



**ESPAÑA** 



(1) Número de publicación: 2 386 831

(21) Número de solicitud: 201130153

(51) Int. Cl.: A61K 31/195 A61P 3/10

(2006.01) (2006.01)

(12)

#### SOLICITUD DE PATENTE

Α1

(22) Fecha de presentación: 04.02.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud: 31.08.2012

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: 31.08.2012

(71) Solicitante/s:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD Avda. de la Constitución 18 41071 Sevilla, ES

(72) Inventor/es:

SEGUNDO IGLESIAS, María del Carmen; AGUILAR DIOSDADO, Manuel; **QUINTANA LÓPEZ, Laura;** PÉREZ ARANA, Gonzalo y **BLANDINO ROSANO, Manuel** 

(74) Agente/Representante:

Illescas Taboada, Manuel

(54) Título: Uso de inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS) y sus composiciones, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la prediabetes y la diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

(57) Resumen:

Uso de inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS) y sus composiciones, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la prediabetes y la diabetes mellitus tipo 1 (DM1).

Uso de de una composición, que comprende al menos un inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS), y preferentemente el L-NMMA o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la prediabetes y la diabetes mellitus tipo 1 en un mamífero.

#### DESCRIPCIÓN

# Uso de Inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS) y sus composiciones, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la prediabetes y la diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la farmacología, y se refiere al uso de inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS), para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1).

10

15

20

# ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome de elevada morbi-mortalidad, que cursa con una permanente elevación de la glucemia debido a un déficit absoluto o relativo de la secreción de insulina por la célula beta del islote pancreático. Este déficit es debido a la muerte, principalmente por apoptosis, de las células beta como consecuencia de un proceso autoinmune que se inicia mucho antes de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. La observación de los procesos proliferativos a lo largo de la insulitis sugieren que además de la muerte celular existen también mecanismos que frenan el proceso regenerativo de la célula beta en respuesta a estos daños.

25

30

La diabetes mellitus puede ser definida como una elevación crónica de la glucosa en sangre (hiperglucemia). Con frecuencia se acompaña de polidipsia, poliuria y pérdida de peso y puede, en ausencia de tratamiento, desencadenar coma y muerte. La hiperglucemia y otras alteraciones bioquímicas son producidas por una insuficiente secreción o acción de la insulina, que es una hormona responsable del control del metabolismo de la glucosa, grasa y aminoácidos. La DM representa un alto riesgo para padecer enfermedad progresiva de la retina, el riñón y los nervios periféricos; además, agrava el proceso aterosclerótico afectando, especialmente, al corazón, los miembros inferiores y el cerebro.

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tanto en humanos como en animales, es un proceso autoinmune que se manifiesta por infiltración linfomonocitaria pancreática y por la presencia de anticuerpos antiislotes circulantes y que cursa con deterioro funcional y estructural progresivo de la masa de células beta (Castaño & Eisenbarth. Annu Rev Immunol. 1990; 8 647-79). Representa entre el 5 y el 10% de los casos totales de diabetes, pero el hecho de que tenga su comienzo en la infancia y las graves complicaciones que lleva asociada tanto a corto como a largo plazo la convierten en una patología de alto impacto tanto social como sanitario. En cuanto a su patogénesis existe un grado variable de predisposición genética junto a determinados factores ambientales que determinan las alteraciones inmunológicas y metabólicas que causan finalmente el síndrome de hiperglucemia crónica. Afecta, fundamentalmente, a población joven (1/500 niños; 1/200 adolescentes) considerándose una incidencia en nuestro país de 10-12 casos/100.000 habitantes/año (Goday & Serrano-Rios 1994. Med Clin (Barc) 102 (8): 306-15; Mathis et al., 2001. Nature. 414 (6865): 792-8).

5

10

15

20

25

La DM1 se inicia con un desorden de la inmunoregulación de origen desconocido que da lugar a la presentación de autoantígenos pancreáticos a linfocitos T autoreactivos. Esto provoca su activación y posterior reclutamiento al territorio pancreático dando lugar a una infiltración linfomonocitaria, con participación de macrófagos y células dendríticas, que deriva en un proceso inflamatorio local conocido como insulitis. Las células del infiltrado, bien de forma directa o mediante la liberación de citoquinas inflamatorias (IL-1beta, TNF-alfa e IFN-gamma) inducen un proceso de muerte de la célula beta, mayoritariamente por apoptosis, que es un proceso activo y programado de muerte celular, regulado por genes y controlado por diversos factores (Mathis et al., 2001. Nature 414 (6865): 792-8.).

30 El periodo que precede el inicio clínico de la enfermedad se denomina prediabetes. El evento que determina su inicio es la aparición de autoanticuerpos (Ziegler et al., 1999. Diabetes Care. 1999;22:1296 - 1301) y a

partir de entonces comienza una etapa de duración variable, asintomática y en la que se va produciendo la pérdida gradual de la masa beta como consecuencia del proceso autoinmune. Cuando la destrucción de las células beta es muy evidente aparece un nuevo evento que es la pérdida de la primera fase de la respuesta secretora de la célula beta a una sobrecarga intravenosa de glucosa (Srikanta et al 1983). Esta etapa culmina con el inicio clínico de la enfermedad que tiene lugar cuando la masa beta pancreática ha descendido hasta el 10-20% de su totalidad.

5

10

15

20

25

30

Se han descrito distintos mecanismos por los cuales las citoquinas proinflamatorias inducen apoptosis en las células beta pancreáticas. IL-1beta, IFN-gamma o TNF-alfa se unen a receptores específicos de membrana que se encuentran presentes en la célula beta, activando rutas de señalización entre las que se encuentran las MAPK (mitogen-activated protein kinase) y la de activación de NF-kB. Estudios realizados en líneas celulares productoras de insulina prueban que la vía preferencial activada por acción apoptótica de las citoquinas proinflamatorias dentro de las MAPK es la vía de JNK. Las rutas alternativas ERK1/2 y p38 no parecen participar en la respuesta de apoptosis ya que su inhibición no altera el porcentaje de células apoptóticas inducido por citoquinas (Ammendrup et al., 2000. Diabetes. 49 (9): 1468-76). La importancia de la vía JNK en la señalización de apoptosis por las citoquinas proinflamatorias se prueba también por el hecho de que péptidos inhibidores de dicha ruta bloquean la muerte de líneas celulares productoras de insulina sensibles a IL-1beta en respuesta a la citoquina (Bonny et al., 2001. Diabetes 50 (1): 77-82). Además de la capacidad proapoptotica de las citoquinas proinflamatorias, nuestro grupo ha podido observar un efecto antiproliferativo de las mismas sobre islotes murinos cultivados que parece estar mediada, al menos en parte por una inhibición de la vía de señalización de ERK1/2, perteneciente al grupo de las MAPK (Blandino-Rosano et al., 2008. J Mol Endocrinol. 41 35-44). Este descenso en los niveles de proliferación puede ser también demostrado "in vivo" en la rata BB, un modelo animal de DM1, en

estadios muy tempranos de la insulitis, antes de que comience el incremento de apoptosis de las células beta.

5

10

15

20

25

30

El óxido nítrico es una molécula que actúa como segundo mensajero en numerosos procesos biológicos entre los que se destacan el control del tono muscular, la funcionalidad neuronal y la respuesta inmune y, en determinadas situaciones, puede ejercer también acciones citotoxicas. Es producido a partir del aminoácido L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que se encuentra presente en los tejidos como una de las siguientes isoformas: neuronal (nNOS o NOS I), endotelial (eNOS o NOS III) e inducible (iNOS o NOS II) (Moncada et al., 1991. Pharmacol Rev. 43 (2): 109-42). Además de estar reguladas en cuanto a su expresión ya que las dos primeras son constitutivas y la tercera inducible, las isoformas de NOS pueden ser también reguladas mediante modificaciones postranscripcionales que modifican su estabilidad o su actividad (Bredt et al., 1992. J Biol Chem. 267 (16): 10976-818-10; Michel et al., 1993. Proc Natl Acad Sci U S A 90 (13): 6252-6; Chesler et al., 2004. J Interferon Cytokine Res. 24 (2): 141-9.).

En las células beta pancreáticas se ha demostrado la presencia de nNOS en condiciones basales. El NO que produce actúa regulando, entre otros, los procesos de producción de insulina (Lajoix *et al.*, 2001. Diabetes 50 (6): 1311-23; Rizzo & Piston 2003. *J Cell Biol* 161 (2): 243-8). Ante determinados estímulos como pueden ser alguna de las citoquinas proinflamatorias, la célula beta responde sintetizando la forma inducible de la NOS (iNOS). Las altas concentraciones de NO producidas por la iNOS han sido consideradas clásicamente responsables, al menos en gran medida, de la destrucción de las células beta durante la DM1 (Eizirik *et al.*, 1986. *Diabetologia* 39 (8): 875-90).

Los mecanismos de acción del NO son diversos y están mediados por las interacciones que realiza con distintas proteínas regulando su función, así como por la capacidad de reaccionar con radicales libres dando lugar a productos como los óxidos de nitrógeno o el peroxinitrito, potentes agentes

5

10

15

20

25

30

oxidantes que reaccionan con distintas moléculas ocasionándoles daño en su estructura.

Clásicamente, se había descrito que la inducción de apoptosis en la célula beta por NO durante la DM1, estaba mediada por la acción de algunos de estos agentes oxidantes sobre el DNA provocando daños en las bases y cortes en la hélice. Este daño en el DNA activaría p53 que a su vez es un factor inductor de genes proapoptoticos como BAX, FAS y los miembros BH3-only de la familia de Bcl-2 NOXA y PUMA. (Eizirik et al., 1996. Diabetologia 39 (8): 875-90). Sin embargo, estudios más recientes sugieren una vía de apoptosis mediada por NO independiente de p53 (Messmer & Brune 1996. Biochem J. 319 (Pt 1) (299-305). Se ha descrito que en célula beta primaria obtenida de rata, la apoptosis inducida por las citoquinas proinflamatorias IL-1beta+TNF-alfa+IFN-gamma está mediada en gran parte por NO, que actuaría inhibiendo la expresión de la de Ca2+ ATPasa2b del retículo endoplásmico (SERCA2b) paralelamente a la inducción de Gadd153/CHOP y de otros componentes de la respuesta a estrés de retículo con la participación específica de la caspasa 12. (Cardozo et al., 2005. Diabetes 54 (2): 452-61, Eizirik et al., 2008. Endocr Rev 29 (1): 42-61). Estudios recientes realizados en la línea de insulinoma de rata RIN-r muestran también la importancia de la vía mitocondrial en la apoptosis mediada por el NO inducido tras el cultivo en presencia de las citoquinas IL-1beta e IFN-gamma (Holohan et al., 2008. J Cell Mol Med. 12 (2): 591-606). En contraste con el efecto proapoptótico del NO sobre la célula beta, ha sido descrito también un efecto promotor de la supervivencia cuando actúa a bajas concentraciones a través de la ruta PI3-K/Akt (Tejedo et al., 2004. Endocrinology. 145 (5): 2319-27).

La proliferación celular es otro proceso biológico en el que se ha descrito un papel regulador del NO. Aunque su mayor efecto es inhibitorio, existen trabajos que muestran un efecto del NO activando la proliferación en determinados sistemas celulares. El efecto citostático del NO está asociado a altas concentraciones y tiene lugar a través de diversos mecanismos moleculares

5

10

15

20

25

30

(Villalobo 2006. Febs J. 273 (11): 2329-44). De forma general se ha observado que el NO inhibe la transición de las fases G1 a S durante el ciclo celular. Esto, en algunos casos, puede ser debido a la sobreexpresión de p21, molécula supresora de ciclo, que provoca la caída de Cdk2 y la hipofosforilación de la proteína del retinoblastoma (Villalobo 2006. Febs J. 273 (11): 2329-44). Se ha descrito también, en células de tumores de mama, que el aumento de NO conlleva una disminución de la ciclina D1 sin cambios en la ciclina E (Pervin et al., 2001. Proc Natl Acad Sci U S A. 98 (6): 3583-8). En algunos tipos celulares, el efecto antiproliferativo del NO está mediado por la activación de la enzima guanilato ciclasa y el subsecuente aumento de GMPc, que activa a su vez a PKG y culmina con la fosforilación de Raf-1 y la interrupción de la vía de señalización de ERK1/2 (Yu et al., 1997. Circulation. 95 (5): 1269-77). NO puede ejercer también su efecto independientemente **GMPc** interaccionando directamente con moléculas relacionadas con el ciclo celular o con la señalización a través de factores de crecimiento y modificando su actividad (Estrada et al. 1997. Biochem J. 326 (Pt 2) 369-76). En cuanto al efecto proliferativo del NO, este ha sido descrito, a concentraciones bajas, en fibroblastos, en líneas tumorales de células ductales pancreáticas y en células PC12 (Hajri et al., 1998. Br J Cancer. 78 (7): 841-9; Bal-Price et al., 2006. Nitric Oxide. 14 (3): 238-46).

