



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 286**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01) **A61K 38/45** (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) **A61K 31/235** (2006.01)

A61K 31/355 (2006.01) **A61K 38/13** (2006.01)

A61P 5/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03770876 .5**

96 Fecha de presentación : **23.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1545560**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54

Título: **Composiciones para inhibir la proteincinasa C- α para el tratamiento de diabetes mellitus.**

30

Prioridad: **24.09.2002 DE 102 44 453**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.04.2011

73

Titular/es: **PHENOS GmbH**
Feodor-Lynen-Str. 5
30625 Hannover, DE

72

Inventor/es: **Menne, Jan y**
Haller, Hermann

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 286 T3

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

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere al uso de inhibidores de la actividad de la proteincinasa C- α (PKC- α) para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de retinopatía diabética, neuropatía diabética y nefropatía diabética.

5 La diabetes mellitus es una de las enfermedades más frecuentes en el mundo occidental que afecta a aproximadamente el 5% de la población. La diabetes mellitus se clasifica en una diabetes de tipo I, que generalmente ya aparece durante la adolescencia, y en la diabetes de tipo II también denominada diabetes de aparición en adultos. Debido a un trastorno del metabolismo de la glucosa, en ambas formas de diabetes se producen valores de glucosa permanentemente elevados en la sangre, lo que en el caso de los pacientes afectados conduce después de varios años a diferentes complicaciones. Las complicaciones más frecuentes y al mismo tiempo las más temidas son la retinopatía diabética que causa ceguera, la neuropatía diabética que puede traer consigo la amputación de los pies o de las piernas y la nefropatía diabética.

10 Una nefropatía diabética se desarrolla en aproximadamente el 40% de todos los pacientes con diabetes y es mundialmente la causa más frecuente de insuficiencia renal crónica y de un tratamiento de diálisis. Aproximadamente del 30 al 40% de todos los nuevos pacientes de diálisis presentan una nefropatía diabética. Como la lesión renal diabética sólo se desarrolla lentamente, es de gran importancia clínica identificar ya prematuramente pacientes que tienen un alto riesgo de desarrollar una insuficiencia renal para empezar etapas terapéuticas adecuadas. Uno de los primeros signos clínicos de una lesión renal incipiente es la aparición de una llamada microalbuminuria. A este respecto se produce una excreción de 30-300 mg de albúmina en la orina recogida en 24 horas. En el caso normal se excretan menos de 30 mg de albúmina por día. Una microalbuminuria aparece bajo las condiciones terapéuticas presentes en aproximadamente el 25% de los diabéticos con diabetes de tipo I o de tipo II (Alzaid, Diabetes Care, 19 (1996), 79-89; Klein y col., Diabetes Care, 22 (1999), 743-751; Valmadrid y col., Arch. Intern. Med., 160 (2000), 1093-1100). El riesgo de desarrollar una insuficiencia renal es en pacientes con microalbuminuria aproximadamente 10 veces más alto que en pacientes con excreción de albúmina normal. Una nefropatía diabética que se caracteriza por una proteinuria de más de 300 mg/día y/o una función renal limitada se desarrolla en aproximadamente del 5 al 10% de todos los pacientes con diabetes y microalbuminuria por año. El riesgo de desarrollar una retinopatía diabética también es considerablemente elevado en diabéticos con microalbuminuria en comparación con diabéticos sin microalbuminuria (Vigstrup y Mogensen, Acta Ophthalmol. (Copenh), 63 (1985), 530-534).

15 Como mostraron estudios a largo plazo con más de diez años de seguimiento, la mortalidad cardiovascular ya aumenta aproximadamente el doble en diabéticos de tipo II y de tipo I en el estadio de microalbuminuria en comparación con diabéticos sin microalbuminuria, también después de ajustarse para los factores de riesgo convencionales como colesterol e hipertensión (Rossing y col., Bmj, 313 (1996), 779-784; Gerstein y col., Diabetes Care, 23 (2000), supl. 2: B35-39; Valmadrid y col., 2000). También puede detectarse una elevada mortalidad cardiovascular en pacientes con microalbuminuria sin diabetes mellitus (Gerstein y col., Jama, 286 (2001), 421-426).

20 Hay distintas hipótesis sobre por qué la microalbuminuria es un marcador extremadamente importante para la aparición de complicaciones en pacientes con diabetes. Según la llamada "hipótesis de Steno" (Deckert, Feldt-Rasmussen y col., Diabetologia, 32 (1989), 219-226), la pérdida de moléculas negativamente cargadas, es decir aniónicas, en la matriz extracelular es responsable de la aparición de albuminuria, retinopatía diabética y complicaciones cardiovasculares, por ejemplo, cardiopatía coronaria. Esta hipótesis está respaldada por datos adquiridos tanto en seres humanos como también en sistemas de modelos animales y se ha confirmado en los últimos años por resultados de otros grupos de trabajo.

25 En el riñón, la orina es secretada en los corpúsculos renales, los llamados glomérulos. Para evitar el paso de proteínas, por ejemplo, albúmina, el lado de la sangre está separado del lado de la orina por una membrana llamada la membrana basal. La membrana basal presenta poros pequeños que hacen posible el paso de moléculas más pequeñas por la membrana basal, mientras que las moléculas de proteína no pueden pasar por la membrana debido a su tamaño. No obstante, en pacientes con microalbuminuria se produce el paso de pequeñas proteínas como albúmina aunque el tamaño de poro no aumenta inicialmente. Como explicación para este fenómeno pudo mostrarse que en los poros o en el borde de los poros están presentes moléculas de carga negativa que repelen las proteínas también negativamente cargadas (Kverneland, Feldt-Rasmussen y col., Diabetologia, 29 (1986), 634-639; Deckert, Feldt-Rasmussen y col., Kidney Int., 33 (1988), 100-106; Kverneland, Welinder y col., Diabetologia, 31 (1988), 708-710). En el caso de estas moléculas con cargas negativas se trata de proteoglicanos. Los proteoglicanos son macromoléculas complejas que están constituidas por proteínas a las que están covalentemente asociadas cadenas de polisacáridos. Las cadenas de polisacáridos están constituidas principalmente por sulfato de heparano y están muy negativamente cargadas. El proteoglicano que está más frecuentemente presente en el cuerpo es perlecan. El perlecan es una proteína de 460 kd de tamaño y tiene varias cadenas laterales de polisacáridos (Murdoch e Iozzo, Virchows Arch. A. Pathol. Anato. Histopathol., 423 (1993), 237-242; Iozzo, Cohen y col., Biochem. J., 302 (1994), 625-639; Murdoch, Liu y col., J. Histochem. Cytochem., 42 (1994), 239-249). En pacientes con diabetes y microalbuminuria, el sulfato de heparano apenas está presente en la membrana basal glomerular. En pacientes con nefropatía diabética avanzada ya no puede detectarse sulfato de heparano en la membrana

basal, aunque las cadenas de proteína todavía estén presentes. Este efecto se explica mediante una síntesis de sulfato de heparano reducida bajo condiciones hiperglucémicas como las que se presentan en diabéticos (Parthasarathy y Spiro, *Diabetes*, 31 (1982), 738-741; Deckert, Feldt-Rasmussen y col., 1988; Nakamura y Myers, *Diabetes*, 37 (1988), 1202-1211; Nerlich y Schleicher, *Am. J. Pathol.*, 139 (1991), 889-899; Makino, Ikeda y col., *Nephron*, 61 (1992), 415-421; Scandling y Myers, *Kidney Int.*, 41 (1992), 840-846; Vernier, Steffes y col., *Kidney Int.*, 41 (1992), 1070-1080; Tamsma, van den Born y col., *Diabetologia*, 37 (1994), 313-320; Iozzo y San Antoniom, *J. Clin. Invest.*, 108 (2001), 349-355). Además, pudo mostrarse que los proteoglicanos de sulfato de heparano no sólo evitan la filtración glomerular de albúmina por la carga negativa, sino que probablemente también son responsables de la integridad del tamaño de poro dentro de la membrana basal (Deckert, Kofoed-Enevoldsen y col., *Diabetologia*, 36 (1993), 244-251). Así, a medida que avanza la insuficiencia renal, la pérdida de proteoglicanos de sulfato de heparano conduce a una destrucción de la microestructura de la membrana basal. Estos cambios podrían explicar por qué durante el transcurso de la nefropatía diabética se produce una gran proteinuria no selectiva con pérdida de proteínas más grandes como inmunoglobulina. Los proteoglicanos de sulfato de heparano también son fuertes inhibidores de la expansión mesangial en los corpúsculos renales. Esto es de gran interés ya que en el caso de pacientes con diabetes se produce clásicamente una expansión del tejido conjuntivo mesangial. Por tanto, no es sorprendente que la pérdida de proteoglicanos de sulfato de heparano en pacientes con diabetes sea culpable de una causa importante de la expansión mesangial.

