas al año (326.000 casos). Se produce paro cardíaco en el hospital en otros 209.000 (Kronic *et al*.,

Circulation, 2015, 132: S397-S413). Además de proporcionar reanimación cardiopulmonar de alta calidad, es de vital importancia optimizar el tratamiento para el síndrome post paro cardíaco para mejorar el resultado a largo plazo para los pacientes con paro cardíaco. Dentro de este síndrome ("síndrome post paro cardíaco") existen 3 áreas principales de énfasis: (1) lesión cerebral post paro cardíaco; (2) disfunción miocárdica post paro cardíaco y lesión por reperfusión; y (3) respuesta de isquemia-reperfusión sistémica. Ahora está claro que la atención posterior a la reanimación puede afectar a la supervivencia a largo plazo y la recuperación y función miocárdica y neurológica de los supervivientes (Kern, 2015, Circ J, 79: 1156-1163). La inhibición de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) durante isquemia-reperfusión puede aliviar las lesiones en el corazón y otros órganos sistémicos. De hecho, se ha mostrado en un modelo animal de paro cardíaco que la disfunción miocárdica y la supervivencia post paro cardíaco pueden mejorarse mediante tratamiento con ciclosporina (Huang *et al*., 2011, Resuscitation, 82S: S41-S47).

En una realización, las combinaciones reivindicadas son para su uso en el tratamiento de un sujeto con ictus isquémico. El ictus es la situación en que un flujo sanguíneo escaso al cerebro da lugar a muerte celular. Existen dos tipos principales de ictus: isquémico, debido a la falta de flujo sanguíneo, y hemorrágico, debido al sangrado. Dan lugar a que parte del cerebro no funcione correctamente. Los signos y síntomas de un ictus pueden incluir la incapacidad de movimiento o sensación en un lado del cuerpo, problemas para entender o hablar, sensación de que el mundo está girando o pérdida de visión en un lado, entre otros. Un ictus isquémico está provocado habitualmente por el bloqueo de un vaso sanguíneo. El tratamiento del ictus isquémico incluye cirugía para abrir (reperfusión) las arterias al cerebro en las que tengan estrechamiento problemático. Un ictus isquémico, si se detecta en las primeras tres a cuatro horas y media, puede tratarse con un medicamento que pueda descomponer el coágulo. En 2013, el ictus fue la segunda causa más frecuente de muerte después de la enfermedad de las arterias coronarias, representando 6,4 millones de muertes (12 % del total).

El ictus isquémico y el infarto agudo de miocardio requieren reperfusión urgente para mejorar el resultado funcional (Patel y Saver, 2013, Stroke, 44: 94-98). El activador de plasminógeno de tipo tisular intravenoso ha sido durante mucho tiempo la única terapia de reperfusión con beneficio clínico demostrado en pacientes con ictus isquémico agudo. Como sucede en el infarto agudo de miocardio, los métodos endovasculares que restauran la reperfusión en ictus isquémico agudo pueden exponer a los pacientes a aumento de la lesión isquémica/por reperfusión, obstaculizando de este modo el beneficio de la recanalización al promover la transformación hemorrágica y el edema vasogénico grave, ambos considerados marcadores de lesión por reperfusión (Bai y Lyden, 2015, Int J Stroke, 10: 143-152). Las pruebas experimentales indican que la lesión por reperfusión isquémica cerebral (como sucede en lesión por reperfusión miocárdica) puede ser atenuada por pre y post acondicionamiento isquémico. Además, las pruebas experimentales sugieren que el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) desempeña un papel crítico en la lesión por reperfusión isquémica tanto miocárdica como cerebral (Schinzel *et al*., 2005, Proc Natl Acad Sci USA, 102: 12005-12010) y la ciclosporina A, (un inhibidor de la apertura de PTPM) puede prevenir la lesión por reperfusión isquémica cerebral en modelos animales (Leger *et al*., 2011, Exp Neurol, 230: 58-66; Borlongan *et al*., 2005, Life Sci, 76: 1503-1512).

En una realización, el sujeto está en riesgo de (o es susceptible a) lesión por oclusión vascular o lesión por isquemia-reperfusión cardíaca.

En una realización, las combinaciones reivindicadas son para proporcionar cardioprotección en un sujeto contra los efectos cardiotóxicos de los fármacos (p. ej., antraciclinas). Se describen ejemplos de fármacos cardiotóxicos en Bovelli *et al*. (Annals of Oncology 21 (suplemento 5): v277-v282, 2010).

Como se usa en el presente documento, el término "cardioprotección" se refiere a proteger el corazón, por ejemplo, previniendo, reduciendo o retrasando la lesión miocárdica. Los fármacos cardiotóxicos incluyen fármacos asociados con insuficiencia cardíaca, fármacos asociados con isquemia o tromboembolia, fármacos asociados con hipertensión, fármacos asociados con otros efectos tóxicos tales como taponamiento y fibrosis endomiocárdica, miocarditis hemorrágica, bradiarritmias, fenómeno de Raynaud, neuropatía autónoma, prolongación de QT o *torsades de pointes*, o fibrosis pulmonar. Los ejemplos de fármacos cardiotóxicos incluyen antraciclinas/antraquinolonas, ciclofosfamida, trastuzumab y otros inhibidores de tirosina cinasa basados en anticuerpos monoclonales, antimetabolitos (fluorouracilo, capecitabina), agentes antimicrotúbulos (paclitaxel, docetaxel), cisplatino, talidomida, bevacizumab, sunitinib, sorafenib, busulfano, paclitaxel, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido de arsénico, bleomicina, metotrexato.

En una realización, los componentes para su uso se administran simultáneamente.
En una realización, la (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio se administra simultáneamente.

En una realización, los componentes para su uso se administran secuencialmente o por separado.

Para una combinación de tres componentes para su uso, los tres componentes pueden administrarse simultáneamente o dos componentes cualesquiera pueden administrarse simultáneamente, administrándose el tercer componente por separado o secuencialmente. Como alternativa, los tres componentes pueden administrarse en cualquier orden por separado o secuencialmente.

En una realización, (i) se administra antes de administrar secuencialmente o por separado (ii).

En otra realización, (ii) se administra antes de administrar secuencialmente o por separado (i).

En una realización, la (i) exenatida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio para su uso, se administran secuencialmente o por separado.

En una realización, los componentes para su uso se administran cada uno en una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a los componentes individuales.

En una realización, la (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio para su uso, se administran cada uno en una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a los componentes individuales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, p. ej., una cantidad que da lugar a la prevención, o una disminución, de lesión por isquemia y/o reperfusión o uno o más síntomas asociados con lesión por isquemia y/o reperfusión.

En el contexto de aplicaciones terapéuticas o profilácticas, la cantidad de una composición administrada al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como la salud general, la edad, el sexo, el cuerpo, el peso y la tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado de gravedad y el tipo de enfermedad. El experto en la materia podrá determinar dosis adecuadas dependiendo de estos y otros factores. La composición también se puede administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

En una realización, los componentes para su uso se administran cada uno en una cantidad subterapéuticamente eficaz con respecto a los componentes individuales.

En una realización, la (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio para su uso, se administran cada uno en una cantidad subterapéuticamente eficaz con respecto a los componentes individuales.

En una realización, los componentes para su uso se administran antes de la reperfusión del sujeto.

En una realización, la (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio para su uso, se administran antes de la reperfusión del sujeto.

En una realización, los componentes para su uso se administran durante la reperfusión del sujeto.

En una realización, la (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio para su uso, se administran durante la reperfusión del sujeto.

En una realización, los componentes para su uso se administran después de la reperfusión del sujeto.

En una realización, la (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio para su uso, se administran después de la reperfusión del sujeto.

En una realización, los componentes para su uso se administran antes y/o durante y/o después de la reperfusión del sujeto.

En una realización, la (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; (ii) canrenoato de potasio para su uso, se administran antes, durante y después de la reperfusión del sujeto.

En algunas realizaciones, el sujeto se administra (i) continuamente antes, durante y después de la reperfusión del sujeto y se administra (ii) como una dosis de embolada antes de la reperfusión.

En algunas realizaciones, el sujeto se administra (ii) continuamente antes, durante y después de la reperfusión del sujeto y se administra (i) como una dosis de embolada antes de la reperfusión.

En algunas realizaciones, se puede realizar administración adicional de uno o más de los componentes después de la reperfusión. Preferentemente, esta administración repetida se lleva a cabo al menos dos veces, más preferentemente de 2 a 100 veces, o puede estar en forma de infusión continua.

En algunas realizaciones, se administran al sujeto los componentes como una dosis de embolada antes de la reperfusión.

En algunas realizaciones, se administran al sujeto los componentes como una dosis de embolada durante la reperfusión.

En algunas realizaciones, se administran al sujeto los componentes como una dosis de embolada después de la reperfusión.

Como se usa en el presente documento, la "reperfusión" es la restauración del flujo sanguíneo a cualquier órgano o tejido en el que el flujo de sangre está disminuido o bloqueado. Por ejemplo, el flujo sanguíneo se puede restaurar a cualquier órgano o tejido afectado por isquemia o hipoxia. La restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) puede producirse por cualquier método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la reperfusión de los tejidos cardíacos isquémicos puede surgir de revascularización.

Se puede lograr reperfusión mediante un procedimiento de revascularización. El procedimiento de revascularización se puede seleccionar del grupo que consiste en: intervención coronaria percutánea; angioplastia con globo; inserción de un injerto de derivación; inserción de un endoprótesis vascular; ateroctomía coronaria direccional; tratamiento con uno o más agentes trombolíticos; y eliminación de una oclusión.

El o los agentes trombolíticos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: activador del plasminógeno tisular; urocinasa; prourocinasa; estreptocinasa; forma acilada de plasminógeno; forma acilada de plasmina; y complejo de estreptocinasa-plasminógeno acilado.

Dosificación

Una persona experta habitual en la materia puede determinar fácilmente una dosis adecuada de una de las presentes composiciones para administrar a un sujeto sin experimentación excesiva. Normalmente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un paciente individual y dependerá de diversos factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el modo y momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad de la afección particular y el individuo que se somete a terapia. Las dosis desveladas en el presente documento son ilustrativas del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que estén justificados intervalos de dosificación mayores o menores y estos están dentro del alcance de la presente invención.

En una realización muy preferida de la invención, la dosis del modulador de insulina (exenatida) en la combinación es en general menor que la dosis normalmente usada en monoterapia en el contexto de sus terapias aprobadas en la actualidad y/o menor que las dosis generales indicadas en la bibliografía sobre lesiones por reperfusión.

Si está presente, la dosis del agente inmunosupresor (p. ej., ciclosporina) en la combinación es en general menor que la dosis normalmente usada en monoterapia en el contexto de sus terapias aprobadas en la actualidad y/o menor que las dosis generales indicadas en la bibliografía sobre lesiones por reperfusión.

Cuando se usa en las combinaciones reivindicadas en la presente, la exenatida se administra preferentemente en una dosis de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,5 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,15 mg/kg.

Cuando se usa en las combinaciones reivindicadas en la presente, el canrenoato de potasio se administra preferentemente en una dosis de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 10, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, más preferentemente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg, aún más preferentemente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg/kg.

Si se usa, la ciclosporina se administra preferentemente en una dosis de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, aún más preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2,5 mg/kg.

