

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 919**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05791454 .1**
96 Fecha de presentación: **26.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1819354**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **MÉTODOS Y COMPUESTOS PARA TRATAR LA DIABETES.**

30 Prioridad:
26.08.2004 US 604792 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2011

73 Titular/es:
BIOCRINE AB
JOHN ERIKSSONGATAN 9
112 22 STOCKHOLM, SE

72 Inventor/es:
BERGGREN, Per, Olof y
BERGGREN, Lisa-Juntti

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 369 919 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

Métodos y compuestos para tratar la diabetes

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con métodos y productos destinados a tratar la diabetes mellitus y con métodos para identificar compuestos que puedan servir para tratar dicha dolencia.

Antecedentes de la invención

10 La transtiretina (TTR) es una proteína tetramérica de subunidades idénticas de 14 kDa, que se sintetiza sobre todo en el hígado y en el plexo coroideo del cerebro (1). Se trata de una proteína de transporte de la tiroxina y, en asociación con la proteína enlazante del retinol, de dicho retinol. La TTR presenta un equilibrio complejo entre diferentes estructuras cuaternarias en suero (2), aunque existe principalmente como tetrámero en concentraciones de 160-380 mg/l, con sólo una pequeña cantidad de monómero de TTR en vivo en individuos normales (3, 4). En la diabetes de tipo 1 (DT1) existe una destrucción específica de la célula β pancreática secretora de insulina. Aunque los mecanismos moleculares exactos que están detrás de la destrucción de la célula β no son conocidos, se ha demostrado que el suero de nuevos pacientes diagnosticados de DT1 aumenta la actividad de los canales de Ca^{2+} de tipo L dependientes del voltaje en células β (8). Esto desemboca en aumentos no fisiológicos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el momento de la despolarización y, por ende, en la apoptosis de la célula β , efectos que pueden evitarse mediante bloqueadores del canal de Ca^{2+} . Así, la apoptosis inducida por Ca^{2+} puede estar implicada en la compleja reacción autoinmune asociada a la DT1. La cuestión básica ha sido determinar qué factor del suero de pacientes con DT1 es responsable de los cambios no fisiológicos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Recientemente, hemos identificado uno de estos factores: la apolipoproteína CIII (apoCIII) (9). La apoCIII aparece en mayor concentración en suero de pacientes con DT1, y provoca tanto un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como la muerte de la célula β . Los efectos del suero de pacientes con DT1 y de la apoCIII sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la apoptosis de la célula β se suprimen en presencia de un anticuerpo contra la apoCIII. A la hora de considerar el desarrollo de la DT1, es importante señalar que los niveles de proinsulina pueden aparecer elevados en hermanos de pacientes con DT1, independientemente de la identidad HLA (10). Esto puede reflejar un deterioro de la función de la célula β antes de la aparición de la DT1. También cabe destacar que la concentración en suero del tetrámero de TTR es menor en niños con DT1 (11-13).

30 En el presente documento se demuestra que el tetrámero de TTR no sólo constituye un componente funcional en el acoplamiento estímulo-secreción en la célula β pancreática normal, sino que también ayuda a conservar la integridad de dicha célula β . También demostramos que la concentración de TTR total disminuye en la DT1, mientras que la concentración de la estructura monomérica aumenta. Una observación importante fue que el monómero no constituye ni un componente funcional en el acoplamiento estímulo-secreción en la célula β pancreática normal, ni tampoco conserva la integridad de la célula β . Por este motivo, es posible que la conversión de la estructura tetramérica de la TTR a la forma monomérica pueda ser uno de los primeros e importantes pasos asociados con el desarrollo de los fallos / la destrucción de la célula β en la DT1.

35 Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona tetrámeros de TTR para su uso en el tratamiento o en la prevención de la diabetes de tipo I en un paciente diabético de tipo I o en un paciente con riesgo de desarrollar la diabetes de tipo I.

40 En otra modalidad, el tetrámero de TTR aislado se suministra en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto adicional, la presente invención ofrece métodos para identificar compuestos de cara al tratamiento o la prevención de la diabetes de tipo I, que comprenden poner en contacto las células β pancreáticas con uno o más compuestos de prueba e identificar aquellos compuestos que limitan la reducción de tetrámeros de TTR en las células β pancreáticas en comparación con la muestra de control, en los que dichos compuestos son candidatos para el tratamiento o la prevención de la diabetes de tipo I. En una modalidad adicional, el método consta, además, de la preparación de los compuestos que se han identificado como elementos que evitan o limitan la reducción de tetrámeros de TTR.

En otro aspecto, la presente invención ofrece métodos para predecir el riesgo de fallo de la célula β pancreática en un paciente, que constan de la determinación de uno o más de los siguientes elementos en las células beta pancreáticas:

50 (a) una cantidad de transtiretina monomérica relativa a las células β pancreáticas testigo; y/o

(a) una cantidad de transtiretina tetramérica relativa a las células β pancreáticas testigo;

donde las mediciones efectuadas en (a) y (b) se utilizan para determinar el riesgo de fallo de la célula β pancreática.

En otro aspecto, la presente invención ofrece métodos para predecir el riesgo de padecer diabetes de tipo I en un paciente, que constan de la determinación de uno o más de los siguientes elementos en las células beta pancreáticas de dicho paciente:

- 5 (a) una cantidad de transtiretina monomérica relativa a las células β pancreáticas testigo; y/o

(a) una cantidad de transtiretina tetramérica relativa a las células β pancreáticas testigo;

donde las mediciones efectuadas en (a) y (b) se utilizan para determinar el riesgo de padecer diabetes de tipo I en el paciente.

Breve descripción de las figuras

- 10 Figura 1. Efectos sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y las corrientes de Ca^{2+} dependientes del voltaje.

A, C: Células incubadas con TTR total. **B, D:** Células incubadas con el monómero. En **A** y **B**, el aumento en $[Ca^{2+}]_i$ se muestra cuando las células son estimuladas con glucosa (**A**, n=48, 98 y 64, respectivamente para células de control, y 46, 113 y 82 para células tratadas con TTR. **B**, n=50, 50 y 56, respectivamente para células de control, y 73, 47 y 74, respectivamente para las células tratadas con monómero de TTR). En **C** y **D**, el aumento delta en $[Ca^{2+}]_i$ se muestra cuando las células son despolarizadas con KCl (**C**, n=48, 97 y 71, respectivamente para células de control, y 44, 111 y 90 para células tratadas con TTR. **D**, n=83, 83 y 65, respectivamente para células de control, y 83, 60 y 83 respectivamente para las células tratadas con monómero de TTR). **E**, ejemplos detrazos de corriente de Ca^{2+} en célula completa, generados por un impulso de voltaje de despolarización (100 ms) hasta -20 mV desde un potencial basal de -70 mV, a partir de una célula de control (trazo superior) y una célula incubada con TTR (trazo inferior). **F**, relaciones corriente-voltaje de Ca^{2+} de célula completa en células β pancreáticas en presencia y en ausencia de TTR. Las células β tratadas con TTR (n=45) muestran corrientes de Ca^{2+} mayores que las células de control (n=50) cuando son despolarizadas hasta -20 mV. (**p<0,01, ***p<0,001).

Figura 2. Efectos de la TTR total sobre la secreción de insulina.

25 La liberación de insulina fue medida en células β previamente incubadas con **A**, TTR a 50 mg/l (n=5); **B**, a 100 mg/l (n=3), y **C**, a 150 mg/l (n=5). **D**, trazo representativo (n=3) de liberación de insulina en islotes humanos expuestos a TTR a 150 mg/l. Liberación de insulina de **A-C** expresada como AUC (área bajo la curva) en **E**, secreción basal, y en **F**; secreción estimulada por glucosa (*p<0,05, **p<0,01).

Figura 3. Perfil de la TTR en SDS-PAGE.

30 TTR comercial sometida a HPLC, con una columna Vydac C18, acetonitrilo (ACN) en 0,1% de TFA; gradiente de 20-60% en 30 minutos; las fracciones 1, 2 y 3 y se recogieron y se sometieron a SDS-PAGE; STD hace referencia a la TTR comercial antes de la HPLC.

