



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 409**

51 Int. Cl.:
A61K 31/51 (2006.01)
A23L 1/302 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05708123 .4**
96 Fecha de presentación : **19.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1708711**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Composiciones útiles especialmente para el tratamiento o prevención del síndrome metabólico.**

30 Prioridad: **30.01.2004 FI 20040136**
14.06.2004 US 578896 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2010

73 Titular/es: **Biotie Therapies Oyj**
Tykistökatu 6 A
20520 Turku, FI

72 Inventor/es: **Jalkanen, Sirpa;**
Salmi, Marko y
Jalkanen, Markku

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 342 409 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones útiles especialmente para el tratamiento o prevención del síndrome metabólico.

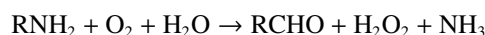
5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere al uso de inhibidores de amino oxidasas sensibles a la semicarbacida (SSAO) para el tratamiento o prevención del síndrome metabólico y enfermedades o afecciones resultantes de éste. La invención también se refiere al uso de la vitamina B1 o sus metabolitos como inhibidores de SSAO.

10 **Antecedentes de la invención**

VAP-1 es una molécula de adhesión de células endoteliales humanas que tiene varias propiedades únicas que la distinguen de otras moléculas de adhesión relacionadas con la inflamación. Una de las características más interesantes de VAP-1 es un dominio catalítico extracelular que contiene una actividad monoamino oxidasa (Smith, D. J., *et al.*, J. Exp. Med 188:17-27 (1998)).

El clonado y la secuenciación del ADNc de VAP-1 humana reveló que codifica una proteína de transmembrana homóloga a una clase de enzimas denominadas amino oxidasas que contienen cobre (E.C. 1.4.3.6). Los ensayos enzimáticos han demostrado que VAP-1 posee una actividad monoamino oxidasa (MAO) que está presente en el dominio extracelular de la proteína (Smith, D. J. *et al.*, J. Exp. Med 188:17-27 (1998)). Por lo tanto, VAP-1 es una ecto-enzima. EL análisis de la actividad MAO de VAP-1 mostró que VAP-1 pertenece a una clase de MAOs unidas a membrana denominadas amino oxidasas sensibles a la semicarbacida (SSAO). Estas se distinguen de las ampliamente distribuidas MAO-A mitocondriales y de las flavoproteínas B en la secuencia de aminoácidos, el cofactor, la especificidad del sustrato y la sensibilidad a determinados inhibidores. Sin embargo, determinados sustratos e inhibidores son comunes a ambas actividades SSAO y MAO. Las SSAOs de mamíferos pueden metabolizar varias monoaminas producidas endógenamente o absorbidas como sustancias de la dieta o xenobióticas. Actúan principalmente sobre las monoaminas alifáticas o aromáticas tales como metilamina y benzilamina (Lyles G. A., Int J. Biochem. Cell Biol, 28:259-274 (1996)). Por lo tanto, VAP-1 localizada en la superficie celular del endotelio vascular puede actuar sobre las monoaminas primarias circulantes según la siguiente ruta de reacción.



Los sustratos fisiológicos de SSAO de VAP-1 en el hombre no han sido claramente identificados. Sin embargo, la metilamina es un buen sustrato para SSAO de VAP-1. La metilamina es un producto de varias rutas bioquímicas humanas para la degradación de creatinina, sarcosina y adrenalina, y se encuentra en diversos tejidos animales y en la sangre. Puede también derivarse de la dieta por degradación con bacterias intestinales de los precursores alimenticios. La concentración de metilamina en la sangre puede incrementarse en determinadas situaciones fisiológicas y patológicas tal como la diabetes. Otro sustrato potencial es la aminocetona.

Se ha propuesto que la actividad SSAO de VAP-1 está directamente involucrada en la ruta de la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales por un nuevo mecanismo que implica la interacción directa con un sustrato amina presentado sobre un ligando VAP-1 expresado en la superficie de un leucocito (Salmi *et al.* Immunity, vol. 14, pp. 265-276 (2001)). Esta publicación describe la implicación directa de la actividad SSAO de VAP-1 en el proceso de adhesión de los leucocitos al endotelio. Por lo tanto se podría esperar que los inhibidores de la actividad SSAO de VAP-1 redujeran la adhesión de los leucocitos en las áreas de inflamación y de ese modo reducir la circulación de los leucocitos hacia las regiones inflamadas y por lo tanto el proceso inflamatorio en sí mismo.

La expresión de VAP-1 en las muestras clínicas de tejidos humanos está inducida en las zonas de inflamación. Este incremento del nivel de VAP-1 puede conducir al incremento de la producción del H_2O_2 generada procedente de la acción del domino extracelular SSAO de VAP-1 en las monoaminas presentes en la sangre. Esta producción de H_2O_2 en el entorno localizado de la célula endotelial podría iniciar otros eventos celulares. El H_2O_2 es una molécula de señalización conocida que puede regular al alza otras moléculas de adhesión y esta expresión incrementada de las moléculas de adhesión puede conducir a aumentar la circulación de leucocitos hacia las zonas en las que se expresa VAP-1. También puede ser que otros productos de la reacción de SSAO de VAP-1 pudiesen tener efectos biológicos que también contribuyan al proceso inflamatorio. Por lo tanto los productos de la actividad SSAO de VAP-1 pueden estar involucrados en una intensificación del proceso inflamatorio que se podría bloquear por medio de inhibidores específicos de SSAO.