En una realización muy preferida, la combinación es una combinación de dosis fija que comprende dosificaciones predeterminadas de los componentes respectivos (p. ej., de aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,05 mg/kg de exenatida y de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mg/kg de canrenoato de potasio, más preferentemente, de aproximadamente 0,05 mg/kg de exenatida y 1 mg/kg de canrenoato de potasio).

Uso no terapéutico

Se desvela en el presente documento una combinación que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para tratar y/o prevenir la isquemia y/o la lesión por reperfusión en un órgano *ex vivo* antes o durante el trasplante.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una combinación que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para tratar y/o prevenir la lesión por isquemia y/o reperfusión en un órgano *ex vivo* antes del trasplante.

Se desvela en el presente documento una combinación que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para tratar y/o prevenir la lesión por reperfusión en un órgano *ex vivo* antes o durante el trasplante.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de una combinación que comprende: (i) exenatida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para tratar y/o prevenir la lesión por reperfusión en un órgano *ex vivo* antes o durante el trasplante.

Se desvela en el presente documento una combinación que comprende al menos dos de los siguientes componentes: (i) un modulador de insulina, (ii) un agente inmunosupresor y (iii) un antagonista de aldosterona para tratar y/o prevenir la isquemia en un órgano *ex vivo* antes o durante el trasplante.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de una combinación que comprende: (i) exenatida, o sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y (ii) canrenoato de potasio, para tratar y/o prevenir la isquemia en un órgano *ex vivo* antes del trasplante.

Un órgano *ex vivo* (extraído del cuerpo) puede ser susceptible a lesión por reperfusión debido a la falta de flujo sanguíneo. Por lo tanto, la combinación de la presente invención se puede usar para prevenir la lesión por reperfusión en el órgano extraído. Preferentemente, el órgano es un corazón, hígado o riñón, más preferentemente, un corazón.

En algunas realizaciones, el órgano extraído se coloca en una solución tamponada convencional, tales como las usadas habitualmente en la técnica, que contiene la combinación de la invención. Por ejemplo, se puede colocar un corazón extraído en una solución cardioplégica que contenga exenatida y ciclosporina. La concentración de exenatida, ciclosporina y canrenoato de potasio útiles en la solución tamponada convencional puede ser determinada fácilmente por los expertos en la materia. Dichas concentraciones pueden ser, por ejemplo, entre aproximadamente 0.1 nM y aproximadamente 10 mM, preferentemente de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 mM.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

Ejemplo comparativo 1. Efectos del tratamiento combinado de exenatida y ciclosporina en un modelo de conejo de lesión por infarto agudo de miocardio

Los estudios sugieren que el tratamiento con exenatida puede atenuar/mitigar la lesión miocárdica resultante de una lesión por isquemia-reperfusión (I/R) como puede ocurrir clínicamente después de un infarto agudo de miocardio (IAM) y/o una intervención coronaria percutánea/angioplastia (ICP). Exenatida (0,150 mg/kg IV en embolada), cuando se administra antes del inicio de la reperfusión, puede tener efectos conservadores del miocardio. Además, los estudios sugieren que el tratamiento con ciclosporina-A (CsA) puede atenuar/mitigar la lesión miocárdica resultante de una lesión I/R como puede suceder clínicamente después de IAM y/o ICP. CsA (embolada IV de 2,5 mg/kg), cuando se administra antes del inicio de la reperfusión, puede tener efectos conservadores del miocardio. Este estudio fue diseñado para evaluar los efectos cardioprotectores combinados de exenatida y CsA en un entorno que imita el escenario clínico de una lesión de I/R aguda. El estudio se realizó bajo la hipótesis de que el tratamiento combinado con exenatida y CsA después del inicio de la isquemia (pero antes de la reperfusión) proporcionaría un efecto protector miocárdico más pronunciado en comparación con el tratamiento solo con exenatida o ciclosporina.

En este estudio se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda. Los conejos eran machos, >8 semanas de edad y con un peso entre 2,9 y 3,8 kg. Las aprobaciones de los comités éticos y las autoridades veterinarias se obtuvieron antes de comenzar el estudio. Los controles ambientales en las habitaciones de los animales se ajustaron para mantener una temperatura de 22 °C a 28 °C y una humedad relativa entre 30 % y 70 %. La temperatura ambiente y la humedad se registraron cada hora y se supervisaron diariamente. Hubo aproximadamente 10-15 intercambios de aire por hora en las habitaciones de los animales. El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se realizaron observaciones diarias rutinarias. Se proporcionó una dieta convencional certificada para conejos, aproximadamente 180 gramos al día desde la llegada a las instalaciones.

Se usan péptido de exenatida [Byetta®, 10 mg/dosis inyectada (40 ml), Eli Lilly Nederland B.V.] y ciclosporina A [CsA, Sandimmun® (50 mg/ml) Novartis Pharma A.G., Suiza] como artículos de prueba, ya sea en monoterapia o en terapia combinada. Se prepararon soluciones de dosificación de exenatida (0,15 mg/kg en solución salina normal) y/o CsA (2,5 mg/kg en solución salina normal) justo antes de la administración a los conejos. Se usó solución salina normal (NaCl 0,9 %) como control.

Los artículos de prueba/control se administraron por vía intravenosa, con anestesia general, para imitar la vía de administración esperada en el contexto clínico de infarto agudo de miocardio e intervención coronaria percutánea primaria. Se administraron emboladas intravenosas a través de una vena periférica (vena auricular de conejo).

El estudio siguió un diseño predeterminado controlado con placebo y simulación. En resumen, se asignaron aleatoriamente 80 conejos machos saludables, aclimatados, a una de las tres ramas de estudio. La rama A (n = 4, SIMULACIÓN) incluye controles temporales operados por simulación tratados con solución salina normal (SN; IV); la rama B (n = 18, CONTROL/PLACEBO) incluye animales con I/R tratados con solución salina normal (SN; IV); la rama C (n = 18, EXENATIDA, 0,15 mg/kg) incluye animales con I/R tratados con exenatida; la rama D (n = 18, CICLOSPORINA, 2,5 mg/kg, IV) incluye animales con I/R tratados con CsA; La rama E (n = 22, EXENATIDA + CICLOSPORINA, IV) incluye animales con I/R tratados con exenatida y CsA.

En grupos de I/R (rama B, C, D y E), los conejos se sometieron a 40 minutos de isquemia regional del corazón (oclusión coronaria), seguido de 120 minutos (2 h) de reperfusión. En todos los casos, se realizaron tratamientos (administración intravenosa en embolada de SN o exenatida o CsA o exenatida más CsA) 30 minutos después del inicio de la isquemia (10 minutos antes del inicio de la reperfusión). En todos los casos, la función cardiovascular se supervisó tanto antes como durante la isquemia, así como durante hasta 120 minutos (2 h) después de la reperfusión. Los experimentos finalizaron 2 h después de la reperfusión (final del estudio); se evaluó la lesión irreversible del miocardio (tamaño del infarto por histomorfometría) en este momento y fue el punto final primario del estudio. En la tabla 1 se resume el diseño del estudio.

Tabla 1. Protocolo experimental

Grupo	Grupo de estudio (n.º de animales)	Tiempo de isquemia	Tiempo de reperfusión
A	SIMULACIÓN - para cirugía sin isquemia (n = 4)	0 min (Últimos 10 minutos con SN)	120 min de placebo (SN)
B	CONTROL/PLACEBO (n = 18)	40 min (Últimos 10 min con SN)	120 min de placebo (SN)
C	EXENATIDA 0,15 mg/kg (n = 18)	40 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
D	CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 18)	40 min (Últimos 10 min con CsA)	120 min de CsA
E	EXENATIDA + CICLOSPORINA (n = 22)	40 min (Últimos 10 min con exenatida + CsA)	120 min de exenatida + CsA

Anestesia/preparación quirúrgica. Se indujo anestesia general por vía intramuscular (IM) con una mezcla de ketamina (~35-50 mg/kg) y xilazina (~5-10 mg/kg). Para conservar la función autónoma y mantener la anestesia durante todo el procedimiento experimental, los animales recibieron anestesia adicional según fue necesario (~10-15 mg de ketamina/30 min o ~15-20 mg/kg de pentobarbital sódico). Se colocó un catéter venoso en una vena periférica (p. ej., vena auricular de la oreja) para la administración de anestésicos adicionales y solución salina normal/artículos de prueba. El efecto de la anestesia se evalúa mediante (i) la anulación total del reflejo corneal del animal, (ii) la anulación total del centro respiratorio del animal y la ventilación mecánica total sin ninguna resistencia al flujo de aire provocada por la respiración espontánea del animal y (iii) la estabilidad de los parámetros hemodinámicos. Se colocó un tubo traqueal con manguito mediante una traqueotomía (incisión ventral en la línea media) y se usó para ventilar mecánicamente los pulmones con una mezcla de O_2 al 95 %/CO_2 al 5 % a través de un respirador de animales con ciclo de volumen (~40 respiraciones/min con un volumen corriente de ~12,5 ml/kg) para mantener los valores de $PaCO_2$ ampliamente dentro del intervalo fisiológico. A lo largo del procedimiento experimental, se supervisaron de manera continua el electrocardiograma, la presión arterial, los pulsos cardíacos y capnograma. Se insertó una sonda de temperatura en el recto y se mantuvo la temperatura corporal usando una almohadilla térmica. Finalmente, se colocó un catéter arterial en una arteria periférica (p. ej., oreja) para tomar muestras de sangre.

Posteriormente, los animales se colocaron en decúbito lateral izquierdo y se abrió quirúrgicamente el tórax con una toracotomía izquierda. Se abrió el tórax a través del cuarto espacio intercostal izquierdo. Se expuso el corazón latiente y se hizo una incisión en el pericardio. Bajo la orejuela auricular, la primera rama anterolateral grande de la arteria circunfleja y, si es necesario, dependiendo de la anatomía coronaria de cada animal, la arteria circunfleja en sí misma, se rodeó con una sutura de seda 3-0. La oclusión de la arteria coronaria en esta región normalmente produce isquemia de un gran territorio de la pared ventricular anterolateral y apical. Los extremos de la sutura se enhebraron a través de un pequeño trozo de tubo de polietileno, formando un asa. Se indujo isquemia tirando del hilo a través del tubo, que se colocó con firmeza contra la pared arterial coronaria con la ayuda de una pequeña pinza. La isquemia dio como resultado elevación del segmento ST en el electrocardiograma y un cambio en el color (es decir, cianótico) del miocardio. Después de 30 min de isquemia, los animales a los que se administró embolada IV de vehículo (solución

salina normal) o exenatida o CsA o la combinación de exenatida y CsA; la isquemia se continuó durante 10 minutos adicionales (es decir, 40 minutos de tiempo de isquemia total) después del tratamiento. Al final del periodo isquémico, se liberaron las asas coronarias y se reperfundió el miocardio isquémico previo durante hasta 2 horas. Cabe destacar que en los animales operados con simulación, las asas vasculares fueron manipuladas en el momento del inicio de la isquemia-reperfusión, pero no se apretaron ni aflojaron.

Las variables hemodinámicas y la temperatura rectal se supervisaron y registraron en 6 momentos predeterminados: después de la anestesia (valor de referencia), justo antes del inicio de la isquemia (preoclusión), 30 min (administración de vehículo/artículos de prueba) de isquemia, así como a los 30, 60 y 120 min después de la reperfusión. Además, para determinar/cuantificar el grado de lesión miocárdica irreversible (es decir, infarto) resultante de la lesión por I/R con y sin exenatida o CsA o su combinación, se evaluaron las áreas infartadas.