En célula beta pancreática, el papel del NO en la proliferación bajo condiciones fisiológicas o en respuesta a daño ha sido muy poco estudiado. Estudios recientes muestran que la activación de las rutas de producción de NO mediante el suministro de L-Arginina, estimula la neogénesis de células beta en un modelo murino de diabetes inducida por Alloxan (Vasilijevic *et al.*, 2007. *J Physiol.* 584 (Pt 3): 921-33). En contraste con este efecto restaurador del NO, observaciones preliminares realizadas por nuestro grupo muestran que el efecto antiproliferativo de las citoquinas proinflamatorias sobre las células beta de los islotes en cultivo podría estar mediado por NO ya que se revierte en presencia de L-NMMA, un inhibidor de la actividad de la NOS. Este efecto del NO es independiente de la apoptosis ya que se puede observar también en

cultivos de islotes tratados con el inhibidor de caspasas z-VAD-fmk donde el porcentaje de apoptosis inducida por las citoquinas no varia con respecto a los cultivos control.

El único abordaje terapéutico de la DM1 ha sido hasta muy recientemente la administración de insulina hasta normalizar los valores de glucosa en sangre. Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas han surgido estrategias terapéuticas, en la actualidad en distintas fases de desarrollo, que persiguen el restablecimiento de la función beta pancreática. Entre ellas se incluyen las que tienen como objetivo la sustitución del tejido destruido mediante trasplantes, tanto de páncreas completo como de islotes aislados, y las encaminadas a recuperar masa de células beta a partir de una población inicial de precursores (neogénesis) o de las propias células beta (proliferación). En este sentido sería muy importante conocer los mecanismos íntimos que regulan la regeneración de las células beta pancreáticas y su afectación por el proceso patogénico de la DM1

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

30

Los autores de la presente invención han demostrado que el uso de Inhibidores de la actividad de los inhibidores de la sintasa de óxido nítrico, también denominados NO sintasas (NOS), así como sus composiciones farmacéuticas, son útiles para la prevención y el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I, actuando también en el periodo de prediabetes, y preferiblemente en el periodo de prediabetes con componente autoinmune.

Así pues, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de de una composición, que comprende al menos un inhibidor de la actividad de cualquiera de las NO sintasas (NOS), para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 en un mamífero, incluyendo un humano, o alternativamente, a un inhibidor de la actividad de cualquiera de las NO sintasas (NOS), para la prevención y/o el

tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición, que comprende un inhibidor de la actividad de cualquiera de las NO sintasas (NOS), para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la prediabetes en un mamífero, incluyendo un humano, y más preferiblemente la prediabetes con componente autoinmune, o alternativamente, a un inhibidor de la actividad de cualquiera de las NO sintasas (NOS), para el tratamiento de la prediabetes en un mamífero, incluyendo un humano, y más preferiblemente la prediabetes con componente autoinmune.

10

15

5

En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS) se seleccionan de la lista que comprende:

- (a) una molécula orgánica,
- (b) una molécula de RNA,
- (c) un oligonucleótido antisentido,
- (d) un anticuerpo, o
- (e) una ribozima, o

cualquiera de sus combinaciones.

20 El término "NO sintasas" (NOS), se refiere a una familia de enzimas eucarioticas que catalizan la producción de óxido nítrico (NO) a partir de la Larginina, a través de una catálisis orgánica de oxidorreducción (reacción RedOx), sin gasto de energía o ATP. Tienen como Número EC: 1.14.13.39. Son oxidorreductasas (ya que tiene un dominio oxidasa y un dominio reductasa) responsable de la síntesis de óxido nítrico (ON, siglas en español, y 25 NO, siglas en inglés y más aceptado por poseer el orden de electronegatividad creciente) a partir del átomo terminal de nitrógeno de la L-arginina en presencia de nad-fosfato reducido o NADPH (nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato reducido) y dioxígeno (O2). NOS es la única enzima conocida que une FAD 30 (flavín-adenín-dinucleótido), **FMN** (flavín mononucleótido), hemo, tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) y calmodulina. Catalizan la siguiente reacción:

L-Arg + NADPH + H+ + O2 
$$\rightarrow$$
 NOHLA + NADP+ + H2O  
NOHLA +  $\frac{1}{2}$  NADPH +  $\frac{1}{2}$  H+ + O2  $\rightarrow$  L-citrulina +  $\frac{1}{2}$  NADP+ + NO + H2O

Los distintos miembros de la familia NOS están codificadas por diferentes genes. Hay tres isoformas conocidas, dos son constitutivas (CNOS) y la tercera es inducible (iNOS). La clonación de enzimas NOS señala que NOS2 es inducible, mientras que NOS3 y NOS1 son constitutivos, en cerebro y en tejido endotelial respectivamente. En esta memoria, el término "NO sintasas" se refiere a cualquiera de los miembros de la familia.

10

15

20

25

30

5

Así, la NOS3 (nitric oxide synthase 3, endothelial cell), también denominada como EC-NOS; NOS type III; NOSIII; OTTHUMP00000213183; cNOS; constitutive NOS; endothelial NOS; nitric oxide synthase, endotelial, está codificado por un gen que se encuentra en el cromosoma 7 (7q36). Tiene varias isoformas, Sus secuencias aminoacídicas se encuentra en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4

En el contexto de la presente invención, NOS3 se refiere también a cualquiera de sus isoformas, y se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ

ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de cualquiera de las isoformas de la NOS3.

5 La NOS2 (nitric oxide synthase 2, inducible), también denominada como NOS type II; NOS, type II; hepatocyte NOS; inducible NO synthase; inducible NOS; nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes); nitric oxide synthase, inducible; nitric oxide synthase, macrophage; peptidyl-cysteine S-nitrosylase NOS2, está codificado por un gen que se encuentra en el cromosoma 17 (17q11.2-q12). Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 5.

En el contexto de la presente invención, NOS2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 5, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

15

20

25

30

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 5,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 5, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido NOS2.

La NOS1 (nitric oxide synthase 1, neuronal), también denominada como NOS; bNOS; nNOS; IHPS1; N-NOS; NC-NOS; NOS1, está codificado por un gen que se encuentra en el cromosoma 12 (12q24.2-q24.31). Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 6.

En el contexto de la presente invención, NOS1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 6, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 6,

5

10

15

20

25

30

- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
  - d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 6, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales del péptido NOS1.

Los inhibidores de las NO sintasas son conocidos en el estado de la técnica. Así por ejemplo, se encuentran entre estos inhibidores L-NAME, 1400W, 1amino-2-hidroxiguanidina, ácido 1-pirrolidinacarboditioico, 2-etil-2tiopseudourea, 7-nitroindazol, aminoguanidina, mesilato de bromocriptina, péptido dominio "scaffolding" de calveolina-1, clorpromazina, dexametasona, cloruro de difenileneiodonio, L-NIO, L-tiocitrulina, mercaptoetilguanidina, ADMA, L-NNA, N-PLA, L-NMMA o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones. Por tanto, en otra realización preferida de la presente invención, los inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS) se seleccionan de la lista que comprende: L-NAME, 1400W, 1-amino-2-hidroxiguanidina, ácido 1-pirrolidinacarboditioico, 2-etil-2tiopseudourea, 7-nitroindazol, aminoguanidina, mesilato de bromocriptina, péptido dominio "scaffolding" de calveolina-1, clorpromazina, dexametasona, cloruro de difenileneiodonio, L-NIO, L-tiocitrulina, mercaptoetilguanidina, ADMA, L-NNA, N-PLA, L-NMMA o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

L-NAME, HCI ( $N^G$ -Nitro-L-arginine Methyl Ester, Hydrochloride.  $N^\omega$ -NO<sub>2</sub>-L-Arg-OMe,  $N^G$ -NO<sub>2</sub>-L-Arg-Ome) es un análogo de la arginina permeable en la célula y que actua como un inhibidor competitivo y lentamente reversible de la NOS endotelial ( $IC_{50} = 500$  nM). Inhibe de forma prolongada la relajación inducida por acetilcolina en anillos aorticos de rata ( $IC_{50} = 400$  nM).

5

10

15

25

30

1400W, N-(3-Aminomethyl)benzylacetamidine, 2HCl. Es un inhibidor selectivo e irreversible de la NOS inducible (iNOS,  $K_d = 7$  nM) en ensayos "in vitro" e "in vivo". Tiene un efecto protector en modelos de isquemia cerebral reduciendo el volumen de las lesiones isquémicas.

1-Amino-2-hidroxiguanidina, p-Toluenesulfonato. Inhibidor permeable a la célula de la forma inducible de la NOS (IC<sub>50</sub> = 68  $\mu$ M). Ensayado en macrofagos murinos y celulas musculares lisas de aorta de rata en cultivo

Ácido 1-pirrolidinacarboditioico, sal de amonio. Inhibidor permeable a la célula de la actividad óxido nítrico sintasa. Ensayado en macrofagos alveolares.

2-etil-2-tiopseudourea, Bromhidrato. Inhibidor potente, competitivo y permeable
 a la célula de las tres isoformas de la NOS (K<sub>i</sub> =17 nM para iNOS; K<sub>i</sub> = 36 nM para eNOS; K<sub>i</sub> =29 nM para nNOS).

7-Nitroindazol (CAS 2942-42-9). Inhibidor reversible y competitivo de la NOS con una alta especificidad para la forma neuronal (IC $_{50}$  = 710 nM) aunque tambien se ha descrito actividad inhibidora de la NOS endotelial bovina (IC $_{50}$  = 800 nM).

Aminoguanidina, Hemisulfato. Inhibidor de las formas constitutiva (IC<sub>50</sub> = 526  $\mu$ M) e inducible (IC<sub>50</sub> = 250  $\mu$ M) de la NOS. Ensayado en homogeneizados de tejido ileal de rata.

Mesilato de bromocriptina. Inhibidor potente y selectivo de la NOS neuronal

 $(IC_{50} = 10 \ \mu\text{M})$  afectando su activación por calmodulina. Presenta solo un suave efecto inhibitorio sobre la NOS inducible de los macrofagos  $(IC_{50} > 100 \ \mu\text{M})$ . Presenta además capacidad inhibitoria de la secreción de prolactina, actua como agonista del receptor de dopamina  $D_2$ , modula la función de la P-glicoproteina e inhibe las actividades  $Mg^{2+}$  ATPasa  $(IC_{50} = 300 \ nM)$  y P-gp ATPasa inducida por verapamil  $(K_i = 200 \ nM)$ .

Péptido dominio "scaffolding" de calveolina-1. Es un peptido permeable a la célula formado por el dominio "scaffolding" de calveolina-1 (C1-SD $_{82-101}$ ) unido por el extremo animo terminal a la secuen cia de internalización de Antennapedia. Ha sido descrito que bloquea "in vitro" la actividad eNOS y reduce tumorigenesis e inflamación "in vivo".

Clorpromazina, Clorhidrato. Inhibe la NOS en cerebro de ratón y previene la inducción de NOS por lipopolisacarido en pulmón murino.

Dexamethasona. Es uno de los glucocorticoides más activos y estables. Entre sus númerosas acciones, está la de inhibir la forma inducible de la NOS en células endoteliales ( $IC_{50} = 5 \text{ nM}$ ).

20

5

10

Cloruro de difenileneiodonio (DIP). Es un inhibidor permeable a la célula e irreversible de la NOS endotelial. Se ha descrito que inhibe la relajación inducida por acetilcolina en anillos aórticos de rata previamente contraidos ( $IC_{50}$  = 180 nM). También inhibe NOS inducible en macrófagos ( $IC_{50}$  = 50 nM).