Sin embargo, la pérdida de sulfato de heparano se produce en diabéticos no sólo en el riñón, sino en casi todos los otros órganos. Así se produce una clara reducción de sulfato de heparano en el tejido conjuntivo de la retina, del músculo esquelético, de las paredes de las arterias y de la piel, así como de los glóbulos rojos. Las células endoteliales también presentan una síntesis reducida de sulfato de heparano (Yokoyama, Hoyer, y col., *Diabetes*, 46 (1997), 1875-1880; van der Pijl, Daha y col., *Diabetologia*, 41 (1998), 791-798). Como los proteoglicanos de sulfato de heparano presentan importantes propiedades anti-trombóticas, la pérdida de proteoglicanos de sulfato de heparano puede contribuir a la aparición de microtrombos, por ejemplo, en los vasos retinianos y, por tanto, favorecer la aparición de una retinopatía diabética (Marcum, Fritze y col., *Am. J. Physiol.*, 245 (1983), H275-33; Marcum, McKenney y col., *J. Clin. Invest.*, 74 (1984), 341-350; Marcum y Rosenberg, *Biochemistry*, 23 (1984), 1730-1737; Marcum, Atha y col., *J. Biol. Chem.*, 261 (1986), 7507-7517). Otras funciones antiateroscleróticas importantes de proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) consisten en que los HSPG inhiben la proliferación de células vasculares de músculo liso, por lo que se produce la aparición de lesiones vasculares arteriales. Los HSPG inhiben además la unión de monocitos (células inflamatorias) al tejido conjuntivo subendotelial. Los HSPG también inhiben la unión subendotelial y la deposición de lipoproteína a y LDL oxidada que tienen una función decisiva en la aparición de arteriosclerosis. Los HSPG también son importantes reguladores en la angiogénesis, es decir, en la formación de nuevos vasos en zonas del cuerpo dañadas (Rosenberg, Shworak y col., *J. Clin. Invest.*, 100 (1997), S67-75; Pillarisetti, *Trends Cardiovasc. Med.*, 10 (2000), 60-65; Iozzo y San Antonio, 2001). Por tanto, la pérdida de proteoglicano de sulfato de heparano no sólo es importante en la aparición de nefropatía diabética y retinopatía diabética, sino también en la aparición de complicaciones cardiovasculares.

Otro aspecto es que en pacientes con hipertensión se produce una microalbuminuria. Hasta la fecha, este fenómeno se explicó mediante una elevada presión en los corpúsculos renales, aceptándose que la albúmina se "secretada" de forma multiplicada. Sin embargo, en caso afirmativo debe partirse de que los pacientes con tensión arterial permanentemente alta también tienen un alto riesgo cardiovascular, independientemente de si presentan una microalbuminuria. Sin embargo, esto es negativo como pudo mostrarse en varias investigaciones futuras. Los pacientes hipertensos con microalbuminuria tienen una morbilidad y mortalidad cardiovasculares aproximadamente el doble que pacientes similarmente hipertensos con, por lo demás, perfil de riesgo comparativo, por ejemplo, hipercolesterolemia, historia de tabaquismo y diabetes (Sleight, *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 1 (2000), 18-20; Crippa, *J. Hum. Hypertens.*, 16 (supl. 1) (2002), S74-7; Diercks, van Boven y col., *Can. J. Cardiol.*, 18 (2002), 525-535). Correspondientemente, la microalbuminuria es un parámetro de riesgo independiente para la aparición y el pronóstico de enfermedades cardiovasculares. Esto sólo puede explicarse por el hecho de que en pacientes con microalbuminuria se produce un cambio en el sistema vascular completo. Sin embargo, hasta la fecha no queda claro qué trastorno en pacientes con hipertensión es la base de la microalbuminuria.

El problema técnico subyacente a la presente invención consiste en proporcionar agentes que puedan utilizarse para la terapia de microalbuminuria en pacientes con diabetes mellitus, para tratar los efectos tardíos asociados a diabetes, retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética, y/o prevenir éstas.

La presente invención resuelve el problema técnico subyacente a la misma mediante el uso según la reivindicación 1.

En el estado de la técnica se aceptó hasta la fecha que la isoforma $\beta 2$ de la proteincinasa C es responsable de la aparición de las complicaciones diabéticas. Por una parte, la isoforma $\beta 2$ se produce multiplicada en el tejido de animales diabéticos (Inoguchi y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992), 11059-11063) y, por otra parte, el inhibidor LY333531 específico de la proteincinasa C- β conduce a una menor proteinuria como signo de una lesión renal reducida en roedores con diabetes de tipo I y de tipo II (Ishii y col.,

J. Mol. Med., 76 (1998), 21-31; Koya y col., Faseb J., 14 (2000), 439-447.

5 Los ratones "con gen inactivado" de la proteincinasa C- α producidos según la invención que no pueden formar proteincinasa C- α no desarrollaron sorprendentemente albuminuria después de la inducción de una diabetes mediante estreptozotocina. Por el contrario, animales de control que, aparte del cambio de la expresión de la proteincinasa C- α , eran genéticamente sustancialmente idénticos, desarrollaron una clara albuminuria. La posterior investigación de los animales "con gen inactivado" dio como resultado según la invención de forma completamente sorprendente que los animales pudieron formar sulfato de heparano en concentración normal bajo condiciones diabéticas. Por el contrario, los animales de control apenas pudieron formar sulfato de heparano bajo condiciones diabéticas.

10 Las investigaciones histológicas realizadas según la invención dieron como resultado otros cambios significativos en los ratones "con gen inactivado" de la proteincinasa C- α . Usando procedimientos inmunohistoquímicos pudo mostrarse según la invención que la falta de la proteincinasa C- α lleva consigo otras diferencias graves en la expresión de VEGF (vascular endothelial growth factor, de factor de crecimiento endotelial vascular) y del receptor correspondiente (VEGF-R II). Mientras que en los animales de control diabéticos pudo detectarse un aumento significativo de las cantidades expresadas de VEGF y del receptor VEGF-R II, en los animales "con gen inactivado" de la proteincinasa C- α se comprobó un aumento claramente menor de las cantidades expresadas de VEGF y del receptor VEGF-R II. Este resultado es de inmensa importancia en la medida que una expresión de VEGF aumentada se considera uno de los mediadores más importantes para la aparición de una retinopatía diabética (Aiello y Wong, *Kidney Int.*, supl., 77 (2000), S113-9; Benjamin, *Am. J. Pathol.*, 158 (2001), 1181-1184).

25 De los resultados según la invención resulta que la proteincinasa C- α desempeña una función clave en la regulación de la formación de proteoglicanos de sulfato de heparano y en la manifestación de una proteinuria. Los resultados según la invención también muestran que la proteincinasa C- α desempeña una función considerablemente más importante en la manifestación de proteinuria que la proteincinasa C- β , pudiendo no obstante asumir la proteincinasa C- β al menos una parte de las funciones de la proteincinasa C- α . Los resultados según la invención muestran además que una inhibición de la isoforma de la proteincinasa C- α tanto una protección específica del desarrollo de las consecuencias tardías diabéticas nefropatía diabética, retinopatía diabética, así como neuropatía diabética.

30 También se da a conocer el uso de agentes para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades vasculares, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales asociadas a proteinuria, efectos tardíos diabéticos y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con diabetes mellitus, complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipertensión y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipercolesterolemia que reducen o inhiben la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- α (PKC- α).

35 En relación con la presente invención, por "enfermedades" se entiende trastornos de los procesos vitales en órganos o en el organismo completo con la consecuencia de cambios físicos, psíquicos o mentales subjetivamente experimentados u objetivamente detectables. Por "complicaciones" o "efectos tardíos" se entiende enfermedades consecutivas o enfermedades secundarias, es decir, una segunda enfermedad que se produce además de un cuadro de enfermedad primario.

40 Se da a conocer que en el caso de las enfermedades que van a tratarse se trata especialmente de enfermedades vasculares, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales asociadas a proteinuria, diabetes mellitus con y sin efectos tardíos y/o complicaciones cardiovasculares asociados, hipertensión con y sin complicaciones cardiovasculares asociadas y/o hipercolesterolemia con y sin complicaciones cardiovasculares asociadas.

45 En relación con la presente revelación, por "enfermedades vasculares" se entiende especialmente enfermedades de las arterias que conducen a trastornos circulatorios funcionales u orgánicos. En la forma de realización preferida de la invención, la enfermedad vascular es una enfermedad oclusiva arterial periférica. Por una "enfermedad oclusiva arterial" se entiende una enfermedad que es causada por cambios estenosantes u ocliterantes en las arterias y conducen a trastornos circulatorios con isquemia en tejidos u órganos que dependen del suministro. En el caso de la diabetes mellitus se producen especialmente enfermedades oclusivas crónicas que son causadas, entre otras cosas, por arteriosclerosis ocliterante, también angiopatías y angioneuropatías.

50 Por "enfermedades cardiovasculares" se entiende enfermedades y trastornos que afectan la función del corazón y la circulación, por ejemplo, el estado de llenado y el tono del aparato circulatorio, el gasto cardíaco del corazón, los mecanismos de acoplamiento neurales y humorales entre el corazón y la circulación, etc. En el caso de las enfermedades cardiovasculares se trata especialmente de cardiopatía coronaria, infarto de miocardio y ataque de apoplejía.

55 Por "cardiopatía coronaria" se entiende la manifestación clínica de una insuficiencia coronaria primaria, produciéndose mediante la constricción u oclusión de los vasos coronarios una reducción de la circulación y, por tanto, del aporte de sustratos que proporcionan energía y oxígeno al músculo cardíaco.

Por un "infarto de miocardio" se entiende la necrosis de una región localizada del músculo cardíaco que la mayoría de las veces aparece de forma aguda como complicación en cardiopatía coronaria crónica. La causa de un infarto de miocardio es una deficiencia de la circulación crítica continuada en insuficiencia coronaria y espasmos de vasos coronarios de larga duración, especialmente en la región de una estenosis coronaria excéntrica preexistente. El infarto de miocardio se manifiesta frecuentemente con carga física o psíquica debido al aumento de la demanda de oxígeno del músculo cardíaco o con interrupción aguda del suministro de sangre.

