

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 831**

21 Número de solicitud: 201130153

51 Int. Cl.:

A61K 31/195 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.02.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.08.2012

Fecha de la concesión:

26.06.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

08.07.2013

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (100.0%)
Avda. de la Constitución 18
41071 Sevilla (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.

ES 2 386 831 B1

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)

5 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

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
15 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
20 además de la muerte celular existen también mecanismos que frenan el proceso regenerativo de la célula beta en respuesta a estos daños.

La diabetes mellitus puede ser definida como una elevación crónica de la glucosa en sangre (hiperglucemia). Con frecuencia se acompaña de polidipsia,
25 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
30 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 antiisletos circulantes y que cursa con deterioro funcional y estructural progresivo de la masa de células beta

5 (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

10 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 &

15 Serrano-Rios 1994. *Med Clin (Barc)* 102 (8): 306-15; Mathis *et al.*, 2001. *Nature.* 414 (6865): 792-8).

La DM1 se inicia con un desorden de la inmunoregulación de origen desconocido que da lugar a la presentación de autoantígenos pancreáticos a

20 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 insulinitis. Las células del infiltrado, bien de forma directa o mediante la liberación de citoquinas inflamatorias (IL-1beta,

25 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
- 5 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.
- 10 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
- 15 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
- 20 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*
- 25 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*
- 30 *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 insulinitis, antes de que comience el incremento de apoptosis de las células beta.

El óxido nítrico es una molécula que actúa como segundo mensajero en
5 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 citotóxicas . 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:
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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

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 proapoptóticos 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 bomba 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

(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 del 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 varía con respecto a los cultivos control.

- 5 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
- 10 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
- 15 de las células beta pancreáticas y su afectación por el proceso patológico de la DM1

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 20 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
- 25 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
- 30 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.

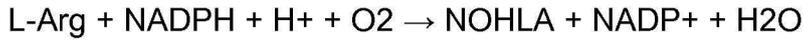
10

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,
- 15 (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 eucarióticas que catalizan la producción de óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina, 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 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
25 (flavín-adenín-dinucleótido), FMN (flavín mononucleótido), hemo, 30 tetrahidrobiopterina (BH₄) y calmodulina. Catalizan la siguiente reacción:



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

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
10 (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
15 diversas variantes procedentes de:

- 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),
- 20 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
25 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
30 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:

- 5 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 6,
- 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,
- 10 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
- 15 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, 1-amino-2-hidroxiguanidina, ácido 1-pirrolidinacarboditioico, 2-etil-2-tiopseudourea, 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

20 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-2-tiopseudourea, 7-nitroindazol, aminoguanidina, mesilato de bromocriptina, péptido dominio "scaffolding" de calveolina-1, clorpromazina, dexametasona,

30 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, HCl (*N^G-Nitro-L-arginine Methyl Ester, Hydrochloride. N^ω-NO₂-L-Arg-OMe, N^G-NO₂-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 (IC₅₀ = 500 nM). Inhibe de forma prolongada la relajación inducida por acetilcolina en anillos aorticos de rata (IC₅₀ = 400 nM).

1400W, *N-(3-Aminomethyl)benzylacetamide*, 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 (IC₅₀ = 68 μM). Ensayado en macrófagos murinos y células musculares lisas de aorta de rata en cultivo

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

20 2-etil-2-tiopseudourea, Bromhidrato. Inhibidor potente, competitivo y permeable a la célula de las tres isoformas de la NOS (K_i =17 nM para iNOS; K_i = 36 nM para eNOS; K_i =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 (IC₅₀ = 710 nM) aunque también se ha descrito actividad inhibidora de la NOS endotelial bovina (IC₅₀ = 800 nM).

30 Aminoguanidina, Hemisulfato. Inhibidor de las formas constitutiva (IC₅₀ = 526 μM) e inducible (IC₅₀ = 250 μM) de la NOS. Ensayado en homogeneizados de tejido ileal de rata.

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

(IC₅₀ = 10 µM) afectando su activación por calmodulina. Presenta solo un suave efecto inhibitorio sobre la NOS inducible de los macrófagos (IC₅₀ >100 µM). Presenta además capacidad inhibitoria de la secreción de prolactina, actúa como agonista del receptor de dopamina D₂, modula la función de la P-glicoproteína e inhibe las actividades Mg²⁺ ATPasa (IC₅₀ = 300 nM) y P-gp ATPasa inducida por verapamil (K_i = 200 nM).

Péptido dominio "scaffolding" de calveolina-1. Es un péptido permeable a la célula formado por el dominio "scaffolding" de calveolina-1 (C1-SD₈₂₋₁₀₁) unido por el extremo amino terminal a la secuencia 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 lipopolisacárido en pulmón murino.

Dexametasona. Es uno de los glucocorticoides más activos y estables. Entre sus numerosas acciones, está la de inhibir la forma inducible de la NOS en células endoteliales (IC₅₀ = 5 nM).

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 contraídos (IC₅₀ = 180 nM). También inhibe NOS inducible en macrófagos (IC₅₀ = 50 nM).