25

30

L-NIO L-N<sup>5</sup>-(1-Iminoetil)ornitina, dihidrocloruro. Potente inhibidor permeable a la célula con mucha mayor especificidad por la NOS endotelial (eNOS;  $IC_{50}$  = 500 nM) que otros análogos de arginina como L-NAME y L-NMMA. Inhibe la relajación inducida por acetilcolina de anillos aorticos de rata ( $IC_{50}$  = 2  $\mu$ M) y causa un incremento dosis dependiente de la presión arterial media en ratas ( $EC_{50}$  = 19.5 mg/kg).

L-NIL, dihidrocloruro. Inhibidor permeable a la célula, potente y selectivo de la NOS que presenta una especificidad 28 veces mayor por la forma inducible de la NOS ( $IC_{50} = 3.3 \,\mu\text{M}$ ) que por su forma neuronal ( $IC_{50} = 92 \,\mu\text{M}$ ). Presenta una potencia inhibitoria 10 veces superior a la de L-NMMA inhibiendo la producción de NO2- inducida por interferón ( $IC_{50} = 460 \,\text{nM}$ ).

5

20

25

30

L-Tiocitrullina, dihidrocloruro. Inhibidor permeable a la célula y selectivo de la forma neuronal de la NOS ( $K_i = 60 \text{ nM}$ ).

Mercaptoetilguanidina, HCl. Inhibidor de la NOS inducible y secuestrador de peroxinitritos. Causa además una inhibición dosisdependiente de actividad COX-1 y COX-2.

ADMA, 2HCl ( $N^G$ ,  $N^G$ -Dimethyl-L-arginine), Dihidrocloruro Inhibidor permeable a la célula y reversible de la NOS ensayado "in vitro" ( $IC_{50} = 2-3 \mu M$ )e "in vivo". Causa vasoconstricción y bradicardia de una forma dosis-dependiente.

L-NNA ( $N^G$ -Nitro-L-arginine.  $N^G$ -NO<sub>2</sub>-L-Arg). Potente inhibidor reversible y permeable a la célula de las isoformas neuronal y endotelial de la NOS. "In vivo" causa una reducción en la frecuencia cardiaca y profunda vasoconstricción.

N-PLA ( $N^G$ -Propyl-L-arginine.  $N^\omega$ -Propyl-L-arginine). Inhibidor potente, permeable a la célula, competitivo y tiempo-dependiente de la forma neuronal de la NOS ( $K_i$  = 57 nM para nNOS;  $K_i$  = 180  $\mu$ M para iNOS;  $K_i$  = 8.5  $\mu$ M para eNOS).

L-NMMA ( $N^G$ -Monomethyl-L-arginine, Monoacetate Salt ( $N^\omega$ -Me-L-Arg,  $N^G$ -Me-L-Arg, AcOH)) es un análogo de la L-arginina y actua como inhibidor competitivo de las tres isoformas de la NOS ( $K_i$  = 700 nM fpara eNOS;  $K_i$  = 3.9  $\mu$ M fpara iNOS;  $K_i$  = 650 nM para nNOS). Inhibe la relajación inducida por histamina y acetilcolina en arteria pulmonar intacta de cobaya contraída

mediante norepinefrina con una K<sub>i</sub> = 9.5 µM (Ensayo "ex vivo").

En otra realización más preferida de la presente invención, el inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS) es la  $N\omega$ -monometil-L-arginina (L-NMMA), de fórmula (I):

5

15

20

25

30

o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos.

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, entre ellos, derivados del compuesto de fórmula (I), que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos inhibidores de cualquiera de las NOS sintasas, y entre ellos el de fórmula (I). El término "profármaco" tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto inhibidor de cualquiera de las NOS sintasas, entre ellos el de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dichos inhibidores de cualquiera de las NOS sintasas, y entre ellos el compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad de inhibidores de

cualquiera de las NOS sintasas, y entre ellos el compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación de inhibidores de cualquiera de las NOS sintasas, y entre ellos el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los inhibidores de cualquiera de las NOS sintasas, y entre ellos la Nω-monometil-L-arginina (L-NMMA), o sus sales, profármacos, derivados o análogos, pueden administrarse en una forma substancialmente pura a un mamífero, y preferiblemente un humano, o puede administrarse como parte de una composición más compleja. Cuando se administra formando parte de una composición, la cantidad de inhibidores de cualquiera de las NOS sintasas, y entre ellos el Nω-monometil-L-arginina (L-NMMA), o sus sales, profármacos, derivados o análogos, es tal que alcanza el efecto deseado, siendo por tanto una cantidad efectiva

20 El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es la prediabetes o la diabetes mellitus tipo 1.

25

30

5

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la

elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

5

10

15

20

25

30

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico. Preferiblemente, la vía de administración es oral.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,... del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de

inhibidores de la NOS sintasas, y particularmente de la N $\omega$ -monometil-Larginina (L-NMMA), o de sus sales, profármacos, derivados o análogos, o de sus combinaciones, que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

5

25

30

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción, distribución o acción de cualquiera de los principios activos de la presente invención, estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, el principio activo es cualquiera de los compuestos de la presente invención.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en

la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos.

El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de las células de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de selección de agentes terapéuticos útiles en la prevención o el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1, o en el tratamiento de la prediabetes, preferentemente con componente autoinmune, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- (a) determinar la actividad de las NO sintasas (NOS) a una determinada concentración del compuesto a analizar, y
- (b) comparar dicha actividad de las NO sintasas con un valor normal o con los valores en ausencia de dicho compuesto.
- En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer método de la invención comprende:
  - (a) determinar la actividad de las NO sintasas (NOS) a una determinada concentración del compuesto a analizar, y
  - (b) comparar dicha actividad de las NO sintasas (NOS) con los valores en presencia de un compuesto empleado en la elaboración de un medicamento para prevenir o tratar la diabetes mellitus tipo I.

30

5

10

15

20

En una realización particular de este aspecto de la invención, el compuesto empleado en el paso (b) es el L-NMMA.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de la diabetes mellitus tipo I que comprende:

- (a) determinar la actividad de las NO sintasas (NOS) en una muestra extraída de un mamífero,
- (b) comparar los valores de la actividad de las NO sintasas (NOS) obtenidos en a) con los valores estándar en mamíferos sanos o enfermos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 20 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

5

10

15

25

Figura 1: Evolución de la proliferación de la célula beta en el modelo "in vivo" durante el tratamiento. Los tejidos pancreáticos fueron inmunomarcados con BrdU e Insulina y se contaron un total de 100 islotes por animal: 50 de la cabeza y 50 de la cola del páncreas. En las gráficas se muestran los resultados como nº de células BrdU+Ins+ por unidad de área de islote expresándose como la media ± e.e.m. para n=3 animales. \*p≤0,05.

Figura 2: Evolución del área relativa de los islotes en el modelo "in vivo" durante el tratamiento. Se contaron un total de 40 islotes en varias secciones de páncreas de los animales, 20 de la cabeza y 20 de la cola. En el eje de ordenadas de la gráfica se muestra el ratio entre el área total de islotes y el

área total de la secciones, expresado como la media±e.e.m. en n=3 animales. \*p≤0,05.

#### **EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los inhibidores de las NO sintasas (NOS), y preferentemente del L-NMMA, en la prevención y/o el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1, y de la prediabetes, en un mamífero.

10 Tratamiento farmacológico de un modelo animal de Diabetes autoinmune con un inhibidor general de la sintasa de óxido nítrico.

#### Tratamiento de los animales:

Los animales utilizados fueron ratas Biobreeding (BB) un modelo de diabetes autoinmune que inicia una diabetes espontánea a partir de las 10 semanas de vida aproximadamente. Se separaron aleatoriamente en dos grupos, control y tratado, y a las 5 semanas se inicio el tratamiento que consistió en:

**Grupo Control**: Consta de 3 animales sometidos a la administración diaria intraperitoneal de 200 microlitros del vehículo en que se encuentra diluido el tratamiento → 0,5% DMSO en suero salino

**Grupo tratado**: Consta de tres animales sometidos a la administración diaria intraperitoneal de 200 microlitros de LNMMA diluido en vehículo a una dosis de 30mg/kg.

25

30

15

20

Ambos grupos de animales fueron sacrificados a las 7 semanas de edad utilizando para ello una cámara de CO2. Para realizar los estudios de proliferación celular se les inyectó intraperitonealmente 6 horas antes del sacrificio 5´-Bromo 2´- Deoxiuridina (BrdU), un análogo de la Timidina que se incorpora al ADN de las células proliferantes a una concentración de 100 mg/Kg. De los animales se extrajeron los páncreas que fueron divididos en

cabeza (zona proxima al duodeno) y cola (zona próxima al bazo) y se almacenaron a -80°C hasta que fueron procesadas mediante corte en criostato, obteniendose secciones de 10 micras de grosor.

# 5 Estudio de proliferación en células beta de los islotes pancreáticos

Los cortes de tejido de cabeza y cola de páncreas fueron fijados con paraformaldehido al 4% en PBS durante 30 minutos a 4°C. La proliferación de las células beta pancreáticas fue determinada mediante inmunomarcaje simultáneo con fluorescencia de BrdU e insulina siguiendo los pasos que se especifican a continuación:

- Permeabilización con Tritón X-100 al 0,02% en PBS, 30 minutos a temperatura ambiente.
- Tratamiento con una solución de HCl 2N en PBS durante 25 minutos con el fin de facilitar la accesibilidad del anticuerpo al BrdU.
- Neutralización mediante 2 incubaciones de 15 minutos con tampón Borato 0,1M, pH 8.
  - Inmunomarcaje de los tejidos incubándolos durante un mínimo de 12 h a 4°C con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU y otro policional anti-insulina de cobaya.
- Revelado mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con acticuerpos secundarios contra inmunoglobulinas de raton y cobaya conjugados, respectivamente, con los fluoróforos Alexa 546 y Alexa 488.

La cuantificación de células beta proliferativas se realizó mediante el contaje,
utilizando el objetivo 40x, de células BrdU e insulina positivas en 50 islotes al
azar, con un microscopio confocal (Leyca TCS SL). Los resultados fueron
expresados como Nº celulas proliferantes (BrdU<sup>+</sup>Insulina<sup>+</sup>)/Area insulina<sup>+</sup>
(milimetros<sup>2</sup>)

#### 30 Histomorfometría

10

La proporción de área celular beta en relación con el área del páncreas, se de determinó en las secciones de tejido de cabeza y cola de páncreas fijadas con

Parafolmaldehido al 4% en PBS mediante una técnica de inmunohistoquímica revelada mediante diaminobenzidina siguiento los pasos que se detallan a continuación:

- Permeabilización utilizando Tritón X-100 al 0,02% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Neutralización de las peroxidasas endogenas mediante incubación con agua oxigenada al 3% en metanol durante 1 minuto.
- Lavados con PBS 5 minutos (3 veces).

5

15

- Bloqueo con BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Incubación con un anticuerpo anti-insulina producido en ratón a una concentración 1:1000 en solución de bloqueo (BSA al 1% en PBS) un mínimo de 12h a 4°C.
  - Lavados con PBS 5 minutos (3 veces)
  - Incubación con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con avidina a una concentración de 1/200 en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.
  - Lavados con PBS 5 minutos (3 veces).
  - Incubación con estreptavidina-peroxidasa 1/100 durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 20 Lavados con PBS 5 minutos (3 veces).
  - Revelado del marcaje mediante incubación de las secciones con Diaminobencidina y peróxido de hidrógeno diluidos en PBS durante 1 minuto aproximadamente, a temperatura ambiente.
  - Lavados con PBS 5 minutos (3 veces)
- Contratinción del tejido con hematoxilina.
  - Deshidratación de los tejidos mediante el paso por una sucesión de alcoholes de graduación creciente y montaje de las preparaciones para su estudio microscópico utilizando medio Entellán.
- 30 La cuantificación se realizó mediante examen microscópico utilizando un microscopio Olympus BX-40, analizándose las imágenes mediante la cámara Olympus DP71 y el software Cell D. Se cuantificó el total de las áreas de 20

islotes, considerándose área de islote como área Insulina relativizándola al área total del páncreas.

La significación estadística se calculó mediante el test no paramétrico Mann-Withney test en una población n=3 animales por grupo.

.