Por "ataque de apoplejía" o "apoplejía" se entiende un infarto cerebral isquémico debido al trastorno de la circulación arterial del cerebro. El ataque de apoplejía se provoca por embolias que se derivan de cambios arterioscleróticos de vasos extracraneales o del corazón, raras veces se debe a una estenosis o a microangiopatías cerebrales.

Por "enfermedades renales asociadas a proteinuria" se entiende especialmente enfermedades renales parenquimatosas que se caracterizan por la presencia de proteínas en la orina. En el caso de la proteinuria puede tratarse de una proteinuria glomerular, una proteinuria tubular o una proteinuria mixta glomerular-tubular. La excreción exclusivamente renal de albúmina y transferrina caracteriza la proteinuria selectiva que se produce, por ejemplo, en nefropatía de cambios mínimos. En el caso de la proteinuria no selectiva también puede detectarse IgG en la orina. Esta forma de proteinuria puede encontrarse, por ejemplo, en amiloidosis renal, pero también en el estadio avanzado de la nefropatía diabética. Una proteinuria tubular se basa en enfermedades tubulointersticiales que afectan a los procesos de reabsorción, lo que tiene como consecuencia la excreción de proteínas de bajo peso molecular. Clínicamente, la proteinuria tubular es especialmente importante cuanto está asociada a otros defectos del túbulo proximal. Las proteinurias tubulares se producen, entre otras cosas, en enfermedades como tubulopatía hereditaria, acidosis tubular renal, nefritis intersticial inducida por bacterias o medicamentos, insuficiencia renal aguda, envenenamiento con metales pesados, nefropatía de Bence-Jones y en la fase posoperatoria del implante de riñón. La proteinuria mixta glomerular-tubular se basa frecuentemente en enfermedades glomerulares primarias con pronunciados cambios intersticiales secundarios.

En la presente revelación, en el caso de las enfermedades renales asociadas a proteinuria se trata especialmente de nefropatía por cambios mínimos, otras glomerulopatías, amiloidosis renal, tubulopatía hereditaria, acidosis tubular renal, nefritis intersticial inducida por bacterias o medicamentos, insuficiencia renal aguda, nefropatía de Bence-Jones y la fase posoperatoria de un implante de riñón.

En relación con la presente invención, por "diabetes mellitus" se entiende distintas formas del trastorno metabólico de la glucosa con diferentes etiologías y sintomatología. La característica común es una deficiencia relativa o absoluta de insulina. Las enfermedades de diabetes mellitus se caracterizan por un aumento permanente de la glucosa en sangre (hiperglucemia) o por una valoración temporalmente inadecuada de la glucosa introducida. La diabetes mellitus se clasifica en tipo I (IDDM) y tipo II (NIDDM).

Las complicaciones crónicas específicas de la diabetes y asociadas a la diabetes son las microangiopatías retinopatía, nefropatía y neuropatía. En la revelación se consideran polineuropatía, pie diabético, trastorno del tejido esquelético, de sostén y conjuntivo, así como macroangiopatía, especialmente cardiopatía coronaria, trastorno de la circulación cerebral y enfermedad oclusiva arterial periférica.

Por "retinopatía diabética" se entiende una microangiopatía del fondo del ojo que se produce en diabetes mellitus. Las formas de la retinopatía diabética son la retinopatía no proliferativa (retinopatía de fondo) como hemorragias retinianas, microaneurismas, exudados duros, edema retiniano con pérdida de la agudeza visual, así como la retinopatía proliferativa, produciéndose la aparición adicional de manchas algodonosas y angiogénesis sobre y delante de la retina con hemorragias vítreas debidas a isquemia retiniana por oclusiones vasculares. La retinopatía proliferativa puede conducir a desprendimiento de retina por tracción, glaucoma neovascular y ceguera.

En relación con la presente, por "nefropatía diabética", que también se denomina glomeruloesclerosis diabética, se entiende una lesión de los capilares renales glomerulares. Clínicamente, la nefropatía diabética se manifiesta por proteinuria, hipertensión, edemas, un ensanchamiento difuso de la membrana basal, un aumento del mesangio y espesamientos nodulares tardíos en los bucles de los glomérulos con constricción de la luz vascular, así como deposiciones fibrinoides en la pared capilar y microaneurismas.

En relación con la presente invención, por una "neuropatía diabética" se entiende una enfermedad de los nervios periféricos. Especialmente se trata a este respecto de la polineuropatía sensoriomotora distal simétrica y la neuropatía autónoma. La polineuropatía periférica se manifiesta normalmente en las extremidades inferiores empezando en los pies y avanza proximalmente y no rara vez también afecta a los brazos. La sintomatología varía considerablemente, conduciendo molestias como dolores, insensibilidad y parestesia frecuentemente a una exacerbación.

Por complicaciones cardiovasculares en el caso de diabetes se entiende enfermedades cardiovasculares y vasculares, especialmente enfermedad oclusiva periférica, cardiopatía coronaria, infarto de

miocardio y ataque de apoplejía que aparecen debidos a diabetes mellitus.

En relación con la presente revelación, por “hipertensión” o “hipertono” se entiende tensión arterial alta o enfermedad de la tensión alta que se caracteriza por una elevación permanente de la tensión arterial a valores de más de 140 mm de Hg de sistólica y de más de 90 mm de Hg de diastólica. Por “complicaciones cardiovasculares asociadas a hipertensión” se entiende enfermedades cardiovasculares y vasculares, especialmente enfermedad oclusiva periférica, cardiopatía coronaria, infarto de miocardio y ataque de apoplejía que aparecen debidos a hipertensión.

En relación con la presente revelación, por “hipercolesterolemia” se entiende una elevada concentración de colesterol en la sangre, pudiendo producirse la hipercolesterolemia principalmente o secundariamente debida a diabetes. La hipercolesterolemia es un factor de riesgo para la arteriosclerosis. Por “complicaciones cardiovasculares asociadas a hipercolesterolemia” se entiende enfermedades cardiovasculares y vasculares, especialmente enfermedad oclusiva periférica, cardiopatía coronaria, infarto de miocardio y ataque de apoplejía que aparecen debidos a hipercolesterolemia.

En relación con la presente invención, por una “proteincinasa C” o “PKC” se entiende una familia de proteínas que desempeña una función esencial en la transmisión de señales, desempeñando las proteínas PKC funciones intracelularmente reguladoras mediante la fosforilación de sustratos como enzimas, factores de transcripción y/o proteínas citoesqueléticas. La activación de las proteínas PKC conduce, por ejemplo, a una activación de otras proteincinasas, incluida la proteincinasa activada por mitógeno (MAPK) que, por tanto, son un sustrato de las proteínas PKC. Las proteínas proteincinasa C son los receptores de ésteres de forbol principales. La familia de proteínas de la proteincinasa C comprende al menos doce isoformas en células de mamífero que se clasifican en tres subfamilias diferentes. Las llamadas isoformas de la proteincinasa C convencionales (conventional) (cPKC) comprenden las isoformas PKC- α , PKC- β I y la variante de corte y empalme β II, así como PKC- γ . Las llamadas nuevas isoformas de las proteincinasas (nPKC) comprenden las isoformas PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η y PKC- θ . Las llamadas isoformas de la proteincinasa C atípicas (aPKC) comprenden las isoformas PKC- ζ y PKC- λ (también llamada PKC- ι). Otras isoformas son PKC- μ (también llamada proteincinasa D), así como las cinasas relacionadas con PKC (PRK) que eventualmente representan subfamilias propias (Toker, *Frontiers in Biosciences*, 3 (1998), d1134-1147). Las isoformas de PKC se diferencian tanto en sus secuencias de aminoácidos como también en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos (Coussens y col., *Sciences*, 233 (1986), 859-866). Las proteínas PKC presentan todas juntas sin excepción una estructura de dominio. También se diferencian su patrón de expresión celular, los mecanismos de su activación y su especificidad de sustrato.

La mayoría de las isoformas de la proteincinasa C no están unidas a la membrana antes de la activación y están distribuidas de forma difusa en el citoplasma. La activación de la actividad de cada isoforma mediante el tratamiento de las células con el compuesto de forbol 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol conduce a cambios específicos de isozima de la morfología celular, así como a una rápida redistribución selectiva de las distintas isozimas de PKC en distintas estructuras subcelulares. La isoforma de la proteincinasa C- α está enriquecida especialmente en el retículo endoplasmático y en el borde de la célula, mientras que la isoforma de PKC- β II está enriquecida en los microfilamentos ricos en actina del citoesqueleto. La especificidad de sustrato de las isoformas de PKC está mediada al menos parcialmente por la distribución subcelular de las isozimas de la proteincinasa C activadas.

Por “proteincinasa C- α ” se entiende una proteína que se activa mediante iones calcio y diacilglicerina, estando la proteincinasa C- α activada especialmente enriquecida en el retículo endoplasmático y en el borde de la célula. La secuencia de aminoácidos de PKC- α y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la PKC- α se describen en Coussens y col., *Sciences*, 233 (1986), 859-866. La proteína PKC- α presenta una estructura de dominio similar a la de las proteínas cPKC restantes. La proteína comprende un dominio de pseudosustrato, una región rica en cisteína, un dominio de unión a calcio y un dominio catalítico. La PKC- α puede activarse mediante diacilglicerina, éster de forbol, fosfatidilserina y calcio.

