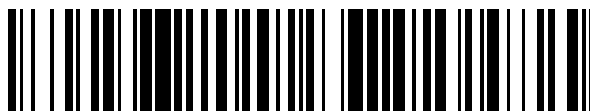


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 695**

51 Int. Cl.:

A61P 5/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2003 E 03808631 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 1581307**

54 Título: **Moduladores de IRS**

30 Prioridad:

02.01.2003 US 437377 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.01.2015

73 Titular/es:

HOUSEY, GERARD M. (50.0%)
28520 Streamwood Lane
Southfield, MI 78034, US y
WHITE, MORRIS F. (50.0%)

72 Inventor/es:

HOUSEY, GERARD M. y
WHITE, MORRIS F.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 526 695 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

Moduladores de IRS

5 **Campo de la invención**

Se describe en este documento un método general para la prevención, inducción de remisión a largo plazo, o incluso la cura de diversas enfermedades y trastornos metabólicos en seres humanos y animales, incluyendo diabetes de tipo 2, mediante la regulación de los niveles de IRS2/IRS1 y la función de señalización en células y tejidos en el cuerpo. IRS1 e IRS2 son parte de las rutas de señalización de insulina o de factor de crecimiento de tipo insulina, pero también median en algunas señales a través de otros factores de crecimiento y citocinas, incluyendo IFN γ , IL2, IL4, IL7, IL9, IL13 o IL15, hormona del crecimiento, prolactina o leptina. La actividad funcional de IRS1 o IRS2 también integra señales que surgen de las citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF α , IL-6, IL1 β y factores relacionados. En general las citocinas proinflamatorias inhiben la señalización de IRS1/IRS2 lo que podría contribuir a síndromes de resistencia a insulina.

Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus es una enfermedad compleja y con peligro para la vida que se ha conocido durante más de 2000 años. Se produce en mamíferos tan diversos como monos, perros, ratas, ratones y seres humanos. El descubrimiento de la insulina y su purificación en 1921 para su uso en personas proporcionó un tratamiento parcial para la diabetes que aún se usa de manera generalizada en la actualidad. Los niveles de insulina se ajustan de forma ordinaria por el cuerpo en cada momento para mantener el nivel de azúcar en sangre dentro de un rango fisiológico estrecho. Las inyecciones de insulina periódicas, sin embargo, sólo pueden aproximarse al estado normal: ya que la respuesta celular a insulina también está en muchos casos reducida. En consecuencia, por estas y otras razones que se analizarán en detalle posteriormente, aún se producen complicaciones con peligro para la vida durante el tiempo de vida de pacientes diabéticos tratados, especialmente en el caso de diabetes tipo 2 (de aparición en adultos)

La diabetes surge de diversas causas, incluyendo detección de glucosa desregulada o secreción de insulina (diabetes de aparición en la madurez de los jóvenes; MODY), destrucción de células β mediada por autoinmunidad (tipo 1) o compensación insuficiente de resistencia a insulina periférica (tipo 2) (*Zimmet, P. et al., Nature 414:782-787 (2001)*). La diabetes de tipo 2 es la forma más prevalente de la enfermedad. Está estrechamente asociada con la obesidad, aparece habitualmente en la mediana edad, y afecta a 18,2 millones de americanos. Es importante entender el mecanismo habitual que provoca resistencia a la insulina periférica e insuficiencia de células β .

La resistencia a la insulina periférica contribuye a la diabetes de tipo 2, pero la insuficiencia de células β es una característica esencial de todos los tipos de diabetes. Las células β con frecuencia no consiguen compensar la resistencia a la insulina, aparentemente porque la rama IRS-2 de la insulina y la cascada de señalización de IGF que median en la señalización de insulina en tejidos diana también es esencial para el crecimiento, función y supervivencia de las células β (*Withers, D. J. et al., Nature 391:900-904 (1998)*).

Debido a que la resistencia a insulina es una causa de desregulación metabólica y diabetes, el entendimiento su base molecular es un objetivo importante. Las mutaciones genéticas son fuentes obvias de resistencia a insulina para toda la vida, pero se asocian con trastornos metabólicos poco habituales y por lo tanto son difíciles de identificar en la población general. La inflamación está asociada con la resistencia a insulina y proporciona un marco para entender cómo la dieta, la tensión aguda o crónica, y la obesidad podrían provocar resistencia a insulina. En tejido adiposo también se producen citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-6 y factor de necrosis tumoral α (TNF α) que se secretan de leucocitos durante la inflamación. El TNF α promueve la fosforilación de serina de proteínas IRS, que se correlaciona estrechamente con la resistencia a insulina. (*Hotamisligil, G. S. et al., Science 259:87-91 (1999)*; *Hotamisligil, G. S. et al., Science 271:665-668 (1996)*; *Peraldi, P. et al., J. Biol. Chem. 271:13018-13022 (1996)*). Aunque el TNF α regula diversas quinasas, la quinasa Jun NH $_2$ terminal (JNK) es un efector prominente porque se une con IRS1 e IRS2 y fosforila restos de serina que inhiben la interacción entre IRS1 y el receptor de insulina. (*Aguirre, V. et al., J. Biol. Chem. 277:1531-1537 (2002)*). La anulación de Jnk1 en ratones obesos, o inhibición general de serina quinasas por altas dosis de salicilatos reduce la fosforilación de Ser de IRS1 e invierte la hiperglucemia, hiperinsulinemia, dislipidemia en roedores obesos sensibilizando las rutas de señalización de insulina. (*Fruebis, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98:2005-2010 (2001)*; *Yuan, M. et al., Science 293:1673-1677 (2001)*).

La degradación mediada por ubiquitina de proteínas IRS también promueve la resistencia a insulina (Figura 1). La IL6 secretada de leucocitos y adipocitos aumenta la expresión de SOCS1 y SOCS3, conocidos por la capacidad para suprimir la señalización de citocinas. Otra función de SOCS1 y SOCS3 es reclutar una ubiquitina ligasa basada en elongina BC al complejo de proteína IRS para mediar en la ubiquitinación. Por lo tanto, la degradación mediada por ubiquitina de proteínas IRS podría ser un mecanismo general de resistencia a insulina inducida por citocinas que contribuye a la diabetes o insuficiencia de las células β . (*Krebs, D.L. et al., Sci.STKE. 2003, E6 (2003)*). Los enfoques genómicos modernos han revelado nuevas citocinas secretadas directamente de adipocitos que influyen

directamente en la homeostasis de nutrientes y la sensibilidad a insulina, incluyendo leptina, adiponectina, resistina y otros que revelarán nuevos mecanismos para modular la sensibilidad a insulina

La actividad de proteína o lípido fosfatasa, incluyendo PTP1B, SHIP2 o pTEN modula la sensibilidad a insulina (Figura 1). La alteración de cada uno de estos genes en ratones aumenta la sensibilidad a insulina, lo que sugiere que cada uno podría ser una diana para el diseño de inhibidores. PTP1B reside en el retículo endoplasmático donde desfosforila el receptor de insulina durante la internalización y reciclaje a la membrana plasmática (Haj, F.G. et al., *Science* 295:1708-1711 (2002)). Este mecanismo especializado parece limitar los efectos secundarios no deseados asociados con la inhibición de las fosfatasa, incluyendo crecimiento celular desregulado.

El receptor de insulina es el prototipo para una familia de proteínas de membrana integrales homólogas compuestas de un dominio de unión a insulina extracelular que controla la actividad de una tirosina quinasa intracelular. Un gen de 150 kb en el cromosoma 19 compuesto de 22 exones codifica el prorreceptor humano. Durante la traducción, dos prorreceptores homólogos forman un dímero unido por disulfuro que se escinde para formar un heterotetrámero de dos subunidades α extracelulares y dos unidades β trans-membrana. La insulina se une con las subunidades α yuxtapuestas facilitando la unión de ATP y la autofosforilación de tirosina de la subunidad β , lo que activa la quinasa y recluta sustratos celulares para iniciar la transducción de señal. La ruta de señalización de insulina completa como se conoce en la actualidad se resume en el mapa de conexiones STKE. (White, M., *Insulin Signaling Pathway, Sci. STKE Connections Map*, como se ha visto en noviembre de 2003, http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_12069).