L-NIO L-N⁵-(1-Iminoetil)ornitina, dihidrocloruro. Potente inhibidor permeable a la célula con mucha mayor especificidad por la NOS endotelial (eNOS; IC₅₀ = 500 nM) que otros análogos de arginina como L-NAME y L-NMMA. Inhibe la relajación inducida por acetilcolina de anillos aórticos de rata (IC₅₀ = 2 µM) y causa un incremento dosis dependiente de la presión arterial media en ratas (EC₅₀ = 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 ($IC_{50} = 3.3 \mu M$) que por su forma neuronal ($IC_{50} = 92 \mu M$). Presenta una potencia inhibitoria 10 veces superior a la de L-NMMA inhibiendo la producción de NO_2^- inducida por interferón ($IC_{50} = 460 nM$).

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

10 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.

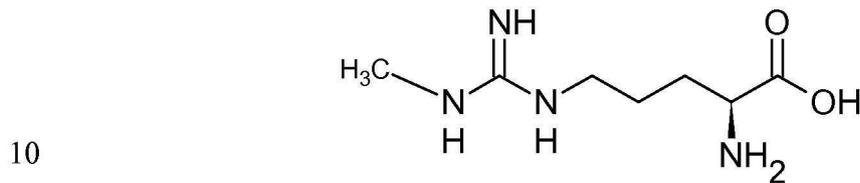
L-NNA (N^G -Nitro-L-arginine. N^G - NO_2 -L-Arg). Potente inhibidor reversible y permeable a la célula de las isoformas neuronal y endotelial de la NOS. "In vivo" causa una reducción en la frecuencia cardiaca y profunda vasoconstricción.

N-PLA (N^G -Propyl-L-arginine. N^ω -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^ω -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 $K_i = 9.5 \mu\text{M}$ (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 ω -monometil-L-arginina (L-NMMA),
 5 de fórmula (I):



(I)

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

15

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
 20 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
 25 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
 30 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

- 5 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.
- 10 Los inhibidores de cualquiera de las NOS sintasas, y entre ellos la N ω -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
- 15 composición, la cantidad de inhibidores de cualquiera de las NOS sintasas, y entre ellos el N ω -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 Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el
- 30 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.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su
5 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
10 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
15 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
20 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,
25 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
30 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 ω -monometil-L-arginina (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
5 “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

10 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

5 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
10 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
15 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:

- 20 (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.

25 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
30 valores en presencia de un compuesto empleado en la elaboración de un medicamento para prevenir o tratar la diabetes mellitus tipo I.

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
5 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)
10 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
15 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**

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
25 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 \pm e.e.m. para n=3 animales. *p \leq 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
30 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

- 5 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:

- 15 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:

- 20 **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

- 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
- 30

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, obteniéndose 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 paraformaldehído 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

10 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.
- 15 - 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 policlonal anti-insulina de cobaya.
- 20 - Revelado mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios contra inmunoglobulinas de ratón y cobaya conjugados, respectivamente, con los fluoróforos Alexa 546 y Alexa 488.

La cuantificación de células beta proliferativas se realizó mediante el conteo, 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 N° células proliferantes (BrdU⁺Insulina⁺)/Área insulina⁺ (milímetros²)

30 **Histomorfometría**

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

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

- 5 - 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).
- Bloqueo con BSA al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 10 - 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.
- 15 - 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)
- 25 - Contraintinción 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-
5 Withney test en una población n=3 animales por grupo.

.

Resultados obtenidos

Los resultados pueden observarse en las Fig. 1 – 2. Como se puede observar
10 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
15 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
20 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

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
30 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 insulinitis.

5 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.

10 Los inhibidores de la 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*).

25 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

Además, respecto a la seguridad de la utilización de este fármaco (LNMMA), ésta quedó 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.*

10

REIVINDICACIONES

- 5 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.
- 10 2- El uso de la composición según la reivindicación anterior, donde la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 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:
- 20 (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