5

10

15

20

#### Resultados obtenidos

Los resultados pueden observarse en las Fig. 1 - 2. Como se puede observar en la figura 1, la proliferación tanto en la cabeza como en la cola del páncreas disminuye significativamente en los individuos tratados con vehículo. Sin embargo, en los animales tratados con el inhibidor de la NOS este descenso en proliferación, aunque se sigue observando en la cola del páncreas, es totalmente revertido en la cabeza del mismo donde los niveles de proliferación se mantienen igual que los existentes a las 5 semanas antes del comienzo del proceso autoinmune.

En cuanto al estudio del área relativa de los islotes, en la figura 2 se puede observar una disminución de la misma a lo largo del tiempo del ensayo tanto en la cabeza como en la cola del páncreas. El tratamiento con L-NMMA consiguió una reversión significativa de este parámetro en la cabeza del páncreas, sin embargo la reversión en la cola del páncreas fue de menor magnitud y no alcanzó la significación estadística aunque se observa una tendencia a la misma.

25

30

Como puede observarse en los resultados mostrados, la proliferación tanto en la cabeza como en la cola de los islotes de páncreas controles disminuye significativamente en los individuos no tratados en la etapa inicial periodo de insulitis. En cambio, en los individuos tratados con el inhibidor de la NOS LNMMA este efecto antiproliferativo revierte de forma total, al menos en la cabeza del páncreas, por lo que podríamos deducir que el inhibidor de la NOS

ejerce un efecto protector en el islote, ya que mantiene los niveles de proliferación igual a los estadios previos a la insulitis.

Es destacable el efecto diferencial observado en la cabeza y en la cola del páncreas. Esto podría estar relacionado con la biodisponibilidad del fármaco en ambas zonas o con una diferente capacidad proliferativa de los islotes en respuesta a estímulos.

5

10

15

20

25

Los inhibidores de las óxido nítrico sintasa han sido probados con diferentes resultados en el tratamiento de otras patologías utilizando modelos animales. En los últimos 5 años han sido descritos resultados en modelos de daño derivado del fenómeno de isquemia reperfusión (*Barocelli et al, 2006 Nitric Oxide 14(3): 212-8*), lesiones neuronales (*Wang et al, 2009 Exp Neurol. Jan 19.*), esclerosis lateral amiotrófica o modelos de daño renal inducidos por fármacos (*Ghaznavi R et al,2007 Arch Toxicol. 81(6): 453-7*). En este sentido merecen una atención especial los ensayos realizados en pacientes con enfermedad arterial coronaria (*Kaufmann et al,2007 Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(4): H2178-82.*) en los que la inhibición de la NOS aumenta la reserva de flujo coronario y los ensayos clínicos en pacientes con infarto de miocardio complicado con shock cardiogénico (fase III) que no mostraron beneficios clínicos pero sin embargo rindieron excelentes resultados en cuanto a bioseguridad (Kaluski et al, 2008 *Future Cardiol.* 4(2):183-9).

Estos antecedentes unidos a los resultados mostrados proponen a los inhibidores de la NOS como una posible alternativa terapéutica en el tratamiento de la prediabetes, utilizándolo desde las etapas iniciales de la etapa preclínica con el objeto de mantener la capacidad regenerativa de las células beta de los islotes pancreáticos en respuesta al daño autoinmune.

30 La utilización de este fármaco como proponen en los ejemplos, plantea la idea original de actuar no solo sobre los agentes inductores del daño directo a la célula beta, sino sobre el microambiente patogénico que se establece en el

islote pancreático a lo largo del periodo de prediabetes manteniendo la capacidad proliferativa de la célula beta y permitiéndole por tanto llevar a cabo una respuesta regenerativa ante la agresión autoinmune que tendrá lugar previamente al inicio clínico.

5

10

Además, respecto a la seguridad de la utilización de este fármaco (LNMMA), ésta quedo demostrada en un ensayo clínico fase III realizado en pacientes con infarto de miocardio complicado con shock cardiogénico que no mostró beneficios clínicos pero sin embargo rindió excelentes resultados en cuanto a bioseguridad (Kaluski et al, 2008 Future Cardiol. 4(2):183-9.

27

#### REIVINDICACIONES

- 1- Uso de una composición, que comprende el inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS) L-NMMA, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la prediabetes o de la diabetes mellitus tipo 1 en un mamífero.
- 2- El uso de la composición según la reivindicación anterior, donde la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
  - 3- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la composición además comprende otro principio activo.
  - 4- Método de obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de la diabetes mellitus tipo I y de la prediabetes, que comprende:
    - (a) determinar la actividad de las NO sintasas (NOS) en una muestra extraída de un mamífero,
      - (b) comparar los valores de la actividad de las NO sintasas (NOS) obtenidos en a) con los valores estándar en mamíferos sanos o enfermos.

25

15

20

5

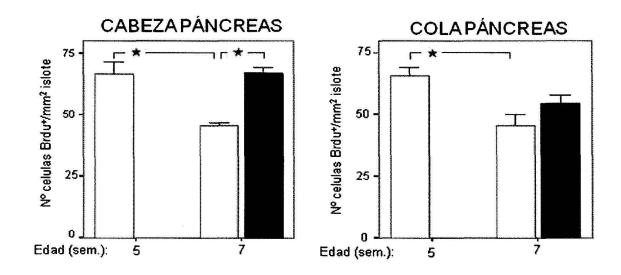
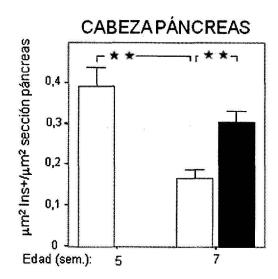


Fig. 1



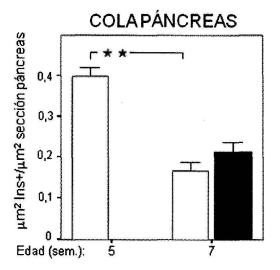


Fig.2

# LISTA DE SECUENICAS

<110> SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
<120> Uso de Inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS) y sus composiciones, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento y la prevención de la prediabetes y la diabetes mellitus tipo 1 (DM1).
<130> P-04234
<160> 6
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1 <211> 1203 <212> PRT <213> Homo sapiens
<400> 1
Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly 1 5 10 15
Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala 20 25 30
Thr Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro 35 40 45
Ala Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr Gln Pro Pro Glu 50 55 60
Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Val Gly Ser Ile Thr 65 70 75 80
Tyr Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro 85 90 95
Arg Arg Cys Leu Gly Ser Leu Val Phe Pro Arg Lys Leu Gln Gly Arg 100 105 110
Pro Ser Pro Gly Pro Pro Ala Pro Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg 115 120 125
Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly Ser Gln 130 135 140
Ala His Glu Gln Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ala Thr 145 150 155 160

Gly Thr Tyr	Gln Leu 165	_	. Ser	Glu	Leu 170	Val	Phe	Gly	Ala	Lys 175	Gln
Ala Trp Arg	Asn Ala 180	Pro Arg	Cys	Val 185	Gly	Arg	Ile	Gln	Trp 190	Gly	Lys
Leu Gln Val 195	Phe Asp	Ala Arg	Asp 200	Cys	Arg	Ser	Ala	Gln 205	Glu	Met	Phe
Thr Tyr Ile 210	Cys Asn	His Ile 215	_	Tyr	Ala	Thr	Asn 220	Arg	Gly	Asn	Leu
Arg Ser Ala 225	Ile Thr	Val Phe	Pro	Gln	Arg	Cys 235	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp 240
Phe Arg Ile	Trp Asn 245		. Leu	Val	Arg 250	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Arg 255	Gln
Gln Asp Gly	Ser Val 260	Arg Gly	' Asp	Pro 265	Ala	Asn	Val	Glu	Ile 270	Thr	Glu
Leu Cys Ile 275	Gln His	Gly Trp	Thr 280	Pro	Gly	Asn	Gly	Arg 285	Phe	Asp	Val
Leu Pro Leu 290	Leu Leu	Gln Ala 295		Asp	Asp	Pro	Pro 300	Glu	Leu	Phe	Leu
Leu Pro Pro 305	Glu Leu	Val Leu 310	. Glu	Val	Pro	Leu 315	Glu	His	Pro	Thr	Leu 320
Glu Trp Phe	Ala Ala 325	Leu Gly	Leu	Arg	Trp 330	Tyr	Ala	Leu	Pro	Ala 335	Val
Ser Asn Met	Leu Leu 340	Glu Ile	: Gly	Gly 345	Leu	Glu	Phe	Pro	Ala 350	Ala	Pro
Phe Ser Gly 355	Trp Tyr	Met Ser	Thr 360	Glu	Ile	Gly	Thr	Arg 365	Asn	Leu	Cys
Asp Pro His 370	Arg Tyr	Asn Ile		Glu	Asp	Val	Ala 380	Val	Cys	Met	Asp
Leu Asp Thr 385	Arg Thr	Thr Ser	Ser	Leu	Trp	Lys 395	Asp	Lys	Ala	Ala	Val 400

Glu	Ile	Asn	Val	Ala 405	Val	Leu	His	Ser	Tyr 410	Gln	Leu	Ala	Lys	Val 415	Thr
Ile	Val	Asp	His 420	His	Ala	Ala	Thr	Ala 425	Ser	Phe	Met	Lys	His 430	Leu	Glu
Asn	Glu	Gln 435	Lys	Ala	Arg	Gly	Gly 440	Cys	Pro	Ala	Asp	Trp 445	Ala	Trp	Ile
Val	Pro 450	Pro	Ile	Ser	Gly	Ser 455	Leu	Thr	Pro	Val	Phe 460	His	Gln	Glu	Met
Val 465	Asn	Tyr	Phe	Leu	Ser 470	Pro	Ala	Phe	Arg	Tyr 475	Gln	Pro	Asp	Pro	Trp 480
Lys	Gly	Ser	Ala	Ala 485	Lys	Gly	Thr	Gly	Ile 490	Thr	Arg	Lys	Lys	Thr 495	Phe
Lys	Glu	Val	Ala 500	Asn	Ala	Val	Lys	Ile 505	Ser	Ala	Ser	Leu	Met 510	Gly	Thr
Val	Met	Ala 515	Lys	Arg	Val	Lys	Ala 520	Thr	Ile	Leu	Tyr	Gly 525	Ser	Glu	Thr
Gly	Arg 530	Ala	Gln	Ser	Tyr	Ala 535	Gln	Gln	Leu	Gly	Arg 540	Leu	Phe	Arg	Lys
Ala 545	Phe	Asp	Pro	Arg	Val 550	Leu	Cys	Met	Asp	Glu 555	Tyr	Asp	Val	Val	Ser 560
Leu	Glu	His	Glu	Thr 565	Leu	Val	Leu	Val	Val 570	Thr	Ser	Thr	Phe	Gly 575	Asn
Gly	Asp	Pro	Pro 580	Glu	Asn	Gly	Glu	Ser 585	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu 590	Met	Glu
Met	Ser	Gly 595	Pro	Tyr	Asn	Ser	Ser 600	Pro	Arg	Pro	Glu	Gln 605	His	Lys	Ser
Tyr	Lys 610	Ile	Arg	Phe	Asn	Ser 615	Ile	Ser	Cys	Ser	Asp 620	Pro	Leu	Val	Ser
Ser 625	Trp	Arg	Arg	Lys	Arg 630	Lys	Glu	Ser	Ser	Asn 635	Thr	Asp	Ser	Ala	Gly 640