La unión con insulina selectiva se complica por el corte y empalme alternativo específico de tejido que dirige la síntesis de dos isoformas de receptores de insulina (IRa e IRb), y por ensamblaje postraduccional de híbridos entre estas isoformas y el receptor de IGF1 (IGF1R) homólogo. (Frasca, F. et al., *Mol. Cell BioL* 19:3278-3288 (1999)). IRb se une exclusivamente con insulina, mientras que IRa se une tanto con la insulina como con IGF2 con afinidades similares. El corte y empalme desregulado altera los patrones de crecimiento fetal y contribuye a formas poco comunes de resistencia a insulina en adultos (Frasca, 1989; Savkur, R. S. et al., *Nat.Genet.* 29:40-47 (2001)). Además, los receptores híbridos compuestos por un dímero $\alpha\beta$ del IGF1R y el IRb se unen selectivamente con IGF1, mientras que los receptores híbridos compuestos por IGF1R e IRa se unen con IGF e insulina con afinidades similares (Figura 1).

El primer miembro de la familia de proteínas de sustratos de receptor de insulina se descubrió en 1985, y las investigaciones posteriores han revelado la existencia de miembros de la familia de IRS relacionados así como las rutas de señalización con las que están ligadas las proteínas IRS. Después del descubrimiento de que el receptor de insulina (IR) poseía una actividad enzimática tirosina-quinasa, muchos grupos investigaron sustratos de receptores de insulina que podrían regular la señalización corriente abajo del receptor. Las primeras pruebas de la existencia de una proteína diana real para el receptor de insulina, llamada posteriormente sustrato de receptor de insulina, o proteína "IRS", resultó del uso de inmunoprecipitados de anticuerpos de fosfotirosina que sorprendentemente reveló una fosfoproteína de 185 kDa (pp185) en células de hepatoma estimuladas por insulina. (White, M. F. et al., *Nature* 318:183-186 (1985)). La purificación y clonación molecular de pp185 reveló uno de los primeros armazones de señalización así como la primera proteína sustrato del receptor de insulina (IRS1). (Patente de Estados Unidos nº 5.260.200; Sun, X.J. et al., *Nature* 352:73-77 (1991)). Se determinó que la IRS1 era biológicamente importante porque se fosforilaba inmediatamente después de la estimulación con insulina, y los mutantes del receptor de insulina catalíticamente activos que no conseguían fosforilar IRS1 estaban biológicamente inactivos. La mayoría, si no todas, de las señales de insulina se producen o se modulan a través de la fosforilación de tirosina de IRS1, IRS2 o sus homólogos; u otras proteínas del armazón incluyendo SHC, CBL, APS y SH2B, GAB1, GAB2, DOCK1, y DOCK2. Aunque el papel de cada uno de estos sustratos merece atención, el trabajo con ratones transgénicos sugiere que muchas respuestas de insulina, especialmente las que están asociados con el crecimiento somático y el metabolismo de carbohidratos, están mediadas por IRS1 o IRS2.

Las proteínas IRS están compuestas de múltiples dominios de interacción y motivos de fosforilación, pero parecen carecer de actividades catalíticas intrínsecas. Todas las proteínas IRS contienen un dominio de homología de pleckstrina NH₂ terminal (PH) adyacente a un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), seguido de una cola COOH terminal con numerosos sitios de fosforilación de tirosina y serina. El dominio PTB se une directamente con el motivo de NPXY fosforilado-Asn-Pro-Xaa-Tyr (Pi), Xaa representa cualquier aminoácido en los receptores activados para insulina, IGF o interleucina-4 (IL-4); el dominio PH también acopla proteínas IRS con receptores activados, pero el mecanismo no está claro. (Yenush, L. et al., *Mol. Cell Biol.* 18:6784-6794 (1998)). Otros receptores también reclutan y fosforilan proteínas IRS, incluyendo las de la hormona del crecimiento, IL-9, IL-13 e IL-15, y diversas integrinas (Shaw, L. M., *Mol. Cell BioL* 21:5082-5093 (2001)).

Los sitios de fosforilación de tirosina en IRS1 e IRS2 se unen con proteínas efectoras comunes, incluyendo enzimas (fosfoinositida 3-quinasa, la fosfatasa SHP2 o la tirosina quinasa fyn) o adaptadores (SOCS1, SOCS3, GRB2, NCK, CRK, SHB y otros).

La activación de PI3K durante la asociación con proteínas IRS aumenta la actividad de la proteína quinasa B (PKB), que fosforila diversos sustratos, incluyendo BAD (importante para la supervivencia celular), GSK3 β (que regula el

crecimiento y la síntesis de glucógeno), y Foxo1 (que controla la expresión génica) (Figura 1). Un papel para Foxo1 en la acción de insulina o IGF se reveló por mutaciones en el ortólogo de *C. elegans* Daf16. (Ogg, S. et al., *Nature* 389:994-999(1997)). Durante la estimulación con insulina o IGF, Daf16 y Foxo1 se fosforilan por PKB y se acumulan en el citosol. La exclusión nuclear de Foxo1 inhibe la gluconeogénesis hepática, pero estimula la diferenciación de adipocitos y la función de células β pancreáticas. (Nakae, J. et al., *Dev. Cell* 4:119-129 (2003); Kitamura, T. et al., *J. Clin. Invest* 110:1S39-1847 (2002); Puigserver, P. et al., *Nature* 423:550-555 (2003)).

IRS1 contiene muchos sitios de fosforilación de tirosina que se fosforilan durante la estimulación con insulina y factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), y se unen con los dominios de homología Src-2 en diversas proteínas de señalización. La interacción entre IRS1 p85 activa la fosfatidilinositida 3 quinasa de clase 1A, revelando de este modo la primera cascada de señalización de insulina que podría reconstituirse con éxito en células y tubos de ensayo.

Varios experimentos sugieren que podrían existir otras proteínas relacionadas: los anticuerpos de IRS1 no reaccionaban completamente con la proteína que contenía fosfotirosina que migraba a 185 kDa hizo durante SDS-PAGE; las células FDCP1 contenían una proteína con características similares a las de IRS1 pero no consiguieron reaccionar con anticuerpos dirigidos contra IRS1; el hígado de ratones transgénicos que carecían de IRS1 aún contenía una proteína en hígado que tenía características de IRS1. Todos estos hallazgos condujeron a la purificación y clonación del sustrato de receptor de insulina 2 (IRS2), un segundo miembro de la familia de IRS. (Patente de Estados Unidos nº 5.858.701; Sun, X. J. et al., *Nature* 377:173-177 (1995)).

Los experimentos en ratones transgénicos han revelado la implicación de IRS1 e IRS2 en la promoción del crecimiento somático y la homeostasis de nutrientes. Sin IRS1, los ratones son 50 % menores de lo normal desde el nacimiento hasta que mueren a los 2 años de edad. Los ratones sin IRS1 tienen menos grasa corporal y son intolerantes a la glucosa. En ratones, la IRS2 es importante para la acción de insulina periférica, ya que los ratones sin IRS2 presentan intolerancia a la glucosa e hiperlipidemia.

La alteración del gen de IRS2 en ratones usando enfoques de anulación de genes convencionales da como resultado diabetes que se desarrolla durante las primeras 10 a 12 semanas de edad. Las células β pancreáticas se pierden de estos ratones a medida que envejecen, y genes que son importantes para la función de células β están regulados negativamente en ratones que carecen de IRS2.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Se ha descubierto ahora que una familia de proteínas diana que actúan inmediatamente corriente arriba del receptor de insulina o receptores del factor de crecimiento de tipo insulina, denominada la familia de proteínas de sustrato del receptor de insulina (IRS), es de importancia clave en la mediación de los efectos de la insulina en células sensibles. En particular, la regulación positiva del nivel o actividad funcional de IRS2 en seres humanos dará como resultado un tratamiento crónico terapéuticamente eficaz para pacientes que padecen diabetes, especialmente la forma de aparición en adultos (tipo 2) de la enfermedad, así como para otros trastornos en los que la función de la proteína IRS es insuficiente, anómala o totalmente ausente. Además, IRS IRS2 son de importancia clave en la ruta de señalización de insulina o factor de crecimiento de tipo insulina, y también median en señales por otros factores de crecimiento y citocinas.