SSAO de VAP-1 puede estar involucrada en una serie de otros estados patológicos asociados con un nivel incrementado de aminas circulantes sustratos de SSAO de VAP-1. La deaminación oxidativa de estos sustratos conduciría a un incremento en el nivel de aldehídos tóxicos y de radicales oxígeno en el entorno local de las células endoteliales que podría dañar a las células llevando a un daño vascular. Se ha propuesto que las vasculopatías tales como la retinopatía, neuropatía y nefropatía se pudiesen tratar con inhibidores específicos de la actividad SSAO.

Takahashi, H. *et al.*, Yakugaku Zasshi 101 (12):1154-1156 (1981) informan de la síntesis de una serie de N-alquilaminoefedrinas, que incluyen N-(isopropil-deneamino)-efedrina o R,S-(+)-(2-hidroxi-1-metil-2-feniletil)metil hidra-

ES 2 342 409 T3

zona-2-propanona. Estos compuestos de hidrazonas se sintetizaron para evaluar su efecto sobre la musculatura de los bronquios y se encontró que no presentaban ninguna actividad significativa.

5 Grifantini, M., *et al.*, *Farmaco*, Ed. Sci. 23(3):197-203 (1968) informan de la síntesis de varios derivados aquilo- y acilo- de N-amino-1-efedrina y N-amino-d-pseudoefedrina que tienen propiedades antidepressivas e inhibitoras de monoamino oxidasa.

10 Jeffrey O'Sullivan *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1647 (2003) 367-371 informan de la inhibición de amino oxidasas sensibles a semicarbacida por determinadas amonohexosas principalmente, principalmente glucosamina, galactosamina y manosamina.

15 Las publicaciones de patentes internacionales WO02/020290 y WO 03/006003 describe determinados compuestos hidrazina de utilidad como inhibidores específicos de SSAO de VAP-1 que modulan la actividad VAP-1. Se describe la utilidad de estos compuestos para el tratamiento de afecciones o enfermedades inflamatorias agudas y crónicas así como en enfermedades relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono, en aberraciones en la diferenciación o función de adipocitos y en diferentes enfermedades vasculares.

Objeto y Compendio de la invención

20 Basándonos en un reciente estudio al que nos referiremos a continuación, los inventores han encontrado que los ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína-1 de adhesión vascular (VAP-1), provocados crónicamente con un sustrato de SSAO adicional o con una dieta aterogénica, mostraban un incremento de la ingesta de glucosa, comparados con los ratones no transgénicos. Un producto final del metabolismo de SSAO, el peróxido de hidrógeno puede producir efectos similares a la insulina aumentando la ingesta de glucosa. Basándose en estos hallazgos, los inventores proponen que la actividad de la enzima amino oxidasa se incrementa en el síndrome metabólico en un intento de regular los niveles de glucosa de la sangre, y que las complicaciones que resultan del síndrome metabólico son estimuladas posteriormente como consecuencia del incremento de la actividad enzimática.

30 Según un primer aspecto, esta invención se refiere al uso de un inhibidor de la enzima amino oxidasa para la fabricación de una preparación farmacéutica de utilidad en el tratamiento o prevención del síndrome metabólico y enfermedades o afecciones resultantes del mismo.

35 Según otro aspecto, la invención se refiere al uso de la vitamina B1 o uno de sus metabolitos para la fabricación de una preparación farmacéutica de uso como inhibidor de la enzima amino oxidasa en el tratamiento o prevención del síndrome metabólico o de enfermedades o afecciones resultantes del mismo.

Descripción detallada de la invención

40 El término "síndrome metabólico" se entiende que incluye las siguientes anomalías: obesidad central, dislipidemia incluyendo especialmente hipertrigliceridemia, colesterol HDL bajo, pequeñas partículas de LDL densas y lipidemia postpranial; intolerancia a la glucosa como la alteración de la glucosa en ayunas; resistencia a la insulina e hipertensión.

45 El término "complicación relacionadas con el síndrome metabólico" se entiende que incluye cualquier enfermedad o desorden resultante de dicho síndrome. Tales enfermedades son especialmente los distintos tipos de microalbuminuria; fibrinólisis deficiente incremento de la coagulabilidad que incluye PAI-1 elevado, fibrinógeno elevado y aumento de los niveles del factor von Willebrand; signos de inflamación crónica tales como CRP elevada; disfunción endotelial tal como vasodilatación dependiente del endotelio deficiente; enfermedad del hígado graso y microangiopatía. Como ejemplos no limitativos de enfermedades y trastornos específicos se pueden mencionar la aterosclerosis, reno-
50 patías vasculares, retinopatías, glomeruloesclerosis, nefropatía, síndrome nefrítico, polineuropatía, mononeuropatía, neuropatía autónoma, glaucoma, catarata gris, úlceras en el pie, problemas en las articulaciones, y riesgo de infección elevado.