Figura 4. SDS-PAGE de suero de adultos y niños con DT1 y de testigos sanos, y efecto de la TTR total y del monómero de TTR \pm apoCIII en la muerte celular.

35 **A.** Cinco sueros DT1 (D) de adultos y un suero de control (C). **B.** Suero de dos DT1 (D) y dos sueros de control (C). La banda de la forma monomérica de la TTR está marcada con una flecha. Tanto en **A** como en **B** se incluyeron calces con TTR comercial y con un marcador de rango amplio (M). Análisis por FACS de células β pancreáticas expuestas a **C**. TTR total o Δ monómero de TTR. TTR +/- (apoCIII o apoCIII solo [n=5]). La muerte celular se expresa como el porcentaje de 10.000 células contadas.

Descripción detallada de la invención

40 En el marco de esta solicitud, a menos que se especifique lo contrario, las técnicas utilizadas pueden encontrarse en cualquiera de las diversas referencias bien conocidas, como por ejemplo: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology* (Methods in Enzymology, vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" en *Methods in Enzymology* (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); *A Manual of Basic Technique*, 2ª Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. Nueva York, NY), *Gene Transfer and Expression Protocols*, págs. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, NJ.), y el catálogo de Ambion de 1998 (Ambion, Austin, TX).

En un aspecto, la presente invención ofrece métodos para tratar o prevenir la diabetes de tipo I, que constan de la administración de una cantidad eficaz del tetrámero de transtiretina («TTR») para tratar o prevenir la diabetes de tipo I en un paciente con diabetes de tipo I o en un paciente con riesgo de desarrollar la diabetes de tipo I.

5 Tal y como se publica en este documento, el tetrámero de TTR no sólo constituye un componente funcional en el acoplamiento estímulo-secreción en la célula β pancreática normal, sino que también ayuda a conservar la integridad de dicha célula β . También publicamos que la concentración de TTR total disminuye en la diabetes de tipo I (DT1), mientras que la concentración de la estructura monomérica aumenta. Una observación importante fue el hecho de que el monómero no constituye ni un componente funcional en el acoplamiento estímulo-secreción en la célula β pancreática normal, ni tampoco conserva la integridad de la célula β . Por este motivo, es posible que la
10 conversión de la estructura tetramérica de la TTR a la forma monomérica pueda ser uno de los primeros e importantes pasos asociados con el desarrollo de los fallos / la destrucción de la célula β en la DT1.

Tal y como se utiliza aquí, «transtiretina» hace referencia a cualquier proteína transtiretina conocida de un mamífero, incluyendo, a título enunciativo, una proteína que conste de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de registro NCBI NP000362 (humano), el número de registro NCBI NP036813 (rata) o el número de registro NCBI NP038725 (ratón). Tal y como se utiliza aquí, «tetrámero de TTR» consta de 4 subunidades idénticas de las
15 secuencias de TTR publicadas más arriba.

El tetrámero de TTR humano es el preferido para todos los usos terapéuticos que se mencionan aquí. De cara al uso en los métodos terapéuticos de la invención, no es necesario que el tetrámero de TTR se purifique separado de los monómeros de TTR o de otras sustancias, siempre y cuando el tetrámero de TTR sea la forma predominante de la
20 TTR (es decir: más del 50%). En las modalidades preferidas para el uso terapéutico, el tetrámero de TTR consta del 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de la TTR utilizada.

Tal y como se utiliza aquí, una «cantidad eficaz» del tetrámero de TTR es una cantidad que resulte suficiente para tratar o prevenir la diabetes de tipo I. Una cantidad eficaz del tetrámero de TTR que puede emplearse suele oscilar entre aprox. 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal y unos 10 mg/kg de peso corporal, y preferiblemente entre aprox. 0,05
25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal y unos 5 mg/kg de peso corporal. No obstante, los niveles de dosificación están basados en diferentes factores, como la edad, el peso, el sexo, el estado de salud de la persona, la gravedad del trastorno, la vía de administración y el compuesto concreto empleado. Así pues, el régimen de dosificación puede variar notablemente, aunque puede ser fácilmente determinado por un médico mediante el uso de métodos estándar.

Tal y como se utiliza aquí, «tratar o prevenir la diabetes de tipo I» incluye cualquier promoción de la salud de la célula β pancreática, a través de cualquier mecanismo, donde los tetrámeros de TTR (a) fomenten un aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) inducido por la glucosa en el paciente diabético (tratamiento) o en el paciente en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 1 (prevención); (b) fomenten un incremento en la liberación de insulina a partir de las células β pancreáticas inducido por glucosa en el paciente diabético (tratamiento) o en el
30 paciente en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 1 (prevención); y/o (c) prevenir o limitar la apoptosis de la célula β pancreática. Tal y como se utiliza aquí, «prevenir» significa ralentizar o suprimir la progresión hacia la diabetes de tipo I en un paciente en riesgo de sufrir diabetes de tipo I. Sin ceñirse a ningún mecanismo específico, los inventores creen que el tetrámero de TTR funciona a través de un efecto directo sobre el canal de Ca^{2+} de tipo L dependiente del voltaje de la célula β pancreática, y también protegiendo frente a la apoptosis de la célula β , limitando así la aparición de fallos y la destrucción de dicha célula β en pacientes con DT1 o en aquellos en riesgo de desarrollar
40 DT1, así como optimizando la secreción adecuada de insulina de las células β pancreáticas restantes en pacientes con diabetes de tipo I. Entre los pacientes en riesgo de desarrollar diabetes de tipo I se incluyen, a título enunciativo, aquellos con predisposición genética a padecer diabetes de tipo I.

Los polipéptidos de TTR que van a utilizarse en los métodos de la invención pueden derivarse aún más para ofrecer una semivida más prolongada, por ejemplo, mediante su unión a polietileno a otros compuestos de este tipo, en la
45 medida en que dicha derivación no interfiera con la formación del tetrámero de TTR. Los polipéptidos de la invención pueden constar de aminoácidos L, aminoácidos D (que son resistentes a las proteasas específicas de aminoácidos L en vivo), una combinación de aminoácidos D y L, y diversos aminoácidos «de diseño» (p. ej., β -metil-aminoácidos, α -metil-aminoácidos y $\text{N}\alpha$ -metil-aminoácidos) para transmitir propiedades especiales. Entre los aminoácidos sintéticos se incluyen la ornitina para sustituir a la lisina, y la norleucina para sustituir a la leucina o a la isoleucina.

Además, los polipéptidos pueden tener enlaces peptidomiméticos, como enlaces éster, para dotar a los polipéptidos de nuevas propiedades: por ejemplo, puede generarse un péptido que incorpore un enlace peptídico reducido, es decir, R1-CH₂-NH-R2, donde R1 y R2 son residuos o secuencias de aminoácidos. Puede introducirse un enlace peptídico reducido como una subunidad dipeptídica; estos polipéptidos son resistentes a la actividad de las proteasas, y poseen una mayor semivida en vivo.
50

Los polipéptidos de TTR pueden sintetizarse químicamente o expresarse de forma recombinante. La expresión recombinante puede lograrse mediante métodos estándar en la técnica, que generalmente implican la clonación de
55

secuencias de ácidos nucleicos capaces de dirigir la expresión de los polipéptidos en un vector de expresión, que puede emplearse para transfectar o transducir una célula huésped para así suministrar la maquinaria celular necesaria para llevar a cabo la expresión de los polipéptidos y la formación del tetrámero. Estos vectores de expresión pueden constar de vectores de expresión bacterianos o virales, y las mencionadas células huésped pueden ser procarióticas o eucarióticas, preferiblemente células huésped eucarióticas, en las que puede tener lugar la formación del tetrámero.

En una alternativa, los polipéptidos destinados a utilizarse en los métodos de la presente invención se sintetizan químicamente. Los polipéptidos sintéticos, que se elaboran mediante las bien conocidas técnicas de fase sólida, fase líquida o condensación de péptidos, o cualquier combinación de éstas, pueden incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos utilizados para la síntesis de péptidos pueden ser la resina de aminoácido Boc habitual (N α -t-butiloxycarbonil protegida con N α -amino) con los protocolos de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado habituales del procedimiento estándar correspondiente a la fase sólida, o bien aminoácidos 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) protegidos con N α -amino hidrolizables en condiciones alcalinas. Tanto los aminoácidos Fmoc y Boc protegidos con N α -amino pueden obtenerse a través de Sigma, Cambridge Research Biochemical, o bien a través de otras empresas químicas conocidas para los expertos en la materia. Además, los polipéptidos pueden sintetizarse con otros grupos protectores de N α conocidos por los expertos en la materia.