En consecuencia, un método general para el tratamiento, cura o prevención de diversos trastornos metabólicos y relacionados, incluyendo la diabetes, regulando el nivel o la actividad funcional de proteínas IRS.

El método es útil para restaurar o potenciar la sensibilidad a insulina en una célula regulando positivamente la función de IRS2. Es útil además para potenciar la función de células β pancreáticas regulando positivamente la función de IRS2. Una enfermedad o trastorno caracterizado por señalización reducida o insuficiente mediante IRS2 puede tratarse regulando positivamente la función de IRS2. Dichas enfermedades incluyen, a título enunciativo enfermedad metabólica, diabetes, dislipidemia, obesidad, infertilidad femenina, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad de Alzheimer y trastornos de angiogénesis.

La regulación positiva de la función de IRS2 incluye la activación de IRS2 o un complejo que incluye IRS2. La regulación positiva de la función de IRS2 también se consigue por inhibición de la fosforilación de restos de serina carboxilo terminales de IRS2. Puede conseguirse regulación positiva de la función de IRS2 mediante expresión potenciada de IRS2 o por inhibición de la degradación de IRS2.

La invención se refiere a un método para determinar si una molécula pequeña es un activador o un inhibidor de IRS2. En particular, la presente invención se refiere a un método como se caracteriza en la reivindicación 1. En un ensayo basado en células, se proporciona una célula de ensayo que produce en exceso IRS2 y muestra un aumento en la unión de una proteína de unión a IRS2 con IRS2, en relación con una célula de control que produce IRS2 a un nivel menor, o no produce la proteína en absoluto, y que muestra una cantidad de unión a dicha proteína inferior a

IRS2. Se identifican moléculas pequeñas que activan o inhiben IRS2 midiendo la cantidad de proteína de unión a IRS2 unida con IRS2.

En otra realización, la invención se refiere a un método para identificar una molécula pequeña capaz de aumentar el nivel de expresión de un promotor de IRS2 en una célula de mamífero. En dicha realización, se construye una célula de ensayo que contiene una construcción que comprende un promotor de IRS2 unido operativamente con un gen indicador de modo que la expresión aumentada de la secuencia promotora de IRS2 usando una sustancia que se sabe que es capaz de regular positivamente el gen de IRS2 endógeno da como resultado un aumento de dicha característica medible de la célula de ensayo. Se identifican moléculas pequeñas que aumentan la expresión de IRS2 detectando un aumento en la actividad del gen indicador.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa componentes de la cascada de señalización de IRS1.

La Figura 2 representa aspectos de la cascada de señalización de IRS2 que son específicos de células β.

Descripción detallada

Se describen en este documento métodos generalizados para prevenir, curar o inducir emisiones a largo plazo duraderas en pacientes con diabetes, trastornos metabólicos, enfermedades del sistema nervioso central, obesidad, fertilidad y otros trastornos humanos en los que un nivel inapropiado de la actividad celular funcional de la familia de IRS de proteínas contribuye a la patología. El método se refiere particularmente a IRS2 y la modulación de la actividad de rutas de señalización celular mediadas por IRS2 como un mecanismo para tratar la enfermedad humana.

El método se basa en el reconocimiento de que la rama IRS2 del sistema de señalización de insulina/IGF coordina reacciones bioquímicas importantes y rutas de señalización necesarias para la función apropiada de tejidos y células sensibles a insulina periférica (músculo y grasa de hígado), la función de los componentes en el cerebro que coordinan la homeostasis de nutrientes y regulación del apetito (hipotálamo), células beta pancreáticas que detectan la glucosa y secretan insulina, y en el sistema reproductor.

Los experimentos en ratones alterados genéticamente que carecen de IRS2 o sobreexpresan IRS2 revelan el papel esencial de IRS2 en la acción de insulina periférica y el papel de IRS2 en la función, crecimiento y supervivencia de células β pancreáticas. En ratones, IRS2 es importante para la acción de insulina periférica, detección de glucosa de células beta pancreáticas y secreción de insulina, y el control por parte del CNS de la homeostasis de nutrientes que regula el apetito y la obesidad. La desregulación de la señalización de IRS2 en tejidos periféricos sensibles a insulina, células beta pancreáticas y cerebro provoca resistencia a insulina, insuficiencia de las células β y obesidad. Por el contrario, la regulación positiva de la proteína IRS2 o el aumento de su potencial de señalización o rutas de bloqueo que inhiben su función corrige estos problemas, lo que previene o cura las patologías clave de diabetes de tipo 2.

Los fármacos que aumentan la expresión de IRS2 en ratones estimulan la función de células beta. Un ejemplo de dicho fármaco es exendina-4. La exendina-4 es un homólogo del péptido natural producido en el intestino llamado péptido de tipo glucagón-1. GLP1/Ex4 regula positivamente los niveles de IRS2 en células β porque estimula la producción de AMPC. GLP1/Ex4 tienen efectos similares en islotes de ratón y humanos para regular positivamente los niveles de IRS2. Otros fármacos que aumentan los niveles de AMPC en estas y otras células también aumentan los niveles de IRS2 y estimulan sus rutas de señalización. Muchas de las acciones positivas de GLP1/Ex4 en células de ratón y humanas se previenen bloqueando la expresión del gen de IRS2 de su producto proteico IRS2.

Por lo tanto, la regulación positiva de la función de IRS2 es un tratamiento para la diabetes de tipo 2 y otras enfermedades en las que es un componente la señalización de insulina desregulada, tales como obesidad, dislipidemia, hipertensión, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración, ictus, ceguera, enfermedad renal, infertilidad femenina y trastornos de angiogénesis. Por el contrario, la reducción de la función de IRS2 puede usarse para tratar trastornos metastásicos (por ejemplo, enfermedades neoplásicas y cáncer).

Por regulación positiva de la función de IRS2 se entiende un aumento en la cantidad de proteína IRS2 dentro de una célula o potenciación de la transducción de señal mediada por IRS2 mediante activadores como se define en el presente documento. Por activador o inhibidor de IRS2 se entiende una molécula pequeña que se une con IRS solamente y activa o inhibe la función de señalización de IRS2, o una molécula pequeña que se une con un complejo que comprende IRS2 y otras proteínas celulares y en el que dichas moléculas pequeñas no se puede unir con las proteínas no IRS2 en ausencia de IRS2. Por reducción o regulación negativa de la función de IRS2 se entiende una reducción en las cantidades de proteína IRS2 dentro de una célula o transducción de señal mediada por IRS2 reducida por inhibidores como se define en este documento.

Hay tres elementos importantes que subyacen a la invención divulgada en este documento que pueden describirse de la siguiente manera:

1. El concepto clave se refiere a la modificación (es decir, estabilización o inhibición) de la interacción de unión de IRS2 con diversas proteínas tanto corriente arriba como corriente abajo que interaccionan con (se unen con) IRS2. Estas incluyen, por ejemplo, el receptor de insulina humana (HIR) que se une con y fosforila IRS2, la quinasa c-jun N-terminal (JNK), isoformas de PKC, ERK1 o ERK2, así como elementos de señalización corriente arriba o corriente abajo adicionales tales como proteínas que contienen el dominio de homología de src 2 (SH2) que se unen con IRS2 y también pueden fosforilar, desfosforilar o de otro modo modificar IRS2.
2. El patrón específico de modificaciones covalentes de IRS2 tales como fosforilación de restos de serina, treonina y tirosina, patrones de ubiquitinación u otras modificaciones covalentes que alteran la función, localización intracelular o estabilidad de IRS2.
3. Métodos que controlan la expresión del gen de IRS2 en células específicas, incluyendo células beta, células cerebrales, células de hígado, células musculares, células reproductoras y tejidos implicados en la reproducción, células de grasa, células mamarias, células de hueso y células del sistema inmunitario, esencialmente cualquier célula del cuerpo en la que IRS2 podría expresarse de forma natural o no natural.