Según Bo Isomaa, *Life Sciences* 73 (2003) 2395-2411, una persona sufre síndrome metabólico en el caso de que se cumplan tres de las cinco afecciones siguientes:

- 55
- 1.- Glucosa del plasma en ayunas > 6,1 mmol/l
 - 2.- Hipertrigliceridemia; triglicéridos > 1,7 mmol/l
 - 60 3.- Colesterol HDL bajo; < 1,0 mmol/l (hombres) y < 1,3 mmol/l (mujeres)
 - 4.- Hipertensión; presión sanguínea > 130/85 y/o medicación
 - 5.- Obesidad central; perímetro de la cintura >102 cm (hombres) y > 88 cm (mujeres).

65

El término "prevención" se entiende que incluye la prevención completa, la profilaxis, así como la disminución del riesgo personal de enfermar de dicha enfermedad o afección. Se entiende que termino incluye también el alivio de los síntomas ya desarrollados.

ES 2 342 409 T3

Los términos “cura” o “tratamiento” se entiende que incluyen la cura completa de una enfermedad o afección, así como la mejora o alivio de dicha enfermedad o afección.

El término “individuo” se refiere a un sujeto humano o animal.

El término “inhibidor de la enzima amino oxidasa” en la presente memoria se entiende que cubre cualquier compuesto conocido o todavía por descubrir que tenga esta actividad. También se entiende que cubre cualquier isómero, mezcla de isómeros, y cualquier sal de dicho compuesto farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

El inhibidor de la enzima monoamino oxidasa es especialmente útil en el tratamiento o prevención de las complicaciones derivadas de los síndromes metabólicos.

Cuando se usa en una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento del síndrome metabólico y de afecciones resultantes del mismo, el inhibidor de la enzima amino oxidasa, su isómero, la mezcla de isómeros o las sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar por diversas vías. Por ejemplo, la administración puede ser por inyecciones parenterales, subcutáneas, intravenosas, intraarticulares, intratecales, intramusculares, intraperitoneales, o intradérmicas, o por vía transdérmica, bucal, oromucosal, ocular o vía inhalación. Alternativamente, o al mismo tiempo, la administración puede ser por vía oral. Se prefiere especialmente la administración oral. Las formulaciones orales adecuadas incluyen p. ej. comprimidos convencionales o de liberación lenta y capsulas de gelatina.

La dosis de los compuestos requerida variará según la enfermedad o afección específica que se vaya a tratar, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la vía de administración y el compuesto específico que se vaya a utilizar.

Así, una dosis típica se encuentra en el intervalo de 0,1 microgramos/kg a 300 mg/kg, preferiblemente de 1,0 microgramos/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una sola dosis diaria, o el total de la dosis diaria se puede administrar en dosis divididas en dos, tres o cuatro veces al día.

Como ejemplos de enfermedades o afecciones inflamatorias se pueden mencionar

- Enfermedades o afecciones inflamatorias del tejido conectivo tales como espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis psoriática, osterartritis, o enfermedad degenerativa articular, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, síndrome de Bechet, policondritis recidivante, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso discoide, esclerosis sistémica, fascitis eosinofílica, polimiositis y dermatomiositis, polimialgia reumática, vasulitis, arteritis temporal, poliartritis nodosa, granulomatosis de Wegner, enfermedad mixta del tejido conectivo, artritis reumatoide juvenil,

- enfermedades o afecciones inflamatorias gastrointestinales, tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable (colon espástico), afecciones fibróticas del hígado, inflamación de la mucosa oral (estomatitis), y estomatitis aftosa recurrente,

- enfermedades o afecciones del sistema nervioso central, tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y lesiones por reperfusión isquémica asociadas al infarto isquémico,

- enfermedades o afecciones inflamatorias pulmonares, tales como asma, enfermedad obstructiva pulmonar crónica, o síndrome de dificultad respiratoria del adulto,

- enfermedades o afecciones inflamatorias de la piel, tales como dermatitis de contacto, psoriasis, pitiriasis rosada, liquen plano y pitiriasis rubra pilaris,

- afecciones inflamatorias relacionadas con trauma tisular o resultado de trasplante de órganos u otras operaciones quirúrgicas.

Como ejemplos de enfermedades relacionadas con aberraciones en la diferenciación o la función de los adipocitos o del funcionamiento de las células del tejido muscular liso se pueden mencionar la aterosclerosis y la obesidad.

Como ejemplos de enfermedades vasculares se pueden mencionar aterosclerosis ateromatosa, aterosclerosis no ateromatosa, enfermedad cardíaca isquémica, oclusión arterial periférica, tromboangiítis obliterante (enfermedad de Buerger), o la enfermedad y el fenómeno de Raynaud.

La invención se explicará en la siguiente Sección Experimental de manera no restrictiva.

Sección experimental

Objetivos específicos

En este trabajo se investiga el significado *in vivo* de la amino oxidación sensible a la semicarbacida elevada (SSAO). Para investigar la capacidad de la actividad de VAP-1 de mimetizar la insulina y para probar su habilidad para causar y/o exacerbar las complicaciones vasculares hemos sobreexpresado VAP-1, una molécula de superficie soluble de la

célula endotelial y que posee actividad SSAO, en ratones transgénicos y posteriormente provocados crónicamente a los ratones durante 15 meses con un sustrato de SSAO adicional o una dieta aterogénica.