En otra alternativa, la TTR puede purificarse como una combinación de tetrámero y monómero a partir de fuentes naturales (como el plasma humano), seguido del aislamiento del tetrámero de TTR separado del monómero. En otra alternativa, la TTR está disponible en el mercado como una combinación de formas monoméricas y tetraméricas (por ejemplo, a través de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.). La TTR tetramérica puede purificarse a partir de estas fuentes disponibles en el mercado mediante el uso de técnicas estándar, entre las que se incluye, a título enunciativo, la HPLC en fase inversa tal y como se describe más abajo (descrita en el aislamiento de la TTR monomérica).

El tetrámero de TTR puede someterse a operaciones farmacéuticas convencionales, como esterilización, y/o puede contener adyuvantes convencionales, como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, amortiguadores, etc.

Para su administración, el tetrámero de TTR suele combinarse con uno o más adyuvantes, adecuados para la ruta de administración indicada. El tetrámero de TTR puede estar mezclado con lactosa, sacarosa, almidón en polvo, ésteres de celulosa y ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sodio y sales cálcicas de ácido fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato sódico, polivinilpirrolidina, sulfato de dextrano, geles que contienen heparina y/o alcohol de polivinilo, en forma de comprimidos o cápsulas para su administración convencional. Como alternativa, el tetrámero de TTR puede disolverse en un medio salino, agua, polietilenglicol, propilenglicol, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma tragacanto y/o diversos amortiguadores. Otros adyuvantes y modos de administración son bien conocidos en el sector farmacéutico. El vehículo o diluyente puede incluir material de retardo temporal, como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo de forma independiente o con una cera, o bien con otros materiales bien conocidos en la técnica.

El tetrámero de TTR puede administrarse a través de cualquier vía adecuada, ya sea oral, parental, por pulverizador para inhalación, por vía rectal o tópica, en formulaciones de unidades de dosis que contengan vehículos, adyuvantes y transportadores convencionales y farmacéuticamente aceptables. El término parenteral, tal y como se utiliza aquí, incluye las vías subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraesternal, intratendinosa, intraespinal, intracraneal, intratorácica, técnicas de infusión o vía intraperitoneal. Las modalidades preferidas para la administración varían en función del trastorno que se estén tratando.

Los tetrámeros de TTR aislados pueden prepararse y purificarse tal y como se detalla en este documento, donde el tetrámero de TTR está básicamente libre de cualquier monómero de TTR o de otra proteína de unión del tetrámero de TTR. Tal y como se utiliza aquí, el término «sustancialmente libre» significa que los tetrámeros de TTR aislados contienen menos del 2%, y más preferiblemente menos del 1,5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005% o 0,0001% de monómero de TTR o de otra proteína de unión del tetrámero de TTR, según lo determinado a través de métodos estándar en la materia, incluyendo, a título enunciativo, el método SDS-PAGE y el de HPLC de fase inversa. El tetrámero de TTR que no contiene cantidades detectables del monómero puede elaborarse y purificarse tal y como se comenta aquí.

Los tetrámeros de TTR aislados sustancialmente libres de agentes y empleados para separar los componentes de las proteínas, como poliacrilamida, agarosa y polímeros/resinas utilizados para separar los componentes de la proteína de forma cromatográfica, pueden elaborarse y purificarse tal y como se detalla aquí. Los métodos para elaborar el tetrámero de TTR son tal y como se describe más arriba.

El tetrámero de TTR aislado puede suministrarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable, como aquellos que se detallan anteriormente. Dichas composiciones farmacéuticas son las preferidas para los usos terapéuticos del tetrámero.

5 En un aspecto adicional, la presente invención ofrece métodos para identificar compuestos de cara al tratamiento o la prevención de la diabetes de tipo I, que comprenden el contacto de las células β pancreáticas con uno o más compuestos de prueba y la identificación de aquellos compuestos que limitan la reducción de tetrámeros de TTR en las células β pancreáticas en comparación con la muestra de control, en los que dichos compuestos son candidatos para el tratamiento o la prevención de la diabetes de tipo I.

10 Tal y como se emplea aquí, las «células β pancreáticas» son cualquier población de células que contenga células de los islotes β pancreáticos. Las células pueden obtenerse a partir de cualquier especie de mamífero, o pueden estar presentes en las especies de dichos mamíferos cuando los ensayos se lleven a cabo en vivo. Estas poblaciones de células de los islotes β pancreáticos incluyen el páncreas, islotes pancreáticos aislados de Langerhans («islotes pancreáticos»), células de los islotes β pancreáticos aislados y líneas celulares secretoras de insulina. Los métodos de aislamiento pancreático son bien conocidos en la técnica, y los métodos para aislar islotes pancreáticos pueden encontrarse, por ejemplo, en Cejvan et al., Diabetes 52:1176-1181 (2003); Zambre et al., Biochem. Pharmacol. 15 57:1159-1164 (1999), y Fagan et al., Surgery 124:254-259 (1998), así como en referencias citadas en ellos. Las líneas celulares secretoras de insulina están disponibles a través de la American Tissue Culture Collection («ATCC») (Rockville, Md.). En una modalidad adicional en la que se utilizan células β pancreáticas, se obtienen a partir de ratones ob/ob, que cuentan con más del 95% de células β en sus islotes, y están disponibles en el mercado.

20 En una modalidad preferida, las células β pancreáticas se obtienen de un paciente con DT1, o bien a través de un modelo animal de la DT1, y la cantidad de tetrámero de TTR, monómero de TTR y/o proporción de éstos se compara en las células β pancreáticas en contacto con los compuestos de prueba y en las células β pancreáticas que no han entrado en contacto con el compuesto o compuestos de prueba. El contacto de las células β pancreáticas con el compuesto o compuestos de prueba puede ser in vitro, en vivo o ex vivo. Entre los compuestos de prueba que puede utilizarse se incluyen, a título enunciativo, polipéptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos o 25 compuestos orgánicos, compuestos que pueden elaborarse utilizando métodos estándar de la técnica.

Tal y como se utiliza aquí, «limitar/limitando la reducción de tetrámeros de TTR» hace referencia a cualquier mecanismo mediante el cual se limite dicha reducción, entre los que se incluyen, a título enunciativo, la promoción de la formación de tetrámeros y la estabilización de tetrámeros de TTR para reducir su conversión a TTR 30 monomérica. En una modalidad preferida, el límite en la reducción de tetrámeros de TTR en comparación con las muestras de control es estadísticamente significativo. Cualquier límite en la reducción de tetrámeros de TTR en comparación con el control puede aportar un beneficio. En varias modalidades, la cantidad de tetrámeros en las células tratadas con compuesto de prueba en comparación con el control diabético es, al menos, del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o 100% superior.

35 Los métodos para determinar la cantidad de tetrámeros y/o monómeros de TTR, o bien su proporción, puede ser cualquiera de los empleados en la técnica para efectuar esas mediciones, incluyendo, a título enunciativo, el método SDS-PAGE y la HPLC de fase inversa, como se indica más adelante.

El método, además, puede incluir la preparación de los compuestos identificados como limitadores de la reducción de los tetrámeros de TTR mediante el uso de métodos estándar en la técnica.

40 Además, los métodos pueden incluir la administración de uno o más compuestos a un paciente con diabetes de tipo I o a un paciente en riesgo de sufrir diabetes de tipo I para limitar la reducción de tetrámeros de TTR. Esta «limitación» incluye cualquier mecanismo mediante el cual se limite dicha reducción, incluyendo, a título enunciativo, la promoción de la formación de tetrámeros y la estabilización de tetrámeros de TTR para reducir su conversión a TTR monomérica. Estos inhibidores pueden identificarse utilizando los métodos descritos anteriormente.