En consecuencia, los métodos para restaurar o potenciar la sensibilidad a insulina y/o la función de células β pancreáticas dependen del aumento de función de IRS2 por cualquier medio, particularmente los enumerados anteriormente. Por lo tanto, la función de IRS2 aumenta mediante aumentos de la cantidad de proteína IRS2 en una célula, por modulación de interacciones específicas entre IRS2 y otros componentes celulares que modificarían IRS2, y por modulación de la interacción de IRS2 con sus sustratos.

Aunque algunos de estos efectos pueden ser de naturaleza opuesta dependiendo del contexto celular, dichas modulaciones pueden conseguirse de forma farmacológica con compuestos (y especialmente moléculas pequeñas), que estabilizan las interacciones de IRS2 con otras proteínas o aceleran la velocidad de disociación de dichas interacciones después de que IRS2 haya interaccionado con dichas proteínas. Dependiendo del contexto celular, cualquiera de las actividades anteriormente mencionadas conducirá a alteraciones en el funcionamiento celular de las cascadas de transducción de señales mediadas por IRS2, dando como resultado mejoras en la señalización celular relevantes para las patologías de interés como se analizará en detalle posteriormente.

El método implica la regulación positiva de la expresión o actividad celular funcional de IRS 2, y preferentemente con respecto a IRS1 u otros miembros de la familia de IRS u otras proteínas. La regulación positiva del gen de IRS2 o la función de la proteína IRS2 promueve las funciones celulares y tisulares particulares para el tejido diana específico. Los métodos que promueven la señalización de IRS2, mediante la regulación positiva de la expresión de IRS2 o la función de IRS2 en tejidos específicos pueden dirigirse a o prevenir enfermedades específicas que implican los tejidos o células específicos. Por ejemplo, la regulación positiva de IRS2 en células β pancreáticas mejora la secreción de insulina estimulada por glucosa. Los fármacos que regulan positivamente el gen de IRS2 o promueven la señalización de IRS2 en células β promoverán la función de células β y prevendrán o curarán la diabetes. Además, el nivel o actividad funcional de IRS2 puede modularse en seres humanos y otros mamíferos para aliviar o incluso evitar la insuficiencia o destrucción masiva de células β pancreáticas que provocan ciertas formas de diabetes, y reducir la necesidad de insulina por tejidos periféricos sensibles a insulina.

IRS2 también es importante en tejidos periféricos que responden a insulina, de modo que la regulación positiva del gen de IRS2 o la regulación positiva de la función de señalización de IRS2 hace a los tejidos más sensibles a la insulina y por lo tanto es necesaria menos insulina para inducir la respuesta apropiada. En una realización podrían desarrollarse dos o más fármacos diferentes que promuevan la expresión del gen de IRS2 o la función de IRS2 en células β o en hepatocitos o en neuronas. Como alternativa, un único compuesto podría promover la expresión del gen de IRS2 o la señalización y función de IRS2 en todos estos tejidos. Estos efectos de IRS2 actúan juntos para mantener la glucosa bajo control y evitar la diabetes y trastornos relacionados que están modulados por la función de IRS2.

En otro ejemplo, la regulación positiva de la expresión de IRS2 o un aumento de la función de señalización de IRS2 también pueden ser beneficiosos para otros tejidos. Por ejemplo, aproximadamente la mitad del crecimiento del cerebro de un ratón depende de la expresión del gen de IRS2. Por lo tanto, se espera que los fármacos que promuevan la señalización de IRS2 también promuevan el crecimiento cerebral en mamíferos y personas. La señalización de IRS2 también desempeña un papel en la desfosforilación de la proteína Tau, un marcador de la enfermedad de Alzheimer. La regulación positiva de IRS2 en el hipocampo debería promover la función normal y contribuir a la prevención de la degeneración neuronal asociada con la enfermedad de Alzheimer.

La señalización de IRS2 también desempeña un papel en el comportamiento de alimentación y la fertilidad femenina. Los ratones sin IRS2 tienden a aumentar de peso como resultado de la incapacidad del cerebro para evaluar apropiadamente si se ha segregado insulina o no después de una comida, de modo que el cerebro no puede determinar si se ha consumido de hecho una comida. La regulación positiva de IRS2 en el hipotálamo, y particularmente el núcleo arcuado del hipotálamo, promoverá la regulación del apetito que da como resultado una reducción del aumento de peso o incluso pérdida de peso.

La invención comprende además métodos para descubrir y utilizar compuestos que regulen positivamente la función o los niveles de IRS2 en personas para evitar o curar una enfermedad asociada con el síndrome de resistencia a insulina, especialmente diabetes.

5 En otra realización, la invención puede usarse para determinar si fármacos conocidos que ya se usan para el tratamiento de otras enfermedades también promueven las funciones de señalización de IRS2 o regulación positiva de la expresión del gen de IRS2. Esto revelaría nuevos mecanismos de acción para viejos fármacos lo que podría indicar su uso en enfermedades humanas provocadas por insuficiencia del sistema de señalización de IRS2, tales como resistencia a insulina, diabetes y las complicaciones resultantes de estos trastornos.

10 IRS2 promueve el crecimiento de la retina. Los ratones que carecen de IRS2 presentan mayor pérdida de neuronas retinianas, especialmente bastones y conos, lo que conduce a la ceguera. Por lo tanto, la regulación positiva de IRS2 o IRS2 aumentada es útil para reducir o prevenir la degeneración retiniana y promover el crecimiento y regeneración retiniano.

15 Sistemas de ensayo para identificación y uso posterior de moduladores de la función de IRS2. Los solicitantes han desarrollado previamente sistemas de ensayo basados en células capaces de adaptarse específicamente a los ejemplos a continuación (véase, por ejemplo, documento US 5.688.655). Además, algunos sistemas de ensayo sin células también son útiles para identificar compuestos como se analiza en detalle en los ejemplos proporcionados posteriormente. Uno de dichos sistemas sin células consiste en una metodología de electroquimioluminiscencia por la que pueden medirse las interacciones proteína-proteína por la emisión de luz a una longitud de onda específica, cuando el IR interacciona con (es decir, se une con) IRS2. Dichos sistemas de ensayos sin células también pueden utilizarse en la identificación y caracterización de compuestos como se analiza en detalle en los ejemplos proporcionados posteriormente. Otros ejemplos se conocen bien por los investigadores expertos en la materia.

25 **Métodos para identificar y usar compuestos que inhiben la degradación de IRS2 en células β .** En el enfoque más general, pueden establecerse exploraciones basadas en células para identificar compuestos que bloquean la degradación intracelular de IRS2. Aunque puede usarse una diversidad de tipos celulares para este proceso, sería preferible uno que exprese (o sobreexpresé) IRS2, por ejemplo, de acuerdo con las enseñanzas previas del documento US 5.688.655 y patentes relacionadas. Por ejemplo, la ubiquitinación promueve la degradación de ambos IRS IRS2. Por lo tanto, se anticiparía que ciertos fármacos que inhiben la ubiquitinación protegen a las células de los efectos deletéreos que resultan de la pérdida de IRS2 y pueden identificarse usando exploraciones basadas en células. Además, la modificación por ingeniería genética de ADNC de IRS2 para el fin de detectar la degradación de IRS2 también sería útil. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de un marcador flag en el extremo COOH de la molécula. Dichos marcadores incluyen un marcador FLAG, un marcador GFP, un marcador MYC y otros conocidos por los expertos en la materia.

