

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
9 de agosto de 2012 (09.08.2012)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/104467 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/195 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070070

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de febrero de 2012 (03.02.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201130153 4 de febrero de 2011 (04.02.2011) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, E-Sevilla 41071 (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SEGUNDO IGLESIAS, María del Carmen** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **AGUILAR DIOSDADO, Manuel** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **QUINTANA LÓPEZ, Laura** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **PÉREZ ARANA, Gonzalo** [EC/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **BLANDINO ROSANO, Manuel** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **Illescas Taboada, Manuel**; C/ Recoletos, 13 5º Izda, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: USE OF NO SYNTHASE (NOS) ACTIVITY INHIBITORS AND COMPOSITIONS THEREOF IN THE PRODUCTION OF A DRUG FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF PREDIABETES AND TYPE 1 DIABETES MELLITUS (DM1)

(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) Abstract: The invention relates to the use of a composition comprising at least one NO synthase (NOS) activity inhibitor, preferably any of the NO synthase (NOS) activity inhibitors having formula (I) and, more preferably, L-NMMA or any of the salts, prodrugs, derivatives or analogues thereof, for the production of a drug for the prevention and/or treatment of prediabetes and for the treatment of type 1 diabetes mellitus in mammals.

(57) Resumen: Uso de una composición, que comprende al menos un inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS), preferentemente cualquiera de los inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS) de fórmula (I), y más 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 para el tratamiento la diabetes mellitus tipo 1 en un mamífero.



WO 2012/104467 A1

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), más preferiblemente a los inhibidores de NOS de fórmula (I), y aún más preferiblemente a la N ω -monometil-L-arginina (L-NMMA), para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la prevención
10 o el tratamiento de la prediabetes y la diabetes mellitus tipo 1 (DM1).

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- La diabetes mellitus (DM) es un síndrome de elevada morbi-mortalidad, que
15 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
20 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.

- La diabetes mellitus puede ser definida como una elevación crónica de la
25 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
30 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
5 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
10 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
15 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).

20

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
25 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
30 muerte celular, regulado por genes y controlado por diversos factores (Mathis
et al., 2001. *Nature* 414 (6865): 792-8.).

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.

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

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 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: 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.).

20

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).

30

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

5

- 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

30

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.

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 pancreática y su afectación por el proceso patológico de la DM1

20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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 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 prediabetes y la diabetes mellitus

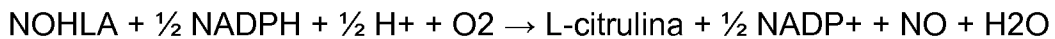
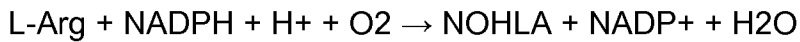
tipo 1 en un mamífero, incluyendo un humano, o alternatively, a un inhibidor de la actividad de cualquiera de las NO sintasas (NOS), para la prevención y/o el tratamiento de la prediabetes y la diabetes mellitus tipo 1. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición, que
5 comprende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

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:

- 15 (a) una molécula orgánica,
- (b) una molécula de RNA,
- (c) un oligonucleótido antisentido,
- (d) un anticuerpo, o
- (e) una ribozima, o
- 20 cualquiera de sus combinaciones.

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
25 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
30 de nad-fosfato reducido o NADPH (nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato reducido) y dióxígeno (O₂). NOS es la única enzima conocida que une FAD (flavín-adenín-dinucleótido), FMN (flavín mononucleótido), hemo,

tetrahidrobiopterina (BH₄) y calmodulina. Catalizan la siguiente reacción:



5

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
10 endotelial respectivamente. En esta memoria, el término "NO sintasas" se refiere a cualquiera de los miembros de la familia.

Así, la NOS3 (nitric oxide synthase 3, endothelial cell), también denominada como EC-NOS; NOS type III; NOSIII; OTTHUMP00000213183; cNOS;
15 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

20 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:

25 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),

30 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.

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:

- 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
5 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,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con
10 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%,
15 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.
20 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,
25 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-2-
30 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.

- 5 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 actúa 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).
- 10 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.
- 15 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
- 20 Ácido 1-pirrolidinacarboditioico, sal de amonio. Inhibidor permeable a la célula de la actividad óxido nítrico sintasa. Ensayado en macrófagos alveolares.
- 25 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).
- 30 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).
- 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 ($IC_{50} = 10 \mu M$) afectando su activación por calmodulina. Presenta solo un suave efecto inhibitorio sobre la NOS inducible de los macrófagos ($IC_{50} > 100 \mu M$).
5 Presenta además capacidad inhibitoria de la secreción de prolactina, actúa como agonista del receptor de dopamina D_2 , modula la función de la P-glicoproteína e inhibe las actividades Mg^{2+} ATPasa ($IC_{50} = 300 \text{ nM}$) y P-gp ATPasa inducida por verapamil ($K_i = 200 \text{ nM}$).