Hallazgos principales

5

1) La sobreexpresión de VAP-1 humana crónica promueve la obesidad

10

A pesar de la disminución de la ingesta calórica los ratones transgénicos tuvieron un incremento de peso, del índice de masa corporal (BMI), y de los depósitos de tejido adiposo blanco abdominal subcutáneo y epididimal (WAT) comparados con los controles.

15

2) La glucosa en sangre está regulada por la actividad VAP-1

20

La combinación del transgen y la metilamina incrementó la ingesta de glucosa cuando los ratones estaban en ayunas y provocados con glucosa (Figura 1A). Este incremento se podría bloquear con una molécula pequeña inhibidora de SSAO (Figura 1B). Los niveles de glucosa en ayunas también se disminuyeron con el transgen y los niveles de HbA1c se disminuyeron con el transgen y/o el suplemento con metilamina (Figura 1C). La mejora de la glucosa en plasma y la tolerancia a la glucosa se puede explicar, al menos en parte, mediante la respuesta mejorada a la insulina del músculo esquelético (Figura 1D).

25

3) La sobreexpresión de VAP-1 incrementa la formación avanzada del producto final de la glicación (AGE)

Los niveles de péptidos AGE se midieron por espectroscopía de fluorescencia en el suero de ratones de 64 semanas de edad. El nivel de fluorescencia específica de AGE (*ex* 360, *em* 465) se incremento en presencia del transgen (Figura 2). La fluorescencia procedente del triptófano (*ex* 280, *em* 333), un estándar interno de la concentración de proteína, no varió significativamente entre los grupos.

30

4) El suplemento con metilamina promueve la hipertensión

Se midieron la presión sanguínea arterial sistólica y la frecuencia cardíaca en todos los grupos utilizando un el método del manguito inflable en la cola. El suplemento con metilamina elevó la presión sanguínea significativamente pero no afectó a la frecuencia cardíaca. También se encontró una tendencia a la presión sanguínea elevada con el transgen solo.

35

5) El suplemento con metilamina y con el transgen mTIEhVAP-1 modifica la progresión de la aterosclerosis

40

Se determinó el porcentaje de área de superficie de la aorta positivo para la tinción Rojo O al aceite para cada grupo de ratones. El suplemento con metilamina aumento el porcentaje de formación de lesiones comparado con los controles no tratados. El transgen disminuía el número de lesiones encontradas en cada aorta mientras que dejaba invariable el área total de formación de lesiones sugiriendo que las lesiones individuales eran mayores.

45

6) El transgen mTIEhVAP-1 inhibe la hipertrofia renal y glomerular mientras que al mismo tiempo promueve la glomerulosclerosis

La glomerulosclerosis es la principal lesión renal en diabetes humana y experimental. Su patogénesis es controvertida y el papel de la hipertrofia renal y glomerular en la patogénesis de la glomerulosclerosis no está claro. En este estudio las dos patologías renales no están asociadas.

50

La masa renal total disminuyó con el transgen. El transgen inhibió también un aumento de la masa renal inducido por una dieta aterogénica. Además el análisis morfométrico reveló una reducción del total de las áreas de superficie del glomérulo significativa específica del transgen y una inhibición de la hipertrofia glomerular inducida por una dieta aterogénica.

55

Por el contrario, el análisis histológico de las secciones renales reveló glomerulosclerosis (disminución del espacio capilar, incremento del número de células, incremento de la matriz extracelular, y un tallo glomerular engrosado) en los ratones transgénicos alimentados con una dieta aterogénica. También se encontraron lesiones glomerulares leves en ratones no transgénicos alimentados con una dieta aterogénica pero en menor medida que en los ratones transgénicos. Además, había quistes glomerulares ocasionales en los ratones transgénicos alimentados con una dieta aterogénica pero no estaban presentes en los ratones no transgénicos alimentados de manera similar.

60

Conclusiones e Importancia

65

El trabajo anterior demuestra que la actividad SSAO es elevada en el suero de pacientes con fallo cardiaco congestivo y enfermedades inflamatorias hepáticas específicas. En este estudio exhaustivo mostramos por primera vez datos *in vivo* que indican que la elevación de SSAO no es solamente una consecuencia benigna de diversos estados patológicos sino que es una causa de cambios fisiológicos y patológicos. Mediante la realización de estos experimentos

en ratones transgénicos revelamos las consecuencias del aumento de SSAO sin las complicaciones adicionales de los estados patológicos en los que se normalmente encuentran niveles elevados de SSAO.

Sugerimos que estos cambios son consecuencia de los productos finales substrato del metabolismo de SSAO: peróxido de hidrógeno, amoníaco, y aldehído. Por un lado el peróxido de hidrógeno puede producir efectos similares a la insulina que pueden ser importantes tanto para la obesidad (promoción de la lipogénesis e inhibición de la lipólisis) como para el síndrome metabólico (aumento de la ingesta de azúcar) y por otro lado el peróxido de hidrógeno es una especie reactiva de oxígeno (ROS) clave que está implicada en la toxicidad de la célula endotelial y en la patología cardiovascular. Además, el amoníaco y el formaldehído son extremadamente son productos químicos extremadamente reactivos y citotóxicos que pueden promover la glicación no enzimática aberrante de las proteínas y puede bien directamente o posteriormente contribuir a las complicaciones tardías de la diabetes como la hipertensión, aterosclerosis y nefropatía.