Muestras de sangre. Se recogieron muestras de sangre total venosa (<3 ml) para la evaluación de la lesión miocárdica mediante análisis de biomarcadores cardíacos en dos momentos de recogida de datos: momento inicial y 120 minutos después de la reperfusión. Se midió la troponina-I cardíaca (cTnI), como el biomarcador más valioso y fiable usado clínicamente. La cTnI se determinó con un analizador bioquímico (panel cardíaco Triage®, Alere San Diego, Inc. CA, EE. UU.).

Histopatología/histomorfometría. Al finalizar el protocolo, se evaluó la lesión miocárdica irreversible (es decir, infarto) resultante del daño por I/R. En resumen, después del final de la reperfusión, se extirparon los corazones, se montaron en un aparato y se perfundieron con solución salina normal durante 2 minutos para la extracción de sangre. Después, se volvió a apretar la ligadura coronaria en el mismo sitio y se infundieron 5 ml de solución de microesferas de polímero verde fluorescente (8 mg/ml; diámetro 3-8 mm; Fluoro-Max™, Thermo Scientific, CA, EE. UU.) para la separación del área normalmente perfundida (sin área isquémica) y para delinear el área en riesgo (AER, área isquémica) del miocardio durante la isquemia. Los corazones se mantuvieron a -20 °C durante 24 horas y se cortaron en perpendicular a su eje largo (desde el ápice hasta la base) en cortes de 3 mm de grosor. Posteriormente, los cortes se incubaron durante 20 minutos en cloruro de trifenil-tetrazolio al 2 % (TTC, Sigma, San Luis, MO, EE. UU.) a 37 °C y se fijaron en una solución de formalina no tamponada al 10 %.

Después de la fijación, el área ventricular izquierda total (VI), el área en riesgo (AER) y el área de infarto (IF) se delinearon/midieron digitalmente. Con una longitud de onda de 366 nm de luz UV, se separó en cada portaobjetos el área isquémica (AER) de la zona infartada (IF) y área no isquémica. Todas las áreas fueron trazadas en una lámina de acetato. Los trazados se importaron posteriormente a un programa de análisis de imágenes (Image J; Institutos Nacionales de Salud) y se realizó una planimetría asistida por ordenador para determinar el tamaño general del ventrículo izquierdo (VI), el área en riesgo (AER) y el infarto (IF). Para cada portaobjetos, el AER se expresó como un porcentaje del área del VI (AER/VI) y el IF se expresó como un porcentaje del AER (IF/AER). En todos los casos, personal sin conocimiento de la asignación de tratamiento/diseño del estudio realizó histomorfometría cuantitativa.

Análisis de datos/estadística. Los datos obtenidos del procedimiento de experimento anterior se tabularon y calcularon usando hojas de cálculo de Excel. El análisis estadístico se realizó con SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., IL, EE. UU.). Los valores se presentan como media ± error típico (ETM). Las comparaciones estadísticas de variables numéricas entre los tres grupos se analizaron usando el modelo de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con análisis de corrección de Bonferroni. Un valor de P calculado de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Observaciones/resultados de animales.

Se muestran variables hemodinámicas, presiones arteriales medias y frecuencia cardíaca en la tabla 2. Los valores basales fueron similares en todos los grupos. Como se ve normalmente en el modelo de conejo de los inventores, las tensiones arteriales disminuyen después de la cirugía y la oclusión y, de manera más significativa, al final de la reperfusión. No hubo diferencias significativas entre los grupos en esta variable de tensión. Todos los grupos siguieron un patrón similar a lo largo del tiempo.

Tabla 2: Parámetros hemodinámicos[a]

Grupo	Valor de referencia FC TAM	Preoclusión FC TAM	30 min de isquemia FC TAM	30 min de reperfusión FC TAM	60 min de reperfusión FC TAM	120 min de reperfusión FC TAM
SIMULACIÓN	221 ± 5 89 ± 6	225 ± 7 71 ± 5	228 ± 7 73 ± 6	227 ± 5 69 ± 3	229 ± 4 68 ± 3	231 ± 3 70 ± 4
CONTROL	208 ± 6 83 ± 2	215 ± 7 68 ± 3	218 ± 7 70 ± 4	217 ± 5 62 ± 4	219 ± 6 56 ± 2	221 ± 8 44 ± 3

EXENATIDA	217 ± 11 86 ± 3	220 ± 3 59 ± 4	219 ± 5 64 ± 4	221 ± 3 58 ± 3	224 ± 6 54 ± 2	226 ± 2 50 ± 3
CICLOSPORINA	215 ± 2 81 ± 3	218 ± 6 70 ± 2	220 ± 4 67 ± 3	218 ± 3 66 ± 3	224 ± 8 57 ± 2	225 ± 2 47 ± 2
EXENATIDA + CICLOSPORINA	219 ± 3 83 ± 2	223 ± 9 64 ± 2	224 ± 5 69 ± 4	221 ± 7 66 ± 2	226 ± 3 66 ± 2	228 ± 3 51 ± 3
[a] Los valores son media ± ETM; FC: frecuencia cardíaca media en latidos/min; TAM: tensión arterial media;						

El tamaño del VI y el tamaño del AER fueron similares en todos los animales tratados, lo que indica que el área inicial del ventrículo izquierdo e isquémica no difirieron significativamente entre los grupos. Aunque la administración de exenatida o CsA dio lugar a disminución del tamaño del infarto en comparación con el control, la administración de la combinación de exenatida y CsA dio lugar a una disminución superior del tamaño del infarto. De manera similar, mientras que exenatida o CsA redujeron la liberación de cTnI en 48 % y 36 %, respectivamente, la terapia combinada de exenatida y ciclosporina redujo la liberación de cTnI en 61 % (62,6 ± 10,7, P < 0,001).

La tabla 3 presenta datos que muestran los niveles cardiacos de troponina I, las relaciones de área de riesgo con respecto a ventricular izquierda, de área infartada con respecto a ventrículo izquierdo y de área infartada con respecto a área de riesgo para cada uno de los grupos usados en este estudio.

Tabla 3. Resultados bioquímicos e histopatológicos del estudio

Grupo	cTnI (ng/ml media ± ETM)	AER/VI (% media ± ETM)	IF/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control
SIMULACIÓN n = 4	10,5 ± 3,5	56,5 ± 7	1,21 ± 0,2	2,3 ± 0,4	-94	*P* < 0,001
CONTROL n = 18	159 ± 10,4	58 ± 2,4	21,9 ± 7,8	37,7 ± 2,1		
EXENATIDA n = 18 (0,15 µg/kg)	82,6 ± 7	55,3 ± 2,2	12,8 ± 4,9	23,5 ± 2	-38	*P* < 0,001

(continuación)

Grupo	cTnI (ng/ml media ± ETM)	AER/VI (% media ± ETM)	IF/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control
CICLOSPORINA n = 18 (2,5 mg/kg)	101,7 ± 10	63,2 ± 2,5	14,28 ± 6,5	22,7 ± 2,3	-40	*P* < 0,01
EXENATIDA + CICLOSPORINA n = 22	62,6 ± 10,7	61,5 ± 3,4	10,09 ± 5,1	16,8 ± 1,7	-55	*P* < 0,001

Estos resultados muestran que en un modelo de conejo normalizado de isquemia miocárdica aguda y lesión por reperfusión, la terapia combinada de exenatida y CsA cuando se administró como una embolada IV (0,15 mg/kg y 2,5 mg/kg, respectivamente) a los 10 minutos antes del inicio de la reperfusión fue capaz de producir una mayor reducción en el tamaño del infarto de miocardio en comparación con grupos de monoterapia de exenatida o CsA. En consecuencia, estos resultados demuestran por primera vez que en la terapia de lesión por reperfusión miocárdica, la administración combinada de ciclosporina y exenatida es más beneficiosa y ventajosa y proporciona un resultado clínico superior frente a terapias con ciclosporina o exenatida por sí solas. Como tal, la combinación de exenatida y CsA es excepcionalmente útil en los métodos para prevenir y tratar la lesión por isquemia-reperfusión en sujetos mamíferos.

Ejemplo comparativo 2. Efectos dependientes de la dosis del tratamiento combinado de exenatida y ciclosporina en un modelo de rata de lesión por infarto agudo de miocardio

Este estudio se diseñó para investigar los efectos cardioprotectores de exenatida, CsA y sus combinaciones en diversas dosis y en un modelo de rata de lesión por reperfusión miocárdica. El estudio se realizó bajo la hipótesis de que la terapia combinada con exenatida y CsA, después del inicio de la isquemia y antes de la reperfusión, también daría lugar a mejor reducción del tamaño del infarto en un modelo animal adicional.

Se usaron ratas Wistar en este estudio. Las ratas eran machos y pesaban entre 266 y 370 g. Se obtuvieron las aprobaciones de los comités éticos y las autoridades veterinarias antes de comenzar el estudio. Los animales se alojaron en jaulas ventiladas individualmente usando aire filtrado con HEPA, que cumplen con las recomendaciones de tamaño en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio DHEW (NIH) más reciente y la Directiva 2010/63/UE sobre la protección de animales usados con fines científicos. Los controles ambientales en las habitaciones de los animales se ajustaron para mantener una temperatura de 22 °C a 28 °C y una humedad relativa entre 30 % y 70 %. El material de lecho colocado debajo de la jaula se cambió al menos tres veces por semana. Hubo aproximadamente 10-15 intercambios de aire por hora en las habitaciones de los animales. El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se realizaron observaciones diarias rutinarias. Los animales se acondicionaron a las instalaciones de alojamiento durante al menos 3 días antes de la prueba. Se disponía de pienso convencional para ratas de laboratorio y agua corriente filtrada a voluntad.

Se usan exenatida (Byetta®, Eli Lilly Nederland B.V.) y CsA (Sandimmun®, Novartis Pharma A.G., Suiza) como artículos de prueba, ya sea en monoterapia o en terapia combinada. Se prepararon soluciones de dosificación de exenatida y/o CsA justo antes de la administración a las ratas. Se usó solución salina normal (NaCl 0,9 %) como control.

El estudio siguió un diseño predeterminado controlado por placebo. En resumen, se asignaron aleatoriamente 130 ratas machos saludables, aclimatadas, a una de las diez ramas de estudio. Todos los animales se sometieron a 30 minutos de isquemia regional del corazón (oclusión coronaria), seguido de 120 minutos (2 h) de reperfusión. En todos los casos, se realizaron tratamientos (administración intravenosa en embolada de SN o exenatida o CsA o sus combinaciones) 20 minutos después del inicio de la isquemia (10 minutos antes del inicio de la reperfusión). En todos los casos, la función cardiovascular se supervisó tanto antes como durante la isquemia, así como durante hasta 120 minutos (2 h) después de la reperfusión. Los experimentos finalizaron 2 h después de la reperfusión (final del estudio); se evaluó la lesión irreversible del miocardio (tamaño del infarto por histomorfometría) en este momento y fue el punto

final primario del estudio. En la tabla 4 se resume el diseño del estudio.