10

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
15 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.

20 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 ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$).

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

L-NIO L-N⁵-(1-Iminoetil)ornitina, dihidrocloruro. Potente inhibidor permeable a la
30 célula con mucha mayor especificidad por la NOS endotelial (eNOS; $IC_{50} = 500 \text{ nM}$) que otros análogos de arginina como L-NAME y L-NMMA. Inhibe la relajación inducida por acetilcolina de anillos aórticos de rata ($IC_{50} = 2 \mu M$) y

causa un incremento dosis dependiente de la presión arterial media en ratas ($EC_{50} = 19.5 \text{ mg/kg}$).

5 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 ($IC_{50} = 3.3 \text{ } \mu\text{M}$) que por su forma neuronal ($IC_{50} = 92 \text{ } \mu\text{M}$). Presenta una potencia inhibitoria 10 veces superior a la de L-NMMA inhibiendo la producción de NO_2^- inducida por interferón ($IC_{50} = 460 \text{ nM}$).

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

15 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” ($IC_{50} = 2\text{-}3 \text{ } \mu\text{M}$)e “in vivo”. Causa vasoconstricción y bradicardia de una forma dosis-dependiente.

20 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.

25 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 ($K_i = 57 \text{ nM}$ para nNOS; $K_i = 180 \text{ } \mu\text{M}$ para iNOS; $K_i = 8.5 \text{ } \mu\text{M}$ para eNOS).

30 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

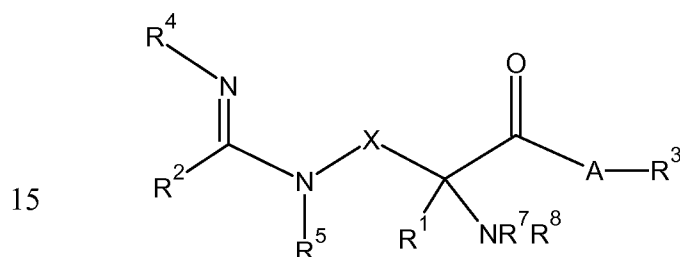
competitivo de las tres isoformas de la NOS ($K_i = 700$ nM fpara eNOS; $K_i = 3.9$ μ M fpara iNOS; $K_i = 650$ nM para nNOS). Inhibe la relajación inducida por histamina y acetilcolina en arteria pulmonar intacta de cobaya contraída mediante norepinefrina con una $K_i = 9.5$ μ M (Ensayo “ex vivo”).

5

Los inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS) son conocidos en el estado de la técnica, y se describen en numerosos documentos.

Más preferiblemente, el inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS) es un compuesto que tiene la fórmula (I):

10



(I)

o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables, donde:

20

- A se selecciona de entre O (oxígeno) o S (azufre), y puede unirse junto con R4 para formar un anillo heterocíclico, o
- A es N cuando R3 y R7 se unen para formar un anillo heterocíclico, o R5 y A-R3 se unen para formar un enlace covalente, o alternatively
- A es N-R3 siempre que R3 no sea un radical heterocíclico, o
- alternativamente
- A es un anillo heterocíclico;
- R1 no está presente o se selecciona entre el grupo formado por hidrógeno, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alquilo y haloalquilo;
- R2 se selecciona del grupo que consiste en un alquilo lineal o ramificado, alquenilo, y alquinilo, cicloalquilo, cicloalquilo, haloalquilo, todos opcionalmente sustituido por uno o más hidrógenos o grupos alquilo, alcoxi, hidroxí, halógeno, trifluorometilo, nitro, ciano, o grupos amino;