Aunque estos hallazgos parecen diametralmente opuestos no son mutuamente excluyentes. Proponemos que la actividad de VAP-1 se puede incrementar en el síndrome metabólico en un intento de regular los niveles de glucosa en sangre y que el daño vascular se causa posteriormente como una consecuencia secundaria de esta actividad enzimática crónica. Esto sugiere que la manipulación de VAP-1 tiene potencial para servir como un tratamiento terapéutico en afecciones relacionadas con el síndrome metabólico.

20 Experimentos

Referencia a las Figuras 1A-1D

La sobreexpresión de VAP-1 humana y el suplemento con metilamina aumentan la tolerancia a la glucosa. Los incrementos de glucosa en la sangre sobre los niveles de glucosa en ayunas a los 30, 60, 90 y 120 minutos de la provocación con glucosa (2,0 g IP glucosa/kg de peso corporal) se expresan como el promedio \pm SEM. (A) Provocación con glucosa en ratones transgénicos de 26 semanas de edad (símbolos en blanco) y ratones transgénicos mTIEhVAP-1 (símbolos rellenos) con agua corriente (líneas continuas) o con agua con un suplemento de metilamina (líneas discontinuas). Los efectos significativos en la tasa de depuración de glucosa se identificaron comparando las áreas de las curvas (AUC) de los ratones individuales con un ANOVA (metilamina $p=0,0002$ e interacción metilamina/transgen $p=0,046$) y mediante la comparación de los niveles de glucosa en momentos concretos con tests de t de Student no pareados (asteriscos, $p < 0,01$ frente a ratones no transgénicos con agua normal; cruces, $p < 0,02$ frente a ratones no transgénicos con metilamina). B) Provocación con glucosa de ratones transgénicos de 10-12 semanas de edad con agua corriente (línea continua) seguido de un tratamiento de 16 días con agua con un suplemento de metilamina (cuadrados y líneas discontinuas), y agua con un suplemento de metilamina además de inyecciones inhibitoras de SSAO (triángulos y líneas discontinuas). Se identificaron efectos significativos con tests de t de Student pareados en momentos concretos (asteriscos, $p < 0,01$ y cruz, $p = 0,037$ frente a ratones transgénicos con agua normal) y para las AUC (agua normal frente a agua tratada con metilamina, $p = 0,006$; tratada con metilamina frente a tratada con metilamina mas un inhibidor SSAO, $p = 0,0005$; agua normal frente a tratada con metilamina mas un inhibidor SSAO, $p=0,0008$). (C) Se determinó el promedio \pm SEM del porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c) a partir de sangre en ayunas, ratones de 57-59 semanas de edad no transgénicos (barras blancas) y transgénicos (barras negras) ratones con (barras grises) o sin suplemento con metilamina oral. Se encontraron efectos significativos sobre los niveles de HbA1c con un modelo ANOVA mixto (transgen $p = 0,03$ y suplemento de metilamina $p < 0,0001$), y se identifico una interacción transgen/metilamina ($p = 0,01$). Asteriscos, tests de t de Student, $p < 0,01$ frente a ratones no transgénicos con comida y bebida normales. (D) Actividad de transporte de glucosa de los músculos de los ratones no transgénicos y mTIEhVAP-1 transgénicos. Se utilizaron los músculos sóleos de ratones no transgénicos (NT, barras blancas) y transgénicos (TG, barras negras) con (barras grises) o sin suplemento oral con metilamina durante 14 días para medir las tasas de insulina basal y simulada del transporte de 2-[1- 14 C]- deoxy-D-glucosa. Los valores se representan como el promedio \pm SEM del incremento del transporte comparado con el transporte basal en ratones no transgénicos sin tratamiento. Asteriscos, $p < 0,05$ frente a muestras no transgénicas basales. Cruz, diferencia significativa al comparar con ratones no transgénicos solamente con insulina ($p = 0,02$) o ratones no transgénicos con insulina y metilamina ($p = 0,01$).

Referencia a las Figuras 2A-2B

(A) Formaldehído, el producto de reacción de SSAO, promueve la formación de AGE *in vitro*. Se midió periódicamente durante 11 días el espectro de fluorescencia específico de AGE (*ex 360/em 465*) de las muestras de proteínas (20 mg/ml ARNasa) incubadas a 37°C con o sin glucosa 0,5M y formaldehído al 0,008%. AU, unidades arbitrarias. (B) El transgen mTIEhVAP-1 incrementa los niveles de péptido-AGE en el suero de ratones de 64 semanas de edad. El espectro de fluorescencia específico de AGE (*ex 360/em 465*) de ratones no transgénicos (NT, barras vacías) y transgénicos (TG, barras rellenas) después de alimentación crónica con comida normal (pienso) y agua (corriente), agua con un suplemento de metilamina (Methyl.), o una dieta aterogénica (athero.). Se encontró un incremento significativo de la fluorescencia específica de AGE con el transgen al analizar todos los tratamientos juntos (ANOVA, efecto transgen $p = 0,05$) y al analizar los ratones con solo comida y agua normales (asterisco, test de t de Student no pareado $p = 0,05$). AU, unidades arbitrarias.