45 En otro aspecto, la presente invención ofrece métodos para predecir el riesgo de fallo de la célula β pancreática en un paciente, que constan de la determinación de uno o más de los siguientes elementos en las células beta pancreáticas:

(a) una cantidad de transtiretina monomérica relativa a las células β pancreáticas testigo; y/o

(a) una cantidad de transtiretina tetramérica relativa a las células β pancreáticas testigo;

50 donde las mediciones efectuadas en (a) y (b) se utilizan para determinar un riesgo de fallo de la célula β pancreática.

Tal y como se menciona más abajo, la concentración de TTR tetramérica disminuye en la DT1, mientras que la concentración de la estructura monomérica aumenta. Los datos que figuran más abajo también indican que la conversión de la estructura tetramérica de la TTR a la forma monomérica puede ser uno de los primeros e importantes pasos asociados con el desarrollo de los fallos / la destrucción de la célula β en la DT1. Así pues, pueden utilizarse métodos para comparar la cantidad de TTR tetramérica y monomérica con respecto a las células beta pancreáticas testigo (es decir: testigos conocidos con DT1 o células beta pancreáticas normales conocidas), con el fin de predecir el riesgo de fallo de las células beta pancreáticas; estos métodos pueden emplearse, por ejemplo, para predecir el riesgo de que un paciente desarrolle DT1. De esta forma, en los casos en los que la muestra de control está compuesta de células β pancreáticas de un paciente con DT1 conocido, una cantidad de TTR monomérica y/o TTR tetramérica similar a la del control con DT1 indica un riesgo de fallo de la célula β pancreática en el paciente, mientras que una cantidad de TTR monomérica inferior y/o una cantidad de TTR tetramérica superior con respecto a la del control DT1 indican un menor riesgo de fallo de la célula β pancreática. En una modalidad preferida, las diferencias o similitudes entre las células de prueba y las de control en relación con los niveles de TTR son estadísticamente significativas. En un ejemplo, se efectuaría un pronóstico de riesgo de fallo de la célula β pancreática en los casos en los que la cantidad del tetrámero en la célula beta pancreática en relación con el control normal fuese, al menos, del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o 100% inferior.

En otro aspecto, la presente invención ofrece métodos para predecir el riesgo de padecer diabetes de tipo I en un paciente, que constan de la determinación de uno o más de los siguientes elementos en las células beta pancreáticas de dicho paciente:

(a) una cantidad de transtiretina monomérica relativa a las células β pancreáticas testigo; y/o

(a) una cantidad de transtiretina tetramérica relativa a las células β pancreáticas testigo;

donde las mediciones efectuadas en (a) y (b) se utilizan para determinar el riesgo de padecer diabetes de tipo I en el paciente.

Tal y como se menciona más abajo, la concentración de TTR tetramérica disminuye en la DT1, mientras que la concentración de la estructura monomérica aumenta. Los datos que figuran más abajo también indican que la conversión de la estructura tetramérica de la TTR a la forma monomérica puede ser uno de los primeros e importantes pasos asociados con el desarrollo de los fallos / la destrucción de la célula β en la DT1. Así pues, pueden utilizarse métodos para comparar la cantidad de TTR tetramérica y monomérica con respecto a los controles de células beta pancreáticas (es decir: controles DT1 conocidos o células beta pancreáticas normales conocidas) de cara a predecir el riesgo de que un paciente desarrolle DT1. De esta forma, en los casos en los que la muestra de control está compuesta de células β pancreáticas de un paciente con DT1 conocido, una cantidad de TTR monomérica y/o TTR tetramérica similar a la del control con DT1 indica un riesgo de que el paciente desarrolle DT1, mientras que una cantidad de TTR monomérica inferior y/o una cantidad de TTR tetramérica mayor que la del control con DT1 indican un menor riesgo de que el paciente pueda desarrollar DT1. En una modalidad preferida, las diferencias o similitudes entre las células de prueba y las de control en relación con los niveles de TTR son estadísticamente significativas. En un ejemplo, se efectuaría un pronóstico de riesgo de padecer DT1 en los casos en los que la cantidad del tetrámero en la célula beta pancreática en relación con el control normal fuese, al menos, del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o 100% inferior.

Este método de pronóstico es especialmente útil para aquellos pacientes en riesgo de desarrollar DT1, como aquellos con predisposición genética a padecer DT1.

En cada uno de estos aspectos de pronóstico, la definición y las posibles fuentes de células β pancreáticas se ajustan a lo dispuesto anteriormente. Los métodos para la detección y la medición de la TTR monomérica y tetramérica son tal y como se describen aquí.

Ejemplos

Más abajo, demostramos que el tetrámero de TTR no sólo constituye un componente funcional en el acoplamiento estímulo-secreción en una célula β pancreática normal, sino que también ayuda a conservar la integridad de dicha célula β . También demostramos que la concentración de TTR total disminuye en la diabetes de tipo 1 (DT1), mientras que la concentración de la estructura monomérica aumenta. Una observación importante fue que el monómero no constituye ni un componente funcional en el acoplamiento estímulo-secreción en una célula β pancreática normal, ni tampoco conserva la integridad de la célula β . Por este motivo, es posible que la conversión de la estructura tetramérica de la TTR a la forma monomérica pueda ser uno de los primeros e importantes pasos asociados con el desarrollo de los fallos / la destrucción de la célula β en la DT1.

Métodos

Identificación de TTR en suero de pacientes con DT1

Se procedió a obtener suero de pacientes con DT1 y de sujetos de control; este suero fue sometido a un procedimiento idéntico de esterilización, inactivación por calor mediante incubación a 56 °C durante 30 minutos y almacenamiento congelado a -20 °C hasta su utilización. Se analizaron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en células β cuando éstas fueron sometidas a despolarización con 25 mM de KCl. Los sueros diabéticos que provocaron un mayor aumento que los sueros de control fueron centrifugados, y el sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro estéril de 0,45 mm. Las muestras se cargaron en una columna Sep-Pak C18 previamente tratada con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Tras la aplicación de la muestra y de un lavado de 5 ml con TFA al 0,1%, las proteínas se eluyeron con acetonitrilo al 60% en TFA al 0,1%. Este procedimiento se repitió dos veces. Las dos fracciones se agruparon y el volumen se redujo por liofilización.

El material liofilizado fue sometido a SDS-PAGE, con una referencia del suero de control procedente de sujetos sanos. El gel se tiñó con plata y se procedió a comparar las bandas de los sueros diabéticos y no diabéticos; a 14 kDa, la banda mostraba una regulación ascendente en los sueros diabéticos.

Se llevaron a cabo dos pruebas de SDS-PAGE al mismo tiempo. Un gel se tiñó con azul brillante de Coomassie, y otro se transfirió a una membrana de PVDF y se tiñó levemente. A 14 kDa, la banda se cortó y se digirió en gel con tripsina. Tras la digestión, el material fue sometido a una micro HPLC. Se recogieron los fragmentos y se obtuvo una huella de masas mediante la espectrometría de masas MALDI, identificando así la TTR. Este resultado fue confirmado por el análisis del secuenciador de aminoácidos durante 15 ciclos.

Medios

El medio utilizado para el aislamiento de células β pancreáticas, así como en los experimentos, fue un amortiguador HEPES (pH 7,4) con un contenido (en mM) de 125 de NaCl, 5,9 de KCl, 1,2 de $MgCl_2$, 1,28 ó 2,56 de $CaCl_2$ y 3,0 de glucosa. La seroalbúmina bovina fue añadida con arreglo a una concentración de 1 mg/ml. El medio de cultivo RPMI 1640, complementado con un suero fetal bovino al 10%, fue utilizado para células de ratones, mientras que el medio CMRL 1066 se empleó para islotes pancreáticos humanos.

Preparación de células

Los islotes pancreáticos de ratones ob/ob fueron aislados mediante una técnica de colagenasa, y posteriormente fraccionados mecánicamente en células (14, 15). Las células se sembraron en cubreobjetos de plástico o se emplearon como suspensiones. Los islotes humanos fueron aislados y cuantificados mediante el procedimiento de Ricordi et al (16).