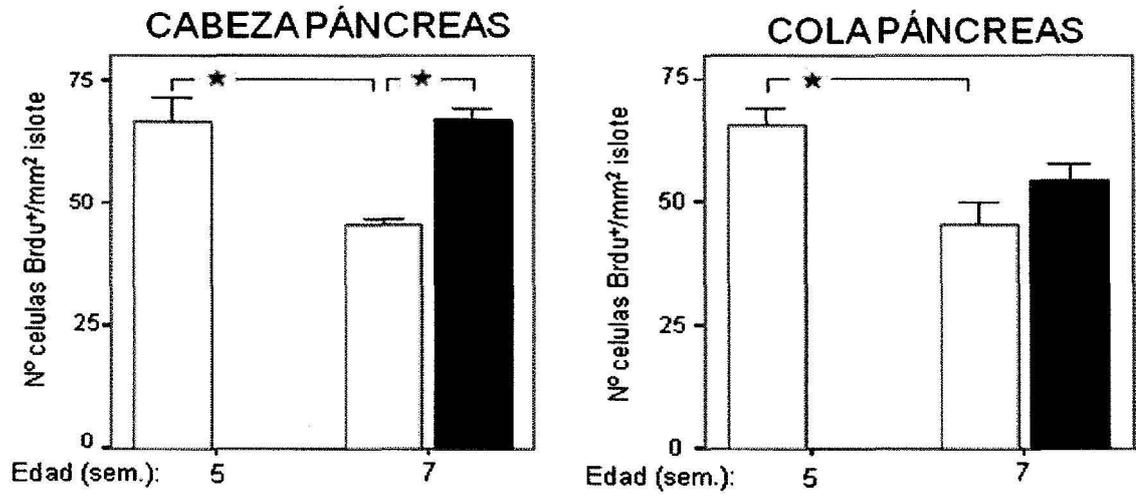


Fig. 1

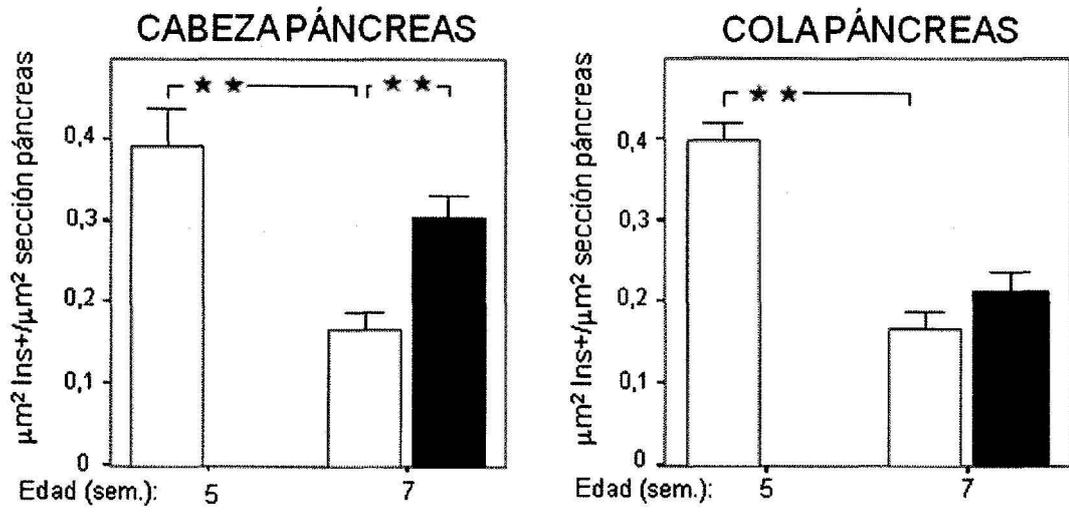


Fig.2

ES 2 386 831 B1

LISTA DE SECUENCICAS

<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 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

ES 2 386 831 B1

Gly Thr Tyr Gln Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln
 165 170 175

Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys
 180 185 190

Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu
 210 215 220

Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp
 225 230 235 240

Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg Gln
 245 250 255

Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile Thr Glu
 260 265 270

Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe Asp Val
 275 280 285

Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Asp Pro Pro Glu Leu Phe Leu
 290 295 300

Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro Thr Leu
 305 310 315 320

Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val
 325 330 335

Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro
 340 345 350

Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys
 355 360 365

Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp
 370 375 380

Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val
 385 390 395 400

ES 2 386 831 B1

Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr
 405 410 415

Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu
 420 425 430

Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile
 435 440 445

Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met
 450 455 460

Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp
 465 470 475 480

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
 530 535 540

Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser
 545 550 555 560

Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn
 565 570 575

Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu
 580 585 590

Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser
 595 600 605

Tyr Lys Ile Arg Phe Asn Ser Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser
 610 615 620

Ser Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly
 625 630 635 640

ES 2 386 831 B1

Ala Leu Gly Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala
645 650 655

Tyr Pro His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu
660 665 670

Glu Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu
675 680 685

Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln
690 695 700

Ala Ala Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala
705 710 715 720

Arg Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr Arg
725 730 735

Leu Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu Ile His
740 745 750

Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser Val Glu Asn
755 760 765

Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg Leu Asp
770 775 780

Thr Gly Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Ile Gly
785 790 795 800

Val Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg
805 810 815

Val Glu Asp Pro Pro Ala Pro Thr Glu Pro Val Ala Val Glu Gln Leu
820 825 830

Glu Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro
835 840 845

Arg Leu Pro Pro Cys Thr Leu Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp
850 855 860

Ile Thr Ser Pro Pro Ser Pro Gln Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu
865 870 875 880

ES 2 386 831 B1

Ala Glu Glu Pro Arg Glu Gln Gln Glu Leu Glu Ala Leu Ser Gln Asp
885 890 895

Pro Arg Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu
900 905 910

Glu Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu
915 920 925

Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser Ser
930 935 940

Ala Pro Ser Thr His Pro Gly Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Leu
945 950 955 960

Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly Val Cys
965 970 975

Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Pro Gly Asp Pro Val Pro Cys Phe
980 985 990

Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Ser Leu Pro
995 1000 1005

Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Gly
1010 1015 1020

Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln
1025 1030 1035

Pro Thr Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu
1040 1045 1050

Asp His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asn Ala Gln Gln Arg Gly
1055 1060 1065