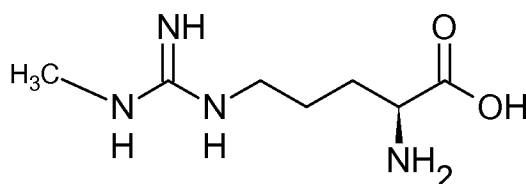
30

- R^3 se selecciona del grupo formado por un arilo heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, todos opcionalmente sustituido por uno o más de halógeno, nitrilo, carboxi, carboxialquilo, carboxyalkylaryl, o alternativamente
- 5 - R^3 se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, alquenilo, $CH_2 OC (= S) YR^6$, alquilhidroxi, alquilpolihidroxi, amino, hidroxi, alquilo (poli) oxiacil, alquilcarboxi, opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilo, hidroxi, amino, carboxi, carboxialquilo alquilcarbonilo,
- R^4 se selecciona de H, OH, SH, OR^6 , SR^6 , $OC(=O)R^6$, $SC(=O)R^6$, $CH_2 OC(=S)YR^6$, $OC(=S)YR^6$, $SC(=S)YR^6$, OSO_2R^6 , $OS(O)R^6$;
- 10 - Y se selecciona independientemente de entre O, S, CH_2 , CHR^6 , $C(R^6)_2$, NH, NR^6 ;
- R^5 se selecciona entre H, OH, SH, OR^6 , SR^6 , $OC(=O)R^6$, $SC(=O)R^6$, $CH_2 OC(=S)YR^6$, $OC(=S)YR^6$, $SC(=S)YR^6$, OSO_2R^6 , $OS(O)R^6$
- 15 - R^6 se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, todos opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilo, alcoxi, hidroxi, halógeno, trifluorometilo, nitro, ciano, o grupos amino;
- R^7 se selecciona de H, $S(O)R^9$, SO_2R^9 , $CH_2OC(O)-R^9$, $C(O)-R^9$, donde
- 20 $C(O)-R^9$ puede representar aminoácidos naturales y sintéticos o R^9 puede ser definida como se define más abajo, o R^7 y R^3 en su conjunto comprenden un anillo heterocíclico de 5 - o 6 - miembros que contiene dos o más heteroátomos, opcionalmente sustituido con alquilo y / o funciones, entre ellas el oxígeno carbonilo, o en su conjunto comprenden
- 25 un complejo de metal que contiene un catión divalente, o un complejo de boro;
- R^8 se selecciona entre H, acilo; a condición de que R^4 , R^5 , R^7 y R^8 no son simultáneamente hidrógeno, excepto cuando Q es SiE_2 ;
- R^9 se selecciona de dihidropiridil sustituido, alquilo, tioalcoxi, alcoxi,
- 30 amino, cicloalcoxi, opcionalmente sustituido con uno o más de alquilo amino, alquil, heteroarilo, alquilheteroarilo, alquilmercaptoalkil, que opcionalmente puede estar sustituido con uno o más de hidroxi, amino ,

guanidino, iminoalkil;

- X se selecciona del grupo formado por alquilenos, alquilenos y alquilenos y que pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más grupos alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, trifluorometilo, nitro, ciano, amino o grupos, o alternativamente
- X se selecciona del grupo que consiste en la fórmula - $(CH_2)_k Q (CH_2)_t$ - donde k es 1, 2 o 3, t es 1, 2 o 3 y Q es O (oxígeno), Se, SiE₂, donde E es alquilo, arilo, S(O)_g, donde g es 0, 1 o 2, o NR donde R es H o alquilo que puede estar opcionalmente sustituido con alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, trifluorometilo, nitro, ciano, amino, o alternativamente
- X se selecciona del grupo que consiste de la fórmula - $(CH_2)_m T (CH_2)_n$ -, donde m es 0, 1 o 2, n es 0, 1 o 2, T es un anillo heterocíclico o carbocíclico de 3 a 6 miembros, un anillo aromático o un anillo heteroaromático que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo formado por alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, nitro, ciano, trifluoroalquilo y amino.

En otra realización más preferida de la presente invención, el inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS) es la Nω-monometil-L-arginina (L-NMMA), de fórmula (II):



(II)

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 (II), 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.

- 5 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 (II). 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
- 10 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 (II) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho
- 15 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
- 20 siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (II) 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.
- 25 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
- 30 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.

La definición general de prediabetes se refiere al periodo anterior al inicio clínico de la enfermedad en el que se están dando lugar una serie de procesos fisiopatológicos que culminan con la incapacidad del organismo para mantener un correcto nivel de glucosa. En el caso de la Diabetes tipo 2, su etapa preclínica de prediabetes se caracteriza por un estado de resistencia insulínica que lleva a una elevación gradual de los niveles de glucosa en sangre. Este estado mantenido en el tiempo aumenta el riesgo de iniciar una diabetes tipo 2 en el futuro en la que la resistencia insulínica se combina con la pérdida de masa beta pancreática así como de desarrollar las complicaciones cardiovasculares asociadas a esta enfermedad. En el caso de la Diabetes tipo 1 la etapa preclínica o prediabetes se presenta como asintomática aunque desde el punto de vista fisiológico e histológico está bastante caracterizada. Durante esta etapa se está produciendo un proceso autoinmune que tiene como diana específica a las células beta de los islotes pancreáticos. Se puede identificar un infiltrado linfomonocitario en la proximidad del islote pancreático así como la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos presentes en la célula beta. Este proceso culmina con la destrucción de casi la totalidad de las células beta y es en ese momento cuando tiene lugar el inicio clínico de la enfermedad caracterizado por una hiperglucemia severa.