En relación con la presente revelación, por “agentes que reducen o inhiben la expresión de la proteincinasa C- α ” se entiende aquellos agentes que impiden completamente o al menos reducen la síntesis de una proteína PKC- α funcional tanto bajo condiciones *in vitro* como también bajo condiciones *in vivo*, inhibiéndose o reduciéndose la transcripción de la secuencia de ADN que codifica la PKC- α en una secuencia de ARNm complementaria, el procesamiento del ARNm, la traducción del ARNm en una cadena de polipéptidos, el procesamiento del polipéptido y/o las modificaciones postraduccionales del polipéptido. El uso de agentes que reducen o inhiben la expresión de la proteincinasa C- α también puede conducir además a que o bien no se prepare absolutamente ninguna proteína PKC- α funcional, por ejemplo, activable o bien se reduzca la cantidad de la proteína PKC- α funcional producida, por ejemplo, activable. Pero el uso de agentes que reducen o inhiben la expresión de la proteincinasa C- α también puede conducir además a que se produzca una proteína PKC- α no funcional, ejemplo, no activable, o una proteína PKC- α sólo parcialmente funcional.

En relación con la presente revelación, por “agentes que reducen o inhiben la actividad de la

5 proteincinasa C- α " se entiende aquellos agentes que pueden eliminar completamente o parcialmente la actividad biológica de la proteína PKC- α funcional tanto bajo condiciones *in vitro* como también bajo condiciones *in vivo*. La inactivación completa o parcial de la proteína PKC- α puede realizarse, por ejemplo, interaccionando el agente usado directamente con la proteína PKC- α . La interacción directa entre el agente y la proteína PKC- α puede realizarse, por ejemplo, mediante enlace covalente o no covalente. Mediante la interacción entre el agente y la proteína PKC- α también pueden producirse, por ejemplo, cambios químicos de la proteincinasa que conducen a una pérdida de la actividad biológica de la proteincinasa. La interacción también puede conducir, por ejemplo, a una degradación específica de la PKC- α . Pero los agentes que reducen o inhiben la actividad de la proteincinasa C- α también pueden ser aquellos que modifican o eliminan o se unen a sustratos específicos, estructuras diana o moléculas diana de la PKC- α de forma que de esta manera se reduzca o se suprima completamente la actividad biológica de la PKC- α . Los agentes que reducen o inhiben la actividad de la proteincinasa C- α también pueden ser aquellos que previenen la translocación de la PKC- α después de la activación, por ejemplo, mediante tratamiento con forbol en el retículo endoplasmático o en el borde de la célula de manera que la PKC- α no pueda interaccionar con sus sustratos específicos, estructuras diana o moléculas diana.

10 En la forma de realización especialmente preferida de la invención, en el caso de los agentes utilizados según la invención se trata de agentes que reducen o inhiben específicamente la expresión y/o la actividad de PKC- α , pero no la expresión y/o la actividad de otras isoformas de PKC, por ejemplo de PKC- β .

20 Según la invención, los agentes que reducen o inhiben específicamente la expresión y/o la actividad de PKC- α son inhibidores de la actividad de la proteincinasa C- α . También se dan a conocer agentes que se seleccionan del grupo constituido por ácidos nucleicos que reducen o inhiben la expresión del gen de la proteincinasa C- α , vectores que contienen el ácido nucleico, células huésped que contienen los vectores, sustancias inhibitoras o reductoras de la expresión de la proteincinasa C- α , sustancias inhibitoras de la translocación de la proteincinasa C- α , antagonistas de la actividad de la proteincinasa C- α y también se da a conocer que el ácido nucleico usado se selecciona del grupo constituido por

- 25
- a) un ácido nucleico que codifica la proteincinasa C- α humana o un fragmento del mismo,
 - b) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico según a) o un fragmento del mismo,
 - c) un ácido nucleico que puede obtenerse mediante sustitución, adición, inversión y/o deleción de una o varias bases de un ácido nucleico según a) o b) o un fragmento del mismo; y
 - 30 d) un ácido nucleico que presenta más del 80% de homología con un ácido nucleico según a) a c) o un fragmento del mismo.

35 En relación con la presente revelación, por un "ácido nucleico que codifica la proteincinasa C- α o un fragmento de la misma" se entiende un ácido nucleico que codifica una proteína PKC- α o un fragmento de la misma que presenta los dominios funcionales, especialmente los dominios de pseudosustrato, la región rica en cisteína, el dominio de unión a calcio y un dominio catalítico de la proteincinasa C- α nativa. En una forma de realización preferida de la invención, el ácido nucleico usado según la invención codifica PKC-alfa humana o partes de la misma.

40 "Homología" significa en relación con la revelación una identidad de secuencias de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85% y con especial preferencia al menos más del 90%, 95%, 97% y 99%. Por tanto, el término "homología" conocido para el experto designa el grado de parentesco entre dos o varias moléculas de ácido nucleico que se determina mediante la coincidencia entre las secuencias.

45 En el caso del ácido nucleico usado puede tratarse de una secuencia de ADN o ARN, especialmente en forma lineal. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico aislado de fuentes naturales, por ejemplo, de tejidos eucariotas, preferiblemente de tejidos de mamífero, lo más preferido de tejidos humanos, o prepararse sintéticamente.

50 Se prevé especialmente que el ácido nucleico usado como agente, siempre y cuando esté insertado en un vector, especialmente en un vector de expresión, pueda inhibir la expresión del gen de la proteincinasa C- α humana en una célula huésped en orientación antisentido a un promotor. En la inserción del ácido nucleico utilizado en la orientación antisentido en un vector, es decir, en presencia de un constructo antisentido del ácido nucleico utilizado, el ácido nucleico se transcribe como ácido nucleico antisentido. Entonces, en la transcripción del gen nativo de PKC-alfa de la célula, el transcrito antisentido generado del ácido nucleico usado según la invención puede unirse mediante el par de bases de Watson-Crick al transcrito de ARNm del gen nativo de la proteincinasa C- α presente en la orientación sentido con formación de una estructura dúplex. De esta manera se impide selectivamente la traducción del ARNm del gen nativo de PKC- α en un polipéptido y se inhibe específicamente la expresión de la PKC-alfa nativa sin que se inhiba la expresión de otras isoformas celulares de PKC.

55 Además, se da a conocer que el ácido nucleico usado para la generación de constructos antisentido no comprende la secuencia que codifica PKC-alfa completa, sino sólo fragmentos de la misma. Estos

fragmentos comprenden al menos 10 nucleótidos, preferiblemente al menos 50 nucleótidos, con especial preferencia al menos 200 nucleótidos, estando elegidas las regiones de nucleótidos de la secuencia que codifica PKC-alfa que se extienden por los fragmentos de forma que en la expresión de los fragmentos en la orientación antisentido en una célula se realice una inhibición específica de la expresión de PKC-alfa, especialmente de la PKC-alfa humana, pero no una inhibición de otras isoformas de PKC, por ejemplo, de las isoformas de PKC-beta.

Se prevé que el ácido nucleico previamente mencionado o un fragmento adecuado del mismo esté insertado en un vector bajo el control de al menos un elemento de regulación de la expresión, estando insertado el ácido nucleico o el fragmento del mismo en orientación antisentido a los elementos de regulación de la expresión. Después de la introducción del vector en una célula, por ejemplo una célula de mamífero, especialmente una célula humana, el ácido nucleico o el fragmento del mismo puede entonces expresarse en orientación antisentido y de esta manera inhibir eficazmente la expresión de la PKC-alfa nativa de la célula. Preferiblemente, en el caso del vector se trata de un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus.

Por tanto, también se da a conocer un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica PKC-alfa o un fragmento bajo el control funcional de al menos un elemento regulador de la expresión, estando insertado el ácido nucleico o el fragmento del mismo en orientación antisentido al elemento de regulación. En el caso del elemento de regulación de la expresión se trata especialmente de un promotor, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia señal o un terminador de la transcripción en 3'.

La revelación se refiere a una célula huésped que contiene un vector anteriormente descrito. En el caso de la célula huésped se trata especialmente de una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana. En una forma especialmente preferida, en el caso de la célula humana se trata de una célula madre adulta.

Para la inhibición de la expresión de PKC-alfa se utilizan oligonucleótidos antisentido sintéticamente preparados que comprenden al menos 10 nucleótidos, preferiblemente al menos 50 nucleótidos, con especial preferencia al menos 200 nucleótidos. Tales oligonucleótidos antisentido pueden utilizarse directamente para la inhibición de la expresión de PKC-alfa, es decir, no deben insertarse en un vector y expresarse bajo condiciones celulares. A este respecto, en el caso de estos oligonucleótidos antisentido específicos de PKC- α se trata especialmente del producto ISIS 3521 de Isis Pharmaceuticals que es un fuerte inhibidor selectivo de la expresión de la proteincinasa alfa. En otra forma de realización, en el caso de los oligonucleótidos antisentido específicos de PKC- α se trata de los oligodesoxinucleótidos antisentido descritos por Busutti y col., J. Surg. Pathol., 63 (1996), 137-142.

Tanto los ácidos nucleicos previamente mencionados, los vectores que contienen estos ácidos nucleicos, como también las células huésped que contienen los vectores pueden utilizarse como agentes para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades vasculares, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales asociadas a proteinuria, efectos tardíos y/o complicaciones cardiovasculares asociados a diabetes mellitus, complicaciones cardiovasculares asociadas a hipertensión y/o complicaciones cardiovasculares asociadas a hipercolesterolemia, por ejemplo, en el marco de una terapia génica.