30 **Métodos para identificar y usar compuestos que regulan positivamente la función de IRS2 en células β .** Otra manera de regular positivamente la expresión de IRS2 es por una sustancia que estimula la transcripción del gen de IRS2. Esto puede realizarse con los métodos de exploración basados en células descritos anteriormente. Pueden prepararse líneas de células β , tales como MIN6, con un promotor de IRS2 unido a un indicador fácilmente detectable tal como una proteína verde fluorescente (GFP) para facilitar la exploración de alto rendimiento. También pueden usarse métodos de exploración basados en PCR para detectar directamente la expresión del gen endógeno. Los aciertos pueden ensayarse con respecto a la función en células de islotes de ratón o humanos aisladas. La especificidad tisular de los aciertos puede ensayarse entre diversas líneas celulares para determinar si los compuestos identificados son específicos para células β o también promueven la expresión de IRS2 en otras células. GLP1 o exendina-4 pueden usarse como controles positivos en dicho ensayo para validar el ensayo.

40 **La regulación positiva de IRS2 en células β y otros tejidos usando péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1).** GLP-1, así como análogos estables como exendina-4, se ha sugerido como tratamientos potenciales para la diabetes: porque parecen promover la secreción de insulina en respuesta a aumentos de los niveles de glucosa en plasma. Se ha mostrado que GLP-1 invierte la degradación dependiente de la edad de la función de células β en ratas o ratones. Además, GLP-1 también estimula la proliferación y neogénesis de células β , y reduce o elimina la apoptosis de células β . También se ha mostrado que la secreción de GLP-1 se reduce en personas con diabetes de tipo 2, mientras que la administración subcutánea de GLP-1 puede mejorar la homeostasis de la glucosa, reducir el peso corporal, reducir los ácidos grasos libres en plasma en circulación y la hemoglobina A (1C) y aumentar la sensibilidad a insulina. GLP-1 regula positivamente en gran medida IRS2 en células β y otras células. Muchos de los efectos positivos de GLP-1 en la función de las células β se pierden tras la inhibición de la expresión de IRS2, lo que demuestra que IRS2 desempeña un papel importante en la acción de GLP-1 (Figura 1). Resulta interesante que los intentos de restaurar la homeostasis de glucosa en ratones de IRS2 por la administración de exendina-4 por inyección no tuvieron éxito.

50 **Compuestos y métodos para usar análogos de GLP-1 que regulan positivamente IRS2 en células beta.** Dado que GLP-1 promueve la expresión de IRS2, las moléculas pequeñas (es decir, agentes químicos con pesos moleculares inferiores a o iguales a 1.000 unidades de masa atómica (Daltons)) que son análogos químicos de GLP-1 u otros agentes químicos capaces de activar el receptor de GLP-1 también serán capaces de aumentar la

expresión de IRS2. Dichos compuestos químicos estarán preferentemente disponibles por vía oral y pueden usarse para promover la expresión de IRS2 en células β y otras células que contienen receptores. Por definición, las sustancias capaces de regular positivamente la función de IRS2 son moléculas pequeñas que aumentan el nivel de proteína IRS2 capaz de actuar dentro de una célula así como activadores de IRS2 como se define en este documento.

Compuestos y métodos para usar moduladores de AMP cíclico para regular positivamente IRS2 en células beta y otros tejidos. Se conocen bien fármacos que regulan positivamente la concentración de AMPc en células. Dado que la expresión de IRS2 se modula en parte por los niveles de AMPc en algunas células, muchos fármacos actuales pueden ejercer algunos de sus efectos actuando a través de la regulación positiva de IRS 2. Por lo tanto, la evaluación de fármacos conocidos con respecto a efectos específicos en la expresión de IRS2 en tejidos revelará nuevos usos de los fármacos conocidos para el tratamiento de enfermedad relacionada con la pérdida de expresión de IRS2 o la función celular. Algunos de los efectos de ciertos fármacos conocidos pueden depender de su capacidad para regular positivamente IRS2. Pueden usarse ensayos basados en células basándose en la expresión de IRS2 o construcciones indicadoras para evaluar fármacos conocidos o identificar nuevos compuestos que regulan positivamente la expresión de IRS2 o síntesis de proteínas.

Métodos para identificar y usar compuestos que regulan positivamente IRS2 de una manera específica de tejido para prevenir enfermedades de síndrome de resistencia a insulina. Un fármaco que regule positivamente IRS2 podría actuar en todos los tejidos del cuerpo, o presentar especificidad tisular. Puede evaluarse el efecto o los efectos de fármacos conocidos y desconocidos en la expresión específica de tejido de IRS2. Como se conoce por un experto en la materia, un método para hacer esto es construir un ratón que exprese una construcción de IRS2 que contenga una extensión carboxilo terminal (COOH) que comprenda proteína verde fluorescente. Después de la administración de compuestos al animal de ensayo, todos los tejidos pueden evaluarse con respecto a expresión de la proteína IRS2 marcada para establecer los efectos específicos de tejido del compuesto particular con respecto a la expresión del gen de IRS2.

Métodos para identificar y usar compuestos que estimulen la señalización por IRS2 en células β y otros tipos celulares. La señalización de IRS2 está inhibida por muchas rutas, incluyendo degradación y fosforilación de serina (Figura 1). Los compuestos que inhiben estos procesos regularán positivamente la función de IRS2. Como se ha analizado anteriormente, puede prepararse un sistema de ensayo basado en células general para identificar compuestos que aumentan la señalización de IRS2. Pueden usarse diversas estrategias experimentales para determinar cuándo se identifican dichos fármacos, incluyendo captación de glucosa por la célula o la expresión posterior de otros genes corriente abajo conocidos. Puede además determinarse el efecto de los compuestos sobre la capacidad de la insulina para modular la expresión génica (por ejemplo, en células capaces o incapaces de expresar IRS1 o IRS2). Si se selecciona un conjunto conocido de genes para este fin, pueden desarrollarse y expresarse construcciones indicadoras en células de ensayo. Como alternativa, el genoma completo puede usarse para evaluar los efectos de los compuestos en estas células, en cuyo caso puede emplearse tecnología de micromatrices.

Inhibidores de la fosforilación de serina de IRS2. Se conocen sitios de fosforilación de serina para modular la actividad de IRS2. Pueden identificarse compuestos que inhiben o estimulan la fosforilación de los restos de serina y éstos usarse para promover la función de IRS2 y prevenir la diabetes, las complicaciones de la diabetes o el síndrome de resistencia a insulina, u otros trastornos en los que la función de IRS2 desempeña un papel como se ha analizado previamente. Puede desarrollarse un enfoque proteómico para evaluar la fosforilación de los restos de serina relevantes. Un enfoque podría usar anticuerpos que reconozcan específicamente y se unan con restos de serina fosforilados en motivos de secuencia definidos específicos. Pueden generarse anticuerpos específicos en conejos o en ratones (policlonales o monoclonales) y disponerse de tal manera que se evalúen todos los restos simultáneamente en extractos celulares expuestos a compuestos de ensayo.

Introducción de un gen de IRS2 artificial en células β para regular positivamente la expresión de IRS2. La terapia génica es un método general para corregir errores en la expresión génica en diversas células. Puede introducirse un gen artificial que codifique IRS 2 en células β para aumentar la expresión de IRS2 y prevenir la diabetes. El gen puede estar activo de forma constitutiva o podría contener elementos reguladores que controlen su expresión. Están disponibles vectores virales (adenovirus, VIH, lentivirus) y otros sistemas de suministro para transfección y regulación positiva de IRS2 en células β u otras células del cuerpo. La regulación positiva del gen de IRS2 podría conseguirse durante la incubación de islotes humanos aislados inmediatamente después del aislamiento de donantes humanos. Estos islotes que se generan para expresar IRS2 pueden usarse después para el trasplante. La regulación positiva de IRS2 en islotes murinos promueve su función durante el trasplante, dando como resultado, por ejemplo, eficacia mejorada de trasplantes y reducción del número de células requerido.

Introducción de una secuencia reguladora que se dirige a y regula positivamente el gen de IRS2 endógeno en células β . La expresión génica se regula por elementos reguladores que se unen con diversos factores de transcripción. Los elementos reguladores pueden sustituirse o añadirse para modificar expresión del gen IRS2. Por ejemplo, pueden usarse elementos reguladores que aumentan la expresión o que responden a otros sistemas de señalización. Están disponibles diversos promotores fuertes que pueden insertarse delante de IRS2 para aumentar

la expresión. Dichos elementos pueden dirigirse a células de una manera específica de tipo celular o tejido.