Tabla 4. Protocolo experimental

Grupo de estudio (n.º de animales)	Tiempo de isquemia	Tiempo de reperfusión
CONTROL (solución salina) (n = 11)	30 min (Últimos 10 min con solución salina)	120 min de solución salina
EXENATIDA 0,03 mg/kg (n = 11)	30 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 12)	30 min (Últimos 10 min con CsA)	120 min de CsA
EXENATIDA 0,03 mg/kg + CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 12)	30 min (Últimos 10 min con exenatida y CsA)	120 min de exenatida y CsA
EXENATIDA 0,15 mg/kg (n = 12)	30 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 12)	30 min (Últimos 10 min con CsA)	120 min de CsA
EXENATIDA 0,15 mg/kg + CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 11)	30 min (Últimos 10 min con exenatida y CsA)	120 min de exenatida y CsA
EXENATIDA 1 mg/kg (n = 12)	30 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
CICLOSPORINA 10 mg/kg	30 min (Últimos 10 min con CsA)	120 min de CsA
EXENATIDA 1 mg/kg + CICLOSPORINA 10 mg/kg (n = 11) (n = 14)	30 min (Últimos 10 min con exenatida y CsA)	120 min de exenatida y CsA

Anestesia/preparación quirúrgica. Se anestesiaron ratas Wistar macho mediante inyección intraperitoneal (IP) de pentobarbital (Euthazol, Produlab Pharma b.v., Raamsdonksveer, Países Bajos; 60 mg/kg de dosis en embolada seguido de 15-20 mg/kg cuando sea necesario durante el experimento). Las ratas se pesaron y se afeitaron las áreas del estómago y el tórax. El mantenimiento de la temperatura corporal se ayudó usando una almohadilla térmica de temperatura constante. La tráquea se intubó con una cánula de plástico conectada a un respirador para roedores. Los animales fueron ventilados con aire ambiental (6,2 ml/kg, 70 ± 5 respiraciones/min). La tensión arterial, el ECG de derivación superficial y la temperatura central del cuerpo se supervisaron a lo largo de los experimentos para garantizar la estabilidad de la preparación. La arteria carótida derecha se canuló para la medición de la tensión sanguínea y la vena yugular derecha se canuló para la administración de los artículos de prueba. Se realizó una toracotomía en el 5º espacio intercostal y se expuso el corazón. Se colocó una sutura de Prolene 5-0 alrededor de la arteria coronaria descendente izquierda. Después se ocluyó la arteria coronaria durante 30 minutos colocando la ligadura a través de un pequeño trozo de tubo de plástico y tirando firmemente del asa usando un hemostato. Después de 30 minutos de oclusión coronaria, la reperfusión se inició liberando el asa y continuó durante 120 minutos.

Las variables hemodinámicas se supervisaron y registraron en 6 momentos predeterminados: después de la anestesia (valor de referencia), justo antes del inicio de la isquemia (preoclusión), 20 min (administración de vehículo/artículos de prueba) de isquemia, así como a los 30, 60 y 120 min después de la reperfusión. Además, para determinar/cuantificar el grado de lesión miocárdica irreversible (es decir, infarto) resultante de la lesión por I/R con y sin exenatida o CsA o el tratamiento de exenatida y CsA, se evaluaron los biomarcadores cardíacos así como el área de infarto.

Histopatología/histomorfometría. Al final del periodo de reperfusión de 120 minutos, se extrajo el corazón y se determinó el tamaño del infarto. En resumen, la arteria coronaria descendente anterior izquierda se volvió a ocluir y el corazón se perfundió con 4 ml de colorante azul de Evans al 0,3 % (p/v) (Sigma-Aldrich) con una presión constante

de 100 cm de H_2O en la aorta para delinear la zona de área en riesgo. El área de tejido perfundido no isquémico se tiñó de azul, mientras que la zona de riesgo se mantuvo sin manchas. Los corazones teñidos se congelaron rápidamente (-20 °C durante al menos 2 horas), se cortaron en cortes de 2 mm de grosor y cada corte se incubó a 37 °C en 1,5 ml de TTC al 1 % (p/v) (Merck Biosciences) disuelto en tampón fosfato 50 mM (pH 7,4) durante 10 minutos. Los cortes se transfirieron después a una solución de formalina al 10 % durante 5 minutos.

Después de la fijación, el área ventricular izquierda total (VI), el área en riesgo (AER) y el área de infarto (IF) se delinearon/midieron digitalmente. Se colocaron cortes entre placas de vidrio y se tomaron fotos digitales de ambos lados de los cortes de corazón. Las áreas de imágenes teñidas de manera diferente se cuantificaron mediante planimetría digital (Infarctsize™ 2.5, Pharmahungary, Szeged, Hungría). Una persona experimentada llevó a cabo la evaluación de todas las imágenes con ocultación a lo largo del estudio. Para cada portaobjetos, el AER se expresó como un porcentaje del área del VI (AER/VI) y el IF se expresó como un porcentaje del AER (IF/AER).

Análisis de datos/estadística. Los datos obtenidos del procedimiento de experimento anterior se tabularon y calcularon usando hojas de cálculo de Excel. El análisis estadístico se realizó con SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., IL, EE. UU.). Los valores se presentan como media ± error típico (ETM). Las diferencias entre las medias de las mediciones de punto final (es decir, el tamaño del infarto, AER) se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey para hacer comparaciones de cada grupo con el control cuando sea adecuado. Las diferencias entre las medias de variables continuas (es decir, los datos hemodinámicos) se analizaron mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de la prueba posthoc de Tukey. Un valor de P calculado de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Observaciones/resultados de animales.

Se muestran variables hemodinámicas, presiones arteriales medias y frecuencia cardíaca en la tabla 5. Los valores basales fueron similares en todos los grupos. Como se ve normalmente en el modelo de rata de los inventores, las tensiones arteriales disminuyen después de la cirugía y la oclusión y, de manera más significativa, al final de la reperfusión. No hubo diferencias significativas entre los grupos en esta variable de tensión. Todos los grupos siguieron un patrón similar a lo largo del tiempo.

Tabla 5: Parámetros hemodinámicos

Grupo	Valor de referencia FC TAM	Preoclusión FC TAM	20 min de isquemia FC TAM	30 min de reperfusión FC TAM	60 min de reperfusión FC TAM	120 min de reperfusión FC TAM
CONTROL (solución salina) (n = 11)	427 112	455 114	434 102	434 88	421 82	441 87
EXENATIDA 0,03 mg/kg (n = 11)	449 108	439 93	404 71	426 69	404 72	388 71
CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 12)	421 115	444 110	419 89	419 95	421 80	412 72
EXENATIDA 0,03 mg/kg + CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 12)	430 111	444 95	413 65	410 73	402 72	416 67
EXENATIDA 0,15 mg/kg (n = 12)	426 119	455 107	439 88	407 75	435 82	435 77
CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 12)	425 109	468 92	411 72	408 81	438 84	374 67

(continuación)

Grupo	Valor de referencia FC TAM	Preoclusión FC TAM	20 min de isquemia FC TAM	30 min de reperfusión FC TAM	60 min de reperfusión FC TAM	120 min de reperfusión FC TAM
EXENATIDA 0,15 mg/kg + CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 11)	432 109	460 109	415 81	438 87	388 81	404 68
EXENATIDA 1 mg/kg (n = 12)	418 111	449 111	439 92	455 93	469 94	404 86
CICLOSPORINA 10 mg/kg (n = 14)	424 114	445 105	411 93	400 89	425 90	404 86
EXENATIDA 1 mg/kg + CICLOSPORINA 10 mg/kg (n = 11)	425 115	447 107	441 85	439 89	454 90	469 87
FC: frecuencia cardíaca media en latidos/min; TAM: tensión arterial media en mmHg.						

El tamaño del VI y el tamaño del AER fueron similares en todos los animales tratados, lo que indica que las áreas inicial del ventrículo izquierdo e isquémica no difirieron significativamente entre los grupos. La administración de exenatida o CsA presentó un efecto dependiente de la dosis. En particular, el tratamiento de animales con dosis menores de exenatida y CsA dio lugar a disminución significativa del tamaño de infarto en comparación con el control, mientras que dosis mayores no tuvieron efectos. Resulta interesante que la administración de la combinación de dosis bajas de exenatida y CsA dio lugar a una disminución superior del tamaño del infarto. Por otro lado, la exenatida a la dosis de 0,03 mg/kg redujo el área infartada en 27 % (45,9 ± 1,4; P < 0,05) y CsA a 0,5 mg/kg en 26,6 % (46,2 ± 3,7; P < 0,05), respectivamente, la terapia combinada de exenatida y CsA redujo el área infartada en 39,1 % (38,3 ± 2,7; P < 0,05), en comparación con el control (62,9 ± 3,7).

La tabla 6 presenta datos que muestran las relaciones de área de riesgo con respecto a ventricular izquierda y área infartada con respecto a área de riesgo para cada grupo del estudio.

TABLA 6. Resultados de histopatología del estudio

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control
CONTROL (solución salina) (n = 11)	47,7 ± 2,9	62,9 ± 3,7	-	
EXENATIDA 0,03 µg/kg (n = 11)	44,1 ± 3	45,9 ± 1,4	-27	*P* < 0,05
CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 12)	42,6 ± 2,2	46,2 ± 3,7	-26,6	*P* < 0,05
EXENATIDA 0,03 µg/kg + CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 12)	42,1 ± 3,5	38,3 ± 2,7	-39,1	*P* < 0,05

(continuación)

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control
EXENATIDA 0,15 µg/kg (n = 12)	49,8 ± 3,5	61,5 ± 4,1	-2,2	*No significativo*
CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 12)	47,3 ± 2,6	61 ± 4,1	-3	*No significativo*
EXENATIDA 0,15 µg/kg + CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 11)	44,7 ± 3,5	58,8 ± 5,1	-6,5	*No significativo*
EXENATIDA 1 µg/kg (n = 12)	38,9 ± 2,4	52,6 ± 2,9	16,4	*No significativo*
CICLOSPORINA 10 mg/kg (n = 14)	38,7 ± 3,1	54,3 ± 3,5	-13,7	*No significativo*
EXENATIDA 1 µg/kg + CICLOSPORINA 10 mg/kg (n = 11)	46,2 ± 4,1	51,5 ± 2,5	-18,1	*No significativo*

Estos resultados muestran que en un modelo de animal (rata) normalizado adicional de isquemia miocárdica aguda y lesión por reperfusión, la terapia combinada de exenatida y CsA también fue capaz de producir una mayor reducción en el tamaño del infarto de miocardio en comparación con monoterapias de exenatida o CsA. Sin embargo, en el presente modelo de rata, el efecto cardioprotector fue evidente en dosis menores en comparación con el modelo de conejo del ejemplo comparativo 1, lo que indica que diferentes especies pueden responder de manera diferente a exenatida o CsA o a su combinación. El hecho de que la duración de la isquemia fuera más larga en el modelo de conejo también puede ser responsable de la diferencia de los efectos observados en las dos especies. No obstante, estos resultados demuestran de nuevo que en la terapia de lesión por reperfusión miocárdica, la administración combinada de CsA y exenatida es más beneficiosa y ventajosa y proporciona un resultado clínico superior frente a terapias con ciclosporina o exenatida por sí solas. Como tal, la combinación de exenatida y CsA es excepcionalmente útil en los métodos para prevenir y tratar la lesión por isquemia-reperfusión en sujetos mamíferos.

Ejemplo 3. Efectos del tratamiento combinado de exenatida y canrenoato de potasio en un modelo de conejo de lesión por infarto agudo de miocardio

Los estudios sugieren que el tratamiento con canrenoato de potasio puede atenuar/mitigar la lesión miocárdica resultante de una lesión I/R como puede suceder clínicamente después de IAM y/o ICP. Este estudio fue diseñado para evaluar los efectos cardioprotectores combinados de exenatida y canrenoato de potasio en un entorno que imita el escenario clínico de una lesión de I/R aguda. El estudio se realizó bajo la hipótesis de que el tratamiento combinado con exenatida y canrenoato de potasio después del inicio de la isquemia (pero antes de la reperfusión) proporcionaría un efecto protector miocárdico más pronunciado en comparación con el tratamiento solo con exenatida o canrenoato de potasio.