Proponemos que la actividad SSAO aumenta en la diabetes en un intento de regular los niveles de glucosa de la sangre y que las complicaciones vasculares son posteriormente promovidas como una consecuencia secundaria de la actividad crónica de SSAO. Cuando se incrementan los niveles *in vivo* de VAP-1 (en respuesta a la diabetes o por

ES 2 342 409 T3

sobreexpresión transgénica) se incrementa el potencial para la actividad SSAO. La desamidación por VAP-1 de las aminas primarias, tal como la metilamina, produce los compuestos biológicamente activos peróxido de hidrógeno, amoníaco, y aldehído. Estos compuestos a su vez pueden producir efectos beneficiosos similares a los de la insulina mientras que al mismo tiempo promueven la formación de AGE y el daño vascular que es típico de la diabetes.

5

Vitamina B1 y sus metabolitos como inhibidores de VAP-1

Detección fluorométrica de la formación de H₂O₂ por medio de SSAO

10

Se midió la actividad SSAO de las células utilizando el reactivo Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina; Molecular Probes Europe BV), una sonda para H₂O₂ altamente sensible y estable. Los cultivos celulares (células CHO transfectadas con VAP-1 y los controles que simulan transfección) se lavaron con Krebs Ringer glucosa con fosfato (KRP; NaCl 145 mM, fosfato sódico 5,7 mM, KCl 4,68 mM, CaCl₂ 0,54 mM, MgSO₄ 1,22 mM, glucosa 5,5 mM, pH 7,35) y se pre-incubaron 30 minutos a 37°C en 200 μ l KRP que contenía tiamina, penicilina o ampicilina (1 mg/ml). Se inició la reacción catalítica añadiendo bencilamina como sustrato y una mezcla para detectar H₂O₂ que contiene peroxidasa de rábano (concentración final 0,8 U/ml) y reactivo Amplex Red (60 μ M). Se incubaron las placas durante 1-2 horas a 37°C en el volumen final de 250 μ l, se clarificó del medio del baño por centrifugación y se colocaron alícuotas (200 μ l) en microplacas blancas no fosforescentes (Cliniplate). Se midió la intensidad de la fluorescencia de las muestras (excitación, 545 nm; emisión, 590 nm; fluoropolarómetro Tecan ULTRA) y se calculó la concentración de H₂O₂ a partir de las curvas de calibración generadas por las diluciones seriadas bien de H₂O₂ estándar o de resorufina, el producto de la reacción Amplex Red (Sondas Moleculares).

15

20

Medidas Radiométricas de la Actividad Monoamino Oxidasa

25

Se comprobó la actividad amino oxidasa radioquímicamente utilizando hidrocloreto de bencilamina [^{7-¹⁴C}] (spec. act. 57 mCi/mmol, Amersham) como sustrato y 25 microlitros de suero. La reacción se inició añadiendo 6 μ mol/L de bencilamina [¹⁴C] (40000 dpm) y se terminó una hora después con ácido cítrico. Los aldehídos se extrajeron en tolueno que contiene difeniloxazol y se cuantificó la formación de benzaldehído marcado con [¹⁴C] por conteo de centelleo. Se midió la inhibición potencial de la actividad enzimática del suero VAP-1/SSAO en presencia de las concentraciones indicadas de tiamina. Finalmente, se midió la actividad enzimática del suero VAP-1/SSAO de seis voluntarios antes y después de ingerir 100 mg/día de vitamina B1 durante 5 a 9 días.

30

Resultados

35

El porcentaje de inhibición obtenido con tiamina después de tratar células CHO transfectadas con VAP-1 fue del 37% con 1 mg/ml y del 38% con 200 microgramos/ml y del 7% con 100 microgramos/ml en un ensayo fluorométrico, mientras que los controles, penicilina y ampicilina, no inhibían la actividad. La tiamina *in vitro* disminuía la actividad del suero VAP-1/SSAO de la siguiente manera: 1 mg/ml, 87%; 800 microgramos/ml, 70%; 400 microgramos/ml 39%; 200 microorganismos/ml 32%. La respuesta *in vivo* de la actividad enzimática de VAP-1/SSAO a la vitamina B1 variaba dependiendo de los individuos. Cuatro de los seis voluntarios respondieron a la vitamina B. La actividad de la enzima VAP-1 al final del experimento había disminuido: 25, 2, 32 y 16% (promedio 19%).

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de un inhibidor de la enzima amino oxidasa en la fabricación de una preparación farmacéutica de uso para el tratamiento o la prevención del síndrome metabólico y enfermedades o afecciones resultantes de éste.

2. El uso según la reivindicación 1 donde la enfermedad es una complicación del síndrome metabólico.

10 3. El uso según la reivindicación 2, donde la complicación es microalbuminuria; fibrinólisis deficiente y coagulabilidad aumentada incluyendo PAI-1 elevado, fibrinógeno elevado y aumento de los niveles del factor von Willebrand; signos de inflamación crónica como CRP elevada; disfunción endotelial tal como vasodilatación dependiente del endotelio deficiente; enfermedad del hígado graso y microangiopatía o cualquier afección o enfermedad derivada de las mismas.