Introducción de un gen de IRS2 artificial en células β aisladas o células madre pluripotenciales para implantación en pacientes.

Pueden retirarse células de islotes del cuerpo y tratarse con ADN que alterará la expresión del gen de IRS2, tal como introduciendo copias adicionales de IRS2, o alterando la región reguladora de IRS2 por recombinación homóloga. Estas células modificadas por ingeniería genética pueden después reemplazarse en el cuerpo para curar la diabetes. Como alternativa, pueden obtenerse células de islotes de otras fuentes (por ejemplo, donantes coincidentes), la expresión de IRS2 puede regularse alterando la expresión del gen por los métodos descritos anteriormente y las células pueden reemplazarse en el paciente. En otro enfoque, las células de islotes pueden diferenciarse de células madre aisladas. Las células de islotes también pueden obtenerse de otros mamíferos (por ejemplo, cerdos, vacas, primates) y la expresión de IRS2 aumentarse por medios genéticos como se ha descrito anteriormente. Las células de islotes pueden modificarse para ser aceptables para trasplante humano, o colocarse en un recipiente biocompatible apropiado para evitar el rechazo.

Introducción de un gen de IRS2 artificial en neuronas que posteriormente se devuelven a los pacientes.

IRS2 se expresa en gran medida en regiones específicas del cerebro, incluyendo el hipotálamo, hipocampo, amígdala y corteza. IRS2 promueve el crecimiento neuronal e inhibe la fosforilación de tau, un marcador de la enfermedad de Alzheimer. IRS2 también promueve el crecimiento de neuronas del CNS durante el desarrollo. La regulación positiva de la expresión de IRS2 en células usadas para reparar el daño neuronal puede potenciar significativamente la oportunidad de reparar y la producción de neurotransmisores. La introducción de neuronas del hipocampo que expresan IRS2 en un hipocampo podría prevenir la enfermedad de Alzheimer en individuos susceptibles. El daño neurológico en general, provocado por el traumatismo, podría ser reparable introduciendo neuronas en el área dañada para reparar. Sería más probable que la reparación tuviera éxito si las neuronas usadas contuvieran niveles elevados de expresión de IRS2. La expresión elevada de IRS2 puede conseguirse por manipulación genética o agentes farmacéuticamente activos con se ha perfilado anteriormente.

Métodos para identificar y usar compuestos que inhiben la degradación de IRS2 en células β .

IRS2 es sensible a la degradación proteolítica. En consecuencia, pueden usarse inhibidores de proteasa para regular positivamente el potencial de señalización de IRS2 interfiriendo con la degradación de IRS2. Pueden usarse exploraciones de sistemas de ensayo de exploración basados en células o sin células (como se ha descrito previamente) para identificar dichos inhibidores.

Métodos para identificar y usar compuestos que bloquean la interacción de IRS2 con enzimas degradantes en células β y otros tipos celulares.

Se consigue frecuentemente especificidad en sistemas biológicos mediante interacciones proteína-proteína específicas. En el caso de enzimas que promueven la degradación de IRS2, los compuestos que evitan la interacción específica entre IRS2 y las enzimas de degradación darían como resultado la regulación positiva de la proteína IRS2. Pueden diseñarse exploraciones basadas en células y sin células usando proteínas marcadas para identificar proteínas que evitan la interacción de IRS2 con enzimas de degradación.

Potenciación de la fertilidad.

Los ratones hembra que carecen de IRS2 son estériles. Regulando positivamente la señalización de IRS2 o la expresión del gen de IRS2 en ovarios, puede potenciarse la ovulación.

Métodos para identificar y usar compuestos promotores de IRS2 para invertir el catabolismo durante traumatismo agudo.

La resistencia a insulina es un problema importante durante el traumatismo agudo. La secreción de insulina reducida durante el traumatismo agudo empeora los problemas. La resistencia a insulina y la secreción de insulina reducida conducen a catabolismo masivo que puede poner en peligro la supervivencia en el periodo temprano de la reparación. Ambos procesos pueden explicarse por la pérdida de señalización de IRS2 debido a la inhibición por procesos inflamatorios. Los fármacos que promueven la función de IRS2, evitan la degradación de IRS2, o promueven la expresión de IRS2 invertirán estos efectos.

Métodos para identificar y usar compuestos promotores de IRS2 para evitar la resistencia a insulina y diabetes asociada con obesidad.

Un problema importante con la obesidad es que los tejidos periféricos se hacen resistentes a insulina; si las células β no consiguen preparar suficiente insulina para superar la resistencia a insulina, entonces se desarrolla diabetes. Esta puede tratarse con compuestos que regulan positivamente IRS2 en células β y/o tejidos periféricos. La regulación positiva de IRS2 en células β promueve una mejor detección de la glucosa y secreción de insulina, y la regulación positiva de IRS2 en tejidos periféricos reduce los requisitos de insulina. En consecuencia, la incidencia de complicaciones con peligro para la vida de la obesidad puede reducirse.

Regulación de genes que modulan los niveles y la función de IRS2 en células β y otros tipos celulares.

Como otros genes, IRS2 está regulado por factores de transcripción tales como CREB. Una manera de aumentar la expresión de IRS2 es aumentar la actividad de los factores de transcripción que estimulan la transcripción de los genes de IRS2. Dichos compuestos pueden identificarse fácilmente mediante el uso de exploraciones basadas en células, como se ha descrito previamente. En particular, las células pueden modificarse por ingeniería genética para expresar genes indicadores de IRS2 y altos o bajos niveles de CREB. Las sustancias que regulan positivamente el indicador de IRS2 pueden identificarse después midiendo las respuestas diferenciales de los compuestos en células que expresan niveles altos o bajos de CREB.

Identificación de compuestos que activan o inhiben componentes de la cascada de señalización de IRS2.

IRS2 es un componente temprano en una cascada de señalización que controla eventos celulares y expresión génica (Figura 1). Se conocen muchos otros componentes de la ruta. En consecuencia, la actividad reducida de IRS2 puede compensarse modulando la actividad de componentes corriente abajo. Por ejemplo, las delecciones genéticas de pTEN, Foxo1 o PTP1B, todas las cuales inhiben la señalización de IRS2, compensan la falta de IRS2 y promueven la función de células β en ratones. En consecuencia, las sustancias que inhiben estos componentes pueden estimular las rutas de señalización de IRS2. Dichos fármacos pueden identificarse por ensayos basados en células o basados en proteínas purificadas. Pueden aplicarse estrategias similares para otros elementos en la cascada (Figura 1 y 2).

Métodos para identificar y usar compuestos que suprimen la inhibición o destrucción de IRS2 en células β por el sistema inmunitario.

La diabetes de tipo 1 es una enfermedad autoinmunitaria. Los leucocitos son atraídos a los islotes por auto-antígenos de células β . Una vez que han migrado a los islotes pancreáticos, los leucocitos a continuación atacan y destruyen células β mediante contactos célula-célula o liberando citocinas proinflamatorias que promueven la muerte de células β . Se cree que la muerte de una célula β se produce mediante mecanismos que son comunes con otras células, tales como activación de la cascada de caspasa incluyendo la escisión y activación de caspasa-3. La señalización de IRS2 inhibe generalmente la apoptosis de muchos tipos celulares, incluyendo células β , promoviendo la fosforilación de BAD y la disociación de BCL1 que inhibe una cascada que culmina en escisión y activación de caspasa-3. Una de las maneras en que los leucocitos preparan células para destrucción rápida es promoviendo la degradación de IRS2 o inhibiendo su función. Los compuestos que inhiben la degradación de IRS2 e inhiben su fosforilación de serina se opondrán a los efectos destructores de leucocitos. Estos compuestos pueden identificarse estableciendo ensayos basados en células realizados en presencia de citocinas proinflamatorias. Los compuestos que regulan positivamente IRS2, lo estabilizan, promueven su función o bloquean su interacción con proteínas en las cascadas inflamatorias promoverán la supervivencia y función de células β que pueden ensayarse con herramientas convencionales.