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.

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 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 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

5 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

10 "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la

15 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

20 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

25 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.

30

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
5 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
10 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
15 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
20 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:

25 (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.

30 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.

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

10

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.

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 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: Efecto de la administración de L-MMA sobre el área relativa de islotes pancreáticos

Las ratas BB fueron tratadas desde la semana 4 de vida con L-NMMA o vehículo (Control) y se sacrificaron a las 7 y 9 semanas de vida. Se calculó el cociente entre el área Insulina + y el área total de dos secciones de páncreas por punto experimental en una n=4 animales por condición. En la gráfica se presentan los valores medios $\pm$ e.e.m. del cociente calculado en los segmentos de cabeza y cola del páncreas, cuantificados por separado, y se incluye también el valor correspondiente al momento previo al tratamiento (4s). Se puede observar que en los dos tiempos estudiados, el tratamiento con L-NMMA induce una recuperación del área relativa. Esta recuperación resulta más evidente en el segmento cabeza de páncreas y en el punto temporal de las 9 semanas de vida que es cuando se puede apreciar una mayor pérdida de área relativa de islotes en los animales no tratados debida al proceso patológico.

Figura 3: Efecto de la administración de L-MMA sobre el área relativa de islotes pancreáticos

Las ratas BB fueron tratadas desde la semana 4 de vida con L-NMMA o vehículo (Control) y se sacrificaron a las 7 y 9 semanas de vida. Se calculó, en el páncreas completo, la masa de las células beta cuantificando el área media Insulina+ en las secciones obtenidas de cada páncreas y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{masa beta} = (\text{área Ins+} \times \text{masa páncreas}) / \text{área total}$$

Los valores medios $\pm$ e.e.m. obtenidos para cada serie experimental (n=4) se representan en esta gráfica donde se incluye también el valor correspondiente al momento previo al tratamiento (4s). Se puede observar que en los tiempos estudiados, el tratamiento con L-NMMA induce una recuperación de la masa beta pancreática. Esta recuperación resulta más evidente a las 9 semanas de vida que es cuando se puede apreciar claramente en los animales no tratados,

la pérdida de masa beta pancreática debida al proceso patológico.

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.

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 3-4 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 3-4 animales sometidos a la administración diaria intraperitoneal de 200 microlitros de LNMMA diluido en vehículo a una dosis de 30mg/kg.

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, obteniéndose secciones de 10 micras de grosor.

Estudio de proliferación en células beta de los islotes pancreáticos

- 5 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 especifican a continuación:
- 10 - 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
- 15 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.
- Revelado mediante incubación durante 1 hora a temperatura ambiente
- 20 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

25 azar, con un microscopio confocal (Leyca TCS SL). Los resultados fueron expresados como N° células proliferantes (BrdU⁺Insulina⁺)/Área insulina⁺ (milímetros²)

Histomorfometría

30

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:

- 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.
 - 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.
 - 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.
- 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 reperusión (*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 20 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 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.*

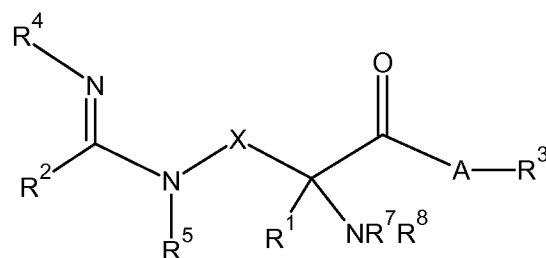
10

REIVINDICACIONES

1- El 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 la prevención y/o el tratamiento de la prediabetes y/o la diabetes mellitus tipo 1 en un mamífero.

2- El uso de una composición, que comprende inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS), para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la prediabetes en un mamífero.

3- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS) es un compuesto de fórmula (I),



(I)

donde:

- A se selecciona de entre O (oxígeno) o S (azufre), y puede unirse junto con R⁴ para formar un anillo heterocíclico, o
- A es N cuando R³ y R⁷ se unen para formar un anillo heterocíclico, o R⁵ y A-R³ se unen para formar un enlace covalente, o
- A es N-R³ siempre que R³ no sea un radical heterocíclico, o
- A es un anillo heterocíclico;
- R¹ no está presente o se selecciona entre el grupo formado por hidrógeno, hidroxialquilo, alcoxialquilo, alquilo y haloalquilo;

- R^2 se selecciona del grupo que consiste en un alquilo lineal o ramificado, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalquilo, haloalquilo, todos opcionalmente sustituidos por uno o más hidrógenos o grupos alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, trifluorometilo, nitrilo, ciano, o grupos amino;
- 5 - R^3 se selecciona del grupo formado por un arilo heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, todos opcionalmente sustituidos por uno o más grupos halógeno, nitrilo, carboxi, carboxialquilo, carboxialkilaril, o
- R^3 se selecciona del grupo que consiste de H, alquilo, alqueno, $CH_2 OC(=S)YR^6$, alquilhidroxilo, alquilpolihidroxilo, amino, hidroxilo, alquilo (poli)
- 10 oxiacil, alquilcarboxi, opcionalmente sustituido por uno o más grupos alquilo, hidroxilo, amino, carboxi, carboxialquilo alquilcarbonilo,
- R^4 se selecciona de H, OH, SH, OR^6 , SR^6 , $OC(=O)R^6$, $SC(=O)R^6$, $CH_2 OC(=S)YR^6$, $OC(=S)YR^6$, $SC(=S)YR^6$, OSO_2R^6 , $OS(O)R^6$;
- Y se selecciona independientemente de entre O, S, CH_2 , CHR^6 , $C(R^6)_2$,
- 15 NH, NR^6 ;
- R^5 se selecciona entre H, OH, SH, OR^6 , SR^6 , $OC(=O)R^6$, $SC(=O)R^6$, $CH_2 OC(=S)YR^6$, $OC(=S)YR^6$, $SC(=S)YR^6$, OSO_2R^6 , $OS(O)R^6$
- R^6 se selecciona entre hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, heterociclo, arilo, heteroarilo, todos opcionalmente sustituido
- 20 por uno o más grupos alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, trifluorometilo, nitrilo, ciano, o grupos amino;
- R^7 se selecciona de H, $S(O)R^9$, SO_2R^9 , $CH_2OC(O)-R^9$, $C(O)-R^9$, donde $C(O)-R^9$ puede representar aminoácidos naturales y sintéticos o R^9 puede ser definido como se define más abajo, o R^7 y R^3 en su conjunto
- 25 comprenden un anillo heterocíclico de 5 - o 6 - miembros que contiene dos o más heteroátomos, opcionalmente sustituido con alquilo y / o funciones, entre ellas el oxígeno carbonilo, o en su conjunto comprenden un complejo de metal que contiene un catión divalente, o un complejo de boro;
- 30 - R^8 se selecciona entre H, acilo; a condición de que R^4 , R^5 , R^7 y R^8 no son simultáneamente hidrógeno, excepto cuando Q es SiE_2 ;
- R^9 se selecciona de dihidropiridil sustituido, alquilo, tioalcoxi, alcoxi,

amino, cicloalcoxi, opcionalmente sustituido con uno o más de alquilo amino, alquil, heteroarilo, alquilheteroarilo, alquilmercaptoalquil, que opcionalmente puede estar sustituido con uno o más de hidroxilo, amino, guanidino, iminoalquil;

- 5 - X se selecciona del grupo formado por alquilenilo, alquenileno y alquinileno y que pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más grupos alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, trifluorometilo, nitro, ciano, amino o grupos, o
- 10 - X se selecciona del grupo que consiste en la fórmula - $(CH_2)_k Q (CH_2)_t$ - donde k es 1, 2 o 3, t es 1, 2 o 3 y Q es O (oxígeno), Se, SiE_2 , donde E es alquilo, arilo, $S(O)_g$, donde g es 0, 1 o 2, o NR donde R es H o alquilo que puede estar opcionalmente sustituido con alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, trifluorometilo, nitro, ciano, amino, o
- 15 - X se selecciona del grupo que consiste de la fórmula - $(CH_2)_m T (CH_2)_n$ -, donde m es 0, 1 o 2, n es 0, 1 o 2, T es un anillo heterocíclico o carbocíclico de 3 a 6 miembros, un anillo aromático o un anillo heteroaromático que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados del grupo formado por alquilo, alcoxi, hidroxilo, halógeno, nitro, ciano, trifluoroalquilo y amino.
- 20 o cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 4- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los inhibidores de la actividad de las NO sintasas (NOS) se seleccionan de la lista que comprende: NAME, 1400W, 1-amino-2-
25 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,
30 derivados o análogos, o cualquiera de sus combinaciones.