Se da a conocer que para la inhibición o la reducción de la expresión de la proteincinasa alfa se utiliza un activador de la proteincinasa C- α . Preferiblemente, el activador es un compuesto de forbol, especialmente 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA) o 12,13-dibutirato de forbol (PDBu). Se sabe que una incubación de células con, por ejemplo, PDBu durante un periodo de tiempo de 16 h a 24 h conduce a una regulación por disminución completa de PKC-alfa (Busutti y col., J. Surg. Res., 63 (1996), 137-142). También se sabe que un tratamiento con una mayor concentración de TPA, por ejemplo 1,6 μ M, inhibe completamente la expresión de PKC-alfa. Por tanto, se prevé el tratamiento de tejido enfermo con ésteres de forbol en una concentración de preferiblemente más de 1,6 μ M durante un periodo de tiempo de al menos 15 h para bloquear parcialmente o completamente la expresión de PKC-alfa en los tejidos u órganos en cuestión.

Según la invención se prevé el uso de un inhibidor para la inhibición o la reducción de la actividad de la proteincinasa α . En relación con la presente invención, por un "inhibidor" se entiende una sustancia que inhibe competitivamente la actividad biológica de la proteincinasa C- α , cambia alostéricamente la estructura espacial de PKC- α o inhibe la PKC- α mediante la inhibición del sustrato.

En una forma de realización preferida de la invención, el inhibidor es un anticuerpo que reacciona específicamente con la proteincinasa C- α . Por un "anticuerpo" se entiende polipéptidos que se codifican esencialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que pueden unirse y reconocer específicamente un analito, es decir, un antígeno. Mediante la unión del anticuerpo a la PKC- α se inhibe su actividad biológica. Según la invención, los anticuerpos contra la proteincinasa C- α pueden presentarse como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos que se generan mediante escisión con distintas peptidasas. El término "anticuerpo" usado según la invención también se refiere a anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos oligoméricos, anticuerpos reducidos, anticuerpos oxidados y anticuerpos marcados. El término "anticuerpo" también comprende fragmentos de anticuerpos que se prepararon o bien mediante modificación del anticuerpo completo o bien *de novo* usando procedimientos de recombinación de ADN. Por tanto, el término "anticuerpo" comprende tanto moléculas intactas como

también fragmentos de las mismas como Fab, F(ab')₂ y Fv que pueden unirse a los determinantes epitópicos. Estos fragmentos de anticuerpos conservan la capacidad de unirse selectivamente al antígeno correspondiente. Los procedimientos para la preparación de anticuerpos o de fragmentos de los mismos son conocidos en el estado de la técnica.

5 En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo usado según la invención para la inhibición de la actividad de la proteincinasa C- α es un anticuerpo monoclonal o policlonal. Según la invención, el anticuerpo también puede ser un anticuerpo humanizado. En una forma de realización especialmente preferida de la invención, los anticuerpos usados para la inhibición de la actividad de la proteincinasa C- α son los descritos por Goodnight y col., J. Biol. Chem., 270 (1995), 9991-10001.

10 En otra forma de realización preferida de la invención se prevé que el inhibidor utilizado según la invención para la inhibición de la PKC-alfa cambie el estado de fosforilación de la proteincinasa C- α y de esta manera inhiba o al menos reduzca la actividad de la PKC-alfa. Por Tasinato y col., Biochem. J., 334 (1998), 243-249, se sabe que el alfa-tocoferol puede inactivar la proteincinasa C-alfa celular cambiando el estado de fosforilación de PKC-alfa. Por tanto, se prevé el uso de alfa-tocoferol para la inhibición de la actividad de PKC-
15 alfa y, por tanto, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades vasculares, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales asociadas a proteinuria, efectos tardíos diabéticos y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con diabetes mellitus, complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipertensión y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipercolesterolemia.

20 Se da a conocer el uso de antagonistas de PKC-alfa para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades vasculares, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales asociadas a proteinuria, efectos tardíos diabéticos y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con diabetes mellitus, complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipertensión y/o complicaciones cardiovasculares en
25 pacientes con hipercolesterolemia. En relación con la presente revelación, por un "antagonista" se entiende una sustancia que compite con la PKC-alfa por la unión a un sustrato específico de PKC-alfa, pero sin causar después de la unión al sustrato el mismo efecto que la PKC-alfa. Por antagonistas también se entiende sustancias que, debido a su estructura, se adaptan a una conformación inactiva de un sustrato específico de PKC-alfa y, por tanto, la PKC-alfa previene la activación del sustrato.

30 Como antagonista para la inhibición de la actividad de PKC-alfa se utiliza un derivado de PKC-alfa que, aunque puede unirse a los sustratos de la PKC-alfa nativa, después de la unión a los mismos no puede desarrollar el mismo efecto biológico que la PKC-alfa nativa.

35 En relación con la presente revelación, por "derivados" se entiende equivalentes funcionales o derivados de la proteincinasa C- α que se obtienen conservando la estructura básica de PKC- α mediante la sustitución de átomos o grupos o restos de moléculas y/o sus secuencias de aminoácidos se diferencian en al menos una posición de las moléculas de PKC- α humanas o animales de procedencia natural, pero que esencialmente presentan un alto grado de homología en el nivel de los aminoácidos. Según la invención, el término "derivado" también comprende proteínas de fusión en las que en la parte del extremo N o en la parte del extremo C están presentes dominios funcionales de otra proteína, por ejemplo, de otro inhibidor de PKC- α .

40 Las diferencias entre un derivado y la PKC- α nativa pueden derivarse de, por ejemplo, mutaciones como, por ejemplo, deleciones, sustituciones, inserciones, adiciones, intercambios de bases y/o recombinaciones de las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de PKC- α . Evidentemente, a este respecto también puede tratarse de variaciones de secuencias que se producen naturalmente, por ejemplo, de secuencias de otro organismo o de secuencias que mutaron de forma natural, o mutaciones que se introdujeron específicamente en las secuencias correspondientes con ayuda de agentes habituales conocidos en la técnica, por ejemplo, agentes químicos y/o agentes físicos.

45 Se da a conocer que como antagonista para la inhibición de la actividad de PKC-alfa se utiliza un análogo de PKC-alfa. Por "análogos" de la proteincinasa C se entiende compuestos que no presentan ninguna secuencia de aminoácidos idéntica a la de la proteincinasa C- α , pero cuya estructura tridimensional se parece mucho a la de la proteincinasa C- α . Los análogos de PKC- α dados a conocer presentan preferiblemente propiedades de especificidad de sustrato similares a las de la PKC- α , es decir, pueden unirse
50 a los sustratos específicos de PKC-alfa, sin embargo, preferiblemente no poseen las propiedades catalíticas de PKC- α . Por tanto, en el caso de los análogos de la proteincinasa C- α dados a conocer puede tratarse, por ejemplo, de compuestos que contienen en la conformación adecuada restos de aminoácidos responsables de la unión de la proteincinasa C- α a sustratos de PKC- α y que, por tanto, pueden imitar las propiedades esenciales de la región de unión de la proteincinasa C- α , pero sin poseer las mismas propiedades catalíticas que la proteincinasa C- α .

55 Además, se da a conocer que para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades vasculares, enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales asociadas a proteinuria, efectos tardíos diabéticos y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con diabetes mellitus, complicaciones cardiovasculares en
60 pacientes con hipertensión y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipercolesterolemia se utilizan agentes que reducen o inhiben no sólo la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- α (PKC- α), sino al mismo tiempo la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- β (PKC- β). Takahashi y Kamimura

describen en J. Invest. Dermatol., 117 (2001), 605-611, que el inmunosupresor ciclosporina A reduce al mismo tiempo la expresión de las isoformas alfa, beta I y beta II de la proteincinasa C. Por tanto, en una forma de realización especialmente preferida de la invención se prevé el uso de ciclosporina A para la reducción de la expresión de PKC-alfa y de PKC-beta y, por tanto, para el tratamiento de las enfermedades mencionadas según la reivindicación 1.

En otra forma de realización preferida de la invención se prevé que el agente que reduce o inhibe específicamente la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- α se use en combinación con un agente que reduce o inhibe específicamente la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- β . Según la invención, por "proteincinasa C- β " se entiende tanto la proteincinasa C- β I como también la variante de corte y empalme β II.

Se da a conocer que el agente reductor o inhibidor de la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- β se selecciona del grupo constituido por ácidos nucleicos que reducen o inhiben la expresión del gen de la proteincinasa C- β , vectores que contienen el ácido nucleico, células huésped que contienen los vectores, sustancias inhibitoras o reductoras de la expresión de la proteincinasa C- β , sustancias inhibitoras de la translocación de la proteincinasa C- β , antagonistas de la actividad de la proteincinasa C- β e inhibidores de la actividad de la proteincinasa C- β .

El ácido nucleico que va a utilizarse como agente se selecciona del grupo constituido por

- a) un ácido nucleico que codifica la proteincinasa C- β humana o un fragmento del mismo,
- b) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico según a) o un fragmento del mismo,
- c) un ácido nucleico que puede obtenerse mediante sustitución, adición, inversión y/o delección de una o varias bases de un ácido nucleico según a) o b) o un fragmento del mismo; y
- d) un ácido nucleico que presenta más del 80% de homología con un ácido nucleico según a) a c) o un fragmento del mismo.

El ácido nucleico usado codifica PKC-alfa humana o partes de la misma.

En el caso del ácido nucleico usado puede tratarse de una secuencia de ADN o ARN, especialmente en forma lineal. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico aislado de fuentes naturales, por ejemplo, de tejidos eucariotas, preferiblemente de tejidos de mamífero, lo más preferido de tejidos humanos, o prepararse sintéticamente.