Ala	Leu	Gly	Thr	Leu 645	Arg	Phe	Cys	Val	Phe 650	Gly	Leu	Gly	Ser	Arg 655	Ala
Tyr	Pro	His	Phe 660	Cys	Ala	Phe	Ala	Arg 665	Ala	Val	Asp	Thr	Arg 670	Leu	Glu
Glu	Leu	Gly 675	Gly	Glu	Arg	Leu	Leu 680	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly 685	Asp	Glu	Leu
Cys	Gly 690	Gln	Glu	Glu	Ala	Phe 695	Arg	Gly	Trp	Ala	Gln 700	Ala	Ala	Phe	Gln
Ala 705	Ala	Cys	Glu	Thr	Phe 710	Cys	Val	Gly	Glu	Asp 715	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala 720
Arg	Asp	Ile	Phe	Ser 725	Pro	Lys	Arg	Ser	Trp 730	Lys	Arg	Gln	Arg	Tyr 735	Arg
Leu	Ser	Ala	Gln 740	Ala	Glu	Gly	Leu	Gln 745	Leu	Leu	Pro	Gly	Leu 750	Ile	His
Val	His	Arg 755	Arg	Lys	Met	Phe	Gln 760	Ala	Thr	Ile	Arg	Ser 765	Val	Glu	Asn
Leu	Gln 770	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr 775	Arg	Ala	Thr	Ile	Leu 780	Val	Arg	Leu	Asp
Thr 785	Gly	Gly	Gln	Glu	Gly 790	Leu	Gln	Tyr	Gln	Pro 795	Gly	Asp	His	Ile	Gly 800
Val	Cys	Pro	Pro	Asn 805	Arg	Pro	Gly	Leu	Val 810	Glu	Ala	Leu	Leu	Ser 815	Arg
Val	Glu	Asp	Pro 820	Pro	Ala	Pro	Thr	Glu 825	Pro	Val	Ala	Val	Glu 830	Gln	Leu
Glu	Lys	Gly 835	Ser	Pro	Gly	Gly	Pro 840	Pro	Pro	Gly	Trp	Val 845	Arg	Asp	Pro
Arg	Leu 850	Pro	Pro	Cys	Thr	Leu 855	Arg	Gln	Ala	Leu	Thr 860	Phe	Phe	Leu	Asp
Ile 865	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser 870	Pro	Gln	Leu	Leu	Arg 875	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu 880

Ala	Glu	Glu	Pro	Arg 885	Glu	Gln	GIn	Glu	Leu 890	Glu	Ala	Leu	Ser	G1n 895	
Pro	Arg	Arg	Tyr 900	Glu	Glu	Trp	Lys	Trp 905	Phe	Arg	Cys	Pro	Thr 910	Leu	Leu
Glu	Val	Leu 915	Glu	Gln	Phe	Pro	Ser 920	Val	Ala	Leu	Pro	Ala 925	Pro	Leu	Leu
Leu	Thr 930	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu 935	Gln	Pro	Arg	Tyr	Tyr 940	Ser	Val	Ser	Ser
Ala 945	Pro	Ser	Thr	His	Pro 950	Gly	Glu	Ile	His	Leu 955	Thr	Val	Ala	Val	Leu 960
Ala	Tyr	Arg	Thr	Gln 965	Asp	Gly	Leu	Gly	Pro 970	Leu	His	Tyr	Gly	Val 975	
Ser	Thr	Trp	Leu 980	Ser	Gln	Leu	Lys	Pro 985	Gly	Asp	Pro	Val	Pro 990	Cys	Phe
Ile	Arg	Gly 995	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg 1000		ı Pro	o Pro	o Asp	o Pr 10		er L	eu Pro
Cys	Ile 1010		ı Val	. Gly	/ Pro	Gl <sub>3</sub>	7.1	nr G.	ly I	le Al		20	Phe .	Arg	Gly
Phe											10	120			
1110	Trp 1025		n Glu	ı Arç	, Leu	His		sp II	le G	lu Se	er Ly		Gly :	Leu	Gln
	1025	Pro				103	30 L Pł				er Ly 10 rg Cy	78 )35	Gly :		
Pro	1025 Thr 1040	Pro	) Met	Thr	. Leu	103 . Val 104	30 L Pl 15 1 Vá	ne Gl	ly C <u>y</u>	ys Ai	er Ly 10 rg Cy 10	/s )35 /s )50	_	Gln	Leu
Pro Asp	1025 Thr 1040	Pro Lev	o Met	Thr	Leu J Asp	103 Val 104 Gli 106	30 L Ph 15 1 Va 50	ne Gi	ly Cy ln As	ys Ai	er Ly 10  rg Cy 10  la Gl 10  rg G	/s )35 /s )50 Ln )65	Ser (	Gln	Leu Gly
Pro Asp Val	Thr 1040 His 1055	Pro Lev Gly	o Met ı Tyr	Thr Arc	Leu J Asp	103 Val 104 Glu 106 Thi	30 L PH 15 1 Va 50 A A A	ne Gl	ly Cy ln As	ys Ai sn Ai	er Ly 10  rg Cy 10  la Gi 10  rg Gi 10	/s 035 /s 050 Ln 065 Lu	Ser (	Gln   Arg   Asp	Leu Gly Asn

Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Thr Asn Val Leu Gln Thr Val Gln Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln Gln Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu Val Thr Ser Arg Ile Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln Leu Arg Gly Ala Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr Asn Ser Pro <210> 2 <211> 596 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 2 Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala Thr Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro Ala Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr Gln Pro Pro Glu Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Val Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro Arg Arg Cys Leu Gly Ser Leu Val Phe Pro Arg Lys Leu Gln Gly Arg Pro Ser Pro Gly Pro Pro Ala Pro Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg 

Asp Phe 1	Ile Asn	Gln Tyr	Tyr 135	Ser	Ser	Ile	Lys	Arg 140	Ser	Gly	Ser	Gln
Ala His (	Glu Gln	Arg Leu 150	Gln	Glu	Val	Glu	Ala 155	Glu	Val	Ala	Ala	Thr 160
Gly Thr	Tyr Gln	Leu Arg 165	Glu	Ser	Glu	Leu 170	Val	Phe	Gly	Ala	Lys 175	Gln
Ala Trp A	Arg Asn 180	Ala Pro	Arg	Cys	Val 185	Gly	Arg	Ile	Gln	Trp 190	Gly	Lys
Leu Gln V	Val Phe 195	Asp Ala	Arg	Asp 200	Cys	Arg	Ser	Ala	Gln 205	Glu	Met	Phe
Thr Tyr 2	Ile Cys	Asn His	Ile 215	Lys	Tyr	Ala	Thr	Asn 220	Arg	Gly	Asn	Leu
Arg Ser A	Ala Ile	Thr Val 230	Phe	Pro	Gln	Arg	Cys 235	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp 240
Phe Arg	Ile Trp	Asn Ser 245	Gln	Leu	Val	Arg 250	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Arg 255	Gln
Gln Asp (	Gly Ser 260	Val Arg	Gly	Asp	Pro 265	Ala	Asn	Val	Glu	Ile 270	Thr	Glu
Leu Cys 2	Ile Gln 275	His Gly	Trp	Thr 280	Pro	Gly	Asn	Gly	Arg 285	Phe	Asp	Val
Leu Pro I 290	Leu Leu	Leu Gln	Ala 295	Pro	Asp	Asp	Pro	Pro 300	Glu	Leu	Phe	Leu
Leu Pro I	Pro Glu	Leu Val 310	Leu	Glu	Val	Pro	Leu 315	Glu	His	Pro	Thr	Leu 320
Glu Trp I	Phe Ala	Ala Leu 325	Gly	Leu	Arg	Trp 330	Tyr	Ala	Leu	Pro	Ala 335	Val
Ser Asn N	Met Leu 340	Leu Glu	Ile	Gly	Gly 345	Leu	Glu	Phe	Pro	Ala 350	Ala	Pro
Phe Ser (	Gly Trp 355	Tyr Met	Ser	Thr 360	Glu	Ile	Gly	Thr	Arg 365	Asn	Leu	Cys

Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp 375 Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val 390 395 Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr 405 410 Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu 420 425 Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile 435 440 Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met 450 455 Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp 475 Lys Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr Phe 485 490 495 Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met Gly Thr 500 505 510 Val Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly Ser Glu Thr 515 520 525 Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe Arg Lys 530 535 Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser 550 545 Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Val Ser Leu Pro Glu Val Ser 580 585 Val Thr Thr Glu 595

<210> 3

<211 <212 <213	2>	614 PRT Homo	sapi	iens											
<400	)>	3													
Met 1	Gly	Asn	Leu	Lys 5	Ser	Val	Ala	Gln	Glu 10	Pro	Gly	Pro	Pro	Cys 15	Gly
Leu	Gly	Leu	Gly 20	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu 25	Cys	Gly	Lys	Gln	Gly 30	Pro	Ala
Thr	Pro	Ala 35	Pro	Glu	Pro	Ser	Arg 40	Ala	Pro	Ala	Ser	Leu 45	Leu	Pro	Pro
Ala	Pro 50	Glu	His	Ser	Pro	Pro 55	Ser	Ser	Pro	Leu	Thr 60	Gln	Pro	Pro	Glu
Gly 65	Pro	Lys	Phe	Pro	Arg 70	Val	Lys	Asn	Trp	Glu 75	Val	Gly	Ser	Ile	Thr 80
Tyr	Asp	Thr	Leu	Ser 85	Ala	Gln	Ala	Gln	Gln 90	Asp	Gly	Pro	Cys	Thr 95	Pro
Arg	Arg	Cys	Leu 100	Gly	Ser	Leu	Val	Phe 105	Pro	Arg	Lys	Leu	Gln 110	Gly	Arg
Pro	Ser	Pro 115	Gly	Pro	Pro	Ala	Pro 120	Glu	Gln	Leu	Leu	Ser 125	Gln	Ala	Arc
Asp	Phe 130	Ile	Asn	Gln		Tyr 135		Ser	Ile		Arg 140		Gly	Ser	Glr
Ala 145	His	Glu	Gln	Arg	Leu 150	Gln	Glu	Val	Glu	Ala 155	Glu	Val	Ala	Ala	Thr 160
Gly	Thr	Tyr	Gln	Leu 165	Arg	Glu	Ser	Glu	Leu 170	Val	Phe	Gly	Ala	Lys 175	Glr
Ala	Trp	Arg	Asn 180	Ala	Pro	Arg	Cys	Val 185	Gly	Arg	Ile	Gln	Trp 190	Gly	Lys
Leu	Gln	Val 195	Phe	Asp	Ala	Arg	Asp 200	Cys	Arg	Ser	Ala	Gln 205	Glu	Met	Ph∈
Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	His	Ile 215	Lys	Tyr	Ala	Thr	Asn 220	Arg	Gly	Asn	Leu

Arg 225	Ser	Ala	Ile	Thr	Val 230	Phe	Pro	Gln	Arg	Cys 235	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp 240
Phe	Arg	Ile	Trp	Asn 245	Ser	Gln	Leu	Val	Arg 250	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Arg 255	Gln
Gln	Asp	Gly	Ser 260	Val	Arg	Gly	Asp	Pro 265	Ala	Asn	Val	Glu	Ile 270	Thr	Glu
Leu	Cys	Ile 275	Gln	His	Gly	Trp	Thr 280	Pro	Gly	Asn	Gly	Arg 285	Phe	Asp	Val
Leu	Pro 290	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala 295	Pro	Asp	Asp	Pro	Pro 300	Glu	Leu	Phe	Leu
Leu 305	Pro	Pro	Glu	Leu	Val 310	Leu	Glu	Val	Pro	Leu 315	Glu	His	Pro	Thr	Leu 320
Glu	Trp	Phe	Ala	Ala 325	Leu	Gly	Leu	Arg	Trp 330	Tyr	Ala	Leu	Pro	Ala 335	Val
Ser	Asn	Met	Leu 340	Leu	Glu	Ile	Gly	Gly 345	Leu	Glu	Phe	Pro	Ala 350	Ala	Pro
Phe	Ser	Gly 355	Trp	Tyr	Met	Ser	Thr 360	Glu	Ile	Gly	Thr	Arg 365	Asn	Leu	Cys
Asp	Pro 370	His	Arg	Tyr	Asn	Ile 375	Leu	Glu	Asp	Val	Ala 380	Val	Cys	Met	Asp
Leu 385	Asp	Thr	Arg	Thr	Thr 390	Ser	Ser	Leu	Trp	Lys 395	Asp	Lys	Ala	Ala	Val 400
Glu	Ile	Asn	Val	Ala 405	Val	Leu	His	Ser	Tyr 410	Gln	Leu	Ala	Lys	Val 415	Thr
Ile	Val	Asp	His 420	His	Ala	Ala	Thr	Ala 425	Ser	Phe	Met	Lys	His 430	Leu	Glu
Asn	Glu	Gln 435	Lys	Ala	Arg	Gly	Gly 440	Cys	Pro	Ala	Asp	Trp 445	Ala	Trp	Ile
Val	Pro 450	Pro	Ile	Ser	Gly	Ser 455	Leu	Thr	Pro	Val	Phe 460	His	Gln	Glu	Met

Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp 470 475 Lys Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr Phe 485 490 Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met Gly Thr 500 505 Val Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly Ser Glu Thr 515 520 Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe Arg Lys 530 535 540 Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser 550 Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn 570 565 Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Arg Trp Gly Phe Ala Met Leu Pro 580 585 Arg Leu Val Ser Asn Ser Trp Val Gln Ala Ile His Leu Pro Arg Pro 595 600 Pro Lys Val Leu Arg Leu 610 <210> 4 <211> 629 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 4 Met Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala 20 Thr Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro 35 40 Ala Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr Gln Pro Pro Glu 50 55 60

Gly 65	Pro	Lys	Phe	Pro	Arg 70	Val	Lys	Asn	Trp	Glu 75	Val	Gly	Ser	Ile	Thr 80
Tyr	Asp	Thr	Leu	Ser 85	Ala	Gln	Ala	Gln	Gln 90	Asp	Gly	Pro	Cys	Thr 95	Pro
Arg	Arg	Cys	Leu 100	Gly	Ser	Leu	Val	Phe 105	Pro	Arg	Lys	Leu	Gln 110	Gly	Arg
Pro	Ser	Pro 115	Gly	Pro	Pro	Ala	Pro 120	Glu	Gln	Leu	Leu	Ser 125	Gln	Ala	Arg
Asp	Phe 130	Ile	Asn	Gln	Tyr	Tyr 135	Ser	Ser	Ile	Lys	Arg 140	Ser	Gly	Ser	Gln
Ala 145	His	Glu	Gln	Arg	Leu 150	Gln	Glu	Val	Glu	Ala 155	Glu	Val	Ala	Ala	Thr 160
Gly	Thr	Tyr	Gln	Leu 165	Arg	Glu	Ser	Glu	Leu 170	Val	Phe	Gly	Ala	Lys 175	Gln
Ala	Trp	Arg	Asn 180	Ala	Pro	Arg	Cys	Val 185	Gly	Arg	Ile	Gln	Trp 190	Gly	Lys
Leu	Gln	Val 195	Phe	Asp	Ala	Arg	Asp 200	Cys	Arg	Ser	Ala	Gln 205	Glu	Met	Phe
Thr	Tyr 210	Ile	Cys	Asn	His	Ile 215	Lys	Tyr	Ala	Thr	Asn 220	Arg	Gly	Asn	Leu
Arg 225	Ser	Ala	Ile	Thr	Val 230	Phe	Pro	Gln	Arg	Cys 235	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp 240
Phe	Arg	Ile	Trp	Asn 245	Ser	Gln	Leu	Val	Arg 250	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Arg 255	Gln
Gln	Asp	Gly	Ser 260	Val	Arg	Gly	Asp	Pro 265	Ala	Asn	Val	Glu	Ile 270	Thr	Glu
Leu	Cys	Ile 275	Gln	His	Gly	Trp	Thr 280	Pro	Gly	Asn	Gly	Arg 285	Phe	Asp	Val
Leu	Pro 290	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala 295	Pro	Asp	Asp	Pro	Pro 300	Glu	Leu	Phe	Leu

Leu 305	Pro	Pro	Glu	Leu	Val 310	Leu	Glu	Val	Pro	Leu 315	Glu	His	Pro	Thr	Leu 320
Glu	Trp	Phe	Ala	Ala 325	Leu	Gly	Leu	Arg	Trp 330	Tyr	Ala	Leu	Pro	Ala 335	Val
Ser	Asn	Met	Leu 340	Leu	Glu	Ile	Gly	Gly 345	Leu	Glu	Phe	Pro	Ala 350	Ala	Pro
Phe	Ser	Gly 355	Trp	Tyr	Met	Ser	Thr 360	Glu	Ile	Gly	Thr	Arg 365	Asn	Leu	Cys
Asp	Pro 370	His	Arg	Tyr	Asn	Ile 375	Leu	Glu	Asp	Val	Ala 380	Val	Cys	Met	Asp
Leu 385	Asp	Thr	Arg	Thr	Thr 390	Ser	Ser	Leu	Trp	Lys 395	Asp	Lys	Ala	Ala	Val 400
Glu	Ile	Asn	Val	Ala 405	Val	Leu	His	Ser	Tyr 410	Gln	Leu	Ala	Lys	Val 415	Thr
Ile	Val	Asp	His 420	His	Ala	Ala	Thr	Ala 425	Ser	Phe	Met	Lys	His 430	Leu	Glu
Asn	Glu	Gln 435	Lys	Ala	Arg	Gly	Gly 440	Cys	Pro	Ala	Asp	Trp 445	Ala	Trp	Ile
Val	Pro 450	Pro	Ile	Ser	Gly	Ser 455	Leu	Thr	Pro	Val	Phe 460	His	Gln	Glu	Met
Val 465	Asn	Tyr	Phe	Leu	Ser 470	Pro	Ala	Phe	Arg	Tyr 475	Gln	Pro	Asp	Pro	Trp 480
Lys	Gly	Ser	Ala	Ala 485	Lys	Gly	Thr	Gly	Ile 490	Thr	Arg	Lys	Lys	Thr 495	Phe
Lys	Glu	Val	Ala 500	Asn	Ala	Val	Lys	Ile 505	Ser	Ala	Ser	Leu	Met 510	Gly	Thr
Val	Met	Ala 515	Lys	Arg	Val	Lys	Ala 520	Thr	Ile	Leu	Tyr	Gly 525	Ser	Glu	Thr
Gly	Arg 530	Ala	Gln	Ser	Tyr	Ala 535	Gln	Gln	Leu	Gly	Arg 540	Leu	Phe	Arg	Lys

Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser 545 550 555 Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn 565 570 Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Gly Leu Thr Leu Trp Pro Arg Leu 580 585 Glu Cys Ser Ser Thr Ile Thr Ala His Cys Ser Leu Asn Leu Leu Asp 595 600 Ser Ser Asn Pro Pro Thr Ser Thr Ser Gln Val Val Gly Thr Thr Gly 610 615 620 Ala Cys His Asp Ala 625 <210> 5 <211> 1153 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 5 Met Ala Cys Pro Trp Lys Phe Leu Phe Lys Thr Lys Phe His Gln Tyr 10 Ala Met Asn Gly Glu Lys Asp Ile Asn Asn Val Glu Lys Ala Pro 20 25 Cys Ala Thr Ser Ser Pro Val Thr Gln Asp Asp Leu Gln Tyr His Asn 40 Leu Ser Lys Gln Gln Asn Glu Ser Pro Gln Pro Leu Val Glu Thr Gly 55 Lys Lys Ser Pro Glu Ser Leu Val Lys Leu Asp Ala Thr Pro Leu Ser Ser Pro Arg His Val Arg Ile Lys Asn Trp Gly Ser Gly Met Thr Phe 90 Gln Asp Thr Leu His His Lys Ala Lys Gly Ile Leu Thr Cys Arg Ser 100 105 110 Lys Ser Cys Leu Gly Ser Ile Met Thr Pro Lys Ser Leu Thr Arg Gly 115 120 125

Pro	Arg 130	Asp	Lys	Pro	Thr	Pro 135	Pro	Asp	Glu	Leu	Leu 140	Pro	Gln	Ala	Ile
Glu 145	Phe	Val	Asn	Gln	Tyr 150	Tyr	Gly	Ser	Phe	Lys 155	Glu	Ala	Lys	Ile	Glu 160
Glu	His	Leu	Ala	Arg 165	Val	Glu	Ala	Val	Thr 170	Lys	Glu	Ile	Glu	Thr 175	Thr
Gly	Thr	Tyr	Gln 180	Leu	Thr	Gly	Asp	Glu 185	Leu	Ile	Phe	Ala	Thr 190	Lys	Gln
Ala	Trp	Arg 195	Asn	Ala	Pro	Arg	Cys 200	Ile	Gly	Arg	Ile	Gln 205	Trp	Ser	Asn
Leu	Gln 210	Val	Phe	Asp	Ala	Arg 215	Ser	Cys	Ser	Thr	Ala 220	Arg	Glu	Met	Phe
Glu 225	His	Ile	Cys	Arg	His 230	Val	Arg	Tyr	Ser	Thr 235	Asn	Asn	Gly	Asn	Ile 240
Arg	Ser	Ala	Ile	Thr 245	Val	Phe	Pro	Gln	Arg 250	Ser	Asp	Gly	Lys	His 255	Asp
Phe	Arg	Val	Trp 260	Asn	Ala	Gln	Leu	Ile 265	Arg	Tyr	Ala	Gly	Tyr 270	Gln	Met
Pro	Asp	Gly 275	Ser	Ile	Arg	Gly	Asp 280	Pro	Ala	Asn	Val	Glu 285	Phe	Thr	Gln
Leu	Cys 290	Ile	Asp	Leu	Gly	Trp 295	Lys	Pro	Lys	Tyr	Gly 300	Arg	Phe	Asp	Val
Val 305	Pro	Leu	Val	Leu	Gln 310	Ala	Asn	Gly	Arg	Asp 315	Pro	Glu	Leu	Phe	Glu 320
Ile	Pro	Pro	Asp	Leu 325	Val	Leu	Glu	Val	Ala 330	Met	Glu	His	Pro	Lys 335	Tyr
Glu	Trp	Phe	Arg 340	Glu	Leu	Glu	Leu	Lys 345	Trp	Tyr	Ala	Leu	Pro 350	Ala	Val
Ala	Asn	Met 355	Leu	Leu	Glu	Val	Gly 360	Gly	Leu	Glu	Phe	Pro 365	Gly	Cys	Pro

Phe	Asn 370	Gly	Trp	Tyr	Met	Gly 375	Thr	Glu	Ile	Gly	Val 380	Arg	Asp	Phe	Cys
Asp 385	Val	Gln	Arg	Tyr	Asn 390	Ile	Leu	Glu	Glu	Val 395	Gly	Arg	Arg	Met	Gly 400
Leu	Glu	Thr	His	Lys 405	Leu	Ala	Ser	Leu	Trp 410	Lys	Asp	Gln	Ala	Val 415	Val
Glu	Ile	Asn	Ile 420	Ala	Val	Leu	His	Ser 425	Phe	Gln	Lys	Gln	Asn 430	Val	Thr
Ile	Met	Asp 435	His	His	Ser	Ala	Ala 440	Glu	Ser	Phe	Met	Lys 445	Tyr	Met	Gln
Asn	Glu 450	Tyr	Arg	Ser	Arg	Gly 455	Gly	Cys	Pro	Ala	Asp 460	Trp	Ile	Trp	Leu
Val 465	Pro	Pro	Met	Ser	Gly 470	Ser	Ile	Thr	Pro	Val 475	Phe	His	Gln	Glu	Met 480
Leu	Asn	Tyr	Val	Leu 485	Ser	Pro	Phe	Tyr	Tyr 490	Tyr	Gln	Val	Glu	Ala 495	Trp
Lys	Thr	His	Val 500	Trp	Gln	Asp	Glu	Lys 505	Arg	Arg	Pro	Lys	Arg 510	Arg	Glu
Ile	Pro	Leu 515	Lys	Val	Leu	Val	Lys 520	Ala	Val	Leu	Phe	Ala 525	Cys	Met	Leu
Met	Arg 530	Lys	Thr	Met	Ala	Ser 535	Arg	Val	Arg	Val	Thr 540	Ile	Leu	Phe	Ala
Thr 545	Glu	Thr	Gly	Lys	Ser 550	Glu	Ala	Leu	Ala	Trp 555	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu 560
Phe	Ser	Cys	Ala	Phe 565	Asn	Pro	Lys	Val	Val 570	Cys	Met	Asp	Lys	Tyr 575	Arg
Leu	Ser	Cys	Leu 580	Glu	Glu	Glu	Arg	Leu 585	Leu	Leu	Val	Val	Thr 590	Ser	Thr
Phe	Gly	Asn 595	Gly	Asp	Cys	Pro	Gly 600	Asn	Gly	Glu	Lys	Leu 605	Lys	Lys	Ser

