

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 687**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2008** **PCT/US2008/062345**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2008** **WO08137633**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2008** **E 08747445 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017** **EP 2152294**

54 Título: **Péptido BAD de dominio BH3 para usar en el tratamiento o retardo de la aparición de la diabetes**

30 Prioridad:

02.05.2007 US 915594 P

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

16.10.2017

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US

72 Inventor/es:

DANIAL, NIKA N.;
WALENSKY, LOREN D.;
BIRD, GREGORY y
KORSMEYER, STANLEY J.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 637 687 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

Péptido BAD de dominio BH3 para usar en el tratamiento o retardo de la aparición de la diabetes

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos para modular la función y supervivencia de células de islote β y proporciona métodos para tratar la diabetes e inhibir la muerte celular de islotes pancreáticos. Además, la invención describe métodos para controlar las actividades discretas de proteínas de solo BH3 individuales mediante la modificación basada en fosfomiméticos de compuestos peptídicos de BH3 bioactivos.

Antecedentes de la invención

10 La diabetes es una respuesta metabólica alterada a la insulina de nuestro propio cuerpo de modo que las células musculares activas no pueden captar glucosa tan fácilmente como deberían. Cuando existe diabetes, o sensibilidad reducida a la insulina, el cuerpo intenta superar esta resistencia secretando más insulina del páncreas. En esa circunstancia patológica, los niveles sanguíneos de insulina son crónicamente altos, lo que inhibe a las células grasas de liberar sus almacenes de energía para permitir la pérdida de peso. La diabetes está asociada a obesidad, hipertensión, triglicéridos anormales e intolerancia a la glucosa. Las proteínas de la familia de BCL-2, tales como
15 BAD, son bien conocidas por desempeñar papeles críticos en la homeostasis del organismo al regular la muerte celular programada o apoptosis. En los últimos años, se han identificado funciones no apoptóticas novedosas para miembros de la familia de BCL-2 seleccionados y estos papeles recién identificados son vitales para mantener la homeostasis del organismo. La desregulación de las funciones apoptóticas de los miembros de la familia de BCL-2 puede conducir a una pérdida celular excesiva o a una supervivencia celular excesiva, dando lugar a enfermedades tales como neurodegeneración y cáncer, respectivamente. La desregulación de las funciones no apoptóticas de los miembros de la familia de BCL-2, tales como BAD, puede producir un fenotipo diabetogénico que no está relacionado con el papel de BAD en la fisiología de la muerte celular. La capacidad de proteínas de la familia de BCL-2 seleccionadas de conmutar entre funciones distintas es un aspecto crítico de su actividad fisiológica. Los mecanismos moleculares mediante los que consiguen papeles duales pueden estar mediados por su dominio BH3 bioactivo y, específicamente, su estado de fosforilación. Por lo tanto, la capacidad de generar compuestos selectivos que imiten los dominios BH3 fosforilados tiene un potencial terapéutico significativo en el tratamiento de enfermedades humanas.

El documento WO 1999/45128 divulga proteínas que comprenden el dominio BH3 útiles para tratar la diabetes.

Proteínas de la familia de BCL-2: puntos de control intracelulares críticos de la apoptosis

30 La muerte celular programada es una ruta conservada genéticamente esencial para un desarrollo embrionario apropiado y el mantenimiento de la homeostasis de tejido (Cory, S. y Adams, J.M. 2002. *Nat Rev Cancer* 2, 647-56). La regulación aberrante de esta ruta participa en la génesis de múltiples enfermedades humanas, incluyendo cáncer, autoinmunidad, trastornos degenerativos y diabetes. La ruta apoptótica de mamífero proporciona pruebas de la participación de orgánulos, especialmente mitocondrias (Green, D.R. y Kroemer, G. 2004. *Science* 305, 626-9).
35 Además de proporcionar la mayoría del ATP celular, las mitocondrias participan en la apoptosis al liberar el citocromo c y otros factores apoptogénicos. Una vez liberado, el citocromo c se ensambla junto con APAF-1 y caspasa 9 formando el "apoptosoma", que a su vez activa las caspasas posteriores, conduciendo en última instancia a la muerte celular (Li, P. *et al.*, 1997. *Cell* 91: 479-89). Las mitocondrias son también responsables de la respiración celular y coordinan múltiples rutas metabólicas, aunque la interrelación de estas funciones con la apoptosis ha permanecido incierta.

40 La familia de proteínas de BCL-2 constituye un punto de control crítico en la apoptosis al residir inmediatamente anteriores al daño celular irreversible, donde los miembros controlan la liberación de factores apoptogénicos de las mitocondrias (Danial, N.N. y Korsmeyer, S.J. 2004. *Cell* 116: 205-19). Varias proteínas de Bcl-2 residen en las membranas subcelulares, incluyendo la membrana externa mitocondrial, el RE y las membranas nucleares. La familia consiste tanto en agonistas como antagonistas de la muerte, que comparten homología de secuencia en uno o más segmentos conocidos como dominios de homología de BCL-2 (BH) (Figura 1). Todos los miembros antiapoptóticos, tales como BCL-2 y BCL-X_L, y un subconjunto de los miembros de la familia proapoptóticos, tales como BAX y BAK, son proteínas "multidominio" que comparten homología de secuencia con 3-4 dominios BH. El subconjunto de "solo BH3" de moléculas proapoptóticas, incluyendo BAD, BID, BIM, NOXA y PUMA, muestra
50 homología de secuencia solo en un único segmento de hélice α , el dominio BH3, que es también conocido como el dominio de muerte crítico (Wang, K. *et al.*, 1996. *Genes Dev* 10: 2859-69). BAX y BAK constituyen una vía de acceso necesaria a la ruta mitocondrial de la apoptosis porque las células doblemente deficientes en estas proteínas son resistentes a todos los estímulos apoptóticos que se señalizan mediante la ruta intrínseca (Lindsten, T. *et al.*, 2000. *Mol.Cell.* 6, 1389-99; Wei, M.C. *et al.*, 2001. *Science* 292, 727-30). Todas las moléculas de solo BH3 funcionan posteriormente a BAX y BAK, conectando las señales de muerte y supervivencia proximales con la ruta apoptótica central (Figura 2) (Cheng, E.H. *et al.*, 2001. *Mol Cell* 8, 705-11; Zong, W.X. *et al.*, 2001. *Genes Dev* 15,1481-86). Tras la recepción de las señales de muerte, BAX y BAK experimentan activación alostérica en las mitocondrias, dando como resultado la permeabilización de la membrana externa y la liberación de citocromo c (Wei,

M.C. *et al.*, 2000. *Genes Dev* 14, 2060-71) (Figura 2).

El equilibrio entre las subclases antiapoptótica y proapoptótica de las moléculas de BCL-2 fija un "reóstato" que determina la susceptibilidad a la muerte (Oltvai, Z. *et al.*, 1993. *Cell* 74, 609-19). Las moléculas proapoptóticas solo de BH3 como BAD, BID y BIM ajustan activamente este "reóstato" y su función se regula dinámicamente por distintos mecanismos, incluyendo control transcripcional y modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, la BID citosólica se activa tras escisión por caspasa 8, conduciendo a translocación mitocondrial, activación de BAX/BAK y liberación de citocromo c (Li, H. *et al.*, 1998. *Cell* 94, 491-501; Luo, X. *et al.*, 1998. *Cell* 94, 481-90, 1998). NOXA y PUMA son dianas transcripcionales de p53 con papeles seleccionados en la apoptosis inducida por estrés genotóxico (Nakano, K. *et al.*, 2001. *Mol Cell* 7, 683-94; #328; Yu, J. *et al.*, 2001. *Mol Cell* 7, 673-82). Adicionalmente, la actividad proapoptótica de BAD se inhibe por la fosforilación en respuesta a factores de crecimiento o supervivencia extracelulares (Zha, J. *et al.*, 1996. *Cell* 87, 619-28; 1996).