Métodos y compuestos que promueven el estado de fosforilación de tirosina de IRS2 en células β .

IRS2 media en señales que promueven el crecimiento funcional y la supervivencia de células β mediante fosforilación de tirosina mediada por el receptor de IGF1, receptor de insulina u otros receptores acoplados a tirosina quinasas. Las fosfatasa desfosforilan proteínas IRS e inhiben estos efectos positivos. Los compuestos que inhiben las actividades fosfatasa específicas en células β regularán positivamente la función de IRS2 y promoverán la función de células β . Se conocen bien métodos de exploración generales que pueden usarse para encontrar fármacos con los efectos inhibidores de fosfatasa apropiados. Por ejemplo, PTP1B es un ejemplo de una de dichas fosfatasa que puede ser una diana de inhibición, y hay otras fosfatasa importantes en células β así como en otros tipos celulares.

Métodos y compuestos que inhiben la ubiquitinación de IRS2 en células β . Las proteínas IRS2 son dianas para la degradación tras la ubiquitinación. Por lo tanto, los compuestos que inhiben la interacción entre IRS2 y complejos de ubiquitina transferasa o inhiben la accesibilidad de los restos que se ubiquitan prolongarán la semivida de IRS2 y por lo tanto potenciarán su capacidad de señalización.

Métodos y compuestos que activan o inhiben la fosforilación de serina, treonina y tirosina de IRS2 en células β , neuronas y otros tipos celulares que son sensibles a IRS2 para crecimiento, función o supervivencia.

Las proteínas IRS2 son dianas para la fosforilación por serina, treonina y tirosina quinasas. Por lo tanto, los compuestos que inhiben o estimulan la fosforilación de IRS2 modularán la función celular de IRS2 de una manera terapéuticamente útil. Dichas funciones de IRS2 incluirán su capacidad para interactuar con (unirse con) otras proteínas implicadas en diversas cascadas de transducción de señales que son beneficiosas para el tratamiento de enfermedades humanas tales como diabetes tipo 2, enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, neuropatía periférica, enfermedad vascular, retinopatías, degeneración macular y similares.

En los métodos descritos en este documento se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos que modulan la actividad funcional de IRS a un mamífero que lo necesite. El término "administrar" como se usa en este documento significa suministrar los compuestos a un mamífero por cualquier método que pueda conseguir el resultado buscado. Pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, por vía parenteral (por vía intravenosa o intramuscular), por vía tópica, por vía transdérmica o por inhalación. Se entiende que el término "mamífero" como se usa en el presente documento incluye, a título enunciativo, seres humanos, animales de laboratorio, animales domésticos y animales de granja. "Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero, es eficaz en la producción del efecto terapéutico deseado, tal como inhibir la actividad quinasa.

Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de estos. Los vehículos pueden comprender además cantidades menores de sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian el periodo de validez o la eficacia de los polipéptidos de unión. Las composiciones pueden, como se conoce bien en la técnica, formularse para proporcionar liberación rápida, continuada o retardada del principio activo después de su administración al mamífero.

Las composiciones pueden estar en una diversidad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, semi-sólidas y líquidas, tales como comprimidos, píldoras, polvos, soluciones, dispersiones o suspensiones líquidas, liposomas, supositorios, soluciones inyectables e infundibles. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y aplicación terapéutica.

5 Dichas composiciones se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica. Al realizar la composición el principio activo habitualmente se mezclará con un vehículo, o se diluirá con un vehículo y/o se incluirá dentro de un vehículo que puede, por ejemplo, estar en forma de una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el vehículo actúa como un diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido o líquido, que actúa como un vehículo, excipiente o medio para el principio activo. Por lo tanto, la composición puede estar en forma de comprimidos, grageas, bolsitas, obleas, elixires, suspensiones, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina duras y blandas, supositorios, soluciones de inyección, suspensiones, polvos envasados estériles y como un parche tópico.

15 Debería apreciarse que los métodos y composiciones descritos en este documento pueden administrarse a cualquier mamífero adecuado, tal como un conejo, rata o ratón. Más preferentemente, el mamífero es un ser humano.

20 Debe entenderse y esperarse que puedan realizarse variaciones en los principios de la invención divulgados en este documento por un experto en la materia y se pretende que dichas modificaciones se incluyan dentro del alcance de la presente invención.

Los ejemplos a continuación no deberían interpretarse como limitantes del alcance de ninguna manera.

25 Ejemplos

La anulación de IRS2 muestra que la acción y secreción de insulina están estrechamente relacionadas al nivel molecular mediante la rama del sustrato de receptor de insulina 2 (IRS2) de la cascada de señalización de insulina/IGF. Los ratones que carecen de IRS2 presentan similitudes con seres humanos con diabetes de tipo 2. Se evaluaron las acciones de la sobreproducción específica de células β de IRS 2 en el desarrollo de la diabetes y la función de células β pancreáticas en modelos murinos de diabetes autoinmunitaria y trasplante de islotes. (*Hennige, A. et al., J. Clin. Invest. 112:1521-1531 (2003)*). M. White y colaboradores mostraron que la regulación positiva de IRS2 en células β pancreáticas promueve el crecimiento, supervivencia y secreción de insulina de células β . Además, demostraron que el aumento de la expresión de IRS2 en células β mejora el trasplante de islotes, ya que se requieren significativamente menos islotes para normalizar los niveles de glucosa en el suero. Los datos apoyan un papel farmacológico para IRS2 o factores corrientes abajo en el tratamiento de insuficiencia de células β y diabetes humana. Los resultados proporcionan apoyo para las enseñanzas de que una manera de conseguir el objetivo de prevenir o curar la diabetes y trastornos metabólicos relacionados es identificar compuestos que aumentan la actividad o función de IRS2 en células β , o en otros tejidos del cuerpo que requieren la función de señalización de IRS2 incluyendo el cerebro o tejidos neuronales específicos como retina, hipotálamo, hipocampo, amígdala; corazón, hígado, músculo, tejido adiposo, ovario, hipófisis, leucocitos, retina u otras células o tejidos que responden a insulina o IGF1 generando cascadas de señalización que se coordinan por IRS2.

45 *Jhala et al. (Genes Dev. 17:1575-1580 (2003))* proporcionan pruebas de que IRS2 es un gen sensible a CREB, y que GLP1/ex4 aumenta fuertemente la expresión de IRS2 en líneas de células β , supuestamente mediante fosforilación mediada por AMPC de CREB. Por el contrario, la expresión de IRS1 no está regulada mediante la activación de CREB. Los resultados demuestran que existen compuestos que pueden regular positivamente la síntesis de IRS2 en células, y particularmente con respecto a otra proteína IRS, y que los compuestos que aumentan los niveles de AMPC en células, incluyendo agonistas de receptores de superficie celular, inhibidores de fosfodiesterasa, activadores de PKA y miméticos de AMPC, también pueden regular positivamente IRS2 mediante la activación de CREB.

50 En consecuencia, estos resultados tomados junto con las enseñanzas descritas en este documento proporcionan pruebas adicionales de que la síntesis de IRS2 puede aumentarse de una manera específica en células β para prevenir o curar la diabetes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una molécula pequeña para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno **caracterizado por** la señalización reducida o insuficiente mediante el sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2) caracterizado por el hecho de que la enfermedad o el trastorno es diabetes, resistencia a insulina, enfermedad metabólica, dislipidemia, obesidad, infertilidad femenina, o enfermedad de Alzheimer, que comprende

(a) proporcionar una célula de ensayo que produce IRS2 en exceso y muestra un aumento en la unión de una proteína de unión a IRS2 con IRS2, en relación con una célula de control que produce IRS2 a un nivel inferior, o no produce la proteína en absoluto, y que muestra una cantidad menor de unión de dicha proteína con IRS2;

(b) provocar que la molécula pequeña entre en contacto con la célula de ensayo intacta; y

(c) examinar la célula de ensayo con respecto a regulación positiva de una señal celular mediada por IRS2, identificando de este modo la molécula pequeña para el tratamiento o la prevención de la enfermedad o el trastorno.