Se da a conocer que el ácido nucleico usado como agente, siempre y cuando esté insertado en un vector, especialmente en un vector de expresión, puede inhibir la expresión del gen de la proteincinasa C- β humana en una célula huésped en orientación antisentido a un promotor. En la inserción del ácido nucleico utilizado en la orientación antisentido en un vector, es decir, en presencia de un constructo antisentido del ácido nucleico utilizado, el ácido nucleico se transcribe como ácido nucleico antisentido. Entonces, en la transcripción del gen nativo de PKC- β de la célula, el transcrito antisentido generado del ácido nucleico usado puede unirse al transcrito de ARNm del gen nativo de la proteincinasa C- β presente en la orientación sentido con formación de una estructura dúplex. De esta manera se impide selectivamente la traducción del ARNm del gen nativo de PKC- β en un polipéptido y se inhibe específicamente la expresión de la PKC- β nativa sin que se inhiba la expresión de otras isoformas celulares de PKC.

Además, se da a conocer que el ácido nucleico usado para la generación de constructos antisentido no comprende la secuencia que codifica PKC- β completa, sino sólo fragmentos de la misma. Estos fragmentos comprenden al menos 10 nucleótidos, preferiblemente al menos 50 nucleótidos, con especial preferencia al menos 200 nucleótidos, estando elegidas las regiones de nucleótidos de la secuencia que codifica PKC- β que se extienden por los fragmentos de forma que en la expresión de los fragmentos en la orientación antisentido en una célula se realice una inhibición específica de la expresión de PKC- β , especialmente de la PKC- β humana, pero no una inhibición de otras isoformas de PKC.

Se prevé que el ácido nucleico previamente mencionado o un fragmento adecuado del mismo esté insertado en un vector bajo el control de al menos un elemento de regulación de la expresión, estando insertado el ácido nucleico o el fragmento del mismo en orientación antisentido a los elementos de regulación de la expresión. Después de la introducción del vector en una célula, por ejemplo una célula de mamífero, especialmente una célula humana, el ácido nucleico o el fragmento del mismo puede entonces expresarse en orientación antisentido y de esta manera inhibir eficazmente la expresión de la PKC- β nativa de la célula. Preferiblemente, en el caso del vector se trata de un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus.

Por tanto, la revelación también se refiere a un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica PKC- β o un fragmento bajo el control funcional de al menos un elemento regulador de la expresión, estando insertado el ácido nucleico o el fragmento del mismo en orientación antisentido al elemento de regulación. En el caso del elemento de regulación de la expresión se trata especialmente de un promotor, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia señal o un terminador de la transcripción en 3'.

Se da a conocer una célula huésped que contiene un vector anteriormente descrito. En el caso de la célula huésped se trata especialmente de una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana. En una forma especialmente preferida, en el caso de la célula humana se trata de una célula madre adulta.

5 Para la inhibición de la expresión de PKC- β se utilizan oligonucleótidos antisentido sintéticamente preparados que comprenden al menos 10 nucleótidos, preferiblemente al menos 50 nucleótidos, con especial preferencia al menos 200 nucleótidos. Tales oligonucleótidos antisentido pueden utilizarse directamente para la inhibición de la expresión de PKC- β , es decir, no deben insertarse en un vector y expresarse bajo condiciones celulares.

10 Para la inhibición de la actividad de la proteincinasa C- β se da a conocer un anticuerpo que reacciona específicamente con la proteincinasa C- β o un fragmento adecuado del mismo. Según la invención, en el caso del anticuerpo se trata de un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo utilizado según la invención también puede ser un anticuerpo humanizado.

En otra forma de realización preferida de la invención se prevé utilizar para la inhibición de la actividad de la proteincinasa C- β una sustancia que cambia el estado de fosforilación de la proteincinasa C- β .

15 En otra forma de realización preferida de la invención se prevé utilizar para la inhibición de la actividad de la proteincinasa C- β un derivado o un análogo de la proteincinasa C- β que actúa de antagonista de PKC- β . Preferiblemente, en el caso de los derivados o análogos de PKC- β utilizados según la invención se trata de sustancias que compiten con la PKC- β nativa por la unión a sustratos específicos de PKC- β , pero sin causar después de la unión a los sustratos el mismo efecto que la PKC- β .

20 En una forma de realización especialmente preferida de la invención, para la inhibición o la reducción específica de la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- β se utilizan los compuestos descritos en los documentos US 5.491.242, US 5.661.173, US 5.481.003, US 5.668.152, US 5.672.618, WO 95/17182, WO 95/35294 y WO 02/.

25 Los agentes que reducen o inhiben específicamente la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- α (PKC- α) pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de cardiopatía coronaria, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva periférica, ataque de apoplejía, enfermedades renales que van acompañadas de proteinuria, efectos tardíos diabéticos y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con diabetes mellitus, complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipertensión y complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipercolesterolemia. A este respecto, en el caso de las complicaciones cardiovasculares se trata preferiblemente de cardiopatía coronaria, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva periférica y ataque de apoplejía. En el caso de los efectos tardíos diabéticos, según la invención se trata de retinopatía diabética, neuropatía diabética y nefropatía diabética.

30 Por una "composición farmacéutica" o un "fármaco" se entiende una mezcla usada para fines diagnósticos, terapéuticos y/o profilácticos, es decir, una mezcla que promueve o restaura la salud de un cuerpo humano o animal que comprende al menos un principio activo preparado naturalmente o sintéticamente que causa el efecto terapéutico. La composición farmacéutica puede ser tanto una mezcla sólida como también una líquida. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende el principio activo puede contener uno o varios componentes farmacéuticamente aceptables. Además, la composición farmacéutica puede comprender normalmente aditivos usados en la técnica, por ejemplo, estabilizadores, agentes de producción, agentes de separación, disgregantes, emulsionantes u otras sustancias usadas normalmente para la preparación de la composición farmacéutica.

35 Por una "composición farmacéutica" o un "fármaco" se entiende una mezcla usada para fines diagnósticos, terapéuticos y/o profilácticos, es decir, una mezcla que promueve o restaura la salud de un cuerpo humano o animal que comprende al menos un principio activo preparado naturalmente o sintéticamente que causa el efecto terapéutico. La composición farmacéutica puede ser tanto una mezcla sólida como también una líquida. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende el principio activo puede contener uno o varios componentes farmacéuticamente aceptables. Además, la composición farmacéutica puede comprender normalmente aditivos usados en la técnica, por ejemplo, estabilizadores, agentes de producción, agentes de separación, disgregantes, emulsionantes u otras sustancias usadas normalmente para la preparación de la composición farmacéutica.

40 Se da a conocer especialmente el uso de agentes que reducen o inhiben específicamente la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- α (PKC- α) como principio activo para la preparación de un fármaco para la terapia y/o la profilaxis de las enfermedades previamente mencionadas.

45 Los agentes utilizados para la preparación de composiciones farmacéuticas se seleccionan del grupo constituido por ácidos nucleicos que reducen o inhiben la expresión del gen de la proteincinasa C- α , vectores que contienen el ácido nucleico, células huésped que contienen los vectores, sustancias inhibitoras o reductoras de la expresión de la proteincinasa C- α , sustancias inhibitoras de la translocación de la proteincinasa C- α , antagonistas de la actividad de la proteincinasa C- α e inhibidores de la actividad de la proteincinasa C- α .

50 Con especial preferencia, en el caso de los agentes usados para la preparación de la composición farmacéutica se trata de oligonucleótidos antisentido del gen que codifica la proteincinasa C- α , tocoferol, compuestos de forbol, derivados de la proteincinasa C- α o análogos de la proteincinasa C- α .

55 La composición farmacéutica se usa para administración parenteral, especialmente intravenosa, intramuscular, intracutánea o subcutánea. Preferiblemente, el fármaco que contiene los agentes utilizados presenta la forma de una inyección o infusión.

La composición farmacéutica que contiene los agentes utilizados según la invención puede

administrarse por vía oral. Por ejemplo, el fármaco se administra en una forma farmacéutica líquida como una disolución, suspensión o emulsión, o una forma farmacéutica sólida como un comprimido.

5 Por tanto, la revelación también se refiere a composiciones farmacéuticas para la prevención y/o el tratamiento de cardiopatía coronaria, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva periférica, ataque de apoplejía, enfermedades renales que van acompañadas de proteinuria, efectos tardíos diabéticos y/o complicaciones cardiovasculares en pacientes con diabetes mellitus, complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipertensión y complicaciones cardiovasculares en pacientes con hipercolesterolemia que comprenden al menos un agente que reduce o inhibe específicamente la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- α (PKC- α) como principio activo.

10 Los agentes contenidos en la composición farmacéutica se seleccionan del grupo constituido por ácidos nucleicos que reducen o inhiben la expresión del gen de la proteincinasa C- α , vectores que contienen el ácido nucleico, células huésped que contienen los vectores, sustancias inhibitoras o reductoras de la expresión de la proteincinasa C- α , sustancias inhibitoras de la translocación de la proteincinasa C- α , antagonistas de la actividad de la proteincinasa C- α e inhibidores de la actividad de la proteincinasa C- α .

15 La composición farmacéutica contiene oligonucleótidos antisentido del gen que codifica la proteincinasa C- α , tocoferol, compuestos de forbol, derivados de la proteincinasa C- α o análogos de la proteincinasa C- α .

20 La composición farmacéutica según la invención contiene especialmente al menos otra composición farmacéutica contiene especialmente al menos otro principio activo. En el caso del otro principio activo se trata especialmente de un agente que reduce o inhibe específicamente la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- β .