- 5- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el inhibidor de la actividad de las NO sintasas (NOS) es el L-NMMA, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos.
- 5 6- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 7- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la composición además comprende otro principio activo.
- 15 8- Un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y de la prediabetes, según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, 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.
- 20 9- Método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y de la prediabetes según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende
- 25 (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, y/o la prediabetes.

- 10-Método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 y de la prediabetes, según la reivindicación anterior, donde el compuesto empleado en el paso (b) es el L-NMMA.
- 5 11-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,
- 10 (b) comparar los valores de la actividad de las NO sintasas (NOS) obtenidos en a) con los valores estándar en mamíferos sanos o enfermos.

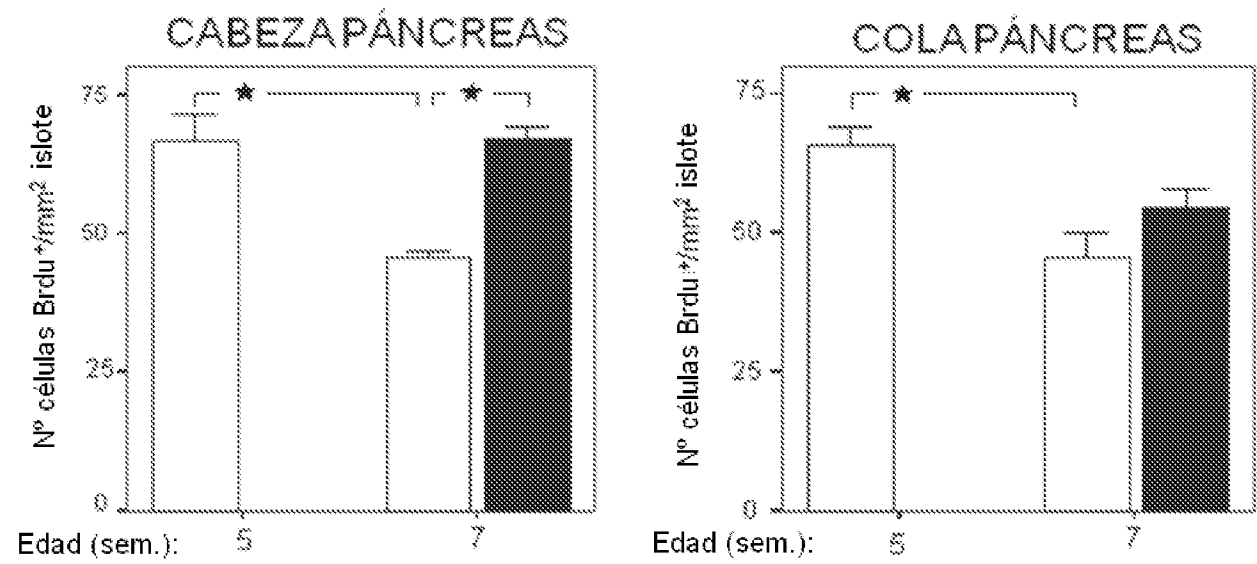


Fig. 1

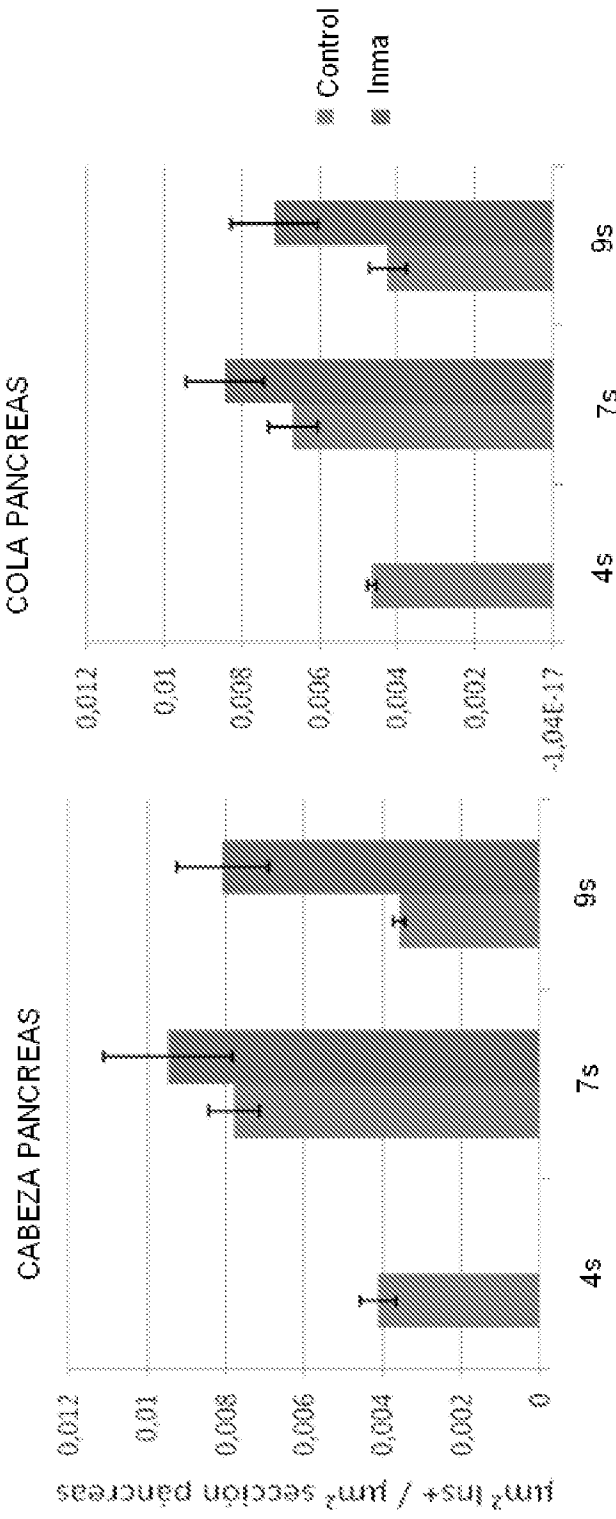


Fig.2

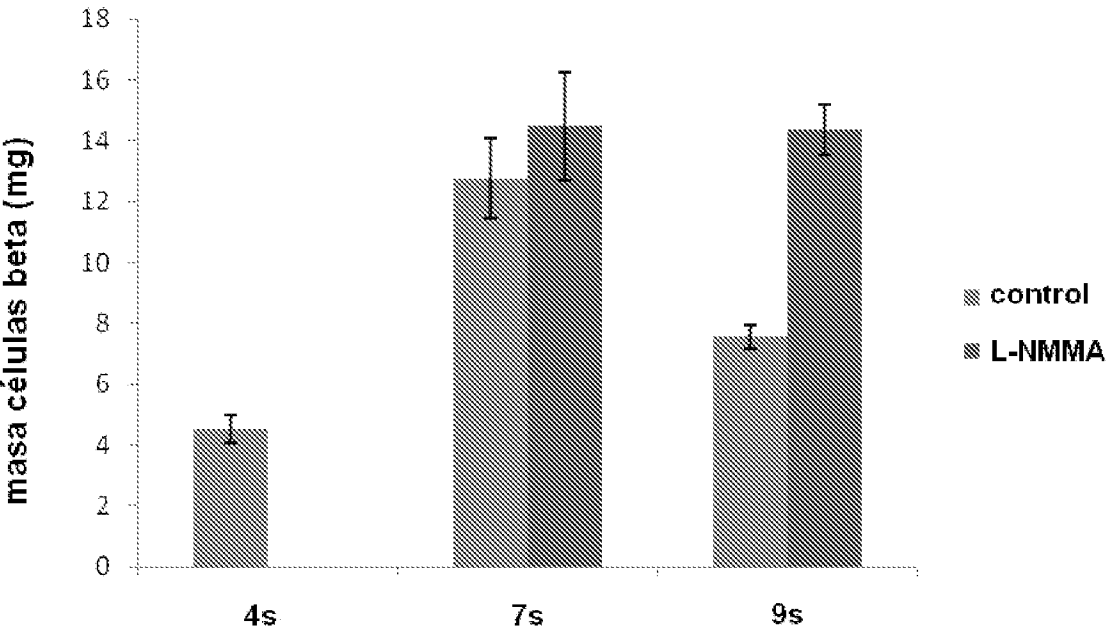


Fig.3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/195 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	1996, 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), pages: 24-32, the whole document.	3-11
X	2005, 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), pages: 139-146, the whole document.	3-11
X	1993, MISKO TP. et al. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. European Journal of Pharmacology. 1993. Vol. 233, pages: 119-125, the whole document.	8-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05/06/2012

Date of mailing of the international search report
(11/06/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. García Grávalos

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070070

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ES 2193285 T3 (SMITHKLINE BEECHAM) 01.11.2003, the whole document.	8-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070070

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1 and 2 and 4 (in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The subject matter of claims 1 and 2 and 4 (in part) fails to meet the requirements of PCT Article 6 in respect of clarity and conciseness to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search on the basis of these claims.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The patent application fails to meet the requirement in respect of unity of invention because it does not relate to a single invention or group of inventions that are so linked as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1) (see supplemental sheet).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

SUPPLEMENTAL SHEET RELATING TO BOX III

The patent application fails to meet the requirement in respect of unity of invention because it does not relate to a single invention or group of inventions that are so linked as to form a single general inventive concept (PCT Rule 13.1). Consequently, the International Searching Authority considers that the application contains two inventions covered by the following claims:

Invention 1: Claims: 3, 5, 11 and 4, 6, 7 (in part).