Mediciones de la liberación de insulina

Ratón: las células en suspensión se incubaron durante la noche, con 50, 100 ó 150 mg/l de TTR (Sigma) y 1 ó 2 μ g/ml de monómero. Las células de control fueron incubadas con el vehículo (agua) de la TTR. La dinámica de la liberación de la insulina se estudió mediante la perfusión de agregados de las células de los islotes combinados con esferas Bio-Gel P4 de poli(acrilamida) (Bio-Rad) en una columna de 0,5 ml a 37 °C (17). El caudal era de 0,2 ml/min, y se recogieron y analizaron fracciones de 2 minutos para detectar insulina mediante radioinmunoensayo, utilizando un patrón de insulina de rata (Novo Nordisk).

Humanos: los islotes se incubaron durante la noche con 150 mg/l de TTR y 2 μ g/ml de monómero o del vehículo. En estos experimentos, se utilizó una columna de 0,27 ml. El caudal era de 0,1 ml/min; se recogieron fracciones de 1 minuto y la insulina fue analizada mediante el método ELISA (Mercodia). El equipo de reactivos de cuantificación de ADN bicatenario (ADNs) PicoGreen (Molecular Probes) se utilizó para cuantificar el ADN en los islotes humanos en cada columna de perfusión. Los valores de la insulina se dividieron por el factor de rendimiento y, así, se normalizaron para tener en cuenta la viabilidad celular.

Mediciones de $[Ca^{2+}]_i$

Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ se registraron en células previamente incubadas con 50, 100 ó 150 mg/l de TTR y 1 ó 2 μ g/ml de monómero de TTR. Las células se adhirieron a los cubreobjetos, se cargaron con 2 μ M de fura-2/AM (Molecular Probes) y se colocaron en un microscopio invertido de epifluorescencia (Zeiss, Axiovert 135) conectado a un sistema Spex Fluorolog-2 para determinar la fluorimetría con dos longitudes de onda de excitación. Las emisiones de las dos longitudes de onda de excitación, de 340 y 380 nm, se utilizaron para calcular la relación de fluorescencia 340/380, que reflejan los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. Con el fin de compensar posibles variaciones en la

intensidad de la luz de los dos monocromadores, cada experimento también incluyó la medición de una relación 360/360. Los experimentos se normalizaron dividiendo todas las relaciones de fluorescencia por la relación 360/360 correspondiente.

Purificación del monómero de TTR

5 La TTR fue sometida a (RP)-HPLC (de fase inversa) con una columna Everest 238 EV 54-C₁₈ (0,46 x 25 cm). La separación se llevó a cabo utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo al 20-60% en TFA al 0,1% durante 30 minutos a 1 ml/min. Las fracciones A1, A2 y A3 se recogieron y se liofilizaron, y después se sometieron a electroforesis en gel de Novex-tricina al 10-20%. La fracción A2 mostró la estructura monomérica a una masa de 14 kDa (Fig.3).

10 Pinzamiento zonal (*patch clamp*)

Las corrientes de Ca²⁺ de célula completa se registraron en células β, incubadas durante la noche con 150 mg/l de TTR o con vehículo, utilizando la variante del parche perforado de la técnica de registro de pinzamiento zonal de célula completa. Los electrodos se llenaron con (en mM): 76 de Cs₂SO₄, 1 de MgCl₂, 10 de KCl, 10 de NaCl₅ y 5 de Hepes (pH 7,35), así como con anfotericina B (0,24 mg/ml). Las células se introdujeron en una solución que contenía
 15 (en mM): 138 de NaCl, 10 de cloruro de tetraetilamonio, 10 de CaCl₂, 5,6 de KCl, 1,2 de MgCl₂, 5 de HEPES y 3 de D-glucosa (pH 7,4). Las corrientes de célula completa provocadas por pulsos de voltaje (desde un potencial basal de -70 mV hasta varios potenciales de pinzamiento desde -60 hasta 50 mV en incrementos de 10 mV, 100 ms, 0,5 Hz) se filtraron a 1 kHz y se registraron. Todos los registros se efectuaron con un amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Foster City, California) a temperatura ambiente (unos 22 °C). La adquisición y el análisis de datos se
 20 llevaron a cabo utilizando el programa de software pCLAMP6 (Axon Instruments, Foster City, California).

Análisis de la muerte celular por citometría de flujo

Las células de ratones ob/ob se cultivaron durante 48 h en presencia de 2 μg/ml de monómero de TTR, 150 mg/l de TTR total, 40 μg/ml de apoCIII, monómero de TTR o TTR total y apoCIII o el vehículo. La población de células completas se recogió y se tiñó con yoduro de propidio (PI) (BD PharMingen) y se analizó en un sistema FACScan
 25 mediante el software de adquisición CELLQuest (Becton Dickinson, Immunocytometry System). La selección FACS, basada en la dispersión frontal y lateral, se utilizó para excluir los restos celulares y la autofluorescencia. Normalmente, se seleccionaban 10.000 células para su análisis.

Estadística

30 El método de la t de Student se utilizó para evaluar la significación estadística, y los valores de p <0,05 se consideraron significativos. Los datos se presentan como medias ± error estándar de la media.

Resultados

La transtiretina (TTR) es una proteína de transporte que existe principalmente como un tetrámero en vivo. Se determinó que la TTR fomentaba el aumento inducido por glucosa de la concentración de Ca²⁺ citoplasmático libre ([Ca²⁺]_i) y la liberación de insulina. Esto se derivó de un efecto directo sobre el canal de Ca²⁺ de tipo L dependiente
 35 del voltaje en células β pancreáticas. La TTR también protegía frente a la apoptosis de las células β. En la diabetes de tipo 1 (DT1), la concentración del tetrámero de TTR se reducía, mientras que la estructura monomérica aumentaba. El monómero no tenía efecto sobre la secreción de insulina inducida por glucosa ni sobre la apoptosis. Así pues, el tetrámero de TTR es un componente en el funcionamiento normal de la célula β pancreática. La conversión del tetrámero de TTR en monómero puede estar implicada en el la aparición de fallos/en la destrucción
 40 de la célula β en la DT1.

La transtiretina (TTR) es una proteína tetramérica de subunidades idénticas de 14 kDa, que se sintetiza sobre todo en el hígado y en el plexo coroideo del cerebro (1). Se trata de una proteína de transporte de la tiroxina y, en asociación con la proteína enlazante del retinol, de dicho retinol. La TTR presenta un equilibrio complejo entre
 45 diferentes estructuras cuaternarias en suero (2), aunque existe principalmente como tetrámero en concentraciones de 160-380 mg/l, con sólo una pequeña cantidad de monómero de TTR en vivo en individuos normales (3, 4). Cuando la concentración de TTR se mide en muestras de suero mediante métodos convencionales, el compuesto que se detecta es la estructura tetramérica. Es posible calcular la cantidad de TTR monomérica mediante SDS-PAGE, sin precocción reductora, y mediante (RP)-HPLC de fase inversa. Tal y como se refleja en la Fig. 3, el monómero se eluyó antes del tetrámero en RP-HPLC (pico 2 y pico 3, respectivamente; el pico 1 no contiene TTR).
 50 La estructura monomérica fue verificada determinando la masa total, 14 kDa, mediante espectrometría de masas MALDI, así como a través de una banda monomérica en SDS-PAGE. Una segunda fracción de HPLC (pico 3) arrojó un valor de masa de 50 kDa, y con el método SDS-PAGE mostró un monómero más otros agregados, incluyendo el tetrámero. Parece posible que la ausencia de una disociación completa del tetrámero con el método SDS-PAGE se

deba a la presencia de algunas estructuras de TTR interconectadas o modificadas químicamente de otra manera. Anteriormente se ha demostrado que la Cys-10 de la TTR es sensible a la modificación (2), por lo que procedimos a comprobar tanto las fracciones del monómero como las del tetrámero procedentes de la HPLC mediante degradación por secuenciador; no obstante, estas fracciones arrojaron resultados idénticos en 15 ciclos para ambos casos, lo que indica que no es probable que la Cys-10 esté implicada en la estabilidad diferencial del tetrámero que ahora se observa.