15 4. El uso según las reivindicaciones 2 o 3, donde la complicación resultado del síndrome metabólico se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, retinopatías vasculares, retinopatías, glomeruloesclerosis, nefropatía, síndrome nefrítico, polineuropatía, mononeuropatía, neuropatía autónoma, glaucoma, catarata gris, úlceras en el pie, problemas en las articulaciones, y riesgo alto de infección.

20 5. El uso de vitamina B1 o sus metabolitos en la fabricación de una preparación farmacéutica de uso como inhibidor de una enzima amino oxidasa en el tratamiento o prevención del síndrome metabólico o enfermedades y afecciones resultantes del mismo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

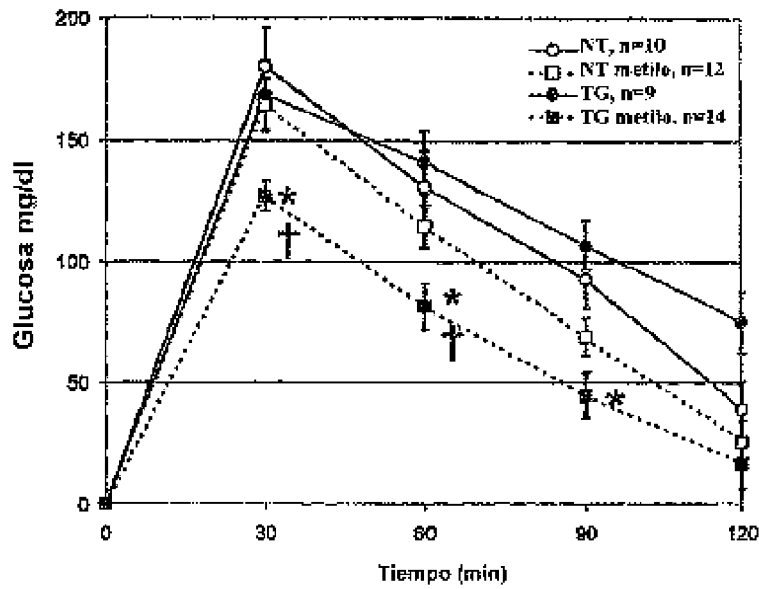


FIG. 1A

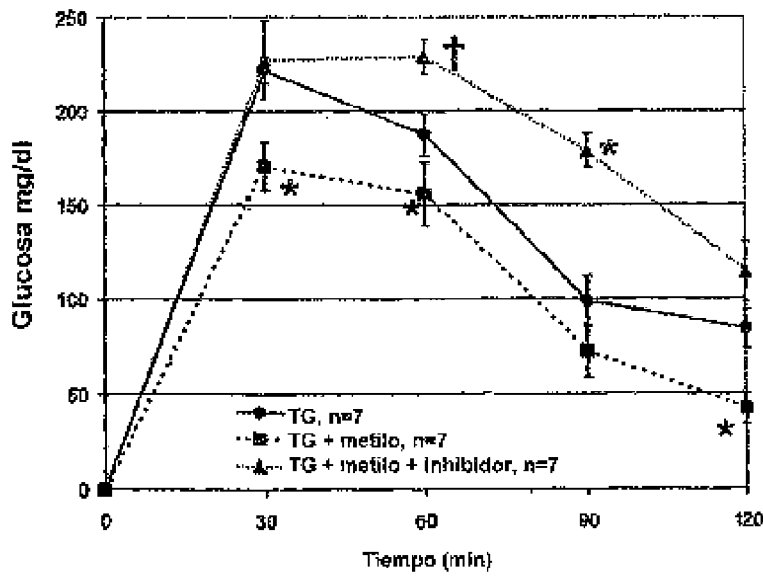


FIG. 1B

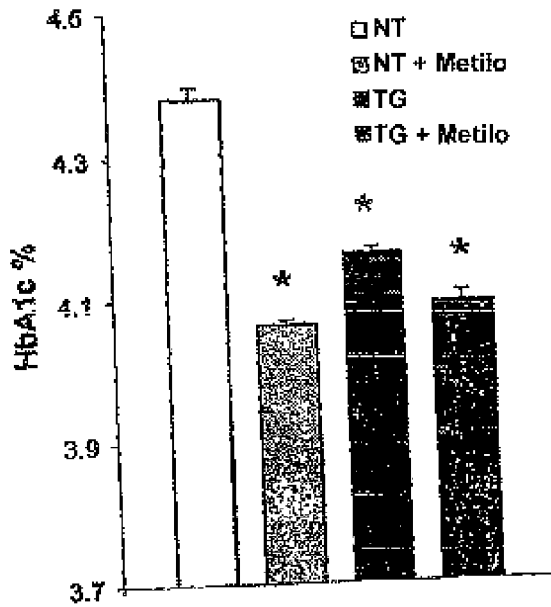


FIG. 1C

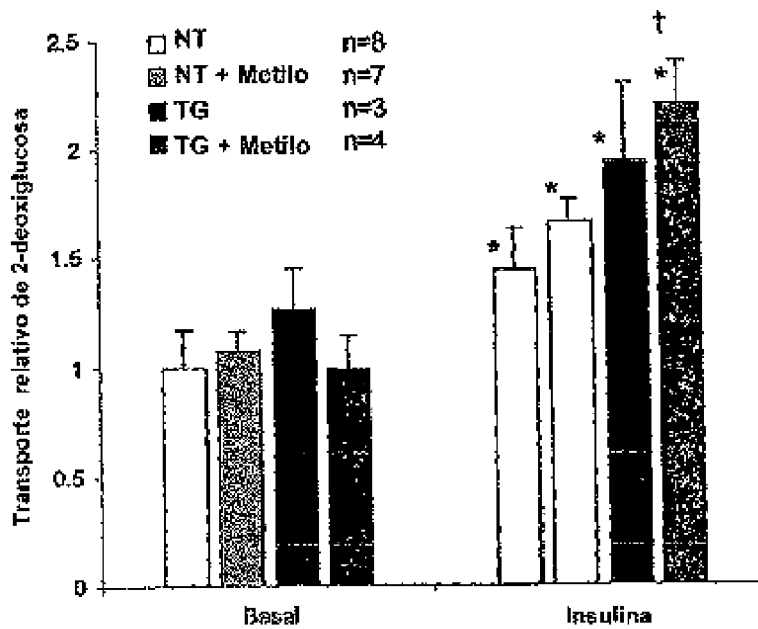


FIG. 1D

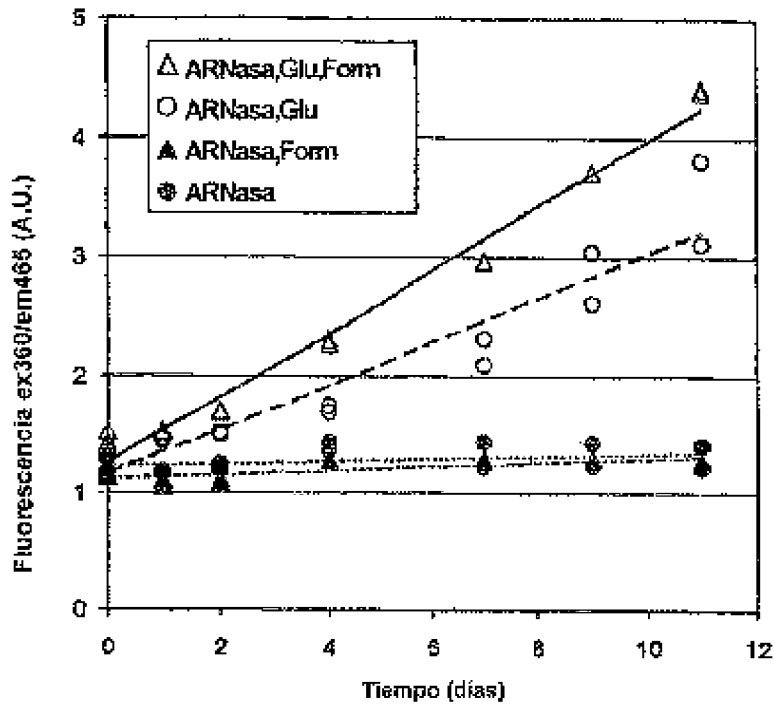


FIG. 2A

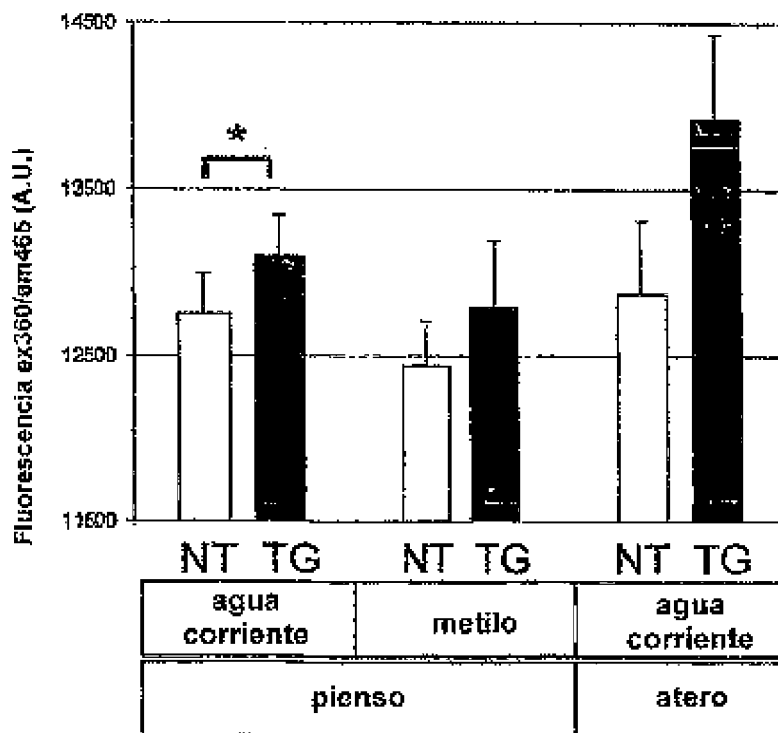


FIG. 2B