25 El agente reductor o inhibidor de la expresión y/o la actividad de la proteincinasa C- β puede seleccionarse del grupo constituido por ácidos nucleicos que reducen o inhiben la expresión del gen de la proteincinasa C- β , vectores que contienen el ácido nucleico, células huésped que contienen los vectores, sustancias inhibitoras o reductoras de la expresión de la proteincinasa C- β , sustancias inhibitoras de la translocación de la proteincinasa C- β , antagonistas de la actividad de la proteincinasa C- β e inhibidores de la actividad de la proteincinasa C- β .

La invención se explica más detalladamente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

30 La Figura 1 muestra la excreción de albúmina en la orina de ratones “con gen inactivado” de PKC-alfa con diabetes mellitus y sin diabetes mellitus (control) y ratones SV129 con diabetes y sin diabetes (control). A este respecto, la concentración de albúmina se determinó usando una prueba de ELISA indirecta. Los valores de albúmina determinados se refirieron a la concentración de creatinina. Los ratones SV129 y PKC- $\alpha^{-/-}$ no diabéticos presentan un cociente de albúmina/creatinina comparable que generalmente se encuentra por debajo de 10 g/mol. Por el contrario, en el caso de los ratones SV129 diabéticos, el cociente es significativamente mayor ($p = 0,004$). Los valores de los ratones PKC- $\alpha^{-/-}$ diabéticos son significativamente más bajos que los valores de los ratones SV129 diabéticos ($p = < 0,001$). La raya transversal indica la mediana. La significancia se calculó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney.

40 La Figura 2 muestra la expresión glomerular de VEGF en ratones “con gen inactivado” de PKC-alfa con diabetes mellitus y sin diabetes mellitus (control) y ratones SV129 con diabetes y sin diabetes (control). A este respecto, por grupo de animal se valoraron semicuantitativamente respectivamente 40 glomérulos usando procedimientos inmunohistoquímicos, realizándose una subdivisión en inmunofluorescencia débil, media y fuerte. La significancia se calculó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney. La expresión de VEGF es en animales diabéticos significativamente mayor que en animales de control ($p < 0,001$). Sin embargo, la expresión de VEGF en animales SV129 diabéticos es significativamente mayor que en animales PKC-alfa $^{-/-}$ diabéticos ($p < 0,001$).

50 La Figura 3 muestra la expresión glomerular del receptor II de VEGF en ratones “con gen inactivado” de PKC-alfa con diabetes mellitus y sin diabetes mellitus (control) y ratones SV129 con diabetes y sin diabetes (control). A este respecto, por grupo de animal se valoraron semicuantitativamente respectivamente 40 glomérulos usando procedimientos inmunohistoquímicos, realizándose una subdivisión en inmunofluorescencia débil, media y fuerte. La significancia se calculó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney. La expresión de VEGF-R II es en animales diabéticos significativamente mayor que en animales de control ($p < 0,001$). Sin embargo, la expresión de VEGF-R II en animales SV129 diabéticos es significativamente mayor que en animales PKC-alfa $^{-/-}$ diabéticos ($p < 0,001$).

55 La Figura 4 muestra la expresión glomerular de perlecan en ratones “con gen inactivado” de PKC-alfa con diabetes mellitus y sin diabetes mellitus (control) y ratones SV129 con diabetes y sin diabetes (control). A este respecto, por grupo de animal se valoraron semicuantitativamente respectivamente 40 glomérulos usando procedimientos inmunohistoquímicos, realizándose una

subdivisión en inmunofluorescencia débil, media y fuerte. La significancia se calculó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney. La expresión de perlecan es en animales SV129 diabéticos significativamente menor que en animales SV129 de control ($p < 0,001$).

Ejemplo 1

5 Generación de diabetes experimental

Los siguientes experimentos se realizaron después de la autorización por las autoridades de protección de animales de Baja Sajonia en ratones que se mantuvieron bajo condiciones normalizadas a 22°C y tuvieron acceso libre a pienso y agua.

10 Antes de empezar el experimento, en todos los animales se determinó el nivel de azúcar en sangre a partir del suero. Los resultados se representan en la Tabla 1. En 16 ratones SV129 de control y 14 ratones SV129 con gen inactivado de proteincinasa C-alfa (PKC- $\alpha^{-/-}$) se indujo una diabetes mediante inyección de estreptozotocina. La estreptozotocina conduce a una destrucción de los islotes celulares productores de insulina en el páncreas. Debido a la falta de insulina resultante se producen niveles de azúcar en sangre permanentemente elevados, es decir, hiperglucemia y, por tanto, diabetes mellitus. Para la generación de la
15 hiperglucemia, a los animales se les administró intraperitonealmente en los días 1 y 4 respectivamente 125 mg de estreptozotocina/kg de peso corporal. La estreptozotocina se disolvió para estos fines en una disolución de citrato de Na 50 mM con un valor de pH de 4,5. Para el control, a 7 ratones SV129 y a 6 PKC- $\alpha^{-/-}$ se les administró intraperitonealmente sólo el disolvente en los días 1 y 4. A continuación, a los ratones se les extrajo cada 2 días una gota de sangre de la cola para controlar el azúcar en sangre. La medición del azúcar
20 en sangre se realizó mediante del aparato de medición Glucometer Elite® de Bayer. Para la determinación se usaron tiras reactivas Glucometer Elite Sensor®.

En los días 7-10, los animales a los que se les administró estreptozotocina eran diabéticos con valores de azúcar en sangre superiores a 350 mg/dl. Los valores iniciales antes de la inyección de estreptozotocina se encontraron por término medio en 200 mg/dl. En los animales que sólo recibieron el disolvente no se produjo un aumento de los valores de azúcar en sangre y no desarrollaron diabetes mellitus.
25 10 días después de la primera inyección, los animales se observaron durante otras 8 semanas. Durante este tiempo, el azúcar en sangre se controló cada dos semanas para garantizar que los animales diabéticos todavía fueran diabéticos. Los valores de azúcar oscilaron en los animales diabéticos durante este tiempo de media aproximadamente 500-550 mg/dl y en los animales no diabéticos aproximadamente 200 mg/dl.

30 Después de 8 semanas, los animales se anestesiaron con el anestésico avertina. Bajo anestesia, a continuación se tomaron 400 µl de sangre del plexo venoso del ojo y la orina de la vejiga completa de la vejiga mediante punción con una aguja de 27 G. A continuación, los riñones se perfundieron con disolución de lactato de Ringer mediante la aorta abdominal y se extirparon los riñones. Los animales se sacrificaron inmediatamente después bajo anestesia. Los valores de azúcar en sangre se determinaron a continuación a partir del suero. Los niveles de azúcar en sangre se encuentran en la Tabla 1. Como puede apreciarse, los
35 animales diabéticos presentan valores de glucosa aproximadamente 2,5-3 veces mayores que al principio del experimento y también en comparación con los animales no diabéticos de control.

Tabla 1

Glucosa en suero en ratones diabéticos y no diabéticos antes de empezar el experimento y al final del experimento

	Glucosa en suero antes de empezar el experimento (mg/dl)	Glucosa en suero al final del experimento (mg/dl)
SV129 Control (n = 7)	205 +/- 40	223 +/- 43
SV129 Diabéticos (n = 16)	192 +/- 36	505 +/- 80*
PKC- $\alpha^{-/-}$ Control (n = 6)	223 +/- 27	197 +/- 21
PKC- $\alpha^{-/-}$ Diabéticos (n = 14)	225 +/- 31	589 +/- 98*

* p = < 0,001 en comparación con animales de control no diabéticos

Ejemplo 2

Determinación de la concentración de albúmina

5 La aparición de una albuminuria en pacientes con diabetes es un fenómeno conocido. Por tanto, se determinó la excreción de albúmina en la orina de ratones “con gen inactivado” de PKC-alfa con diabetes mellitus y sin diabetes mellitus (control) y ratones SV129 con diabetes y sin diabetes (control). Para este fin se determinó la concentración de albúmina en la orina recogida. Para determinar la concentración de albúmina se usó una prueba de ELISA indirecta (Albuwell M[®] de la empresa Exocell Inc., Filadelfia, EE.UU.). Esta prueba de ELISA es específica para albúmina de ratón. La determinación se realizó correspondientemente a las especificaciones del fabricante. Para poder registrar oscilaciones en la excreción de orina, los valores de albúmina determinados se refirieron a la concentración de creatinina en la orina. Los resultados se representan en la Figura 1. A este respecto se mostró que los ratones SV129 y PKC- $\alpha^{-/-}$ no diabéticos tienen un cociente de albúmina/creatinina comparable que generalmente se encuentra por debajo de 10 g/mol. Por el contrario, el cociente en ratones SV129 diabéticos es significativamente mayor (p = 0,004). La mediana asciende a 21,5 g/mol frente a 7,48 g/mol en animales SV129 de control no diabéticos. En comparación con esto, en los ratones PKC- $\alpha^{-/-}$ diabéticos se produce un aumento significativo de la albuminuria. El cociente de albúmina/creatinina siempre se encuentra por debajo de 20 g/mol y la mediana se encuentra en 10,2 g/mol. La mediana de los ratones PKC- $\alpha^{-/-}$ de control no diabéticos se encuentra en 8,5 g/mol. Los valores de los ratones PKC- $\alpha^{-/-}$ diabéticos son significativamente menores que los valores de los ratones SV129 diabéticos (p = < 0,001). Los resultados se representan en la Figura 1.