Hemos medido cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático libre $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células β previamente tratadas con TTR comercial, que presenta las estructuras monomérica y tetramérica, y estimuladas con glucosa y KCl. La TTR a una concentración de 100 y 150 mg/l provocó un aumento pronunciado en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, después de la estimulación con glucosa y KCl (Fig. 1 A, C), en comparación con el control, mientras que 50 mg/l no provocaron efecto alguno. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal no se vio afectada. A una concentración de 200 mg/l, la TTR suprimió los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocados tanto por la glucosa como por el KCl (datos no mostrados). En un intento de dilucidar el mecanismo celular subyacente bajo el incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se analizó la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células incubadas con 150 mg/l de TTR (Fig. 1 E, F). Las corrientes de Ca^{2+} registradas en las células tratadas con TTR, despolarizadas hasta -20 mV, experimentaron un aumento significativo en comparación con las de las células de control (Fig. 1 E, F). Estos datos respaldan la hipótesis de que la TTR actúa sobre los canales de Ca^{2+} ya que el efecto tiene lugar en el intervalo de despolarizaciones fisiológicas (5), y se sabe que las células β de ratones contienen exclusivamente canales de Ca^{2+} de tipo L (6). El acoplamiento estímulo-secreción en la célula β pancreática es un proceso complejo, en el que los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sirven como regulador fundamental de la secreción de insulina. Para aclarar hasta qué punto los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por TTR sucedían en paralelo a los cambios en la liberación de insulina, se procedió a incubar células β de ratón durante la noche con TTR comercial; posteriormente, estas células fueron estimuladas con glucosa y KCl (Fig. A-C) en un sistema de perfusión. No hubo diferencia en la secreción de insulina, evaluada como área bajo la curva (AUC), en células expuestas a 50 mg/l de TTR; en el caso de 100 mg/l se generó un aumento en la liberación de insulina estimulada por glucosa ($p < 0,05$), mientras que en el caso de 150 mg/l se produjo un aumento en la liberación de insulina tanto basal ($p < 0,05$) como estimulada por glucosa ($p < 0,05$) (Fig. 2 E, F). Ninguna de estas concentraciones de TTR tuvo influencia sobre la liberación de insulina estimulada por KCl. También hemos estudiado la liberación de insulina a partir de los islotes humanos de tres sujetos sanos (donantes para el trasplante de islotes) incubados con 150 mg/l de TTR, y los resultados obtenidos estaban en consonancia con aquellos obtenidos a partir de las células β de ratones (Fig. 2D). En conformidad con los efectos sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 200 mg/l de TTR suprimieron la liberación de insulina inducida por glucosa y por KCl (datos no mostrados). Aunque no tenemos ninguna explicación que esclarezca por qué 200 mg/l de TTR afectan drásticamente al funcionamiento de la célula β , la exposición a concentraciones elevadas de una proteína de transporte, como la TTR, durante períodos prolongados y en condiciones in vitro puede derivar en una interferencia no específica con la función celular. Por el momento, no está claro hasta qué punto una concentración estimada in vivo puede traducirse directamente y utilizarse en un sistema in vitro. Nuestros datos apuntan a que la realidad es que esa traducción no debe ser tan sencilla.

En la diabetes de tipo 1 (DT1) existe una destrucción específica de la célula β pancreática secretora de insulina. Aunque los mecanismos moleculares exactos que están detrás de la destrucción de la célula β no son conocidos, se ha demostrado que el suero de nuevos pacientes diagnosticados de DT1 aumenta la actividad de los canales de Ca^{2+} de tipo L dependientes del voltaje en células β (8). Esto desemboca en aumentos no fisiológicos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el momento de la despolarización y, por ende, en la apoptosis de la célula β , efectos que pueden evitarse mediante bloqueadores del canal de Ca^{2+} . Así, la apoptosis inducida por Ca^{2+} puede estar implicada en la compleja reacción autoinmune asociada a la DT1. La cuestión básica ha sido determinar qué factor del suero de la DT1 es responsable de los cambios no fisiológicos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Recientemente, hemos identificado este factor, denominado apolipoproteína CIII (apoCIII) (P). La apoCIII aparece en mayor concentración en suero de pacientes con DT1, y provoca tanto un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como la muerte de la célula β . Los efectos del suero de pacientes con DT1 y de la apoCIII sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la apoptosis de la célula β se suprimen en presencia de un anticuerpo contra la apoCIII. A la hora de considerar el desarrollo de la DT1, es importante señalar que los niveles de proinsulina pueden aparecer elevados en hermanos de pacientes con DT1, independientemente de la identidad HLA (10). Esto puede reflejar un deterioro de la función de la célula β antes de la aparición de la DT1.

Cabe destacar que la concentración en suero del tetrámero de TTR es menor en niños con DT1 (11-13). Debido a una cantidad limitada de suero, sólo pudimos medir la concentración de TTR, con nefelometría cinética, en nueve sueros positivos, tres negativos y diez de control (tabla 1). Los niveles fueron 116 ± 11 mg/l en sueros diabéticos y 220 ± 18 mg/l en sueros de control ($p < 0,001$). De los tres sueros diabéticos negativos (n.º 10-12, tabla 1), uno presentaba un nivel de TTR comparable con el suero de control (196 mg/l), mientras que los otros dos se encontraban en el mismo intervalo inferior que los sueros diabéticos positivos. Conociendo la posibilidad de calcular la cantidad de monómero, procedimos a analizar sueros DT1 y de control para determinar patrones de SDS-PAGE.

Tabla 1 Concentración de TTR en sueros de pacientes con DT1 y de control derivados de pacientes sanos

	TTR (sueros diabéticos) mg/l	TTR (sueros de control) mg/l
1	103	227
2	112	248
3	90	169
4	76	203
5	134	205
6	151	172
7	70	178
8	130	318
9	151	317
10	196	165
11	78	
12	105	
Media ± error estándar de la media	116±11	220±18

En sueros procedentes de adultos (Fig. 4A) y niños (Fig. 4B) con DT1, la banda que representa al monómero de TTR tiene una mayor intensidad en la SDS-PAGE con tinción con plata en comparación con los sueros de control procedentes de sujetos sanos. Conseguimos calcular la intensidad de la banda de la estructura monomérica en sueros procedentes de diez de los doce niños analizados, y en seis de ellos se produjo una regulación ascendente.

Nuestra observación relativa a que la banda en SDS-PAGE, que representaba al monómero de TTR, era de una mayor intensidad en pacientes con DT1, mientras que el nivel sérico del tetrámero se había reducido, nos llevó a analizar el efecto del monómero en la $[Ca^{2+}]_i$ de la célula β . El monómero de TTR se purificó a partir de TTR comercial mediante HPLC, y se procedió a efectuar mediciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células β incubadas con 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ del monómero. Las concentraciones se seleccionaron a partir del único estudio, según nuestros datos, en el que se han medido los niveles de monómero en suero de pacientes con polineuropatía amiloidótica familiar (PAF) y sujetos normales (4). En los pacientes con PAF, la concentración era de $0,3\pm 0,1 \mu\text{g/ml}$, mientras que en las muestras de control era de $0,6\pm 0,2 \mu\text{g/ml}$. Debido a que nuestros pacientes diabéticos presentaban una banda más fuerte que los controles, decidimos tomar una concentración del intervalo normal superior y, además, una concentración más elevada. En células expuestas a 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ del monómero, la glucosa y la despolarización con un alto nivel de K^+ derivaron en un aumento más pronunciado de la $[Ca^{2+}]_i$ en comparación con las células de control (Fig. 1 B, D). No se observó diferencia alguna en la $[Ca^{2+}]_i$ basal. La secreción de insulina, estimulada por glucosa y KCl, no se vio afectada por el monómero en ninguna de las concentraciones seleccionadas, aunque la secreción de insulina basal era significativamente mayor en células tratadas con 2 $\mu\text{g/ml}$ de monómero. Un aumento en la secreción de insulina basal puede reflejar problemas en el funcionamiento de la célula β . Como dato de interés cabe mencionar que, mientras que el tetrámero de TTR (150 mg/l) protegía frente a la apoptosis de la célula β inducida por apoCIII, el monómero (2 $\mu\text{g/ml}$) no tuvo efecto alguno (Fig. 4 C y D).