Val Phe Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Asn
1070 1075 1080

Pro Lys Thr Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala
1085 1090 1095

Glu Val His Arg Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val
1100 1105 1110

ES 2 386 831 B1

Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Thr Asn Val Leu Gln Thr Val Gln
 1115 1120 1125

Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly
 1130 1135 1140

Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln Gln Arg Tyr His Glu Asp
 1145 1150 1155

Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu Val Thr Ser Arg Ile
 1160 1165 1170

Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln Leu Arg Gly Ala
 1175 1180 1185

Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr Asn Ser Pro
 1190 1195 1200

<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
 1 5 10 15

Leu Gly 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

ES 2 386 831 B1

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 Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln
 165 170 175

Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys
 180 185 190

Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu
 210 215 220

Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp
 225 230 235 240

Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg Gln
 245 250 255

Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile Thr Glu
 260 265 270

Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe Asp Val
 275 280 285

Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Asp Pro Pro Glu Leu Phe Leu
 290 295 300

Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro Thr Leu
 305 310 315 320

Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val
 325 330 335

Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro
 340 345 350

Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys
 355 360 365

ES 2 386 831 B1

Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp
 370 375 380

Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val
 385 390 395 400

Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr
 405 410 415

Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu
 420 425 430

Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile
 435 440 445

Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met
 450 455 460

Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp
 465 470 475 480

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
 530 535 540

Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser
 545 550 555 560

Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn
 565 570 575

Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Val Ser Leu Pro Glu Val Ser
 580 585 590

Val Thr Thr Glu
 595

<210> 3

ES 2 386 831 B1

<211> 614
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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 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 Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln
 165 170 175

Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys
 180 185 190

Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu
 210 215 220

ES 2 386 831 B1

Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp
 225 230 235 240

Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg Gln
 245 250 255

Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile Thr Glu
 260 265 270

Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe Asp Val
 275 280 285

Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Asp Pro Pro Glu Leu Phe Leu
 290 295 300

Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro Thr Leu
 305 310 315 320

Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val
 325 330 335

Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro
 340 345 350

Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys
 355 360 365

Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp
 370 375 380

Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val
 385 390 395 400

Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr
 405 410 415

Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu
 420 425 430

Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile
 435 440 445

Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met
 450 455 460

ES 2 386 831 B1

Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp
 465 470 475 480

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
 530 535 540

Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser
 545 550 555 560 565

Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn
 565 570 575

Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Arg Trp Gly Phe Ala Met Leu Pro
 580 585 590

Arg Leu Val Ser Asn Ser Trp Val Gln Ala Ile His Leu Pro Arg Pro
 595 600 605

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
 1 5 10 15

Leu Gly 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

ES 2 386 831 B1

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 Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln
 165 170 175

Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys
 180 185 190

Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu
 210 215 220

Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp
 225 230 235 240

Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg Gln
 245 250 255

Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile Thr Glu
 260 265 270

Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe Asp Val
 275 280 285

Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Asp Pro Pro Glu Leu Phe Leu
 290 295 300

ES 2 386 831 B1

Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro Thr Leu
 305 310 315 320

Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val
 325 330 335

Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro
 340 345 350

Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys
 355 360 365

Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp
 370 375 380

Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val
 385 390 395 400

Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr
 405 410 415

Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu
 420 425 430

Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile
 435 440 445

Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met
 450 455 460

Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp
 465 470 475 480

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
 530 535 540

ES 2 386 831 B1

Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser
 545 550 555 560

Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn
 565 570 575

Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Gly Leu Thr Leu Trp Pro Arg Leu
 580 585 590

Glu Cys Ser Ser Thr Ile Thr Ala His Cys Ser Leu Asn Leu Leu Asp
 595 600 605

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
 1 5 10 15

Ala Met Asn Gly Glu Lys Asp Ile Asn Asn Asn Val Glu Lys Ala Pro
 20 25 30

Cys Ala Thr Ser Ser Pro Val Thr Gln Asp Asp Leu Gln Tyr His Asn
 35 40 45

Leu Ser Lys Gln Gln Asn Glu Ser Pro Gln Pro Leu Val Glu Thr Gly
 50 55 60

Lys Lys Ser Pro Glu Ser Leu Val Lys Leu Asp Ala Thr Pro Leu Ser
 65 70 75 80

Ser Pro Arg His Val Arg Ile Lys Asn Trp Gly Ser Gly Met Thr Phe
 85 90 95

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

ES 2 386 831 B1

Pro Arg Asp Lys Pro Thr Pro Pro Asp Glu Leu Leu Pro Gln Ala Ile
 130 135 140

Glu Phe Val Asn Gln Tyr Tyr Gly Ser Phe Lys Glu Ala Lys Ile Glu
 145 150 155 160

Glu His Leu Ala Arg Val Glu Ala Val Thr Lys Glu Ile Glu Thr Thr
 165 170 175

Gly Thr Tyr Gln Leu Thr Gly Asp Glu Leu Ile Phe Ala Thr Lys Gln
 180 185 190

Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Ile Gly Arg Ile Gln Trp Ser Asn
 195 200 205

Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Ser Cys Ser Thr Ala Arg Glu Met Phe
 210 215 220