En este estudio se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda. Los conejos eran machos, >8 semanas de edad y con un peso entre 2,6 y 3,8 kg. Todos los animales fueron tratados según la Directiva 2010/63/UE del Convenio europeo para la protección de los animales vertebrados usados con fines experimentales y otros fines científicos, y se ajustaron a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (Publicación de NIH n.º 85-23, revisado en 1985). Las aprobaciones de los comités éticos y las autoridades veterinarias se obtuvieron antes de comenzar el estudio. Los controles ambientales en las habitaciones de los animales se ajustaron para mantener una temperatura de 22 °C a 28 °C y una humedad relativa entre 30 % y 70 %. La temperatura

ambiente y la humedad se registraron cada hora y se supervisaron diariamente. Hubo aproximadamente 10-15 intercambios de aire por hora en las habitaciones de los animales. El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se realizaron observaciones diarias rutinarias. Se proporcionó una dieta convencional certificada para conejos, aproximadamente 180 gramos al día desde la llegada a las instalaciones.

Exenatida (Byetta®; Eli Lilly Nederland B.V.] y canrenoato de potasio (Sigma-Aldrich, Alemania) se usan como artículos de prueba, ya sea en monoterapia o en terapia combinada. Se prepararon soluciones de dosificación de exenatida (0,15 mg/kg en solución salina normal) y/o canrenoato de potasio (1 mg/kg en solución salina normal) justo antes de la administración a los conejos. Se usó solución salina normal (NaCl 0,9 %) como control.

Los artículos de prueba/control se administraron por vía intravenosa, con anestesia general, para imitar la vía de administración esperada en el contexto clínico de infarto agudo de miocardio e intervención coronaria percutánea primaria. Se administraron emboladas intravenosas a través de una vena periférica (vena auricular de conejo).

El estudio siguió un diseño predeterminado controlado por placebo. En resumen, se asignaron aleatoriamente 52 conejos machos saludables, aclimatados, a una de las cuatro ramas de estudio. En todos los grupos, los conejos se sometieron a 30 minutos de isquemia regional del corazón (oclusión coronaria), seguido de 180 minutos (3 h) de reperfusión. En todos los casos, se realizaron tratamientos (administración intravenosa en embolada de solución salina o exenatida o canrenoato de potasio o su combinación) 15 minutos después del inicio de la isquemia (15 minutos antes del inicio de la reperfusión). Los experimentos finalizaron 3 h después de la reperfusión (final del estudio); se evaluó la lesión irreversible del miocardio (tamaño del infarto por histomorfometría) en este momento y fue el punto final primario del estudio. En la tabla 7 se resume el diseño del estudio.

Tabla 7. Protocolo experimental

Grupo de estudio (n.º de animales)	Tiempo de isquemia	Tiempo de reperfusión
CONTROL (n = 12)	30 min (Últimos 15 min con solución salina)	180 min de placebo (solución salina)
EXENATIDA 0,15 mg/kg (n = 11)	30 min (Últimos 15 min con exenatida)	180 min de exenatida
CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 12)	30 min (Últimos 15 min con canrenoato de potasio)	180 min de canrenoato de potasio
EXENATIDA + CANRENOATO DE P. (n = 17)	30 min (Últimos 15 min con exenatida y canrenoato de potasio)	180 min de exenatida y canrenoato de potasio

Anestesia/preparación quirúrgica. Se indujo anestesia general por vía intramuscular (IM) con una mezcla de ketamina (-35-50 mg/kg) y xilazina (~5-10 mg/kg). Para conservar la función autónoma y mantener la anestesia durante todo el procedimiento experimental, los animales recibieron anestesia adicional según fue necesario (~10-15 mg de ketamina/30 min o -15-20 mg/kg de pentobarbital sódico). Se colocó un catéter venoso en una vena periférica (p. ej., vena auricular de la oreja) para la administración de anestésicos adicionales y solución salina normal/artículos de prueba. Se colocó un tubo traqueal con manguito mediante una traqueotomía (incisión ventral en la línea media) y se usó para ventilar mecánicamente los pulmones con una mezcla de O_2 al 95 %/CO_2 al 5 % a través de un respirador de animales con ciclo de volumen (~40 respiraciones/min con un volumen corriente de ~12,5 ml/kg) para mantener los valores de $PaCO_2$ ampliamente dentro del intervalo fisiológico.

Posteriormente, los animales se colocaron en decúbito lateral izquierdo y se abrió quirúrgicamente el tórax con una toracotomía izquierda. Se abrió el tórax a través del cuarto espacio intercostal izquierdo. Se expuso el corazón latiente y se hizo una incisión en el pericardio. Bajo la orejuela auricular, la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) se rodeó con una sutura de seda 3-0. La oclusión de la arteria coronaria en esta región normalmente produce isquemia de un gran territorio de la pared ventricular anterolateral y apical. Los extremos de la sutura se enhebraron a través de un pequeño trozo de tubo de polietileno, formando un asa. Se indujo isquemia tirando del hilo a través del tubo, que se colocó con firmeza contra la pared arterial coronaria con la ayuda de una pequeña pinza. La isquemia dio como resultado un cambio en el color (es decir, cianótico) del miocardio. Después de 15 min de isquemia, los animales a los que se administró embolada IV de vehículo (solución salina normal) o artículo de prueba indicado; la isquemia se continuó durante 15 minutos adicionales (es decir, 30 minutos de tiempo de isquemia total) después del tratamiento. Al final del periodo isquémico, se liberaron las asas coronarias y se reperfundió el miocardio isquémico previo durante hasta 3 horas. Para determinar/cuantificar el grado de lesión miocárdica irreversible (es decir, infarto) resultante del daño por isquemia y reperfusión con y sin el tratamiento indicado, se evaluaron las áreas de infarto.

Histopatología/histomorfometría. Al finalizar el protocolo, se evaluó la lesión miocárdica irreversible (es decir, infarto) resultante del daño por I/R. En resumen, después del final de la reperfusión, se extirparon los corazones, se montaron en un aparato y se perfundieron con solución salina normal durante 2 minutos para la extracción de sangre. Después, se volvió a apretar la ligadura coronaria en el mismo sitio y se infundieron 5 ml de solución de microesferas de polímero verde fluorescente (8 mg/ml; diámetro 3-8 mm; Fluoro-Max™, Thermo Scientific, CA, EE. UU.) para la separación del área normalmente perfundida (sin área isquémica) y para delinear el área en riesgo (AER, área isquémica) del miocardio durante la isquemia. Los corazones se mantuvieron a -20 °C durante 24 horas y se cortaron en perpendicular a su eje largo (desde el ápice hasta la base) en cortes de 3 mm de grosor. Posteriormente, los cortes se incubaron durante 20 minutos en 2 % (TTC, Sigma) a 37 °C y se fijaron en una solución de formalina no tamponada al 10 %.

Después de la fijación, el área ventricular izquierda total (VI), el área en riesgo (AER) y el área de infarto (IF) se delinearon/midieron digitalmente. Con una longitud de onda de 366 nm de luz UV, se separó en cada portaobjetos el área isquémica (AER) de la zona infartada (IF) y área no isquémica. Todas las áreas fueron trazadas en una lámina de acetato. Los trazados se importaron posteriormente a un programa de análisis de imágenes (Image J; Institutos Nacionales de Salud) y se realizó una planimetría asistida por ordenador para determinar el tamaño general del ventrículo izquierdo (VI), el área en riesgo (AER) y el infarto (IF). Para cada portaobjetos, el AER se expresó como un porcentaje del área del VI (AER/VI) y el IF se expresó como un porcentaje del AER (IF/AER). En todos los casos, personal sin conocimiento de la asignación de tratamiento/diseño del estudio realizó histomorfometría cuantitativa.

Análisis de datos/estadística. El análisis estadístico se realizó con SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., IL, EE. UU.). Los valores se presentan como media ± error (ETM). Las comparaciones estadísticas de variables numéricas entre los tres grupos se analizaron usando el modelo de análisis de ANOVA de una vía con análisis de corrección de Bonferroni. Un valor de P calculado de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Observaciones/resultados de animales.

El área del ventrículo izquierdo (VI) y el área isquémica (AER) fueron similares en todos los animales y no difirieron estadísticamente entre los grupos de estudio. La inducción de isquemia (30 min) y reperfusión (180 min) en el grupo de control dio lugar a una lesión significativa al miocardio de animales experimentales (49,47 ± 3,97 %), lo que indica la implementación suficiente del modelo y la reproducibilidad del procedimiento experimental del estudio. La monoterapia con exenatida (0,150 mg/kg) provocó una reducción de la extensión del infarto en 36,2 % (31,55 ± 3,31 %; $P < 0,05$) en comparación con el grupo de control. La administración de monoterapia con canrenoato de potasio (1 mg/kg) redujo el área del infarto en 30,5 % (34,36 ± 2,83 %; $P < 0,05$) en comparación con el grupo de control.

El tratamiento de combinación de exenatida y canrenoato de potasio provocó una reducción drástica en la extensión del infarto en 73,1 % (13,31 ± 2,14 %; $P < 0,001$) en comparación con el grupo de control. Resulta interesante que el efecto de la combinación también fue estadísticamente significativo ($P < 0,01$) en comparación con las respectivas monoterapias de exenatida y canrenoato de potasio.
La tabla 8 presenta datos que muestran las relaciones de área de riesgo con respecto a ventricular izquierda y área infartada con respecto a área de riesgo para cada grupo usado en este estudio.

Tabla 8. Resultados de histopatología del estudio

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control	Significación en IF/AER frente a monoterapias
CONTROL (n = 12)	55,46 ± 2,84	49,47 ± 3,97		-	-
EXENATIDA 0,15 µg/kg (n = 11)	55,01 ± 2,42	31,55 ± 3,31	-36,2	$P < 0,05$	-

(continuación)

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control	Significación en IF/AER frente a monoterapias
CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 12)	57,67 ± 1,73	34,36 ± 2,83	-30,5	*P* < 0,05	-
EXENATIDA + CANRENOATO DE P. (n = 17)	56,74 ± 3,46	13,31 ± 2,14	-73,1	*P* < 0,001	*P* < 0,01

Estos resultados muestran que en un modelo de conejo normalizado de isquemia miocárdica aguda y lesión por reperfusión, la terapia combinada de exenatida y canrenoato de potasio cuando se administró como una embolada IV (0,15 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente) a los 15 minutos antes del inicio de la reperfusión fue capaz de producir una reducción significativamente mayor en el tamaño del infarto de miocardio en comparación con grupos de monoterapia de exenatida o canrenoato de potasio. Asimismo, es de gran interés que los resultados actuales proporcionen por primera vez pruebas sólidas de que la terapia combinada de canrenoato de potasio con exenatida redujo el alcance de la lesión miocárdica también de manera sinérgica, ya que la reducción obtenida con la combinación supera la suma de las reducciones de las monoterapias respectivas. En consecuencia, estos resultados demuestran por primera vez que en la terapia de lesión por reperfusión miocárdica, la administración combinada de canrenoato de potasio y exenatida es más beneficiosa y ventajosa y proporciona un resultado clínico superior frente a terapias con canrenoato de potasio o exenatida por sí solas. Como tal, la combinación de exenatida y canrenoato de potasio es excepcionalmente útil en los métodos para prevenir y tratar la lesión por isquemia-reperfusión en sujetos mamíferos.