Referencias y notas

1. D. R. Soprano, J. Herbert, K. J. Soprano, E. A. Schon, D. S. Goodman, J Biol Chem 260, 11793-8 (1985).
2. T. Pettersson, A. Carlstrom, H. Jornvall, Biochemistry 26, 4572-83 (1987).
3. C. C. Blake, M. J. Geisow, S. J. Oatley, B. Rerat, C. Rerat, J Mol Biol 121, 339-56 (1978).
4. Y. Sekijima et al, Amyloid 8, 257-62 (2001).
5. P. Rorsman, G. Trube, J Physiol 374, 531-50 (1986).
6. F. M. Ashcroft, P. Rorsman, Prog Biophys Mol Biol 54, 87-143 (1989).
7. P. O. Berggren et al., Adv Exp Med Biol 334, 25-45 (1993).
8. L. Juntti-Berggren et al., Science 261, 86-90 (1993).
9. L. Juntti-Berggren et al, Proc Natl Acad Set USA 101,10090-10094 (2004).
10. S. G. Hartling, F. Lindgren, G. Dahlqvist, B. Persson, C. Binder, Diabetes 38, 1271-4 (1989).

11. M. Gebre-Medhin, U. Ewald, T. Tuvemo, *Acta Paediatr Scand* 74, 961 -5 (1985).
12. A. M. Kobbah, K. Hellsing, T. Tuvemo, *Acta Paediatr Scand* 77, 734-40 (1988).
13. S. K. Jain, R. Mc Vie, J. Duett, J. J. Herbst, *Horm Metab Res* 25, 102-4 (1993).
14. A. Lernmark, *Diabetologia* 10, 431 -8 (1974).
- 5 15. P. Arkhammar, P. O. Berggren, P. Rorsman, *Biosci Rep* 6, 355-61 (1986).
16. C. Ricordi, P. E. Lacy, E. H. Finke, B. J. Olack, D. W. Scharp, *Diabetes* 37, 413-20 (1988).
17. T. Kanatsuna, A. Lernmark, A. H. Rubenstein, D. F. Steiner, *Diabetes* 30, 231-4 (1981).

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad eficaz del tetrámero de transtiretina para la fabricación de un medicamento para tratar la diabetes de tipo I o para prevenir la diabetes de tipo I en un paciente con diabetes de tipo I o en un paciente en riesgo de desarrollar diabetes de tipo I.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el tetrámero de transtiretina está sustancialmente desprovisto de monómeros de transtiretina.
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el tetrámero de transtiretina comprende transtiretina de mamífero.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que la transtiretina de mamífero es transtiretina humana.
- 10 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se trata la diabetes de tipo I en un paciente con diabetes de tipo I.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se previene la diabetes de tipo I en un paciente en riesgo de desarrollar diabetes de tipo I.
- 15 7. Un método para identificar compuestos para el tratamiento o la prevención de la diabetes de tipo I, que comprende contactar las células β pancreáticas con uno o más compuestos de prueba e identificar aquellos compuestos de prueba que limitan la reducción de tetrámeros de TTR en las células β pancreáticas en comparación con la muestra de control, en el que dichos compuestos de prueba son compuestos candidatos para el tratamiento o la prevención de la diabetes de tipo I.
8. Método según la reivindicación 7, que además comprende la síntesis de los compuestos candidatos.
- 20 9. Método según la reivindicación 7, en el que las células β pancreáticas son de un paciente con diabetes de tipo 1 o de un modelo animal de diabetes de tipo 1.
10. Método según la reivindicación 7, en el que las células β pancreáticas son de ratones ob/ob.
11. Método para predecir el riesgo de fallo de la célula β pancreática, que comprende detectar uno o más de los siguientes elementos en células beta pancreáticas, en el que dichas células se obtienen a partir de especies animales:
25 (a) una cantidad de transtiretina monomérica relativa a las células β pancreáticas control; y/o
(b) una cantidad de transtiretina tetramérica relativa a las células β pancreáticas control;
en el que las mediciones efectuadas en (a) y (b) se utilizan para determinar un riesgo de fallo de la célula β pancreática.
- 30 12. Método según la reivindicación 11, en el que el método se emplea para predecir el riesgo de desarrollar diabetes de tipo I.
13. Método para predecir el riesgo de diabetes de tipo I en un paciente, que comprende la detección de uno o más de los siguientes elementos en las células beta pancreáticas, en el que dichas células se obtienen a partir de dicho paciente:
35 (a) una cantidad de transtiretina monomérica relativa a las células β pancreáticas control; y/o
(b) una cantidad de transtiretina tetramérica relativa a las células β pancreáticas control;
en el que las mediciones efectuadas en (a) y (b) se utilizan para determinar el riesgo de padecer diabetes de tipo I en el paciente.
- 40 14. Tetrámero de transtiretina para su uso en el tratamiento o en la prevención de la diabetes de tipo I en un paciente con diabetes de tipo I o en un paciente en riesgo de desarrollar diabetes de tipo I.

15. Tetrámero de transtiretina para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el tetrámero de transtiretina comprende transtiretina humana.