Glu His Ile Cys Arg His Val Arg Tyr Ser Thr Asn Asn Gly Asn Ile
 225 230 235 240

Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Ser Asp Gly Lys His Asp
 245 250 255

Phe Arg Val Trp Asn Ala Gln Leu Ile Arg Tyr Ala Gly Tyr Gln Met
 260 265 270

Pro Asp Gly Ser Ile Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Phe Thr Gln
 275 280 285

Leu Cys Ile Asp Leu Gly Trp Lys Pro Lys Tyr Gly Arg Phe Asp Val
 290 295 300

Val Pro Leu Val Leu Gln Ala Asn Gly Arg Asp Pro Glu Leu Phe Glu
 305 310 315 320

Ile Pro Pro Asp Leu Val Leu Glu Val Ala Met Glu His Pro Lys Tyr
 325 330 335

Glu Trp Phe Arg Glu Leu Glu Leu Lys Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val
 340 345 350

Ala Asn Met Leu Leu Glu Val Gly Gly Leu Glu Phe Pro Gly Cys Pro
 355 360 365

ES 2 386 831 B1

Phe Asn Gly Trp Tyr Met Gly Thr Glu Ile Gly Val Arg Asp Phe Cys
 370 375 380

Asp Val Gln Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Glu Val Gly Arg Arg Met Gly
 385 390 395 400

Leu Glu Thr His Lys Leu Ala Ser Leu Trp Lys Asp Gln Ala Val Val
 405 410 415

Glu Ile Asn Ile Ala Val Leu His Ser Phe Gln Lys Gln Asn Val Thr
 420 425 430 435

Ile Met Asp His His Ser Ala Ala Glu Ser Phe Met Lys Tyr Met Gln
 435 440 445

Asn Glu Tyr Arg Ser Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ile Trp Leu
 450 455 460

Val Pro Pro Met Ser Gly Ser Ile Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met
 465 470 475 480

Leu Asn Tyr Val Leu Ser Pro Phe Tyr Tyr Tyr Gln Val Glu Ala Trp
 485 490 495

Lys Thr His Val Trp Gln Asp Glu Lys Arg Arg Pro Lys Arg Arg Glu
 500 505 510

Ile Pro Leu Lys Val Leu Val Lys Ala Val Leu Phe Ala Cys Met Leu
 515 520 525

Met Arg Lys Thr Met Ala Ser Arg Val Arg Val Thr Ile Leu Phe Ala
 530 535 540

Thr Glu Thr Gly Lys Ser Glu Ala Leu Ala Trp Asp Leu Gly Ala Leu
 545 550 555 560

Phe Ser Cys Ala Phe Asn Pro Lys Val Val Cys Met Asp Lys Tyr Arg
 565 570 575

Leu Ser Cys Leu Glu Glu Glu Arg Leu Leu Leu Val Val Thr Ser Thr
 580 585 590

Phe Gly Asn Gly Asp Cys Pro Gly Asn Gly Glu Lys Leu Lys Lys Ser
 595 600 605

ES 2 386 831 B1

Leu Phe Met Leu Lys Glu Leu Asn Asn Lys Phe Arg Tyr Ala Val Phe
 610 615 620

Gly Leu Gly Ser Ser Met Tyr Pro Arg Phe Cys Ala Phe Ala His Asp
 625 630 635 640

Ile Asp Gln Lys Leu Ser His Leu Gly Ala Ser Gln Leu Thr Pro Met
 645 650 655

Gly Glu Gly Asp Glu Leu Ser Gly Gln Glu Asp Ala Phe Arg Ser Trp
 660 665 670

Ala Val Gln Thr Phe Lys Ala Ala Cys Glu Thr Phe Asp Val Arg Gly
 675 680 685

Lys Gln His Ile Gln Ile Pro Lys Leu Tyr Thr Ser Asn Val Thr Trp
 690 695 700

Asp Pro His His Tyr Arg Leu Val Gln Asp Ser Gln Pro Leu Asp Leu
 705 710 715 720

Ser Lys Ala Leu Ser Ser Met His Ala Lys Asn Val Phe Thr Met Arg
 725 730 735

Leu Lys Ser Arg Gln Asn Leu Gln Ser Pro Thr Ser Ser Arg Ala Thr
 740 745 750

Ile Leu Val Glu Leu Ser Cys Glu Asp Gly Gln Gly Leu Asn Tyr Leu
 755 760 765

Pro Gly Glu His Leu Gly Val Cys Pro Gly Asn Gln Pro Ala Leu Val
 770 775 780

Gln Gly Ile Leu Glu Arg Val Val Asp Gly Pro Thr Pro His Gln Thr
 785 790 795 800

Val Arg Leu Glu Ala Leu Asp Glu Ser Gly Ser Tyr Trp Val Ser Asp
 805 810 815

Lys Arg Leu Pro Pro Cys Ser Leu Ser Gln Ala Leu Thr Tyr Phe Leu
 820 825 830

Asp Ile Thr Thr Pro Pro Thr Gln Leu Leu Leu Gln Lys Leu Ala Gln
 835 840 845

ES 2 386 831 B1

Val Ala Thr Glu Glu Pro Glu Arg Gln Arg Leu Glu Ala Leu Cys Gln
 850 855 860

Pro Ser Glu Tyr Ser Lys Trp Lys Phe Thr Asn Ser Pro Thr Phe Leu
 865 870 875 880

Glu Val Leu Glu Glu Phe Pro Ser Leu Arg Val Ser Ala Gly Phe Leu
 885 890 895

Leu Ser Gln Leu Pro Ile Leu Lys Pro Arg Phe Tyr Ser Ile Ser Ser
 900 905 910

Ser Arg Asp His Thr Pro Thr Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Val
 915 920 925