Aunque los estudios *in vitro* muestran que la sobreexpresión de moléculas de solo BH3 conduce a la apoptosis en una variedad de estirpes celulares, los modelos de pérdida de función en ratón indican que las proteínas de solo BH3 individuales sirven como iniciadores de la muerte celular que responden a señales seleccionadas en tipos celulares restringidos. El tipo celular y función *in vivo* específica de señal de las moléculas de solo BH3 sugieren que o bien la redundancia funcional de estas moléculas es específica del tipo de tejido o que las moléculas de solo BH3 pueden tener distintos papeles en otras rutas. Es más, descubrimientos recientes han desvelado papeles fisiológicos para proteínas de la familia de BCL-2 más allá de la apoptosis. Los siguientes son solo cuatro ejemplos de la integración de la apoptosis con las rutas homeostáticas celulares.

(i) **Las proteínas de la familia de BCL-2 y el metabolismo celular:** Se realizó anteriormente un análisis proteómico de mitocondrias de hígado, que reveló que la proteína BAD de la familia de BCL-2 reside en un complejo que contiene glucocinasa (GK) que regula la respiración de célula completa impulsada por glucosa (Danial N.N. *et al.*, 2003. *Nature* 424, 952-6) (Figura 4). El modelo genético nulo de *Bad* mostraba que BAD es necesaria para el ensamblaje del complejo y el modelo de ratón con inserción génica *Bad* 3SA no fosforilable proporcionaba pruebas de que se requiere BAD fosforilada para la actividad GK anclada a mitocondria completa. Consistentemente con el papel de BAD en el apoyo a la actividad GK, tanto los animales deficientes en *Bad* como *Bad* 3SA exhiben una homeostasis de glucosa anormal marcada por hiperglucemia en ayuno e intolerancia a la glucosa. Debido a que nulo de *Bad* y *Bad*3SA representan modelos de pérdida y ganancia de la actividad proapoptótica de BAD, respectivamente, las anomalías metabólicas comunes en estos animales sugerían que el papel de BAD en el metabolismo de la glucosa puede ser distinto de su capacidad de sensibilizar a células ante la apoptosis. Es más, los experimentos presentados en esta solicitud muestran papeles específicos para BAD tanto en páncreas como en hígado, cada uno con consecuencias fisiológicas significativas.

(ii) **La proteína BID de la familia de BCL-2 y la respuesta celular ante el daño de ADN:** En respuesta ante daño de ADN, las células o bien detienen la proliferación para permitir un tiempo suficiente de reparación de su ADN o experimentan apoptosis. La proteína proapoptótica BID funciona tanto en los puntos de control de apoptosis como de daño de ADN en las células (Zinkel, S. *et al.*, 2006. *Cell Death Differ* 13, 1351-9). La pérdida de BID da como resultado inestabilidad genómica y malignidades mieloides (Zinkel, S. *et al.*, 2003. *Genes Dev* 17, 229-39). BID es un sustrato para la cinasa de daño al ADN ATM en el núcleo y modula el punto de control intrafase S en las células con ADN dañado (Zinkel, S. *et al.*, 2005. *Cell* 122, 579-91; Kamer, I. 2005. *Cell* 122, 593-603). De forma importante, aunque se requiere el dominio BH3 de BID para su función apoptótica en las mitocondrias, es prescindible para su función de punto de control del ciclo celular en el núcleo (Zinkel, S. *et al.*, 2005. *Cell* 122, 579-91) (Figura 68).

(iii) **La comunicación cruzada entre el control de calidad de proteína y la apoptosis:** El plegamiento apropiado de proteínas es esencial para la integridad funcional de las células. Por consiguiente, las células han concebido mecanismos sofisticados para asegurar una "homeostasis de proteína" apropiada (Rutkowski, D.T. y Kaufman, R.J. 2004. *Trends Cell Biol* 14, 20-8). La acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE), también conocido como estrés del RE, activa una respuesta adaptativa celular a la que se hace referencia como UPR (respuesta a proteína no plegada). El estrés de RE está implicado en la patofisiología de múltiples enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer (Oakes, S.A. *et al.*, 2006. *Curr Mol Med* 6, 99-109). Se ha mostrado recientemente que se requieren las proteínas BAX y BAK de la familia de BCL-2 para la ejecución apropiada de las rutas de señalización implicadas en la UPR al asociarse físicamente con varios componentes de esta ruta (Hetz, C. *et al.*, 2006. *Science* 312: 572-6). Se ha propuesto que BAX/BAK sirven para ligar la UPR en el RE con la maquinaria apoptótica central en las mitocondrias y por tanto orquestan la respuesta celular ante proteínas mal plegadas mediante o bien la ejecución apropiada de una respuesta adaptativa o la muerte celular.

(iv) **Proteínas de la familia de BCL-2 y regulación de la morfología mitocondrial durante la vida y la muerte:** La forma mitocondrial y estructura reticular se regulan dinámicamente por procesos de fusión y fisión (Griparic, L. y Van der Bliek, A.M. 2001. *Traffic* 2, 235-44). Esto asegura el intercambio de material entre diferentes mitocondrias y la eliminación de aquellos orgánulos inadecuados para la función. Los cambios dinámicos en la morfología mitocondrial afectan directamente a la adecuación metabólica de la célula. Durante la apoptosis, las mitocondrias experimentan fragmentación antes de la activación de caspasa (Frank, S. *et al.*, 2001. *Dev Cell* 1, 515-25). Varias proteínas de la familia de BCL-2 están implicadas en estos procesos. Las moléculas antiapoptóticas

BCL-2/BCL-X_L tienen una actividad profusión que parece estar conservada a lo largo de la evolución. Esto coincide con su capacidad de unirse a mitofusión 2 (Mfn-2), una proteína conocida por gobernar la fusión mitocondrial (Delivani, P. *et al.*, 2005. *Mol Cell* 21, 761-73). La BAX proapoptótica regula la actividad de Mfn-2 directamente (Karbowski, M. *et al.*, 2006. *Nature* 443, 658-62). Es notable que el papel de los miembros de la familia de BCL-2 en la dinámica mitocondrial sea también esencial en células sanas que no han recibido un estímulo mortal. Se ha sugerido que se requiere el dominio BH3 de BAX para la regulación de la dinámica mitocondrial (Karbowski, M. *et al.*, 2006. *Nature* 443, 658-62). Por tanto, el mismo dominio en BAX tiene la capacidad de regular dos funciones distintas; apoptosis y forma mitocondrial.