Ejemplo 3

Determinación de la expresión de VEGF y del receptor II de VEGF

25 Como se ha citado previamente en el Ejemplo 1, todos los animales se sacrificaron al terminar el experimento. Inmediatamente después se extirparon los riñones y se congelaron a -70°C. Un análisis posterior de los riñones extirpados mostró en los corpúsculos renales (glomérulos) de los animales de control diabéticos un aumento significativo de la expresión del “vascular endothelial growth factor” (factor de crecimiento endotelial vascular) (VEGF) y del receptor II de VEGF (VEGF-R II). La detección de la expresión de VEGF y de VEGF-R II se realizó mediante procedimientos inmunohistoquímicos. Para esto, los riñones congelados a -70°C se criocortaron con un espesor de 6 nm y se secaron al aire. A continuación, las rebanadas criogénicas se fijaron con acetona fría, se secaron al aire y se lavaron con tampón Tris (TBS: tampón Tris 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6). Las rebanadas criogénicas se incubaron a continuación 60 minutos en una cámara húmeda con un anticuerpo “de conejo” policlonal primario contra VEGF de ratón (Santa Cruz, A-20) o VEGF-R II (Santa Cruz, C-1158). Después de lavar de nuevo con TBS, las rebanadas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo “anti-conejo” secundario marcado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-165-152) y se lavaron de nuevo con TBS. A continuación, los preparados se evaluaron mediante un microscopio Zeiss Axioplan-2 (Zeiss, Jena, Alemania) y se fotografiaron. En todos los animales se evaluaron respectivamente 40 corpúsculos renales, clasificándose la intensidad de fluorescencia en fuerte, media y débil. A este respecto, en animales SV129 de control diabéticos se encontró

un aumento significativo ($p < 0,001$) de la expresión de VEGF y de VEGF-R II en comparación con animales de control no diabéticos. En comparación con esto, el aumento de la expresión era significativamente menor en ratones SV129 y PKC- $\alpha^{-/-}$ diabéticos ($p < 0,001$). Los resultados se muestran en las Figuras 2 y 3.

Ejemplo 4

5 Determinación de la expresión de perlecan

10 Como la diferencia establecida en la expresión de VEGF no pudo explicar por sí sola la diferencia en la albuminuria, se investigó la expresión del proteoglicano de sulfato de heparano perlecan en los riñones de animales diabéticos y no diabéticos usando procedimientos inmunohistoquímicos. A este respecto, se prepararon rebanadas criogénicas de los riñones y se incorporaron como se ha descrito en el Ejemplo 3.

15 Como anticuerpo primario se usó un anticuerpo de rata monoclonal que estaba dirigido contra perlecan de ratón (RDI Systems, A7L6). Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo “anti-rata de mono” marcado con Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, 712-165-153). La investigación inmunohistoquímica de las rebanadas dio el resultado completamente sorprendentemente que el perlecan ya no pudo detectarse o apenas en animales de control diabéticos (véase la Figura 4). Entonces, el perlecan no pudo detectarse ni en el glomérulo ni en la pared vascular de arteriolas. Por el contrario, la expresión de perlecan en ratones PKC- $\alpha^{-/-}$ diabéticos fue invariable o sólo se redujo insignificadamente. Como la falta de sulfato de heparano se considera uno de los mediadores principales para la aparición de una proteinuria, se puede concluir de ello que este hallazgo puede explicar la ausencia de albuminuria.

REIVINDICACIONES

1.- Uso de inhibidores de la actividad de la proteincinasa C- α (PKC- α) para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de retinopatía diabética, neuropatía diabética y nefropatía diabética.

5

2.- Uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la actividad de la proteincinasa C- α es un anticuerpo que reacciona con la proteincinasa C- α , especialmente un anticuerpo monoclonal o policlonal, como un anticuerpo humanizado, o en el que el inhibidor cambia el estado de fosforilación de la proteincinasa C- α .

3.- Uso según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el inhibidor de la actividad de la proteincinasa C- α es al mismo tiempo un inhibidor de la actividad de la proteincinasa C- β .

10

4.- Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el inhibidor de la actividad de la proteincinasa C- α se utiliza en combinación con un inhibidor de la actividad de la proteincinasa C- β .

5.- Uso según la reivindicación 4, en el que el inhibidor es un anticuerpo que reacciona con la proteincinasa C- β , especialmente un anticuerpo monoclonal o policlonal, preferiblemente un anticuerpo humanizado.

15

6.- Uso según la reivindicación 5, en el que el inhibidor cambia el estado de fosforilación de la teincinasa C- β .

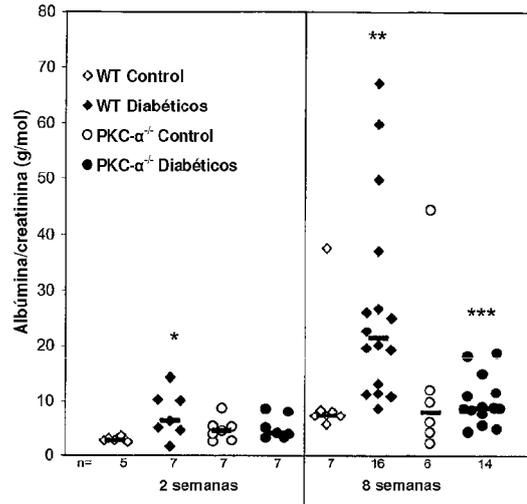
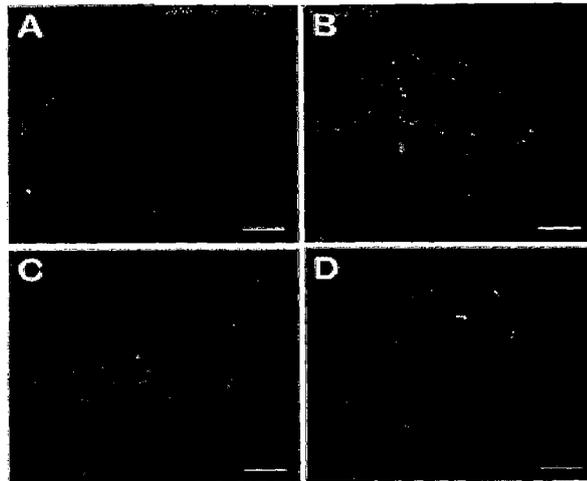


Figura 1: Albuminuria, después de 2 y 8 semanas de hiperglucemia. El valor de la mediana está marcado como raya.
 *, p<0,05 frente al control; **, p<0,01 frente al control; ***, p<0,01 frente a SV129 diabéticos



E

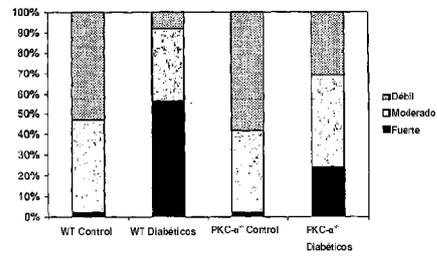
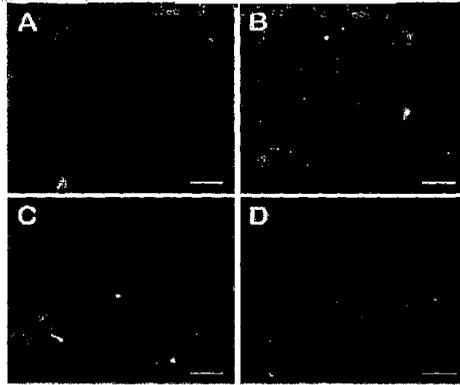


Figura 2: Evaluación inmunohistoquímica representativa de la expresión de VEGF en ratones de control (A, B) y PKC- $\alpha^{-/-}$ (C, D) con valoración semicuantitativa (E).



E

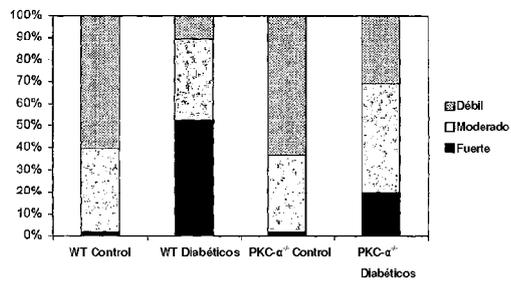


Figura 3: Evaluación inmunohistoquímica representativa de la expresión de VEGF-R II en ratones de control (A, B) y PKC- $\alpha^{-/-}$ (C, D) con valoración semicuantitativa.

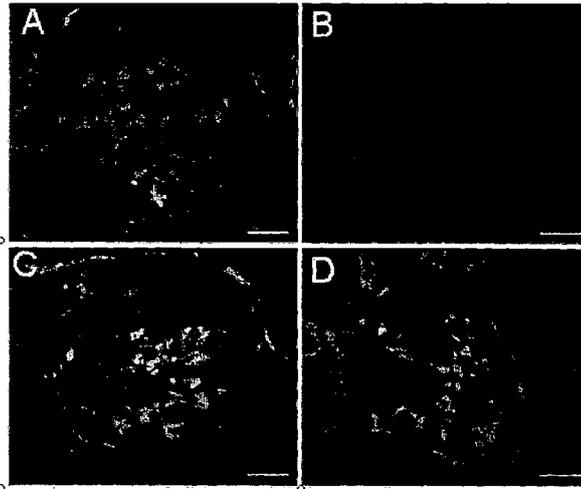


Figura 4:
La investigación inmunohistoquímica de las rebanadas dio como resultado que el proteoglicano de sulfato de heparano ya no podía detectarse o apenas en animales de control diabéticos (B), pero se formó en concentración normal en ratones PKC- $\alpha^{-/-}$ diabéticos (D).