Thr Tyr His Thr Arg Asp Gly Gln Gly Pro Leu His His Gly Val Cys
 930 935 940

Ser Thr Trp Leu Asn Ser Leu Lys Pro Gln Asp Pro Val Pro Cys Phe
 945 950 955 960

Val Arg Asn Ala Ser Gly Phe His Leu Pro Glu Asp Pro Ser His Pro
 965 970 975

Cys Ile Leu Ile Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Ser Phe
 980 985 990

Trp Gln Gln Arg Leu His Asp Ser Gln His Lys Gly Val Arg Gly Gly
 995 1000 1005

Arg Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Arg Pro Asp Glu Asp His
 1010 1015 1020

Ile Tyr Gln Glu Glu Met Leu Glu Met Ala Gln Lys Gly Val Leu
 1025 1030 1035

His Ala Val His Thr Ala Tyr Ser Arg Leu Pro Gly Lys Pro Lys
 1040 1045 1050

Val Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Gln Gln Leu Ala Ser Glu Val
 1055 1060 1065

Leu Arg Val Leu His Lys Glu Pro Gly His Leu Tyr Val Cys Gly
 1070 1075 1080

ES 2 386 831 B1

Asp Val Arg Met Ala Arg Asp Val Ala His Thr Leu Lys Gln Leu
 1085 1090 1095

Val Ala Ala Lys Leu Lys Leu Asn Glu Glu Gln Val Glu Asp Tyr
 1100 1105 1110

Phe Phe Gln Leu Lys Ser Gln Lys Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe
 1115 1120 1125

Gly Ala Val Phe Pro Tyr Glu Ala Lys Lys Asp Arg Val Ala Val
 1130 1135 1140

Gln Pro Ser Ser Leu Glu Met Ser Ala Leu
 1145 1150

<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
 1 5 10 15

Ser Val Arg Leu Phe Lys Arg Lys Val Gly Gly Leu Gly Phe Leu Val
 20 25 30

Lys Glu Arg Val Ser Lys Pro Pro Val Ile Ile Ser Asp Leu Ile Arg
 35 40 45

Gly Gly Ala Ala Glu Gln Ser Gly Leu Ile Gln Ala Gly Asp Ile Ile
 50 55 60

Leu Ala Val Asn Gly Arg Pro Leu Val Asp Leu Ser Tyr Asp Ser Ala
 65 70 75 80

Leu Glu Val Leu Arg Gly Ile Ala Ser Glu Thr His Val Val Leu Ile
 85 90 95

Leu Arg Gly Pro Glu Gly Phe Thr Thr His Leu Glu Thr Thr Phe Thr
 100 105 110

Gly Asp Gly Thr Pro Lys Thr Ile Arg Val Thr Gln Pro Leu Gly Pro
 115 120 125

Pro Thr Lys Ala Val Asp Leu Ser His Gln Pro Pro Ala Gly Lys Glu
 130 135 140

ES 2 386 831 B1

Gln Pro Leu Ala Val Asp Gly Ala Ser Gly Pro Gly Asn Gly Pro Gln
 145 150 155 160

His Ala Tyr Asp Asp Gly Gln Glu Ala Gly Ser Leu Pro His Ala Asn
 165 170 175

Gly Leu Ala Pro Arg Pro Pro Gly Gln Asp Pro Ala Lys Lys Ala Thr
 180 185 190

Arg Val Ser Leu Gln Gly Arg Gly Glu Asn Asn Glu Leu Leu Lys Glu
 195 200 205

Ile Glu Pro Val Leu Ser Leu Leu Thr Ser Gly Ser Arg Gly Val Lys
 210 215 220

Gly Gly Ala Pro Ala Lys Ala Glu Met Lys Asp Met Gly Ile Gln Val
 225 230 235 240

Asp Arg Asp Leu Asp Gly Lys Ser His Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val
 245 250 255

Glu Asn Asp Arg Val Phe Asn Asp Leu Trp Gly Lys Gly Asn Val Pro
 260 265 270

Val Val Leu Asn Asn Pro Tyr Ser Glu Lys Glu Gln Pro Pro Thr Ser
 275 280 285

Gly Lys Gln Ser Pro Thr Lys Asn Gly Ser Pro Ser Lys Cys Pro Arg
 290 295 300

Phe Leu Lys Val Lys Asn Trp Glu Thr Glu Val Val Leu Thr Asp Thr
 305 310 315 320

Leu His Leu Lys Ser Thr Leu Glu Thr Gly Cys Thr Glu Tyr Ile Cys
 325 330 335

Met Gly Ser Ile Met His Pro Ser Gln His Ala Arg Arg Pro Glu Asp
 340 345 350

Val Arg Thr Lys Gly Gln Leu Phe Pro Leu Ala Lys Glu Phe Ile Asp
 355 360 365

Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Phe Gly Ser Lys Ala His Met Glu
 370 375 380