Homeostasis de glucosa, diabetes y síndrome metabólico

La diabetes sacarina de tipo 2 (T2DM) es una enfermedad multigenética que incluye múltiples anomalías metabólicas que se manifiestan comúnmente en una tolerancia a la glucosa alterada. Los principios fisiológicos básicos de la T2DM incluyen anomalías en la producción y función de insulina (Saltiel, A.R. y Kahn, C.R. 2001. *Nature* 414, 799-806). Esto implica cambios en la función de páncreas, músculo, grasa e hígado. Las células β pancreáticas y hepatocitos son los principales sensores de glucosa en el cuerpo (Accili, D. 2004. *Diabetes* 53, 1633-42). En respuesta ante una fluctuación de la glucosa sanguínea, las células β secretan insulina de manera sensible a la dosis. La insulina a su vez estimula la captación de glucosa por tejidos periféricos tales como músculo y grasa y da pie al almacenamiento apropiado de glucosa como glucógeno en el hígado. Los islotes pancreáticos tienen también tendencia a adaptar su masa para satisfacer las demandas secretoras de insulina en el cuerpo (Bell G.I. y Polonsky K.S., 2001. *Nature* 414, 788-91; Weir G.C. *et al.*, 2001. *Diabetes* 50 supl. 1, S154-9; DeFronzo R.A., 1988. *Diabetes* 37, 667-87; Accili D. *et al.*, 2001. *Curr Mol Med* 1, 9-23). La falta de una sensibilización glucosa y/o de una adaptación de masa por los islotes apropiadas contribuye a la T2DM. Los hepatocitos sienten las fluctuaciones en la glucosa sanguínea y ajustan su función o bien a producir glucosa durante el ayuno, lo que ayuda a mantener un suministro de glucosa adecuado al cerebro, o a almacenar glucosa como glucógeno cuando los niveles de glucosa sanguínea superan su intervalo normal (Cherrington, A.D. 1999. *Diabetes* 48, 1198-1214). Además de la regulación del metabolismo de carbohidratos, la insulina afecta también al metabolismo de las grasas al suprimir la lipólisis en células grasas (DeFronzo, R.A. 2004. *Int J Clin Pract Suppl* 143, 9-21). La resistencia a la insulina es un estado en que músculo, grasa e hígado son insensibles a la acción de la insulina. El síndrome metabólico se define como una agrupación de deficiencias metabólicas que incluyen resistencia a la insulina, dislipidemia (incluyendo niveles anormales de triglicéridos plasmáticos), obesidad y diabetes (Reaven, G.M. 2004. *Diabetes Care* 27, 1011-12).

Metabolismo de glucosa y cáncer

Las células individuales dependen de la disponibilidad de factores de crecimiento/supervivencia que regulan característicamente tanto el metabolismo celular como la supervivencia celular (Plas, D.R. y Thompson, C.B. 2002. *Trends Endocrinol Metab* 13, 75-8). Metabolismo celular es un término usado para describir un grupo de reacciones químicas que tiene lugar en una célula u organismo vivo, donde los nutrientes como la glucosa se degradan procurando energía para procesos vitales. La insulina, el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1) y múltiples citocinas transducen señales a través de PI3K mediante la serina/treonina cinasa AKT y cinasas relacionadas para regular el transporte y metabolismo de glucosa (Cheatham, B. y Kahn, C.R. 1995. *Endocr Rev* 16, 117-42). La señalización posterior de AKT afecta al metabolismo de la glucosa al regular los niveles de transportadores de glucosa (Glut 1 y Glut 4) (Figura 3). Por consiguiente, los ratones que carecen de AKT2 exhiben bajos niveles de Glut4 y desarrollan una marcada resistencia a la insulina (Cho, H. *et al.*, 2001. *Science* 292, 1728-31). Un segundo mecanismo mediante el que la AKT regula el metabolismo de la glucosa es estimulando el agrupamiento de hexocinasa (HK) en las mitocondrias (Robey, R.B. y Hay, N. 2006. *Oncogene* 25, 4683-96). La hexocinasa es la enzima que cataliza la primera etapa en el metabolismo de la glucosa (glucólisis) convirtiendo la glucosa en glucosa 6-fosfato. El mecanismo molecular subyacente en la localización mitocondrial de HK no es completamente conocido. Como la hexocinasa asociada a mitocondria tiene un acceso inmediato al ATP mitocondrial y escapa de la inhibición de producto por la glucosa 6-fosfato (G6P), esto puede explicar cómo la AKT activada aumenta la actividad 6-fosforilante de glucosa (Bustamante, E. y Pedersen, P.L. 1977. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 3735-39; Arora, K.K. y Pedersen, P.L. 1988. *J Biol Chem* 263, 17422-28). La AKT activada promueve además la supervivencia al estimular la expresión de varias proteínas antiapoptóticas, tales como BCL-X_L y MCL-1 así como la fosforilación de varios actores celulares clave, incluyendo los factores de transcripción Forkhead BAD y NFkB (Datta, S.R. *et al.*, 1999. *Genes Dev* 13, 2905).

La resistencia a la apoptosis y un metabolismo celular aumentado son características comunes de los tumores. BCL-2 se descubrió originalmente debido a su translocación cromosómica en linfoma folicular. Además, los modelos de ratón de proteínas de la familia de BCL-2 indican claramente que los defectos en la apoptosis pueden ser un evento oncogénico primario (McDonnell, T.J. *et al.*, 1989. *Cell* 57, 79-88; McDonnell, T.J. *et al.*, *Nature* 349, 254-56). La translocación cromosómica en el gen *Bcl-2* encontrada en linfoma folicular en seres humanos yuxtapone la secuencia de codificación de *Bcl-2* próxima a las secuencias génicas de inmunoglobulina (Ig). De forma importante, resumir esta translocación cromosómica usando ratones transgénicos *Bcl-2-Ig* era suficiente para causar linfoma difuso de células grandes con el tiempo. Igualmente, varios hallazgos sugieren que los miembros proapoptóticos de la familia de BCL-2 pueden funcionar como supresores tumorales porque su pérdida de función contribuye a la malignidad. La incidencia aumentada de tumores del plexo coroideo en ratones nulos de *Bax* que expresan un antígeno SV40 T truncado y de leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) en ratones deficientes en *Bid* refleja su

importancia en la supervivencia celular neuronal y la homeostasis mieloide, respectivamente (Zinkel, S. *et al.*, 2003. Genes Dev 17, 229-39; Yin, C. *et al.*, 1997. Nature 385, 637-40). Los ratones nulos de *Bad* avanzan hasta linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) de origen de centro germinal (Ranger, A.M. *et al.*, 2003. Proc Natl Acad Sci USA 100, 9324-29). Esto puede reflejar un papel potencial para BAD en la regulación de la homeostasis celular de linfocitos B maduros a medida que migran a los centros germinales.