Leu	Phe 610	Met	Leu	Lys	Glu	Leu 615	Asn	Asn	Lys	Phe	Arg 620	Tyr	Ala	Val	Phe
Gly 625	Leu	Gly	Ser	Ser	Met 630	Tyr	Pro	Arg	Phe	Cys 635	Ala	Phe	Ala	His	Asp 640
Ile	Asp	Gln	Lys	Leu 645	Ser	His	Leu	Gly	Ala 650	Ser	Gln	Leu	Thr	Pro 655	Met
Gly	Glu	Gly	Asp 660	Glu	Leu	Ser	Gly	Gln 665	Glu	Asp	Ala	Phe	Arg 670	Ser	Trp
Ala	Val	Gln 675	Thr	Phe	Lys	Ala	Ala 680	Cys	Glu	Thr	Phe	Asp 685	Val	Arg	Gly
Lys	Gln 690	His	Ile	Gln	Ile	Pro 695	Lys	Leu	Tyr	Thr	Ser 700	Asn	Val	Thr	Trp
Asp 705	Pro	His	His	Tyr	Arg 710	Leu	Val	Gln	Asp	Ser 715	Gln	Pro	Leu	Asp	Leu 720
Ser	Lys	Ala	Leu	Ser 725	Ser	Met	His	Ala	Lys 730	Asn	Val	Phe	Thr	Met 735	Arg
Leu	Lys	Ser	Arg 740	Gln	Asn	Leu	Gln	Ser 745	Pro	Thr	Ser	Ser	Arg 750	Ala	Thr
Ile	Leu	Val 755	Glu	Leu	Ser	Cys	Glu 760	Asp	Gly	Gln	Gly	Leu 765	Asn	Tyr	Leu
Pro	Gly 770	Glu	His	Leu	Gly	Val 775	Cys	Pro	Gly	Asn	Gln 780	Pro	Ala	Leu	Val
Gln 785	Gly	Ile	Leu	Glu	Arg 790	Val	Val	Asp	Gly	Pro 795	Thr	Pro	His	Gln	Thr 800
Val	Arg	Leu	Glu	Ala 805	Leu	Asp	Glu	Ser	Gly 810	Ser	Tyr	Trp	Val	Ser 815	Asp
Lys	Arg	Leu	Pro 820	Pro	Cys	Ser	Leu	Ser 825	Gln	Ala	Leu	Thr	Tyr 830	Phe	Leu
Asp	Ile	Thr 835	Thr	Pro	Pro	Thr	Gln 840	Leu	Leu	Leu	Gln	Lys 845	Leu	Ala	Gln

Val Ala Thr Glu Glu Pro Glu Arg Gln Arg Leu Glu Ala Leu Cys 850 855 860	Gln
Pro Ser Glu Tyr Ser Lys Trp Lys Phe Thr Asn Ser Pro Thr Phe 865 870 875	Leu 880
Glu Val Leu Glu Glu Phe Pro Ser Leu Arg Val Ser Ala Gly Phe 885 890 895	Leu
Leu Ser Gln Leu Pro Ile Leu Lys Pro Arg Phe Tyr Ser Ile Ser 900 905 910	Ser
Ser Arg Asp His Thr Pro Thr Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val 915 920 925	Val
Thr Tyr His Thr Arg Asp Gly Gln Gly Pro Leu His His Gly Val 930 935 940	Cys
Ser Thr Trp Leu Asn Ser Leu Lys Pro Gln Asp Pro Val Pro Cys 945 950 955	Phe 960
Val Arg Asn Ala Ser Gly Phe His Leu Pro Glu Asp Pro Ser His 965 970 975	Pro
Cys Ile Leu Ile Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Ser 980 985 990	Phe
Trp Gln Gln Arg Leu His Asp Ser Gln His Lys Gly Val Arg Gl 995 1000 1005	y Gly
Arg Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Arg Pro Asp Glu Asp H 1010 1020	is
Ile Tyr Gln Glu Glu Met Leu Glu Met Ala Gln Lys Gly Val L 1025 1030 1035	eu
His Ala Val His Thr Ala Tyr Ser Arg Leu Pro Gly Lys Pro L 1040 1045 1050	ys
Val Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Gln Gln Leu Ala Ser Glu V 1055 1060 1065	al
Leu Arg Val Leu His Lys Glu Pro Gly His Leu Tyr Val Cys G 1070 1075 1080	31y

Asp Val Arg Met Ala Arg Asp Val Ala His Thr Leu Lys Gln Leu 

Val Ala Ala Lys Leu Lys Leu Asn Glu Glu Gln Val Glu Asp Tyr 

Phe Phe Gln Leu Lys Ser Gln Lys Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe 

Gly Ala Val Phe Pro Tyr Glu Ala Lys Lys Asp Arg Val Ala Val 

Gln Pro Ser Ser Leu Glu Met Ser Ala Leu 

<210> 6

<211> 1434 <212> PRT <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Glu Asp His Met Phe Gly Val Gln Gln Ile Gln Pro Asn Val Ile 

Ser Val Arg Leu Phe Lys Arg Lys Val Gly Gly Leu Gly Phe Leu Val 

Lys Glu Arg Val Ser Lys Pro Pro Val Ile Ile Ser Asp Leu Ile Arg 

Gly Gly Ala Ala Glu Gln Ser Gly Leu Ile Gln Ala Gly Asp Ile Ile 

Leu Ala Val Asn Gly Arg Pro Leu Val Asp Leu Ser Tyr Asp Ser Ala 

Leu Glu Val Leu Arg Gly Ile Ala Ser Glu Thr His Val Val Leu Ile 

Leu Arg Gly Pro Glu Gly Phe Thr Thr His Leu Glu Thr Thr Phe Thr 

Gly Asp Gly Thr Pro Lys Thr Ile Arg Val Thr Gln Pro Leu Gly Pro 

Pro Thr Lys Ala Val Asp Leu Ser His Gln Pro Pro Ala Gly Lys Glu 

Gln I 145	Pro	Leu	Ala	Val	Asp 150	Gly	Ala	Ser	Gly	Pro 155	Gly	Asn	Gly	Pro	Gln 160
His A	Ala	Tyr	Asp	Asp 165	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly 170	Ser	Leu	Pro	His	Ala 175	Asn
Gly 1	Leu	Ala	Pro 180	Arg	Pro	Pro	Gly	Gln 185	Asp	Pro	Ala	Lys	Lys 190	Ala	Thr
Arg \	Val	Ser 195	Leu	Gln	Gly	Arg	Gly 200	Glu	Asn	Asn	Glu	Leu 205	Leu	Lys	Glu
Ile (	Glu 210	Pro	Val	Leu	Ser	Leu 215	Leu	Thr	Ser	Gly	Ser 220	Arg	Gly	Val	Lys
Gly ( 225	Gly	Ala	Pro	Ala	Lys 230	Ala	Glu	Met	Lys	Asp 235	Met	Gly	Ile	Gln	Val 240
Asp A	Arg	Asp	Leu	Asp 245	Gly	Lys	Ser	His	Lys 250	Pro	Leu	Pro	Leu	Gly 255	Val
Glu A	Asn	Asp	Arg 260	Val	Phe	Asn	Asp	Leu 265	Trp	Gly	Lys	Gly	Asn 270	Val	Pro
Val <sup>v</sup>	Val	Leu 275	Asn	Asn	Pro	Tyr	Ser 280	Glu	Lys	Glu	Gln	Pro 285	Pro	Thr	Ser
Gly 1	Lys 290	Gln	Ser	Pro	Thr	Lys 295	Asn	Gly	Ser	Pro	Ser 300	Lys	Cys	Pro	Arg
Phe 1	Leu	Lys	Val	Lys	Asn 310	Trp	Glu	Thr	Glu	Val 315	Val	Leu	Thr	Asp	Thr 320
Leu I	His	Leu	Lys	Ser 325	Thr	Leu	Glu	Thr	Gly 330	Cys	Thr	Glu	Tyr	Ile 335	Cys
Met (	Gly	Ser	Ile 340	Met	His	Pro	Ser	Gln 345	His	Ala	Arg	Arg	Pro 350	Glu	Asp
Val A	Arg	Thr 355	Lys	Gly	Gln	Leu	Phe 360	Pro	Leu	Ala	Lys	Glu 365	Phe	Ile	Asp
Gln :	Tyr 370	Tyr	Ser	Ser	Ile	Lys 375	Arg	Phe	Gly	Ser	Lys 380	Ala	His	Met	Glu

Arg 385	Leu	Glu	Glu	Val	Asn 390	Lys	Glu	Ile	Asp	Thr 395	Thr	Ser	Thr	Tyr	Gln 400
Leu	Lys	Asp	Thr	Glu 405	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala 410	Lys	His	Ala	Trp	Arg 415	Asn
Ala	Ser	Arg	Cys 420	Val	Gly	Arg	Ile	Gln 425	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln 430	Val	Phe
Asp	Ala	Arg 435	Asp	Cys	Thr	Thr	Ala 440	His	Gly	Met	Phe	Asn 445	Tyr	Ile	Cys
Asn	His 450	Val	Lys	Tyr	Ala	Thr 455	Asn	Lys	Gly	Asn	Leu 460	Arg	Ser	Ala	Ile
Thr 465	Ile	Phe	Pro	Gln	Arg 470	Thr	Asp	Gly	Lys	His 475	Asp	Phe	Arg	Val	Trp 480
Asn	Ser	Gln	Leu	Ile 485	Arg	Tyr	Ala	Gly	Tyr 490	Lys	Gln	Pro	Asp	Gly 495	Ser
Thr	Leu	Gly	Asp 500	Pro	Ala	Asn	Val	Gln 505	Phe	Thr	Glu	Ile	Cys 510	Ile	Gln
Gln	Gly	Trp 515	Lys	Pro	Pro	Arg	Gly 520	Arg	Phe	Asp	Val	Leu 525	Pro	Leu	Leu
Leu	Gln 530	Ala	Asn	Gly	Asn	Asp 535	Pro	Glu	Leu	Phe	Gln 540	Ile	Pro	Pro	Glu
Leu 545	Val	Leu	Glu	Val	Pro 550	Ile	Arg	His	Pro	Lys 555	Phe	Glu	Trp	Phe	Lys 560
Asp	Leu	Gly	Leu	Lys 565	Trp	Tyr	Gly	Leu	Pro 570	Ala	Val	Ser	Asn	Met 575	Leu
Leu	Glu	Ile	Gly 580	Gly	Leu	Glu	Phe	Ser 585	Ala	Cys	Pro	Phe	Ser 590	Gly	Trp
Tyr	Met	Gly 595	Thr	Glu	Ile	Gly	Val 600	Arg	Asp	Tyr	Cys	Asp 605	Asn	Ser	Arg
Tyr	Asn 610	Ile	Leu	Glu	Glu	Val 615	Ala	Lys	Lys	Met	Asn 620	Leu	Asp	Met	Arg

Lys 625	Thr	Ser	Ser	Leu	Trp 630	Lys	Asp	Gln	Ala	Leu 635	Val	Glu	Ile	Asn	Ile 640
Ala	Val	Leu	Tyr	Ser 645	Phe	Gln	Ser	Asp	Lys 650	Val	Thr	Ile	Val	Asp 655	His
His	Ser	Ala	Thr 660	Glu	Ser	Phe	Ile	Lys 665	His	Met	Glu	Asn	Glu 670	Tyr	Arg
Cys	Arg	Gly 675	Gly	Cys	Pro	Ala	Asp 680	Trp	Val	Trp	Ile	Val 685	Pro	Pro	Met
Ser	Gly 690	Ser	Ile	Thr	Pro	Val 695	Phe	His	Gln	Glu	Met 700	Leu	Asn	Tyr	Arg
Leu 705	Thr	Pro	Ser	Phe	Glu 710	Tyr	Gln	Pro	Asp	Pro 715	Trp	Asn	Thr	His	Val 720
Trp	Lys	Gly	Thr	Asn 725	Gly	Thr	Pro	Thr	Lys 730	Arg	Arg	Ala	Ile	Gly 735	Phe
Lys	Lys	Leu	Ala 740	Glu	Ala	Val	Lys	Phe 745	Ser	Ala	Lys	Leu	Met 750	Gly	Gln
Ala	Met	Ala 755	Lys	Arg	Val	Lys	Ala 760	Thr	Ile	Leu	Tyr	Ala 765	Thr	Glu	Thr
Gly	Lys 770	Ser	Gln	Ala	Tyr	Ala 775	Lys	Thr	Leu	Cys	Glu 780	Ile	Phe	Lys	His
Ala 785	Phe	Asp	Ala	Lys	Val 790	Met	Ser	Met	Glu	Glu 795	Tyr	Asp	Ile	Val	His 800
Leu	Glu	His	Glu	Thr 805	Leu	Val	Leu	Val	Val 810	Thr	Ser	Thr	Phe	Gly 815	Asn
Gly	Asp	Pro	Pro 820	Glu	Asn	Gly	Glu	Lys 825	Phe	Gly	Cys	Ala	Leu 830	Met	Glu
Met	Arg	His 835	Pro	Asn	Ser	Val	Gln 840	Glu	Glu	Arg	Lys	Ser 845	Tyr	Lys	Val
Arg	Phe 850	Asn	Ser	Val	Ser	Ser 855	Tyr	Ser	Asp	Ser	Gln 860	Lys	Ser	Ser	Gly