Ejemplo 4. Terapia combinada triple: Efectos del tratamiento combinado de exenatida, ciclosporina y canrenoato de potasio en un modelo de conejo de lesión por infarto agudo de miocardio

Este estudio se diseñó para analizar los efectos cardioprotectores combinados de exenatida, ciclosporina (CsA) y canrenoato de potasio en un entorno que imita el escenario clínico de una lesión aguda de I/R. El estudio se realizó bajo la hipótesis de que el tratamiento combinado triple con exenatida, CsA y canrenoato de potasio después del inicio de la isquemia (pero antes de la reperfusión) proporcionaría un efecto protector miocárdico más pronunciado en comparación con el tratamiento doble con exenatida y ciclosporina.

En este estudio se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda. Los conejos eran machos, >8 semanas de edad y con un peso entre 2,6 y 3,8 kg. Todos los animales fueron tratados según la Directiva 2010/63/UE del Convenio europeo para la protección de los animales vertebrados usados con fines experimentales y otros fines científicos, y se ajustaron a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (Publicación de NIH n.º 85-23, revisado en 1985). Las aprobaciones de los comités éticos y las autoridades veterinarias se obtuvieron antes de comenzar el estudio. Los controles ambientales en las habitaciones de los animales se ajustaron para mantener una temperatura de 22 °C a 28 °C y una humedad relativa entre 30 % y 70 %. La temperatura ambiente y la humedad se registraron cada hora y se supervisaron diariamente. Hubo aproximadamente 10-15 intercambios de aire por hora en las habitaciones de los animales. El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se realizaron observaciones diarias rutinarias. Se proporcionó una dieta convencional certificada para conejos, aproximadamente 180 gramos al día desde la llegada a las instalaciones.

Se usan exenatida (Byetta®; Eli Lilly Nederland B.V.], CsA (Sandimmun®, Novartis Pharma A.G., Suiza) y canrenoato de potasio (Sigma-Aldrich, Alemania) como artículos de prueba, ya sea en terapia combinada doble o triple. Se prepararon soluciones de dosificación de exenatida, CsA y canrenoato de potasio justo antes de la administración a los conejos. Se usó solución salina normal (NaCl 0,9 %) como control.

Los artículos de prueba/control se administraron por vía intravenosa, con anestesia general, para imitar la vía de administración esperada en el contexto clínico de infarto agudo de miocardio e intervención coronaria percutánea primaria. Se administraron emboladas intravenosas a través de una vena periférica (vena auricular de conejo).

El estudio siguió un diseño predeterminado controlado por placebo. En resumen, se asignaron aleatoriamente 55 conejos machos saludables, aclimatados, a una de las cuatro ramas de estudio. En todos los grupos, los conejos se sometieron a 30 minutos de isquemia regional del corazón (oclusión coronaria), seguido de 180 minutos (3 h) de reperfusión. En todos los casos, se realizaron tratamientos (administración intravenosa en embolada de solución salina

o combinación de artículos de prueba) 15 minutos después del inicio de la isquemia (15 minutos antes del inicio de la reperfusión). Los experimentos finalizaron 3 h después de la reperfusión (final del estudio); se evaluó la lesión irreversible del miocardio (tamaño del infarto por histomorfometría) en este momento y fue el punto final primario del estudio. En la tabla 9 se resume el diseño del estudio.

Tabla 9. Protocolo experimental

Grupo de estudio (n.º de animales)	Tiempo de isquemia	Tiempo de reperfusión
CONTROL (n = 12)	30 min (Últimos 15 min con solución salina)	180 min de placebo (solución salina)
EXENATIDA 0,15 mg/kg + CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 15 min con exenatida y ciclosporina)	180 min de exenatida y ciclosporina
EXENATIDA 0,15 mg/kg + CICLOSPORINA 0,5 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 10)	30 min (Últimos 15 min con exenatida y ciclosporina y canrenoato de potasio)	180 min de exenatida y ciclosporina y canrenoato de potasio
EXENATIDA 0,15 mg/kg + CICLOSPORINA 1 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 9)	30 min (Últimos 15 min con exenatida y ciclosporina y canrenoato de potasio)	180 min de exenatida y ciclosporina y canrenoato de potasio
EXENATIDA 0,15 mg/kg + CICLOSPORINA 2,5 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 16)	30 min (Últimos 15 min con exenatida y ciclosporina y canrenoato de potasio)	180 min de exenatida y ciclosporina y canrenoato de potasio

Anestesia/preparación quirúrgica. Se indujo anestesia general por vía intramuscular (IM) con una mezcla de ketamina (-35-50 mg/kg) y xilazina (~5-10 mg/kg). Para conservar la función autónoma y mantener la anestesia durante todo el procedimiento experimental, los animales recibieron anestesia adicional según fue necesario (~10-15 mg de ketamina/30 min o -15-20 mg/kg de pentobarbital sódico). Se colocó un catéter venoso en una vena periférica (p. ej., vena auricular de la oreja) para la administración de anestésicos adicionales y solución salina normal/artículos de prueba. Se colocó un tubo traqueal con manguito mediante una traqueotomía (incisión ventral en la línea media) y se usó para ventilar mecánicamente los pulmones con una mezcla de O_2 al 95 %/CO_2 al 5 % a través de un respirador de animales con ciclo de volumen (~40 respiraciones/min con un volumen corriente de ~12,5 ml/kg) para mantener los valores de $PaCO_2$ ampliamente dentro del intervalo fisiológico.

Posteriormente, los animales se colocaron en decúbito lateral izquierdo y se abrió quirúrgicamente el tórax con una toracotomía izquierda. Se abrió el tórax a través del cuarto espacio intercostal izquierdo. Se expuso el corazón latiente y se hizo una incisión en el pericardio. Bajo la orejuela auricular, la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) se rodeó con una sutura de seda 3-0. La oclusión de la arteria coronaria en esta región normalmente produce isquemia de un gran territorio de la pared ventricular anterolateral y apical. Los extremos de la sutura se enhebraron a través de un pequeño trozo de tubo de polietileno, formando un asa. Se indujo isquemia tirando del hilo a través del tubo, que se colocó con firmeza contra la pared arterial coronaria con la ayuda de una pequeña pinza. La isquemia dio como resultado un cambio en el color (es decir, cianótico) del miocardio. Después de 15 min de isquemia, los animales a los que se administró embolada IV de vehículo (solución salina normal) o artículo de prueba indicado; la isquemia se continuó durante 15 minutos adicionales (es decir, 30 minutos de tiempo de isquemia total) después del tratamiento. Al final del periodo isquémico, se liberaron las asas coronarias y se reperfundió el miocardio isquémico previo durante hasta 3 horas. Para determinar/cuantificar el grado de lesión miocárdica irreversible (es decir, infarto) resultante del daño por isquemia y reperfusión con y sin el tratamiento indicado, se evaluó el área de infarto.

Histopatología/histomorfometría. Al finalizar el protocolo, se evaluó la lesión miocárdica irreversible (es decir, infarto) resultante del daño por I/R. En resumen, después del final de la reperfusión, se extirparon los corazones, se montaron en un aparato y se perfundieron con solución salina normal durante 2 minutos para la extracción de sangre. Después, se volvió a apretar la ligadura coronaria en el mismo sitio y se infundieron 5 ml de solución de microesferas de polímero verde fluorescente (8 mg/ml; diámetro 3-8 mm; Fluoro-Max™, Thermo Scientific, CA, EE. UU.) para la separación del área normalmente perfundida (sin área isquémica) y para delinear el área en riesgo (AER, área isquémica) del miocardio durante la isquemia. Los corazones se mantuvieron a -20 °C durante 24 horas y se cortaron en perpendicular a su eje largo (desde el ápice hasta la base) en cortes de 3 mm de grosor. Posteriormente, los cortes se incubaron durante 20 minutos en 2 % (TTC, Sigma) a 37 °C y se fijaron en una solución de formalina no tamponada al 10 %.

Después de la fijación, el área ventricular izquierda total (VI), el área en riesgo (AER) y el área de infarto (IF) se delinearon/midieron digitalmente. Con una longitud de onda de 366 nm de luz UV, se separó en cada portaobjetos el área isquémica (AER) de la zona infartada (IF) y área no isquémica. Todas las áreas fueron trazadas en una lámina de acetato. Los trazados se importaron posteriormente a un programa de análisis de imágenes (Image J; Institutos Nacionales de Salud) y se realizó una planimetría asistida por ordenador para determinar el tamaño general del ventrículo izquierdo (VI), el área en riesgo (AER) y el infarto (IF). Para cada portaobjetos, el AER se expresó como un porcentaje del área del VI (AER/VI) y el IF se expresó como un porcentaje del AER (IF/AER). En todos los casos, personal sin conocimiento de la asignación de tratamiento/diseño del estudio realizó histomorfometría cuantitativa.

Análisis de datos/estadística. El análisis estadístico se realizó con SPSS versión 21.0 (SPSS Inc., IL, EE. UU.). Los valores se presentan como media ± error (ETM). Las comparaciones estadísticas de las variables numéricas entre los tres grupos se analizaron usando el modelo de ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de LSD de Fisher. Un valor de P calculado de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Observaciones/resultados de animales.

El área del ventrículo izquierdo (VI) y el área isquémica (AER) fueron similares en todos los animales y no difirieron estadísticamente entre los grupos de estudio. El tratamiento de combinación doble de exenatida y CsA (0,150 mg/kg y 0,5 mg/kg, respectivamente) provocó una reducción del área de infarto en 50 % (24,74 ± 3,8 %; $P < 0,05$) en comparación con el grupo de control (49,47 ± 4). La adición a este tratamiento de canrenoato de potasio (1 mg/kg) dio lugar a una reducción adicional del área del infarto en 70,6 % (14,56 ± 3 %; P < 0,001) en comparación con el grupo de control. De manera similar, la administración de una combinación triple de exenatida, canrenoato de potasio y CsA 1 mg/kg redujo el área del infarto en 74,8 % (12,49 ± 2,2 %; P < 0,001), en comparación con el grupo de control.

Resulta interesante que el efecto de estas combinaciones triples fue estadísticamente significativo (P < 0,05) en comparación con la combinación doble de exenatida y CsA. Sin embargo, la administración de una combinación triple de exenatida, canrenoato de potasio y CsA 2,5 mg/kg provocó una reducción de la extensión del infarto en 46,5 % (26,48 ± 2,93 %; P < 0,05), que no fue estadísticamente significativa en comparación con la combinación doble de exenatida y CsA.

La tabla 10 presenta datos que muestran las relaciones de área de riesgo con respecto a ventricular izquierda y área infartada con respecto a área de riesgo para cada grupo usado en este estudio.