La relevancia del metabolismo celular para la malignidad se reconoció originalmente por Warburg, que señaló que los tumores exhiben a menudo altas tasas glucolíticas. La glucólisis da cuenta de un ~60 % del ATP en las células tumorales y proporciona intermedios metabólicos para la síntesis de macromoléculas que incluyen ácidos nucleicos necesarios para la síntesis de ADN y su proliferación rápida. Es más, varios oncogenes bien caracterizados en cánceres humanos, incluyendo Ras, Myc y Akt, son conocidos por orientarse a la ruta glucolítica (Semenza, G.L. 2001. Novartis Found Symp 240, 251-60). La hipótesis de Warburg sugería adicionalmente que las altas tasas glucolíticas podrían ser debidas a una respiración mitocondrial alterada; sin embargo, este hallazgo se ha probado algo variable en tumores. Estudios recientes han mostrado que incluso en presencia de una capacidad de fosforilación oxidativa (OXPHOS) totalmente funcional por las mitocondrias, las células tumorales respaldan sus demandas bioenergéticas preferentemente mediante la glucólisis (Fantin, V.R. *et al.*, 2006. Cancer Cell 9, 425-34). Se requiere esta alternancia para el mantenimiento tumoral, ya que la interferencia con la glucólisis está asociada a un aumento compensatorio de la OXPHOS concomitante con una rebaja de la capacidad proliferativa de las células tumorales. La posible razón de esta "alternancia glucolítica" en tumores puede ser que, además de proporcionar ATP a una tasa más rápida, los productos glucolíticos (principalmente piruvato) se usan como intermedios para la síntesis de ácidos grasos (Figura 3). Esto asegura que las células tumorales tengan suficiente suministro de ácidos grasos para que la síntesis de membrana nueva siga el ritmo de la alta tasa de proliferación celular. Además, la dependencia de la glucólisis en lugar de la OXPHOS asegura que los tumores puedan crecer en ausencia de oxígeno (hipoxia) antes de la vascularización (Gatenby, R.A. y Gillies, R.J. 2004. Nat Rev Cancer 4, 891-99). En varios tumores humanos, múltiples enzimas clave implicadas en el metabolismo de la glucosa exhiben una actividad aumentada cuando se comparan con tejidos normales. Estas incluyen hexocinasa (HK), fosfofructocinasa (PFK), piruvato cinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH). Los mecanismos subyacentes de la actividad aumentada se han estudiado mejor en el caso de las enzimas HK e incluyen una expresión aumentada (resultante de la amplificación génica y/o activación de promotor), una unión aumentada a mitocondrias y/o una alternancia en la expresión génica de isoformas de km alta (hexocinasa IV) a baja (hexocinasa I-III) (Rempel, A. *et al.*, 1994. Biochem J 303, 269-74; Klimek, F. *et al.*, 1993. Carcinogenesis 14, 1857-61; Mazurek, S. *et al.*, 1999. J Cell Physiol 181, 136-46). Estas observaciones subestiman la importancia de orientarse a la glucólisis o el uso de intermedios glucolíticos en rutas específicas de tumores como una estrategia terapéutica prometedora.

Pruebas recientes sugieren también que la obesidad y el síndrome metabólico están asociados a un alto riesgo de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal (Gunter, M.J. y Leizmann, M.F. 2006. J Nutr Biochem 17, 145-56), cáncer de mama (Lorincz, A.M. 2006. Endocr Relat Cancer 13, 279-92) y cáncer de próstata (O'Malley, R.L. y Taneja, S.S. 2006. Can J Urol Supl 2, 11-7). Aunque los nexos moleculares entre estas anomalías metabólicas y el cáncer no se entienden totalmente, varios estudios sugieren que los niveles plasmáticos elevados de insulina, como se observan en el estado resistente a la insulina, activan la proliferación celular en células epiteliales. Además, la insulina puede aumentar los niveles de factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), una hormona de crecimiento con actividad proliferativa y antiapoptótica significativa (Cowey, S. y Hardy, R.W. 2006. Amer J Pathol 169, 1505-22). La insulina y el IGF-1 regulan también los esteroides sexuales, que a su vez modulan la actividad de estrógeno y andrógenos y por consiguiente el desarrollo de cánceres dependientes de hormonas sexuales, incluyendo cánceres de mama y próstata (Calle, E.E. y Kaaks, R. 2004. Nat Rev Cancer 4, 579-91). Además, las hormonas producidas por células grasas, las adipocinas, tienen efectos proliferativos, angiogénicos y proinflamatorios. Las adipocinas influyen en las células cancerosas o bien directamente a través de estos efectos o indirectamente causando resistencia a la insulina (y por tanto hiperinsulinemia) (Cowey, S. y Hardy, R.W. 2006. Amer J Pathol 169, 1505-22).

Compendio

La presente invención proporciona un péptido BAD de dominio BH3 de menos de 195 aminoácidos para uso en el tratamiento o el retardo del inicio de la diabetes.

La capacidad de proteínas de la familia de BCL-2 seleccionadas de conmutar entre distintas funciones es un aspecto crítico de su actividad fisiológica. La presente invención está basada en el descubrimiento de que el miembro proapoptótico BAD de la familia de BCL-2 regula la eficacia de las mitocondrias usando glucosa como combustible a través de mecanismos que pueden ser blancos e imitarse distintamente por su capacidad de activar la maquinaria apoptótica en las mitocondrias. Tanto en hígado como en páncreas, dos tejidos principales implicados en la regulación del azúcar sanguíneo, la BAD modula la actividad de un sensor de glucosa clave en mamíferos, la glucocinasa (hexocinasa IV). Los mecanismos moleculares mediante los que la BAD consigue papeles duales están mediados por su dominio BH3 bioactivo. Específicamente, se encuentra que el estado de fosforilación de un residuo clave, que puede ser imitado y manipulado genética y químicamente, instruye a BAD a asumir una función o bien metabólica o apoptótica. La BAD fosforilada o su mimético regula la actividad glucocinasa, la respiración mitocondrial impulsada por glucosa y la secreción de insulina en células β del páncreas y simultáneamente las dota de una respuesta adaptativa ventajosa en un estado resistente a la insulina (Figura 4). Este es uno de los muchos ejemplos

proporcionados en la presente memoria en cuanto a la importancia y los beneficios de la manipulación genética y química de las rutas homeostáticas celulares y la supervivencia celular a través de reguladores de la familia de BCL-2 conocidos por portar papeles duales en la apoptosis y otras rutas fisiológicas celulares. De forma importante, esta regulación puede manipularse por un compuesto peptídico que contenga un resto fosfomimético y tenga un potencial significativo de tratamiento de enfermedades humanas.

Se describen tanto los métodos profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto con riesgo (o susceptible) de un trastorno o que tiene un trastorno asociado a un metabolismo de glucosa aberrante (p.ej., insuficiente o excesivo) o anormalidades de la ruta apoptótica extrínseca o intrínseca.

Se trata la diabetes (p.ej., de tipo I o de tipo II) o se retarda el inicio administrando a un sujeto necesitado de ello una composición que contiene un péptido BAD de dominio BH3 o mimético del mismo. El sujeto es, por ejemplo, hiperglucémico, obeso o resistente a la insulina.

Se aumenta la supervivencia de células β poniendo en contacto las células β con una composición que contiene un péptido BAD de dominio BH3 o mimético del mismo. En diversos aspectos, se ponen en contacto las células antes o después del trasplante a un sujeto.

Se induce la secreción de insulina o se aumenta la actividad glucocinasa exponiendo, p.ej. poniendo en contacto un tejido (p.ej., tejido de páncreas) o célula (p.ej., células β) con un péptido BAD de BH3 o mimético.

Se modula el crecimiento tumoral o se sensibiliza una célula tumoral ante un agente terapéutico, p.ej. agente quimioterapéutico o radiación, poniendo en contacto la célula tumoral con un péptido de dominio BH3 o mimético del mismo.

Se modula el ciclo celular o una ruta homeostática poniendo en contacto una célula con un péptido de dominio BH3 o mimético del mismo. La célula es una célula hepática o una célula neuronal.

Se fosforila el péptido de dominio BH3, péptido BAD de dominio BH3 o mimético del mismo. Preferiblemente, se estabiliza el péptido de dominio BH3 de estructura de hélice alfa o péptido BAD de dominio BH3. Por ejemplo, se estabilizan los péptidos mediante el grapado de hidrocarburos o reticulación química. El péptido BAD de dominio BH3 comprende la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1-3 o fragmentos de la misma.

Se incluye también en la invención un péptido que tiene la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1, 2 o 3, en la que X_3 está fosforilado y en la que X_1 está fosforilado.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un especialista en la materia a la que pertenece esta invención.