Asp Gly Pro Asp 865	Leu Arg Asp 870		Ser Ala Gly 875	Pro Leu Ala 880
Asn Val Arg Phe	Ser Val Phe 885	Gly Leu Gly 890	Ser Arg Ala	Tyr Pro His 895
Phe Cys Ala Phe 900	Gly His Ala	Val Asp Thr 905	Leu Leu Glu	Glu Leu Gly 910
Gly Glu Arg Ile 915	Leu Lys Met	Arg Glu Gly 920	Asp Glu Leu 925	Cys Gly Gln
Glu Glu Ala Phe 930	Arg Thr Trp 935	Ala Lys Lys	Val Phe Lys 940	Ala Ala Cys
Asp Val Phe Cys 945	Val Gly Asp 950		Ile Glu Lys 955	Ala Asn Asn 960
Ser Leu Ile Ser	Asn Asp Arg 965	Ser Trp Lys 970	Arg Asn Lys	Phe Arg Leu 975
Thr Phe Val Ala 980	Glu Ala Pro	Glu Leu Thr 985	Gln Gly Leu	Ser Asn Val 990
His Lys Lys Arg 995	Val Ser Ala	Ala Arg Leu 1000	Leu Ser Aro	
Gln Ser Pro Lys 1010	s Ser Ser Arg 101		e Phe Val 1020	Arg Leu His
Thr Asn Gly Ser 1025	Gln Glu Leu 103		n Pro Gly 1	Asp His Leu
Gly Val Phe Pro	o Gly Asn His 104		u Val Asn 1050	Ala Leu Ile
Glu Arg Leu Glu 1055	ı Asp Ala Pro 106		n Gln Met '	Val Lys Val
Glu Leu Leu Glu 1070	ı Glu Arg Asn 107	_	u Gly Val 1080	Ile Ser Asn

Phe Lys 1100		Tyr	Leu	Asp	Ile 1105	Thr	Thr	Pro	Pro	Thr 1110	Pro	Leu	Gln
Leu Gln 1115		Phe	Ala	Ser	Leu 1120	Ala	Thr	Ser	Glu	Lys 1125	Glu	Lys	Gln
Arg Leu 1130		Val	Leu	Ser	Lys 1135	Gly	Leu	Gln	Glu	Tyr 1140	Glu	Glu	Trp
Lys Trp 1145	10000	Lys	Asn	Pro	Thr 1150		Val	Glu	Val	Leu 1155	Glu	Glu	Phe
Pro Ser 1160		Gln	Met	Pro	Ala 1165	Thr	Leu	Leu	Leu	Thr 1170	Gln	Leu	Ser
Leu Leu 1175		Pro	Arg	Tyr	Tyr 1180	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser 1185	Pro	Asp	Met
Tyr Pro 1190	100	Glu	Val	His	Leu 1195	Thr	Val	Ala	Ile	Val 1200	Ser	Tyr	Arg
Thr Arg 1205	_	Gly	Glu	Gly	Pro 1210	Ile	His	His	Gly	Val 1215	Cys	Ser	Ser
Trp Leu 1220		Arg	Ile	Gln	Ala 1225	Asp	Glu	Leu	Val	Pro 1230	Cys	Phe	Val
Arg Gly 1235		Pro	Ser	Phe	His 1240	Leu	Pro	Arg	Asn	Pro 1245	Gln	Val	Pro
Cys Ile 1250		Val	Gly	Pro	Gly 1255	Thr	Gly	Ile	Ala	Pro 1260	Phe	Arg	Ser
Phe Trp 1265		Gln	Arg	Gln	Phe 1270	Asp	Ile	Gln	His	Lys 1275	Gly	Met	Asn
Pro Cys 1280		Met	Val	Leu	Val 1285	Phe	Gly	Cys	Arg	Gln 1290	Ser	Lys	Ile
Asp His 1295		Tyr	Arg	Glu	Glu 1300	Thr	Leu	Gln	Ala	Lys 1305	Asn	Lys	Gly
Val Phe 1310		Glu	Leu	Tyr	Thr 1315	Ala	Tyr	Ser	Arg	Glu 1320	Pro	Asp	Lys

Pro	Lys 1325	Lys	Tyr	Val	Gln	Asp 1330	Ile	Leu	Gln	Glu	Gln 1335	Leu	Ala	Glu
Ser	Val 1340	Tyr	Arg	Ala	Leu	Lys 1345	Glu	Gln	Gly	Gly	His 1350	Ile	Tyr	Val
Cys	Gly 1355	Asp	Val	Thr	Met	Ala 1360	Ala	Asp	Val	Leu	Lys 1365	Ala	Ile	Gln
Arg	Ile 1370	Met	Thr	Gln	Gln	Gly 1375	Lys	Leu	Ser	Ala	Glu 1380	Asp	Ala	Gly
Val	Phe 1385	Ile	Ser	Arg	Met	Arg 1390	Asp	Asp	Asn	Arg	Tyr 1395	His	Glu	Asp
Ile	Phe 1400	Gly	Val	Thr	Leu	Arg 1405		Tyr	Glu	Val	Thr 1410	Asn	Arg	Leu
Arg	Ser 1415	Glu	Ser	Ile	Ala	Phe 1420	Ile	Glu	Glu	Ser	Lys 1425	Lys	Asp	Thr
Asp	Glu 1430	Val	Phe	Ser	Ser									



(21) N.º solicitud: 201130153

2 Fecha de presentación de la solicitud: 04.02.2011

32 Fecha de prioridad:

#### INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

<b>61K31/195</b> (2006.01) <b>61P3/10</b> (2006.01)

#### **DOCUMENTOS RELEVANTES**

Categoría	66	Reivindicaciones afectadas	
Х		d Nitric Oxide in Islet Inflammation and Diabetes. Proceedings of my and Medicine. 1996. Vol. 211(1), páginas: 24-32, todo el	1-4
X		O in Modulation of COX-2 Expression and PGE2 Production in a et Biophysica sinica. 2005. Vol. 37(2), páginas: 139-146, todo	1-4
Α		tion of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. 7. 1993. Vol. 233, páginas: 119-125, todo el documento.	1-4
Α	ES 2193285 T3 (SMITHKLINE BEI	ECHAM) 01.11.2003, todo el documento.	1-4
X: d Y: d r	egoría de los documentos citados le particular relevancia le particular relevancia combinado con ot nisma categoría efleja el estado de la técnica	O: referido a divulgación no escrita ro/s de la P: publicado entre la fecha de prioridad y la de pr de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después d de presentación de la solicitud	
	presente informe ha sido realizado para todas las reivindicaciones	para las reivindicaciones nº:	
Fecha	de realización del informe 04.06.2012	Examinador M. D. García Grávalos	<b>Página</b> 1/5

# INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 201130153

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)							
A61K, A61P							
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)							
INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.							

**OPINIÓN ESCRITA** 

Nº de solicitud: 201130153

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Reivindicaciones

SI

Reivindicaciones 1-4 NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) Reivindicaciones SI

Reivindicaciones 1-4 NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

#### Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Nº de solicitud: 201130153

#### 1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	McDANIEL ML et al. Proceedings of the Society for Experimental	1996
	Biology and Medicine. 1996. Vol. 211(1), páginas: 24-32.	
D02	LING J-J et al. Acta Biochimica et Biophysica sinica. 2005.	2005
	Vol. 37(2), páginas: 139-146.	
D03	MISKO TP. et al. European Journal of Pharmacology. 1993. Vol.	1993
	233, páginas: 119-125.	
D04	ES 2193285 T3	01.11.2003

# 2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga el uso de una composición que contiene el compuesto N-monometil-L-arginina (L-NMMA), inhibidor de la actividad de las NO sintasas, para elaboración de un medicamento para prevención y/o tratamiento de la prediabetes o diabetes tipo 1 (reivindicaciones 1-3). Se refiere también a un método de diagnóstico y/o pronóstico de la prediabetes o diabetes tipo 1 mediante la determinación de la actividad de las NO sintasas en una muestra extraída de un mamífero y comparación de la actividad obtenida con valores estándar en mamíferos sanos o que padecen la enfermedad (reivindicación 4).

El documento D01 divulga un estudio sobre la función de las citoquinas y el oxido nítrico en la destrucción de las células beta del páncreas en procesos de diabetes tipo 1. La diabetes dependiente de insulina se caracteriza por una insulitis, o inflamación de los islotes de Langerhans, con infiltración de células autoinmunes que conducen a la atrofia y desaparición de las células beta, productoras de insulina. Este proceso es producido principalmente por la citoquina interleuquina-1 (IL-1) que induce la inhibición de secreción de insulina dependiente de la producción de ácido nítrico por L-arginina. El compuesto N-monometil-L-arginina (L-NMMA), inhibidor de la actividad de las NO sintasas, previene completamente la inhibición de la secreción de insulina, así como la producción de nitrito, producto de la oxidación de NO, hecho que sugiere el uso de inhibidores de las NO sintasas en estudios de procesos de diabetes en animales (ver todo el documento).

El documento D02 divulga un estudio sobre la función del ácido nítrico (NO) en la modulación de la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) de prostaglandina E2 (PGE2) en células beta del páncreas. La diabetes tipo 1, dependiente de insulina, se caracteriza por una inflamación de los islotes de Langerhans, producida fundamentalmente por la acción de la por la citoquina interleuquina-1 (IL-1), que induce la expresión de la forma inducible de la enzima oxido nítrico sintasa (iNOS) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), produciendo oxido nítrico y prostaglandina E2 (PGE2), lo que produce daños en las células beta del páncreas inhibiendo su función. El uso del compuesto N-monometil-L-arginina (L-NMMA), inhibidor de la actividad de las NO sintasas, inhibe la producción de NO y atenúa la de PGE2, bloqueando la transcripción y expresión de COX-2 inducida por IL-1, lo que sugiere una posible estrategia de actuación durante el desarrollo de procesos de diabetes tipo 1 (ver todo el documento).

El documento D03 divulga un estudio sobre la inhibición de la forma inducible de la enzima oxido nitro sintasa por aminoguanidina. Este compuesto muestra una actividad equipotente a la del inhibidor N-monometil-L-arginina cuando se trata de la forma inducida y una actividad de 10 a 100 veces menor si se trata de la forma constitutiva de la enzima. Considera que la aminoguanidina también puede ser útil, como inhibidor selectivo de la forma inducible de la enzima oxido nitro sintasa, en el caso enfermedades caracterizadas por la superproducción patológica de oxido nítrico (ver todo el documento).

El documento D04 divulga el uso de un inhibidor de la NO-sintasa o de uno de sus derivados farmacéuticamente aceptables para la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de la diabetes tipo-2. Estos inhibidores de la NO-sintasa, incluyen compuestos proteicos y no proteicos, tales como aminoguanidina y la n-monometilarginina, u otros análogos de la l-arginina (ver todo el documento).

**OPINIÓN ESCRITA** 

Nº de solicitud: 201130153

#### 1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente invención es el uso de una composición que contiene el compuesto N-monometil-L-arginina (L-NMMA) para elaboración de un medicamento para prevención y/o tratamiento de la prediabetes o diabetes tipo 1.

#### 1.1. REIVINDICACIONES 1-4

Los documentos D01 y D02 se consideran los más cercanos al estado de la técnica ya que anticipan la función de las citoquinas, principalmente de la interleuquina-1, y del oxido nítrico en procesos de diabetes tipo 1, destruyendo las células beta del páncreas e inhibiendo la producción de insulina. Estos documentos, anticipan también el uso de inhibidores de las NO sintasas para revertir el daño producido y evitar la inhibición de la secreción de insulina, incluyendo estudios de diabetes en animales. En los estudios realizados, la N-monometil-L-arginina (L-NMMA) se utiliza como inhibidor principal de las NO sintasas.

En consecuencia, según lo expuesto en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-4 no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D03 y D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.