2. Un método para identificar una molécula pequeña para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno **caracterizado por** la señalización reducida o insuficiente mediante el sustrato de receptor de insulina 2 (IRS2) caracterizado por el hecho de que la enfermedad o el trastorno es diabetes, resistencia a insulina, enfermedad metabólica, dislipidemia, obesidad, infertilidad femenina o enfermedad de Alzheimer, que comprende:

(a) proporcionar una célula de ensayo que contiene un promotor de IRS2 unido operativamente con un gen indicador de modo que la expresión aumentada de la secuencia del promotor de IRS-2 usando una sustancia que se sabe que es capaz de regular positivamente el gen de IRS2 endógeno da como resultado un aumento de los niveles de proteína indicadora;

(b) provocar que dicha molécula pequeña entre en contacto con la célula de ensayo intacta; y

(c) determinar si se ha producido un aumento en el nivel de proteínas indicadoras en la célula de ensayo, identificando de este modo la molécula pequeña para el tratamiento o la prevención de la enfermedad o el trastorno.

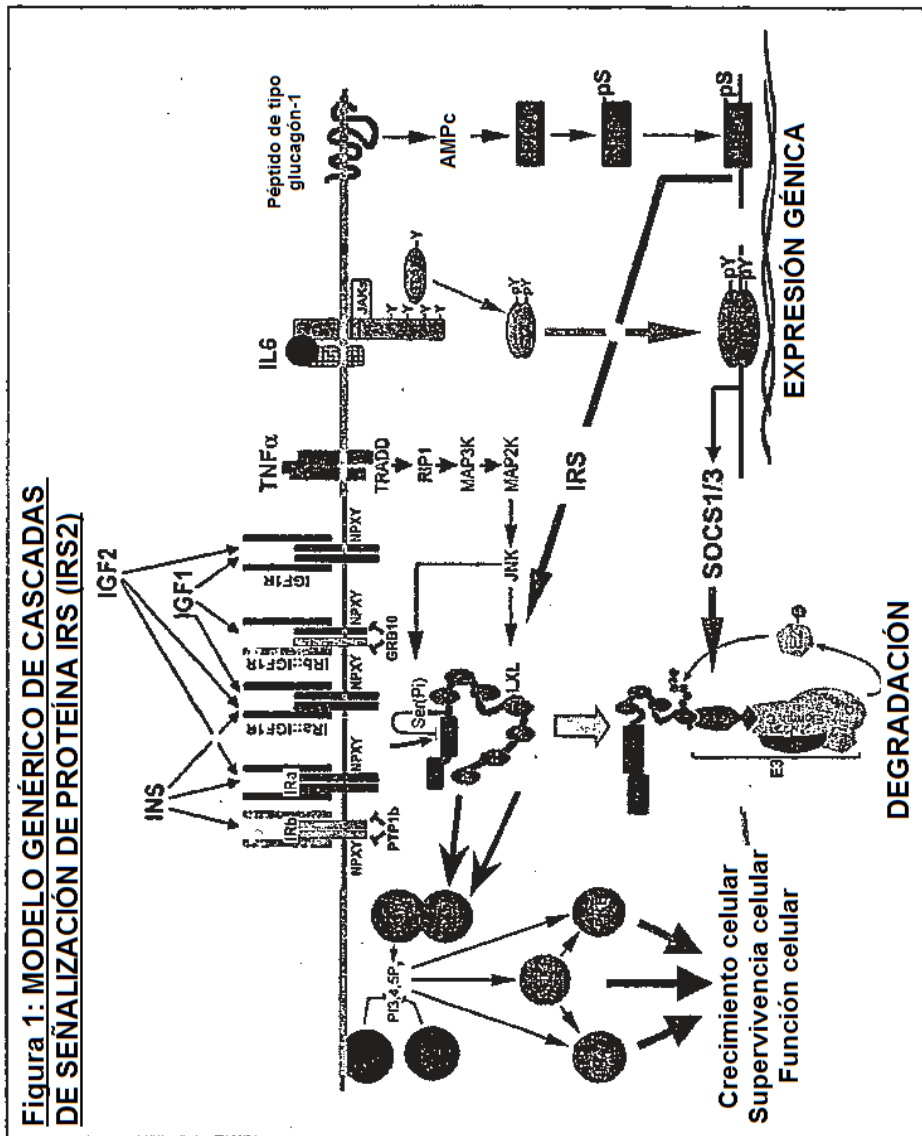


Fig. 1

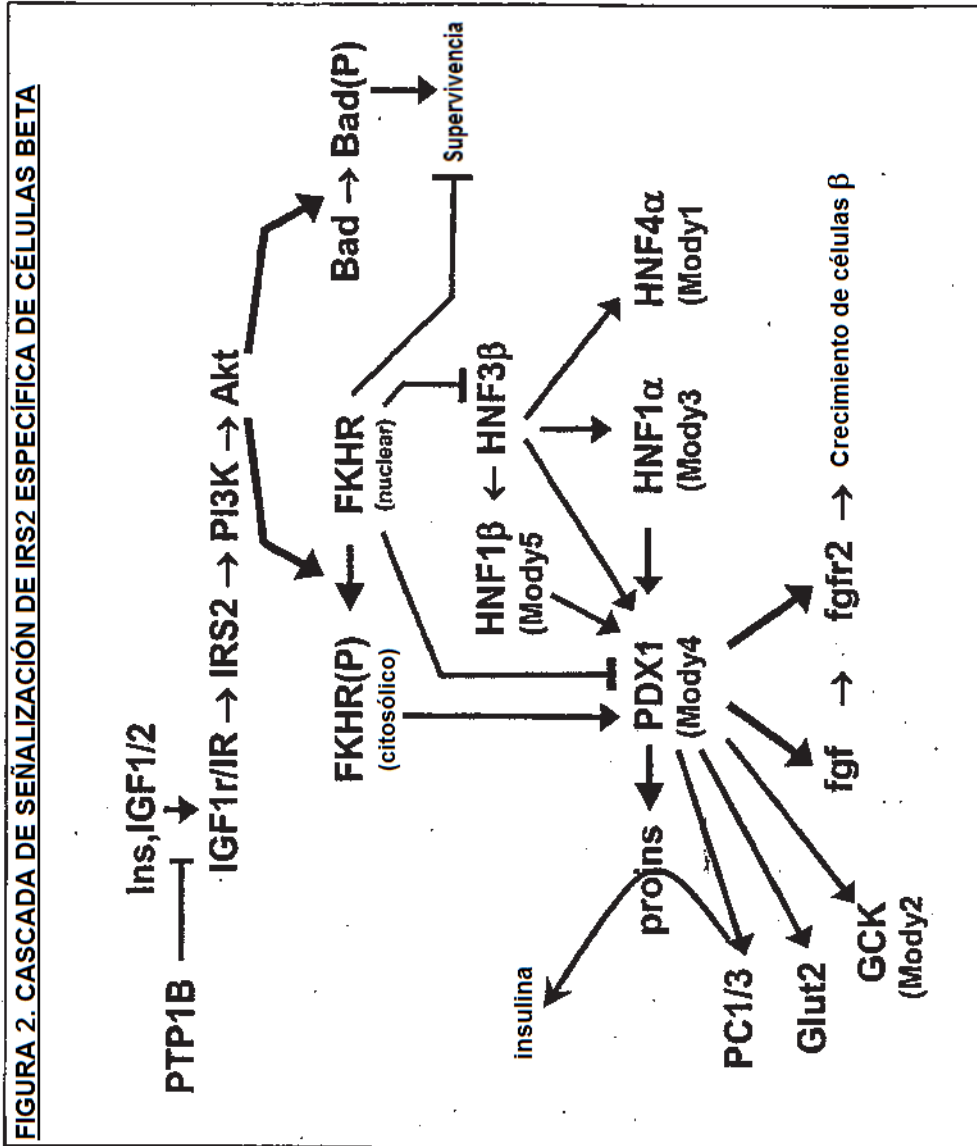


Fig. 2