ES 2 386 831 B1

Arg Leu Glu Glu Val Asn Lys Glu Ile Asp Thr Thr Ser Thr Tyr Gln
 385 390 395 400

Leu Lys Asp Thr Glu Leu Ile Tyr Gly Ala Lys His Ala Trp Arg Asn
 405 410 415

Ala Ser Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Ser Lys Leu Gln Val Phe
 420 425 430

Asp Ala Arg Asp Cys Thr Thr Ala His Gly Met Phe Asn Tyr Ile Cys
 435 440 445

Asn His Val Lys Tyr Ala Thr Asn Lys Gly Asn Leu Arg Ser Ala Ile
 450 455 460

Thr Ile Phe Pro Gln Arg Thr Asp Gly Lys His Asp Phe Arg Val Trp
 465 470 475 480

Asn Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Ala Gly Tyr Lys Gln Pro Asp Gly Ser
 485 490 495

Thr Leu Gly Asp Pro Ala Asn Val Gln Phe Thr Glu Ile Cys Ile Gln
 500 505 510

Gln Gly Trp Lys Pro Pro Arg Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro Leu Leu
 515 520 525

Leu Gln Ala Asn Gly Asn Asp Pro Glu Leu Phe Gln Ile Pro Pro Glu
 530 535 540

Leu Val Leu Glu Val Pro Ile Arg His Pro Lys Phe Glu Trp Phe Lys
 545 550 555 560

Asp Leu Gly Leu Lys Trp Tyr Gly Leu Pro Ala Val Ser Asn Met Leu
 565 570 575

Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Ser Ala Cys Pro Phe Ser Gly Trp
 580 585 590

Tyr Met Gly Thr Glu Ile Gly Val Arg Asp Tyr Cys Asp Asn Ser Arg
 595 600 605

Tyr Asn Ile Leu Glu Glu Val Ala Lys Lys Met Asn Leu Asp Met Arg
 610 615 620

ES 2 386 831 B1

Lys Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Gln Ala Leu Val Glu Ile Asn Ile
 625 630 635 640

Ala Val Leu Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Lys Val Thr Ile Val Asp His
 645 650 655

His Ser Ala Thr Glu Ser Phe Ile Lys His Met Glu Asn Glu Tyr Arg
 660 665 670

Cys Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Val Trp Ile Val Pro Pro Met
 675 680 685

Ser Gly Ser Ile Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Leu Asn Tyr Arg
 690 695 700

Leu Thr Pro Ser Phe Glu Tyr Gln Pro Asp Pro Trp Asn Thr His Val
 705 710 715 720

Trp Lys Gly Thr Asn Gly Thr Pro Thr Lys Arg Arg Ala Ile Gly Phe
 725 730 735

Lys Lys Leu Ala Glu Ala Val Lys Phe Ser Ala Lys Leu Met Gly Gln
 740 745 750

Ala Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Ala Thr Glu Thr
 755 760 765

Gly Lys Ser Gln Ala Tyr Ala Lys Thr Leu Cys Glu Ile Phe Lys His
 770 775 780

Ala Phe Asp Ala Lys Val Met Ser Met Glu Glu Tyr Asp Ile Val His
 785 790 795 800

Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn
 805 810 815

Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Lys Phe Gly Cys Ala Leu Met Glu
 820 825 830

Met Arg His Pro Asn Ser Val Gln Glu Glu Arg Lys Ser Tyr Lys Val
 835 840 845

Arg Phe Asn Ser Val Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Gln Lys Ser Ser Gly
 850 855 860

ES 2 386 831 B1

Asp Gly Pro Asp Leu Arg Asp Asn Phe Glu Ser Ala Gly Pro Leu Ala
 865 870 875 880

Asn Val Arg Phe Ser Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala Tyr Pro His
 885 890 895

Phe Cys Ala Phe Gly His Ala Val Asp Thr Leu Leu Glu Glu Leu Gly
 900 905 910

Gly Glu Arg Ile Leu Lys Met Arg Glu Gly Asp Glu Leu Cys Gly Gln
 915 920 925

Glu Glu Ala Phe Arg Thr Trp Ala Lys Lys Val Phe Lys Ala Ala Cys
 930 935 940

Asp Val Phe Cys Val Gly Asp Asp Val Asn Ile Glu Lys Ala Asn Asn
 945 950 955 960

Ser Leu Ile Ser Asn Asp Arg Ser Trp Lys Arg Asn Lys Phe Arg Leu
 965 970 975

Thr Phe Val Ala Glu Ala Pro Glu Leu Thr Gln Gly Leu Ser Asn Val
 980 985 990

His Lys Lys Arg Val Ser Ala Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gln Asn Leu
 995 1000 1005