Resultarán evidentes otros rasgos y ventajas de la invención a partir de la siguiente descripción.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra los miembros de la familia de BCL-2 que tienen uno o más dominios de homología con BCL-2 (BH) conservados.

La Figura 2 es una representación esquemática de la ruta apoptótica intrínseca en que los orgánulos, incluyendo mitocondrias y retículo endoplásmico (RE), desempeñan papeles principales. Las moléculas de solo BH3 sirven como centinelas anteriores que responden selectivamente ante las señales de muerte específicas y regulan en última instancia la activación de BAX y BAK directamente o indirectamente. Este proceso se inhibe a su vez por los miembros antiapoptóticos de la familia de BCL-2. BAX y BAK sirven como vías de acceso para la apoptosis al regular tanto la liberación de citocromo c de las mitocondrias como la liberación de Ca^{2+} del RE.

La Figura 3 resalta el metabolismo distinto de las células cancerosas, que experimentan una alternancia glucolítica y activan la glucólisis de manera constitutiva. Véase el texto para detalles.

La Figura 4 es un esquema que muestra que el dominio BH3 de BAD puede servir para integrar las señales metabólicas celulares para involucrar a distintos conjuntos de coparticipes moleculares que determinan el destino de una célula β con respecto a la secreción de insulina frente a la apoptosis. La fosforilación de la serina 155 en el dominio BH3 de BAD instruye a la proteína a asumir un papel metabólico a través de su efecto sobre GK, respiración impulsada por glucosa y secreción de insulina.

La Figura 5 es una gráfica lineal que muestra los niveles plasmáticos de glucosa durante un análisis de pinzamiento hiperglucémico. Se elevaron los niveles de glucosa y se mantuvieron a 300 mg/dl a lo largo del análisis de ratones *Bad* +/+ (n= 10) y *Bad* -/- (n= 12).

La Figura 6 es una gráfica lineal que muestra los niveles plasmáticos de insulina en ratones *Bad* +/+ (n= 10) y *Bad* -/- (n= 12). Asteriscos: $p < 0,05$; dobles asteriscos, $p < 0,01$, prueba de t de dos colas no pareada.

La Figura 7 es una gráfica de barras que cuantifica el área bajo la curva (AUC) para la secreción de insulina a lo largo del experimento (0-120 min), o durante la fases aguda (0-30 min) y tardía (30-120 min) de secreción. Asteriscos: $p < 0,05$; dobles asteriscos, $p < 0,01$, prueba de t de dos colas no pareada.

La Figura 8 es una gráfica lineal que representa la secreción de insulina de islotes perfundidos de ratones *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$. Después de un periodo de preperfusión de 25 min con glucosa 3 mM, se perfundieron 120 islotes de cada genotipo con glucosa 3 mM y 25 mM como se indica. Después de 40 min, se conmutó la solución de perfusión a KCl 30 mM para despolarizar la membrana plasmática y liberar el conjunto total de gránulos de insulina. El contenido de ADN por islote era de 12,4 ng y de 14,6 ng para ratones *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$, respectivamente. El AUC para la primera fase de liberación (min 8-15) era de 12,50 frente a 5,98, y para la segunda fase (min 15-40) de 15,05 frente a 8,44, *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ respectivamente. Se muestran datos representativos de 3 experimentos independientes.

La Figura 9 es una gráfica de barras que demuestra la relación de ATP/ADP en islotes *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ tras un aumento de glucosa de 5,5 mM a 25 mM.

La Figura 10 es una gráfica de barras que muestra la liberación de insulina en islotes *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ en respuesta ante secretagogos. Se cultivaron islotes *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ en medios que contenían la cantidad indicada de glucosa en presencia o ausencia de ácido 2-cetoisocaproico (KIC) 10 mM, tolbutamida 0,25 mM o carbacol 0,25 mM. Se midió la secreción de insulina usando el método de incubación estática. $n = 8-11$ por grupo. El contenido de insulina por islote era de $115,1 \pm 4,64$ y de $118,49 \pm 4,09$ ng, *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$, respectivamente. Asterisco, $p < 0,05$, *Bad* $+/+$ frente a *Bad* $-/-$, prueba de t de dos colas no pareada.

La Figura 11 es una ilustración que demuestra los cambios en la intensidad de fluorescencia de TMRE de células β *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ individuales tras el aumento de la concentración de glucosa de 3 a 8 mM. Las imágenes están codificadas por color por intensidad de fluorescencia; azul (baja) y rojo (alta).

La Figura 12 es una gráfica de barras que muestra los cambios de $\Delta\Psi$ de células β *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ individuales después de la adición de KIC 10 mM en presencia de glucosa 3 mM.

La Figura 13 es una gráfica de barras que demuestra la fluorescencia de NADH como indicativo de actividad glucocinasa en homogeneizados de islotes primarios aislados de ratones *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$.

La Figura 14 es un diagrama de barras que muestra la secreción de insulina en islotes *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ perfundidos con dosis crecientes de glucosa. Dobles asteriscos, $p < 0,01$, prueba de t de dos colas no pareada, islotes *Bad* $+/+$ frente a *Bad* $-/-$ para la concentración de glucosa indicada.

La Figura 15 es un diagrama de barras que demuestra la secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG) en islotes *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ infectados con adenovirus que expresan GFP sola, GFP-BAD o GFP-BAD L $\rightarrow$ A. $n = 10-15$ por grupo. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes con dos preparaciones independientes de disoluciones madre víricas.

La Figura 16 es una gráfica de barras que muestra la SIEG en ratones *Bad* $+/+$ o animales que expresan mutantes no fosforilables de BAD (*Bad* 3SA y *Bad* S155A). n por grupo: *Bad* $+/+$ ($n = 10$), *Bad* 3SA ($n = 8$), *Bad* S155A ($n = 12$).

La Figura 17 es un diagrama de barras que demuestra la SIEG en islotes *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ tratados con 3 μ M de hélices alfa estabilizadas de dominios BCL-2 (SAHB) indicadas enumeradas en la Figura 18 o control de vehículo (DMSO). $n = 8$ por grupo.

La Figura 18 es un diagrama que enumera los compuestos de SAHB usados en 18-2. Los residuos L151 y D156 conservados en los dominios BH3 de BAD y BID y S155 están marcados con recuadros. Se muestran los residuos alterados en diferentes compuestos de SAHB. N_L en SAHB_A de BID: norleucina; *: el aminoácido no natural S5 (véase la Figura 33). Se muestra la colección de truncamiento de compuestos BAD de BH3 y su capacidad de unirse a BCL-X_L. Se proporciona la lista completa de derivados de SAHB de BAD generados hasta la fecha, incluyendo los compuestos fosfomiméticos y los compuestos para captura de diana e inmunoprecipitación basada en SAHB o reticulación.

La Figura 19 es una gráfica de barras que muestra el efecto de los compuestos de SAHB sobre los cambios inducidos por la glucosa en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$).

La Figura 20 es un diagrama de barras que demuestra la fluorescencia de NADH como indicativo de la actividad glucocinasa en homogeneizados preparados a partir de células β MIN6 tratadas durante 4 horas con 3 μ M de los compuestos indicados. Asterisco: $p < 0,05$ SAHB_A de BAD frente a DMSO, cruz doble: $p < 0,01$ SAHB_{A(S $\rightarrow$ PS)} de BAD o SAHB_{A(S $\rightarrow$ D)} de BAD frente a SAHB_A de BAD.

La Figura 21 es una gráfica de barras que representa los niveles de ARNm de BAD de islote en ratones de tipo silvestre con dieta rica en grasas (HFD) durante 16 semanas o dieta de control.