Tabla 10. Resultados de histopatología del estudio

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control	Significación en IF/AER frente a combinación doble
CONTROL (n = 12)	55,46 ± 2,8	49,47 ± 4	-	-	-
EXENATIDA 0,15 µg/kg + CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 8)	61,11 ± 5,6	24,74 ± 3,8	-50	$P < 0,05$	

(continuación)

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control	Significación en IF/AER frente a combinación doble
EXENATIDA 0,15 µg/kg + CICLOSPORINA 0,5 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 10)	60,52 ± 4,4	14,56 ± 3	-70,6	*P* < 0,001	*P* < 0,05
EXENATIDA 0,15 µg/kg + CICLOSPORINA 1 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 9)	54,5 ± 3,7	12,49 ± 2,2	-74,8	*P* < 0,001	*P* < 0,05
EXENATIDA 0,15 µg/kg + CICLOSPORINA 2,5 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 16)	53,8 ± 2,6	26,48 ± 2,9	-46,5	*P* < 0,05	*No significativo*

Estos resultados muestran que en un modelo de conejo normalizado de isquemia miocárdica aguda y lesión por reperfusión, la administración combinada de exenatida y CsA proporciona un efecto beneficioso, mientras que la adición de canrenoato de potasio al tratamiento demostró una potenciación significativa adicional de la cardioprotección de la combinación. Es de gran interés que el presente ejemplo proporcione por primera vez pruebas sólidas de que la terapia combinada triple de exenatida, CsA y canrenoato de potasio produjo una mayor reducción en la extensión de la lesión miocárdica en comparación con el tratamiento combinado de exenatida y CsA. En consecuencia, estos resultados demuestran por primera vez que en terapia de lesión por reperfusión miocárdica la administración combinada triple de exenatida, CsA y canrenoato de potasio es más beneficiosa y ventajosa y proporciona un resultado clínico superior frente a monoterapias o CsA y exenatida administradas como terapias combinadas. Como tal, exenatida, CsA (al menos en dosis bajas) y canrenoato de potasio combinados son excepcionalmente útiles en métodos para prevenir y tratar lesión por isquemia-reperfusión en sujetos mamíferos.

Ejemplo 5. Efectos de exenatida, ciclosporina y canrenoato de potasio y sus terapias combinadas dobles o triples en un modelo de ratón de lesión por infarto agudo de miocardio

Este estudio se diseñó para probar lo siguiente:

i) Los efectos dependientes de la dosis de exenatida, CsA y canrenoato de potasio como monoterapia en un modelo animal (murino) adicional de lesión por reperfusión miocárdica.
ii) Los efectos de terapias de combinación dobles de exenatida, CsA y canrenoato de potasio a dosis que son menores que las dosis óptimas de monoterapia.
iii) El efecto de terapia de combinación triple de exenatida, CsA y canrenoato de potasio a la misma dosis de cada componente usado en la combinación doble.

El estudio se realizó para demostrar adicionalmente en un modelo de ratón que las terapias combinadas dobles con exenatida, CsA y canrenoato de potasio, después del inicio de la isquemia y antes de la reperfusión, dan lugar a reducción mejorada del tamaño del infarto en comparación con las monoterapias respectivas y que la terapia combinada triple con exenatida, CsA y canrenoato de potasio es más beneficiosa y ventajosa en comparación con terapias combinadas dobles.

Se usaron ratones C57BL/6 en este estudio. Los ratones eran machos, de 13-15 semanas de edad. Todos los animales fueron tratados según la Directiva 2010/63/UE del Convenio europeo para la protección de los animales vertebrados usados con fines experimentales y otros fines científicos, y se ajustaron a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (Publicación de NIH n.º 85-23, revisado en 1985). Las aprobaciones de los comités éticos y las autoridades veterinarias se obtuvieron antes de comenzar el estudio. Los controles ambientales en las habitaciones de los animales se ajustaron para mantener una temperatura

de 22 °C a 28 °C y una humedad relativa entre 30 % y 70 %. La temperatura ambiente y la humedad se registraron cada hora y se supervisaron diariamente. Hubo aproximadamente 10-15 intercambios de aire por hora en las habitaciones de los animales. El fotoperiodo fue de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se realizaron observaciones diarias rutinarias. Se disponía de pienso convencional para ratón de laboratorio y agua corriente filtrada a voluntad.

Se usan exenatida (Byetta®; Eli Lilly Nederland B.V.], CsA (Sandimmun®, Novartis Pharma A.G., Suiza) y canrenoato de potasio (Sigma-Aldrich, Alemania) como artículos de prueba, ya sea como monoterapias o en terapia combinada doble o triple. Se prepararon soluciones de dosificación de exenatida, CsA y canrenoato de potasio justo antes de la administración a los ratones. Se usó solución salina normal (NaCl 0,9 %) como control.

Los artículos de prueba/control se administraron por vía intravenosa, con anestesia general, para imitar la vía de administración esperada en el contexto clínico de infarto agudo de miocardio e intervención coronaria percutánea primaria.

El estudio siguió un diseño predeterminado controlado por placebo. En resumen, se asignaron aleatoriamente 149 ratones machos saludables, aclimatados, a una de las veinte (20) ramas de estudio. En todos los grupos, los ratones se sometieron a 30 minutos de isquemia regional del corazón (oclusión coronaria), seguido de 120 minutos (2 h) de reperfusión. En todos los casos, se realizaron tratamientos (administración intravenosa en embolada de solución salina o artículos de prueba o sus combinaciones) 20 minutos después del inicio de la isquemia (10 minutos antes del inicio de la reperfusión). Los experimentos finalizaron 2 h después de la reperfusión (final del estudio); se evaluó la lesión irreversible del miocardio (tamaño del infarto por histomorfometría) en este momento y fue el punto final primario del estudio. En la tabla 11 se resume el diseño del estudio.

Tabla 11. Protocolo experimental

Grupo de estudio (n.º de animales)	Tiempo de isquemia	Tiempo de reperfusión
CONTROL (n = 12)	30 min (Últimos 10 min con solución salina)	120 min de placebo (solución salina)
EXENATIDA 0,001 mg/kg (n = 5)	30 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
EXENATIDA 0,005 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
EXENATIDA 0,05 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
EXENATIDA 0,15 mg/kg (n = 7)	30 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
EXENATIDA 1,5 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con exenatida)	120 min de exenatida
CICLOSPORINA 0,001 mg/kg (n = 5)	30 min (Últimos 10 min con ciclosporina)	120 min de ciclosporina
CICLOSPORINA 0,01 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con ciclosporina)	120 min de ciclosporina
CICLOSPORINA 0,15 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con ciclosporina)	120 min de ciclosporina
CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 7)	30 min (Últimos 10 min con ciclosporina)	120 min de ciclosporina
CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con ciclosporina)	120 min de ciclosporina
CANRENOATO DE P. 0,03 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con canrenoato de potasio)	120 min de canrenoato de potasio

(continuación)

Grupo de estudio (n.º de animales)	Tiempo de isquemia	Tiempo de reperfusión
CANRENOATO DE P. 0,3 mg/kg (n = 7)	30 min (Últimos 10 min con canrenoato de potasio)	120 min de canrenoato de potasio
CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con canrenoato de potasio)	120 min de canrenoato de potasio
CANRENOATO DE P. 10 mg/kg (n = 8)	30 min (Últimos 10 min con canrenoato de potasio)	120 min de canrenoato de potasio
EXENATIDA 0,05 mg/kg + CICLOSPORINA 0,15 mg/kg (n = 5)	30 min (Últimos 10 min con exenatida y ciclosporina)	120 min de exenatida y ciclosporina
EXENATIDA 0,05 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 11)	30 min (Últimos 10 min con exenatida y canrenoato de potasio)	120 min de exenatida y canrenoato de potasio
EXENATIDA 0,05 mg/kg + CANRENOATO DE P. 10 mg/kg (n = 6)	30 min (Últimos 10 min con exenatida y canrenoato de potasio)	120 min de exenatida y canrenoato de potasio
CICLOSPORINA 0,15 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 6)	30 min (Últimos 10 min con ciclosporina y canrenoato de potasio)	120 min de ciclosporina y canrenoato de potasio
EXENATIDA 0,05 mg/kg + CICLOSPORINA 0,15 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 6)	30 min (Últimos 10 min con exenatida y ciclosporina y canrenoato de potasio)	120 min de exenatida y ciclosporina y canrenoato de potasio

Anestesia/preparación quirúrgica. Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal (0,01 ml/kg) con una combinación de ketamina, xilazina y atropina (las dosis finales de ketamina, xilazina y atropina fueron de 100, 20 y 0,6 mg/kg, respectivamente). La profundidad anestésica se evaluó mediante la pérdida de reflejo pedio al estímulo de pellizco de los dedos y la frecuencia respiratoria. Se realizó una traqueotomía para respiración artificial a 120-150 respiraciones/min y presión telespiratoria positiva 2,0 (0,2 ml de volumen corriente total; ventilador para roedores Flexivent, Scireq, Montreal, ON, Canadá). Después se realizó una toracotomía entre las costillas cuarta y quinta y el pericardio se retiró cuidadosamente para visualizar el descendente anterior izquierdo (DAI), que se ligó usando una sutura de polipropileno de monofilamento Prolene 8-0 colocada 1 mm por debajo de la punta de la aurícula izquierda. El corazón se dejó estabilizar durante 12 minutos antes de la ligadura para inducir isquemia. Después del periodo isquémico, se liberó la ligadura permitiendo la reperfusión del miocardio. A lo largo de los experimentos, la temperatura corporal se mantuvo a 37 ± 0,5 °C por medio de una almohadilla térmica y se supervisó mediante un termopar insertado por vía rectal.

Histopatología/histomorfometría. Después de la reperfusión, los animales se sacrificaron con una inyección intraperitoneal de la mezcla anestésica de ketamina (200 mg/kg) y xilazina (50 mg/kg) (0,02 ml/kg), se extrajeron rápidamente los corazones de los ratones y se canularon directamente y se lavaron con 2,5 ml de heparina salina al 1 % para extracción de sangre. Se infundieron cinco ml de tampón de fosfato TTC al 1 % a 37 °C en la circulación coronaria; el tejido se incubó durante 5 minutos en el mismo tampón. Después se infundió azul de Evans diluido al 1 % en agua destilada (2,5 ml) en el corazón. Los corazones se mantuvieron a -20 °C durante 24 horas y después se cortaron en secciones de 1 mm paralelas al surco auriculoventricular y después se fijaron en formalina al 4 % durante una noche. Después, los cortes se comprimieron entre placas de vidrio separadas 1 mm y se fotografiaron con una cámara digital Cannon Powershot A620 a través de un microscopio Zeiss 459300 y se midieron con el programa Scion Image. Las áreas de tejido miocárdico en riesgo e infartadas se transformaron automáticamente en volúmenes. Los

volúmenes del área de infarto y en riesgo se expresaron en cm^3. Para cada portaobjetos, el AER se expresó como un porcentaje del área del VI (AER/VI) y el IF se expresó como un porcentaje del AER (IF/AER). En todos los casos, personal sin conocimiento de la asignación de tratamiento/diseño del estudio realizó histomorfometría cuantitativa.

Análisis de datos/estadística. Todos los resultados se presentan como media + ETM. Las comparaciones de variables numéricas entre los grupos se analizaron usando un modelo de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con corrección de Bonferroni y con análisis post hoc de Tukey. Se realizaron análisis usando un paquete de software estadístico Stata 13.1 (StataCorp, TX, EE. UU.). Un valor de P calculado de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Observaciones/resultados de animales.

El área del ventrículo izquierdo (VI) y el área isquémica (AER) fueron similares en todos los animales y no difirieron estadísticamente entre los grupos de estudio. La inducción de isquemia (30 min) y reperfusión (120 min) en el grupo de control dio lugar a una lesión significativa al miocardio de animales experimentales (47,4 ± 1,9 %), lo que indica la implementación suficiente del modelo y la reproducibilidad del procedimiento experimental del estudio.