Gln Ser Pro Lys Ser Ser Arg Ser Thr Ile Phe Val Arg Leu His
 1010 1015 1020

Thr Asn Gly Ser Gln Glu Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Leu
 1025 1030 1035

Gly Val Phe Pro Gly Asn His Glu Asp Leu Val Asn Ala Leu Ile
 1040 1045 1050

Glu Arg Leu Glu Asp Ala Pro Pro Val Asn Gln Met Val Lys Val
 1055 1060 1065

Glu Leu Leu Glu Glu Arg Asn Thr Ala Leu Gly Val Ile Ser Asn
 1070 1075 1080

Trp Thr Asp Glu Leu Arg Leu Pro Pro Cys Thr Ile Phe Gln Ala
 1085 1090 1095

ES 2 386 831 B1

Phe Lys Tyr Tyr Leu Asp Ile Thr Thr Pro Pro Thr Pro Leu Gln
 1100 1105 1110

Leu Gln Gln Phe Ala Ser Leu Ala Thr Ser Glu Lys Glu Lys Gln
 1115 1120 1125

Arg Leu Leu Val Leu Ser Lys Gly Leu Gln Glu Tyr Glu Glu Trp
 1130 1135 1140

Lys Trp Gly Lys Asn Pro Thr Ile Val Glu Val Leu Glu Glu Phe
 1145 1150 1155

Pro Ser Ile Gln Met Pro Ala Thr Leu Leu Leu Thr Gln Leu Ser
 1160 1165 1170

Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile Ser Ser Ser Pro Asp Met
 1175 1180 1185

Tyr Pro Asp Glu Val His Leu Thr Val Ala Ile Val Ser Tyr Arg
 1190 1195 1200

Thr Arg Asp Gly Glu Gly Pro Ile His His Gly Val Cys Ser Ser
 1205 1210 1215

Trp Leu Asn Arg Ile Gln Ala Asp Glu Leu Val Pro Cys Phe Val
 1220 1225 1230

Arg Gly Ala Pro Ser Phe His Leu Pro Arg Asn Pro Gln Val Pro
 1235 1240 1245

Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Ser
 1250 1255 1260

Phe Trp Gln Gln Arg Gln Phe Asp Ile Gln His Lys Gly Met Asn
 1265 1270 1275

Pro Cys Pro Met Val Leu Val Phe Gly Cys Arg Gln Ser Lys Ile
 1280 1285 1290

Asp His Ile Tyr Arg Glu Glu Thr Leu Gln Ala Lys Asn Lys Gly
 1295 1300 1305

Val Phe Arg Glu Leu Tyr Thr Ala Tyr Ser Arg Glu Pro Asp Lys
 1310 1315 1320

ES 2 386 831 B1

Pro Lys Lys Tyr Val Gln Asp Ile Leu Gln Glu Gln Leu Ala Glu
1325 1330 1335

Ser Val Tyr Arg Ala Leu Lys Glu Gln Gly Gly His Ile Tyr Val
1340 1345 1350

Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Ala Asp Val Leu Lys Ala Ile Gln
1355 1360 1365

Arg Ile Met Thr Gln Gln Gly Lys Leu Ser Ala Glu Asp Ala Gly
1370 1375 1380

Val Phe Ile Ser Arg Met Arg Asp Asp Asn Arg Tyr His Glu Asp
1385 1390 1395

Ile Phe Gly Val Thr Leu Arg Thr Tyr Glu Val Thr Asn Arg Leu
1400 1405 1410

Arg Ser Glu Ser Ile Ala Phe Ile Glu Glu Ser Lys Lys Asp Thr
1415 1420 1425

Asp Glu Val Phe Ser Ser
1430



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130153

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.02.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/195** (2006.01)
A61P3/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	McDANIEL ML et al. Cytokines and Nitric Oxide in Islet Inflammation and Diabetes. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1996. Vol. 211(1), páginas: 24-32, todo el documento.	1-4
X	LING J-J et al. Potential Role of NO in Modulation of COX-2 Expression and PGE2 Production in Pancreatic β -cells. Acta Biochimica et Biophysica sinica. 2005. Vol. 37(2), páginas: 139-146, todo el documento.	1-4
A	MISKO TP. et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. European Journal of Pharmacology. 1993. Vol. 233, páginas: 119-125, todo el documento.	1-4
A	ES 2193285 T3 (SMITHKLINE BEECHAM) 01.11.2003, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El 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

Página
1/5

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.

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.

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 Biology and Medicine. 1996. Vol. 211(1), páginas: 24-32.	1996
D02	LING J-J et al. Acta Biochimica et Biophysica sinica. 2005. Vol. 37(2), páginas: 139-146.	2005
D03	MISKO TP. et al. European Journal of Pharmacology. 1993. Vol. 233, páginas: 119-125.	1993
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 óxido 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 insulinitis, 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 citoquina interleuquina-1 (IL-1), que induce la expresión de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), produciendo óxido 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 óxido nítrico 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 óxido nítrico sintasa, en el caso de enfermedades caracterizadas por la superproducción patológica de óxido 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).

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 óxido 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.