La Figura 22 es una gráfica lineal que demuestra los niveles sanguíneos de glucosa semanales de una cohorte de

Bad $+/+$ y *Bad* $-/-$ (n= 20) dispuestos con HFD durante 16 semanas.

La Figura 23 es un gráfico de puntos que representa los pesos corporales semanales de una cohorte de *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ (n= 20) dispuestos con HFD durante 16 semanas.

5 La Figura 24 es una gráfica de barras que ilustra el área porcentual de islote en las secciones pancreáticas preparadas a partir de las cohortes con control o HFD. Asterisco: $p < 0,05$, *Bad* $-/-$ frente a *Bad* $+/+$ con HFD.

La Figura 25 es una ilustración que demuestra el análisis inmunohistoquímico de secciones pancreáticas representativas preparadas a partir de las cohortes anteriores reveladas con anticuerpo anti-insulina.

La Figura 26 es un gráfico de barras que indica los niveles sanguíneos de insulina con alimentación de *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ con control o HFD durante 8 semanas.

10 La Figura 27 es una gráfica lineal que representa los niveles sanguíneos de glucosa semanales de una cohorte de *Bad* $+/+$ y *Bad* 3SA (n= 8) dispuestos con HFD durante 16 semanas.

La Figura 28 es un diagrama de puntos que muestra los pesos corporales de una cohorte de *Bad* $+/+$ y *Bad* 3SA (n= 8) dispuestos con HFD durante 16 semanas.

15 La Figura 29 es una gráfica de barras y una fotografía que muestran el área porcentual de islote en las secciones pancreáticas preparadas a partir de las cohortes mostradas en (27-28) anteriormente.

La Figura 30 es un gráfico de barras que demuestra los niveles sanguíneos de insulina con alimentación de *Bad* $+/+$ y *Bad* 3SA con control o HFD durante 8 semanas. Asterisco: $p < 0,05$, *Bad* 3SA frente a *Bad* $+/+$ con HFD.

20 La Figura 31 es una fotografía de una transferencia Western que muestra los resultados de incubar anticuerpo anti-glucocinasa (carriles 1-3) o IgG de conejo de control (carriles 4-6) con la fracción de membrana pesada (HM) enriquecida en mitocondrias solubilizada con CHAPS preparada a partir de células β MIN6.

La Figura 32 es una fotografía de una transferencia Western que muestra los resultados de incubar la fracción de membrana pesada (HM) enriquecida en mitocondrias solubilizada con CHAPS de células β de MIN6 con perlas de agarosa acopladas con microcistina (MC). Se resolvieron las proteínas unidas por PAGE-SDS y se inmunotifaron con los anticuerpos indicados. Sirven como control perlas no acopladas (ctrl).

25 La Figura 33 es un esquema de la estrategia sintética de grapado de hidrocarburos. Se efectuó la síntesis asimétrica de S-N-(carbamato de 9-fluorenilmetilo)-2-(4'-penteril)alanina ("S5") como se describe anteriormente. Se generaron los compuestos de SAHB reemplazando dos aminoácidos de la secuencia de BH3 por aminoácidos no naturales en localizaciones discretas que flanquean 3 aminoácidos naturales (posiciones i, i+4). Se efectuaron la síntesis peptídica, la metátesis olefínica, la derivatización con FITC, la purificación por HPLC en fase inversa y el microanálisis como se reseña anteriormente para SAHB de BID. Se reemplazó la metionina nativa de BH3 de BID por norleucina (N_L) en SAHB de BID debido a la incompatibilidad del azufre con la reacción de metátesis catalizada por rutenio.

La Figura 34 es un gráfico de puntos que muestra que los espectros de diroísmo circular demuestran una helicidad α potenciada de las SAHB en comparación con sus correspondientes péptidos no modificados.

35 La Figura 35 es una gráfica lineal y un gráfico de puntos que ilustran las afinidades de unión de los compuestos de SAHB a BCL-X_L Δ C purificada o proteína GST de control.

La Figura 36 es un esquema que muestra la estrategia de orientación a inserción génica. El mapa del locus de BAD marca los sitios de restricción X, Xba1; B, BamH1; EV, EcoRV; S, SmaI; E, EcoRI y los recuadros denotan exones. La mutación de serina 155 a alanina se ligó a RFLP (EcoRI) y se insertó un módulo PGK-NEO con sitios FRT flanqueados (triángulos azules) posteriormente a la 3' UTR. Se escindió el módulo NEO después de la generación de *Bad* S155A^{(neo)/+} por cruzamiento con ratones transgénicos de FlpE.

40 La Figura 37 es una fotografía de una transferencia Western que verifica la orientación apropiada. Se usaron las sondas indicadas en la Fig. 36 para mostrar la inserción del módulo FRT-Neo-FRT (panel izquierdo) y la integración de RFLP de EcoRI en BAD (panel derecho). Los clones marcados con (*) eran positivos tanto de inserto como de RFLP.

La Figura 38 es una fotografía que muestra el fragmento de PCR para el marcador de mutación RFLP de S155A después de digestión con EcoRI usado para genotipar las progenies de S155A de *Bad* S155A^{(neo)/+} cruzados con ratones FlpE.

50 La Figura 39 es una gráfica lineal que demuestra los niveles sanguíneos de glucosa después de una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT) en que, después de una noche de ayuno, se inyectó a los ratones 1 g/kg de glucosa i.p. (tiempo 0). Se midieron los niveles sanguíneos de glucosa e insulina antes y a 5, 15 y 30 min en la ipGTT. n por grupo: WT= 10 y *Bad* S155A= 10. Asteriscos: $p < 0,05$.

La Figura 40 es una gráfica lineal que representa los niveles sanguíneos de insulina después de una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal como en la Fig. 39. Asteriscos: $p < 0,05$; dobles asteriscos en (e), $p < 0,01$, prueba de t de dos colas no pareada, *Bad* +/+ frente a *Bad* S155A.

5 La Figura 41 es una gráfica de barras que demuestra el efecto de la exposición crónica a alta glucosa o STZ en islotes *Bad* -/-. Se infectaron *Bad* +/+ *Bad* +/+ con adenovirus que expresan GFP sola o GFP y BAD, respectivamente. Se recogieron manualmente entonces los islotes que expresan GFP en cada grupo y se cultivaron durante 48 horas en medio que contenía 5,5 mM (glucosa normal), 16,7 mM (glucosa alta) o STZ 5,5 mM y 1,2 mM. Se dispersaron los islotes por tripsinización leve y se valoró la viabilidad por exclusión con azul de tripano.

10 La Figura 42 es una gráfica de barras que demuestra el efecto de la exposición crónica a glucosa alta o STZ. Se expusieron islotes *Bad* +/+ y *Bad* 3SA a glucosa alta crónica o STZ y se valoró la viabilidad como anteriormente. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes leídos por triplicado. El asterisco compara *Bad* -/- frente a *Bad* +/+, o *Bad* 3SA frente a *Bad* +/.

15 La Figura 43 es una fotografía que muestra la microscopia de fluorescencia de secciones pancreáticas preparadas a partir de ratones *Bad* -/- y *Bad* +/+ el día 0 o el día 7 después de tratamiento con STZ teñidas doblemente con anticuerpos de insulina y glucagón.

La Figura 44 es una fotografía que muestra la inmunohistoquímica de secciones pancreáticas del experimento de la Figura 43 tras tinción con anticuerpos de insulina o caspasa 3 activa seguida de contratinción con hematoxilina y eosina.