- This invention relates to the use of a pharmaceutical composition comprising an inhibitor of the activity of any of the nitric oxide synthases for preparing a medicament for the treatment of a mammal suffering from type 1 diabetes or prediabetes mellitus, where the inhibitor is preferably L-NMMA or any of the salts, prodrugs, derivatives and analogues thereof, or other related compounds. This invention also relates to a method for obtaining data useful for diagnosing and/or prognosing this disease.

Invention 2: Claims 8-10.

- This invention relates to a method for selecting therapeutic agents useful for the treatment of type 1 diabetes mellitus.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2012/070070

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2193285 T	01.11.2003	WO9723204 A	03.07.1997
		CA2240396 A	03.07.1997
		AU1379497 A	17.07.1997
		NO982854 A	19.06.1998
		TR9801133 T	21.09.1998
		EP0868175 AB	07.10.1998
		EP19960944077	18.12.1996
		MX9805098 A	31.10.1998
		PL327472 A	07.12.1998
		CN1209057 A	24.02.1999
		CZ9801986 A	16.06.1999
		BR9612245 A	13.07.1999
		NZ325307 A	29.11.1999
		JP2000502668 A	07.03.2000
		HU9903979 A	28.03.2000
		AT232724 T	15.03.2003
		DE69626307 T	16.10.2003
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2012/070070

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/195 (2006.01)

A61P3/10 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (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.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	1996, 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.	3-11
X	2005, 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.	3-11
X	1993, 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.	8-10

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
05/06/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
11 de junio de 2012 (11/06/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Grávalos

Nº de teléfono 91 3493404

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES2012/070070

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	ES 2193285 T3 (SMITHKLINE BEECHAM) 01.11.2003, todo el documento.	8-10

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070070

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n°s: **1, 2 y 4 (parcialmente)**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

El objeto de las reivindicaciones 1 y 2 y 4 (parcialmente), no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT, hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esas reivindicaciones no es posible.

3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

La solicitud de patente no satisface la exigencia de unidad de invención, puesto que no está relacionada con una sola invención o un grupo de invenciones vinculadas entre sí de tal manera que formen un solo concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT (Ver hoja adicional).

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070070

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2193285 T	01.11.2003	WO9723204 A	03.07.1997
		CA2240396 A	03.07.1997
		AU1379497 A	17.07.1997
		NO982854 A	19.06.1998
		TR9801133 T	21.09.1998
		EP0868175 AB	07.10.1998
		EP19960944077	18.12.1996
		MX9805098 A	31.10.1998
		PL327472 A	07.12.1998
		CN1209057 A	24.02.1999
		CZ9801986 A	16.06.1999
		BR9612245 A	13.07.1999
		NZ325307 A	29.11.1999
		JP2000502668 A	07.03.2000
		HU9903979 A	28.03.2000
		AT232724 T	15.03.2003
		DE69626307 T	16.10.2003
-----	-----	-----	-----

HOJA ADICIONAL DE REC. III

La solicitud de patente **no satisface la exigencia de unidad de invención**, puesto que no está relacionada con una sola invención o un grupo de invenciones vinculadas entre sí de tal manera que formen un solo concepto inventivo general según la regla 13.1 del PCT. En consecuencia, la Administración encargada de la búsqueda internacional considera que hay dos invenciones cubiertas por las siguientes reivindicaciones:

Invención 1: Reivindicaciones 3, 5, 11 y 4, 6, 7 (parcialmente).

- Esta invención se refiere al uso de una composición farmacéutica, que comprende un inhibidor de la actividad de cualquiera de las óxido nítrico sintasas, para la preparación de un medicamento para tratamiento de la diabetes, o prediabetes, mellitus tipo 1 en un mamífero, donde dicho inhibidor es preferentemente el L-NMMA o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados, análogos u otros compuestos relacionados. Se refiere también a un método de obtención de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de esta enfermedad.

Invención 2: Reivindicaciones 8-10.

- Esta invención se refiere a un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1.