La monoterapia de exenatida (0,001 mg/kg - 1,5 mg/kg) provocó un efecto de respuesta a dosis con las dosis de 0,005 mg/kg y 0,05 mg/kg para provocar una reducción del tamaño del infarto en 36,9 % (29,9 ± 1,8 %; P < 0,05) y 31,6 % (32,4 ± 1,9 %; P < 0,05), respectivamente, en comparación con el grupo de control. La monoterapia de ciclosporina (0,001 mg/kg - 2,5 mg/kg) provocó un efecto de respuesta a dosis con las dosis de 0,01 mg/kg y 0,15 mg/kg para provocar una reducción del tamaño del infarto en 43,7 % (26,7 ± 2,8 %; P < 0,05) y 49,4 % (24 ± 1,9 %; P < 0,05), respectivamente, en comparación con el grupo de control. La monoterapia de canrenoato de potasio (0,03 mg/kg - 10 mg/kg) provocó un efecto de respuesta a dosis con las dosis de 1 mg/kg y 10 mg/kg para provocar una reducción del tamaño del infarto en 30 % (33,2 ± 2,4 %; P < 0,05) y 58,9 % (19,5 ± 2,5 %; P < 0,05), respectivamente, en comparación con el grupo de control.

La combinación doble de exenatida y ciclosporina provocó una reducción en la extensión del infarto en 52,5 % (22,5 ± 2,3 %; *P* < 0,05) en comparación con el grupo de control. Sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo en comparación con las dosis de monoterapia respectivas de exenatida y ciclosporina. La combinación doble de exenatida y canrenoato de potasio provocó una reducción en la extensión del infarto en 70,9 % (13,8 ± 1,3 %; P < 0,01) en comparación con el grupo de control. Resulta interesante que el efecto de la combinación también fue estadísticamente significativo (P < 0,05) en comparación con las dosis respectivas de monoterapias de exenatida y canrenoato de potasio. Sin embargo, cuando la exenatida se combinó con una dosis mayor (10 mg/kg) de canrenoato de potasio redujo el tamaño del infarto en 52,3 % (22,6 ± 2 %), lo que no fue estadísticamente significativo con las respectivas monoterapias. La combinación doble de ciclosporina y canrenoato de potasio provocó una reducción en la extensión del infarto en 61,4 % (18,3 ± 2,6 %; *P* < 0,05) en comparación con el grupo de control. Sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo en comparación con las dosis de monoterapia respectivas de ciclosporina y canrenoato de potasio. Finalmente, una combinación triple de exenatida, ciclosporina y canrenoato de potasio provocó una reducción en la extensión del infarto en 56,7 % (20,5 ± 2 %; *P* < 0,05) en comparación con el grupo de control. Sin embargo, este efecto no fue estadísticamente significativo en comparación con las dosis de monoterapia respectivas de exenatida, ciclosporina y canrenoato de potasio.

La tabla 12 presenta datos que muestran las relaciones de área de riesgo con respecto a ventricular izquierda y área infartada con respecto a área de riesgo para cada grupo usado en este estudio.

Tabla 12. Resultados de histopatología del estudio

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control	Significación en IF/AER frente a monoterapias
CONTROL (n = 12)	53,1 ± 1,8	47,4 ± 1,9	-	-	-
EXENATIDA 0,001 µg/kg (n = 5)	56,1 ± 2,5	44,8 ± 3,8	-5,5	*ns*	-
EXENATIDA 0,005 µg/kg (n = 8)	51,4 ± 4,5	29,9 ± 1,8	-36,9	*P* < 0,05	"

(continuación)

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control	Significación en IF/AER frente a monoterapias
EXENATIDA 0,05 µg/kg (n = 8)	53,1 ± 2,2	32,4 ± 1,9	-31,6	*P* < 0,05	"
EXENATIDA 0,15 µg/kg (n = 7)	54,5 ± 2	41 ± 3	-13,5	*ns*	-
EXENATIDA 1,5 µg/kg (n = 8)	54,8 ± 2,6	45,4 ± 2,1	-4,2	*ns*	-
CICLOSPORINA 0,001 mg/kg (n = 5)	58 ± 5,7	36,6 ± 2,4	-22,8	*ns*	
CICLOSPORINA 0,01 mg/kg (n = 8)	48,6 ± 2,82	26,7 ± 2,8	-43,7	*P* < 0,05	
CICLOSPORINA 0,15 mg/kg (n = 8)	50,7 ± 2,9	24 ± 1,9	-49,4	*P* < 0,05	
CICLOSPORINA 0,5 mg/kg (n = 7)	56,4 ± 3,6	33,6 ± 2,5	-29,1	*P* < 0,05	
CICLOSPORINA 2,5 mg/kg (n = 8)	50,4 ± 1,9	30 ± 2,4	-36,7	*P* < 0,05	
CANRENOATO DE P. 0,03 mg/kg (n = 8)	59,4 ± 5,8	46 ± 2,5	-3	*ns*	
CANRENOATO DE P. 0,3 mg/kg (n = 7)	55,5 ± 6,1	44 ± 3,2	-7,2	*ns*	
CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 8)	52,4 ± 1,4	33,2 ± 2,4	-30	*P* < 0,05	"
CANRENOATO DE P. 10 mg/kg (n = 8)	45,8 ± 1,2	19,5 ± 2,5	-58,9	*P* < 0,05	
EXENATIDA 0,05 µg/kg + CICLOSPORINA 0,15 mg/kg (n = 5)	54,8 ± 5,6	22,5 ± 2,3	-52,5	*P* < 0,05	*ns*
EXENATIDA 0,05 µg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 11)	55,5 ± 2,9	13,8 ± 1,3	-70,9	*P* < 0,01	*P* < 0,05
EXENATIDA 0,05 µg/kg + CANRENOATO DE P. 10 mg/kg (n = 6)	53,5 ± 3,1	22,6 ± 2	-52,3	*P* < 0,05	*ns*

(continuación)

Grupo	AER/VI (% media ± ETM)	IF/AER (% media ± ETM)	Diferencia (%) en IF/AER con respecto a control	Significación en IF/AER frente a control	Significación en IF/AER frente a monoterapias
CICLOSPORINA 0,15 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 6)	56,1 ± 4,4	18,3 ± 2,6	-61,4	*P* < 0,05	*ns*
EXENATIDA 0,05 µg/kg + CICLOSPORINA 0,15 mg/kg + CANRENOATO DE P. 1 mg/kg (n = 6)	55,7 ± 3,2	20,5 ± 2	-56,7	*P* < 0,05	*ns*

Estos resultados muestran que en un modelo de animal (murino) normalizado adicional de isquemia miocárdica aguda y lesión por reperfusión, la terapia combinada de exenatida, ciclosporina y canrenoato de potasio cuando se administró como una embolada IV a los 10 minutos antes del inicio de la reperfusión pudo producir una mayor reducción en el tamaño del infarto de miocardio en comparación con grupos de monoterapia de exenatida o CsA o canrenoato de potasio. Es de gran interés que los resultados actuales proporcionen pruebas sólidas de que la terapia combinada de canrenoato de potasio con exenatida redujo el alcance de la lesión miocárdica también de manera sinérgica, ya que la reducción obtenida con la combinación supera la suma de las reducciones de las monoterapias respectivas. En consecuencia, estos resultados demuestran que en la terapia de lesión por reperfusión miocárdica, la administración combinada de exenatida y canrenoato de potasio proporciona el mayor efecto de cardioprotección en comparación con las respectivas monoterapias u otras combinaciones dobles o triples. Como tal, la combinación de exenatida y canrenoato de potasio es excepcionalmente útil en los métodos para prevenir y tratar la lesión por isquemia-reperfusión en sujetos mamíferos.

Diversas modificaciones y variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia sin alejarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe considerarse limitada indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que sean evidentes para los expertos en los campos relevantes estén abarcadas por la presente invención.

Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto mencionada en los párrafos adjuntos a la misma según lo permitido por la ley aplicable.

Todos los títulos y subtítulos se usan en el presente documento solo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende un modulador de insulina, en donde el modulador de insulina es exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un antagonista de aldosterona, en donde el antagonista de aldosterona es canrenoato de potasio.

2. Una combinación según la reivindicación 1 que comprende al menos un ingrediente farmacéutico activo (IFA) adicional seleccionado de un betabloqueante, un inhibidor de renina-angiotensina, una estatina (inhibidor de la HMG-CoA reductasa), un inhibidor de la activación o agregación plaquetaria, un inhibidor de la fosfodiesterasa-3, un sensibilizador de calcio, un antioxidante y un agente antiinflamatorio.

3. Una composición farmacéutica que comprende una combinación según cualquier reivindicación anterior y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3 en una forma adecuada para administración parenteral, preferentemente administración intravenosa.

5. Un producto farmacéutico que comprende un modulador de insulina, en donde el modulador de insulina es exenatida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un antagonista de aldosterona, en donde el antagonista de aldosterona es canrenoato de potasio.

6. Una combinación según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una composición farmacéutica según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos.

7. Una combinación o una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en donde la lesión por isquemia y/o reperfusión es lesión por isquemia y/o reperfusión del cerebro, corazón, pulmón, riñón, preferentemente isquemia miocárdica, lesión por reperfusión miocárdica o infarto agudo de miocardio.

8. Una combinación o una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6 o la reivindicación 7 en donde los componentes son para administración por vía intravenosa.

9. Una combinación o una composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en donde los componentes son para administración durante la reperfusión.

10. Una combinación o una composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en donde los componentes son para administración antes de la reperfusión.

11. Una combinación o una composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 en donde los componentes son para administración después de la reperfusión.

12. Un producto farmacéutico según la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de uno o más de los siguientes: lesión por isquemia y/o reperfusión, ictus isquémico, paro cardíaco, infarto agudo de miocardio, asfixia neonatal y choque cardiógeno, o para su uso en el suministro de cardioprotección contra fármacos cardiotóxicos, en donde los componentes son para administración simultánea, secuencial o por separado.

13. Un producto farmacéutico para su uso según la reivindicación 12, en donde la lesión por isquemia y/o reperfusión es lesión por isquemia y/o reperfusión del cerebro, corazón, pulmón, riñón, preferentemente isquemia miocárdica, lesión por reperfusión miocárdica o infarto agudo de miocardio.

14. Un producto farmacéutico para su uso según la reivindicación 12 o la reivindicación 13 en donde los componentes son para administración parenteral, preferentemente administración intravenosa.

15. Un producto farmacéutico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en donde los componentes son para administración durante la reperfusión.

16. Un producto farmacéutico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en donde los componentes son para administración antes de la reperfusión.

17. Un producto farmacéutico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en donde los componentes son para administración después de la reperfusión.

18. Un producto farmacéutico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 en donde los componentes son para administración simultánea.

19. Uso de una combinación que comprende un modulador de insulina, en donde el modulador de insulina es exenatida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un antagonista de aldosterona, en donde el antagonista de aldosterona es canrenoato de potasio, para tratar y/o prevenir la lesión por isquemia y/o reperfusión en un órgano *ex vivo* antes del trasplante.

20. Un uso según la reivindicación 19 en donde la lesión por isquemia y/o reperfusión es isquemia miocárdica, lesión por reperfusión miocárdica o infarto agudo de miocardio.

21. Un uso según la reivindicación 19 o la reivindicación 20 en donde los componentes se administran antes del trasplante.