20 La Figura 45 es un diagrama de barras que demuestra los niveles séricos de insulina el día 0 y el día 7 en la misma cohorte de ratones *Bad* +/+ (n= 7) y *Bad* -/- (n= 8) usada en las (Fig. 43-44). Asterisco, $p < 0,05$; dobles asteriscos, $p < 0,01$, prueba de t de dos colas no apareada.

La Figura 46 es una gráfica de barras que muestra los niveles de glucosa el día 0 y el día 7 en la misma cohorte de ratones *Bad* +/+ (n= 7) y *Bad* -/- (n= 8) usada en las (Fig. 43-44). Asterisco. $p < 0,05$.

25 La Figura 47 es un histograma que muestra el número de islotes y su distribución de tamaño en secciones pancreáticas representativas preparadas a partir de ratones *Bad* +/+ después de 16 semanas con HFD. Histograma que muestra el número de islotes y su distribución de tamaño en secciones pancreáticas representativas preparadas a partir de ratones *Bad* +/+ después de 16 semanas con HFD. Cada rombo representa un islote que se inmunoteñía con anticuerpo anti-insulina. El eje vertical demuestra el área de píxeles asignada a los islotes rastreada por el programa de software MetaMorph. El eje horizontal denota los islotes. Para cada par representativo de genotipos mostrado (*Bad* +/+ frente a *Bad* -/- y *Bad* +/+ frente a *Bad* 3SA), era comparable el área de sección total. Las secciones de *Bad* -/- contienen significativamente más islotes para el mismo área de tejido total, mientras que los ratones *Bad* 3SA tienen significativamente menos islotes. Se analizaron múltiples secciones de al menos 3 animales por grupo de forma similar.

35 La Figura 48 es un histograma que demuestra el número de islotes y su distribución de tamaño en secciones pancreáticas representativas preparadas a partir de ratones *Bad* -/- después de 16 semanas con HFD.

La Figura 49 es un histograma que muestra el número de islotes y su distribución de tamaño en secciones pancreáticas representativas preparadas a partir de ratones *Bad* +/+ después de 16 semanas con HFD.

La Figura 50 es un histograma que indica el número de islotes y su distribución de tamaño en secciones pancreáticas representativas preparadas a partir de ratones *Bad* 3SA después de 16 semanas con HFD.

40 La Figura 51 describe brevemente el método de pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico y la fórmula usada para calcular diversos parámetros metabólicos.

La Figura 52 es una gráfica lineal que documenta que se alcanzaba la euglucemia y se mantenía en ratones *Bad* +/+ (n= 7) y *Bad* -/- (n= 9) a lo largo del periodo de pinzamiento.

45 La Figura 53 es una gráfica lineal que muestra la tasa de infusión de glucosa (GINF) en ratones *Bad* +/+ (n= 7) y *Bad* -/- (n= 9) sometidos a análisis de pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico.

La Figura 54 es un diagrama de barras que demuestra la producción hepática de glucosa calculada usando la fórmula de la Figura 51 (PHG).

50 La Figura 55 es un diagrama de barras que muestra el índice de sensibilidad a la insulina periférica, que incluye captación de glucosa, glucólisis y síntesis de glucógeno, todo medido usando la fórmula proporcionada en la Figura 51.

La Figura 56 es un diagrama de barras que documenta la captación de glucosa en músculo esquelético obtenido de animales *Bad* +/+ y *Bad* -/- sometidos a análisis de pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico.

La Figura 57 es un diagrama de barras que muestra la captación de glucosa en tejidos adiposos blancos aislados de animales *Bad* +/+ y *Bad* -/- sometidos a análisis de pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico.

La Figura 58 es un diagrama de barras que muestra el efecto de la insulina sobre el ácido graso libre (FFA) plasmático en animales *Bad* +/+ y *Bad* -/- sometidos a análisis de pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico.

- 5 La Figura 59 es un diagrama de barras que muestra el efecto de la insulina sobre los lípidos plasmáticos en animales *Bad* +/+ y *Bad* -/- sometidos a análisis de pinzamiento euglucémico-hiperinsulinémico.

La Figura 60 es una fotografía que muestra el análisis histoquímico de una sección de tejido preparada a partir de hígados extraídos de ratones *Bad* -/- alimentados con dieta de control durante 16 semanas.

- 10 La Figura 61 es una fotografía que muestra el análisis inmunohistoquímico de una sección de tejido preparada a partir de hígados extraídos de ratones *Bad* 3SA alimentados con dieta rica en grasas durante 16 semanas.

La Figura 62 es una fotografía que muestra el análisis inmunohistoquímico de una sección de tejido preparada a partir de hígados extraídos de ratones *Bad* +/+ alimentados con dieta de control durante 16 semanas.

La Figura 63 es una fotografía que muestra el análisis inmunohistoquímico de una sección de tejido preparada a partir de hígados extraídos de ratones *Bad* -/- alimentados con dieta rica en grasas durante 16 semanas.

- 15 La Figura 64 es una fotografía que muestra el análisis inmunohistoquímico de una sección de tejido preparada a partir de hígados extraídos de ratones *Bad* +/+ alimentados con dieta rica en grasas durante 16 semanas.

La Figura 65 es una fotografía que muestra el análisis inmunohistoquímico de una sección de tejido preparada a partir de hígados extraídos de ratones *Bad* +/+ alimentados con dieta rica en grasas durante 16 semanas.

- 20 La Figura 66 representa un modelo para la función dual de BID en apoptosis y punto de control del daño de ADN. Ambos papeles se regulan mediante la modificación postraduccional de BID en distintos residuos. Posteriormente a la señalización de receptor de muerte, se escinde BID por la caspasa 8. Se modifica entonces la BID escindida mediante la adición de restos lipídicos (grupos miristoílo) y se transloca a mitocondrias para activar la apoptosis. Por otro lado, posteriormente al daño de ADN, se transloca la BID al núcleo, donde se modifica por fosforilación por las cinasas de punto de control del ciclo celular ATM/ATR en residuos específicos cercanos a su dominio BH3. Esta modificación permite a BID funcionar en la detención del ciclo celular (punto de control intrafase S), lo que en última instancia evita que las células reparen su ADN dañado antes de la proliferación.

- 25 La Figura 67 enumera los sitios de fosforilación en las secuencias de BH3 de múltiples proteínas de la familia de BCL-2 definidos mediante bioinformática y probados posteriormente. La derivatización de estos sitios en compuestos miméticos de BH3 permitirá la manipulación de las proteínas de la familia de BCL-2 que conmutan entre apoptosis y otra función homeostática.

- 30 La Figura 68 es una fotografía de una proteína teñida en gel con Coomassie que muestra la metodología de reticulación para ensayos de captura de diana usando la secuencia de BH3 de BAD. Los ensayos de captura de diana usan la metodología de reticulación y la secuencia de BH3 de BAD fotoactivable. Se incubaron 20 μ M del derivado de FITC de un péptido BAD de BH3 que contenía 4-benzoilfenilalanina (véase el panel de captura de diana en la Figura 18) con 5 μ M de BCL-X_L marcada con GST purificada en el paso de luz de 350 nm de un transiluminador TLC durante 135 min. La BCL-X_L tratada con vehículo (DMSO) servía como control. Se cargaron las proteínas en un gel PAGE-SDS y se tiñeron con Coomassie. La fotoactivación da como resultado la reticulación covalente de BCL-X_L y el péptido BH3, dando como resultado un desplazamiento de la movilidad de la proteína BCL-X_L como se indica.