Fig. 1

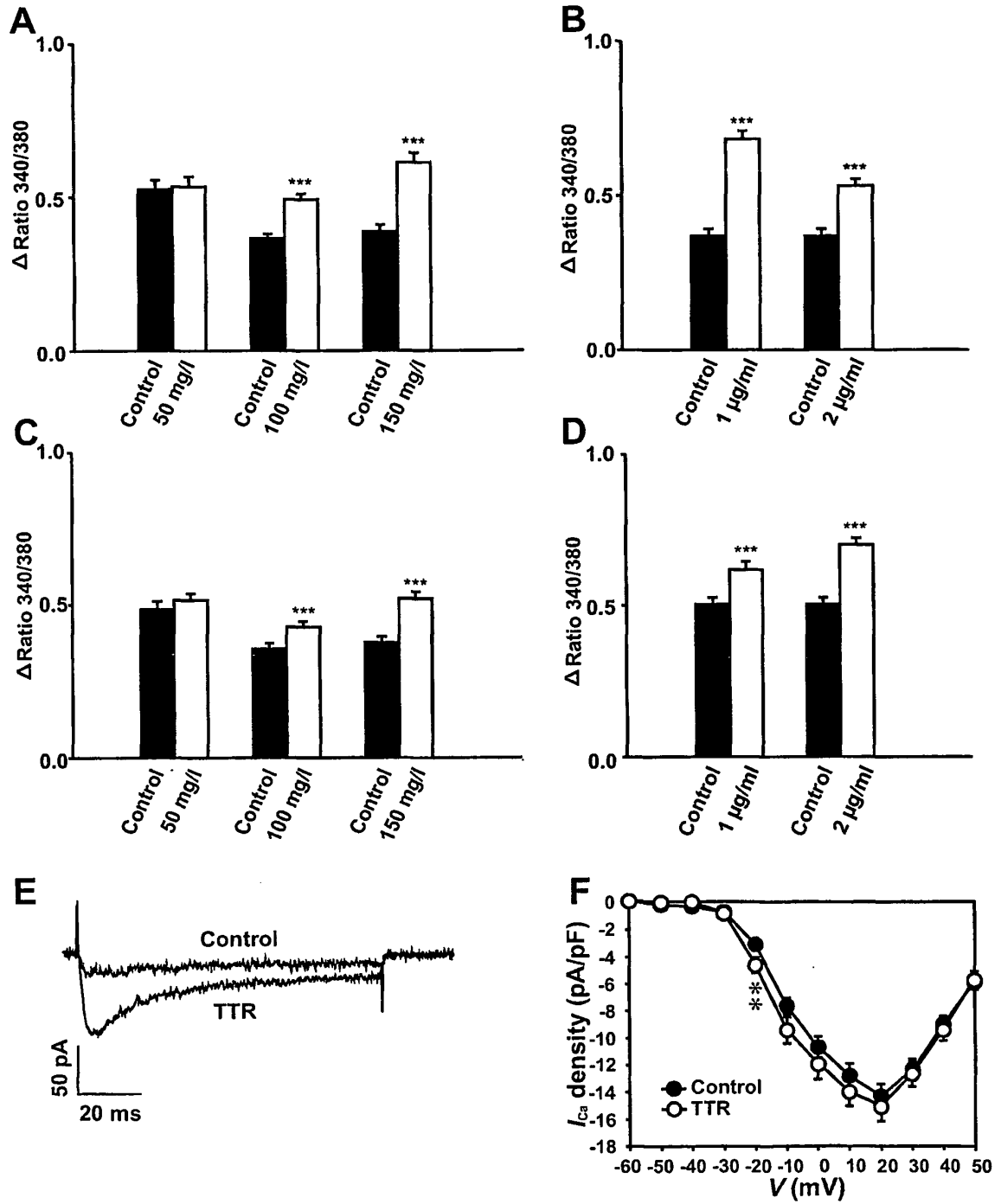


Fig. 2

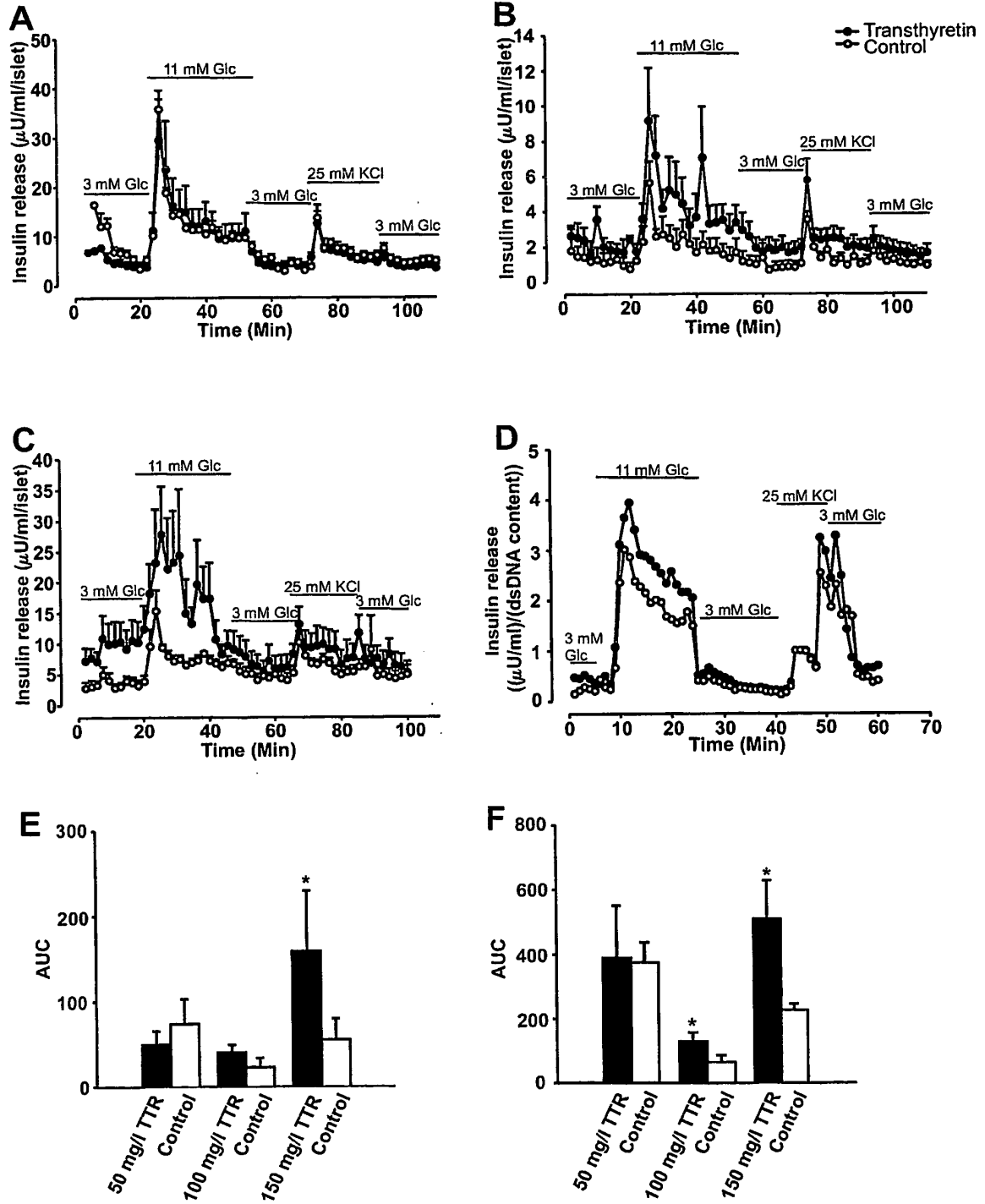


Fig. 3

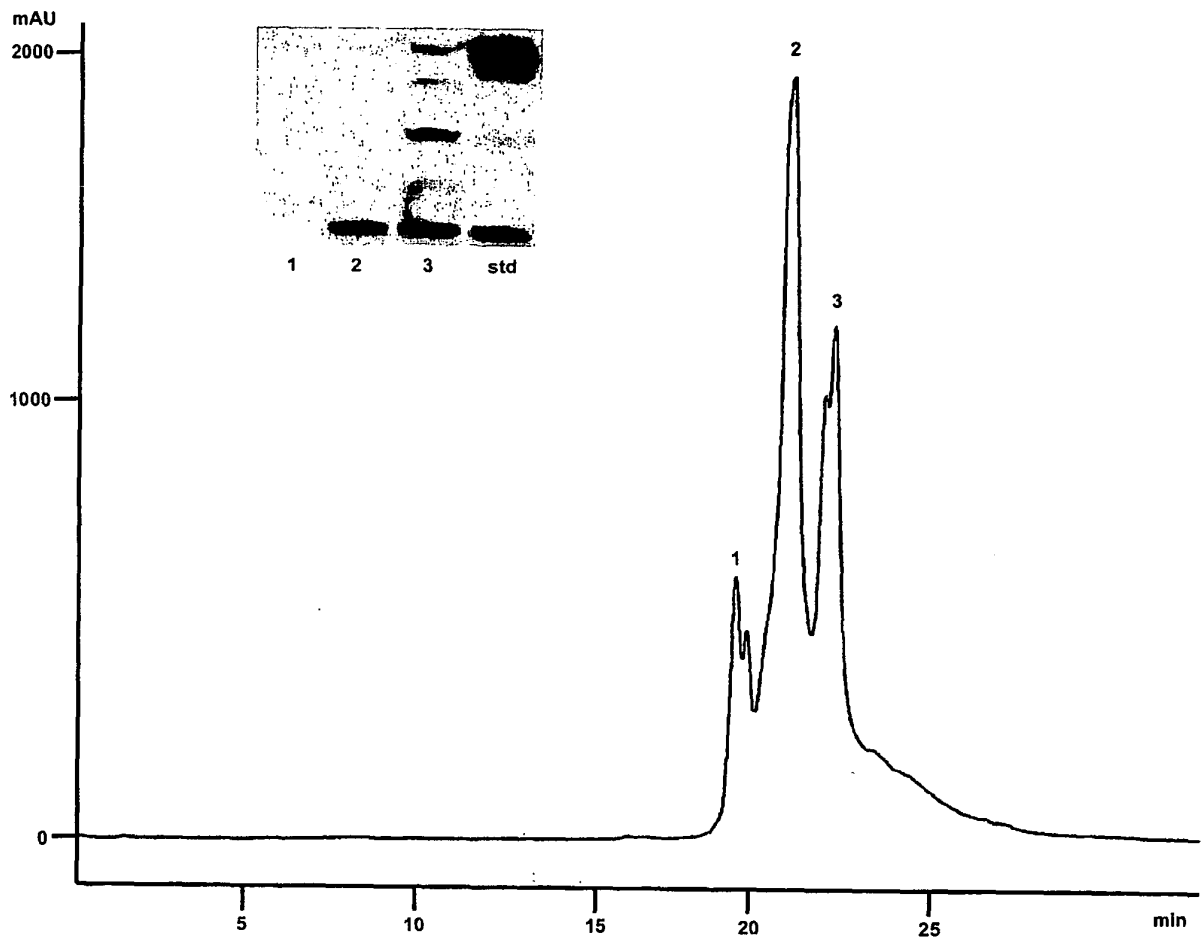


Fig. 4