- 35 La Figura 69 es una fotografía de una proteína en gel sometida a un barrido de gel fluorescente que muestra la metodología de reticulación para ensayos de captura de diana usando la secuencia BH3 de BAD. Se detecta el complejo proteico que contiene BCL-X_L reticulado con el péptido FITC BH3 de BAD.

- 40 La Figura 70 es una fotografía de una inmunotransferencia que muestra la glucocinasa como una diana directa de BH3 de BAD. Se preincubaron 20 μ M de compuestos de SAHB de BAD que contenían un resto benzofenona fotoactivable con extractos preparados a partir de células INS-1 durante 30 min a 23 °C seguido de exposición a luz de 350 nm durante 2 h a 4 °C. Se detectó el enlace covalente de las SAHB a GK por inmunoprecipitación de GK (IP). Se eluyó el material unido, se fraccionó en gel y se transfirió (WB) usando anticuerpos anti-GK o anti-FITC.

- 45 La Figura 71 es una fotografía de una inmunotransferencia que muestra la competición de los compuestos de SAHB de BAD con BAD recombinante de longitud completa por la unión a glucocinasa recombinante. Se cotradujeron BAD y GK usando transcripción-traducción *in vitro* (TTIV) en un sistema de lisado de reticulocito de conejo. Se coinmunoprecipitaron GK y BAD en presencia de 30 μ M de compuestos de SAHB o DMSO en tampón RIPA usando las columnas de afinidad de GK descritas en la Fig. 31. Se resolvieron los complejos inmunitarios en PAGE-SDS y se sondearon (WB) con anticuerpo anti-BAD.

Descripción detallada

La presente invención está basada en parte en el descubrimiento de que el miembro proapoptótico BAD de la familia de BCL-2 reside en un complejo que contiene glucocinasa que regula la respiración impulsada por glucosa. Más específicamente, la invención está basada en el descubrimiento de un papel fisiológico de BAD en la respiración mitocondrial estimulada por glucosa, la sensibilización ante glucosa y la secreción de insulina estimulada por glucosa por células β pancreáticas mediante la modulación de la glucocinasa de células β . La función novedosa de BAD es específicamente dependiente de la fosforilación de su secuencia de BH3, definida anteriormente como un dominio de muerte esencial. Se usaron versiones estabilizadas químicamente de un péptido BAD con dominio BH3 fosforilado para restaurar la actividad glucocinasa, y se corrigieron la respiración mitocondrial impulsada por glucosa y la secreción de insulina en islotes deficientes en BAD. Por tanto, el dominio BH3 de BAD modula dos funciones separadas: apoptosis y metabolismo. De forma importante, la fosforilación de un residuo de serina definido en la secuencia de BH3 constituye un interruptor molecular que instruye a BAD a asumir un papel metabólico. La señalización por factores de crecimiento y supervivencia afecta tanto al metabolismo celular como a la maquinaria apoptótica central. Múltiples estudios recientes han asignado papeles novedosos a las proteínas de la familia de BCL-2 en rutas homeostáticas normales, tales como metabolismo de la glucosa, homeostasis de Ca^{2+} en RE y respuesta ante el daño de ADN. Si estos papeles novedosos representan funciones separadas para estas proteínas, que son conocidas de otro modo como reguladoras de la muerte celular, está bajo investigación activa. La proteína proapoptótica BAD pertenece a un subconjunto de miembros de la familia de BCL-2 que comparten un motivo BH3 de hélice α anfipática conservado. La actividad proapoptótica de BAD se regula mediante la fosforilación mediada por cinasas localizadas en la membrana mitocondrial. Para dilucidar el papel de BAD en la mitocondria, se realizó el análisis proteómico de mitocondrias de hígado, que reveló que BAD reside en un complejo que contiene glucocinasa (GK) que regula la respiración impulsada por glucosa. El modelo genético nulo de *Bad* mostraba que BAD es necesaria para el ensamblaje del complejo y que los ratones con inserción génica *Bad* 3SA no fosforilable proporcionaban pruebas de que la BAD fosforilada es necesaria para la activación completa de GK anclada a mitocondria (Danial N.N. *et al.*, 2003. *Nature* 424, 952-6). Consistentemente con un papel de BAD en la modulación de la actividad GK, tanto los animales deficientes en *Bad* como *Bad* 3SA exhibían una homeostasis de glucosa anormal. Debido a que nulo de *Bad* y *Bad* 3SA representan modelos de pérdida y ganancia de función para la actividad proapoptótica de esta molécula, respectivamente, las anomalías metabólicas comunes en estos animales sugerían que el papel de BAD en el metabolismo de la glucosa puede ser distinto de su capacidad de sensibilizar a células ante la apoptosis. La GK se expresa principalmente en hepatocitos y células β pancreáticas y constituye un componente clave de la maquinaria de sensibilización de glucosa de mamífero. En el hígado, la GK controla la síntesis de glucógeno y la salida de glucosa, mientras que en el páncreas regula la secreción de insulina por células β . Por tanto, el defecto de homeostasis de glucosa observado en modelos de ratón *Bad* puede derivar de deficiencias en cualquiera o ambos tejidos. Los enfoques genéticos y las herramientas químicas novedosas dilucidaban un papel esencial de BAD en la regulación de la secreción de insulina estimulada por glucosa (SIEG) por células β .

Por consiguiente, la invención proporciona métodos de tratamiento, alivio de un síntoma o retardo del inicio de diabetes y obesidad mediante la administración a un sujeto de un péptido BAD con dominio BH3 derivatizado o mimético del mismo. Además, la invención proporciona métodos de mejora de la supervivencia y la función de trasplantes de islote en sujetos que padecen la pérdida de masa de células β .

PÉPTIDOS BH3 Y MIMÉTICOS

Un péptido BH3 contiene el dominio BH3 de hélice α anfipática de la proteína de la familia de Bcl-2. Un péptido BH3 incluye un dominio BH3 de BID, NOXA, BAD, BNIP3, HRK, NIX, SPIKE, BAK, BAX, BOK, BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, PUMA, BIK, BIM y otros homólogos que contienen el dominio BH3. No está implicada una longitud particular por el término "péptido". Se entiende por el término "péptido" dos o más aminoácidos naturales o sintéticos ligados por un enlace covalente (p.ej. un enlace amida).

Un péptido de dominio BH3 es menor de 195 aminoácidos de longitud, p.ej. menor o igual a 150, 100, 75, 50, 35, 25, 15 o 10 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, el péptido de dominio BH3 es menor de 25 aminoácidos. El término "péptido" incluye además dos o más aminoácidos naturales o sintéticos ligados por un enlace covalente (p.ej., un enlace amida). El término "aminoácido" hace referencia a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. Los aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, ambos isómeros D y L de los 20 aminoácidos comunes de origen natural encontrados en péptidos (p.ej., A, R, N, C, D, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V (como se conocen por las abreviaturas de una letra)) así como los aminoácidos de origen natural y origen no natural preparados por síntesis orgánica u otras rutas metabólicas.

Los péptidos BH3 están fosforilados en uno o más residuos de serina, treonina o tirosina. Como alternativa, los péptidos BH3 son miméticos de fosfopéptidos. Se entiende por mimético de fosfopéptido que el mimético de fosfopéptido se aproxima estrechamente a la funcionalidad del residuo fosforilado natural. Por ejemplo, los aminoácidos fosforilables se reemplazan por aminoácidos que imitan la carga negativa del átomo de fósforo, tales como ácido glutámico o ácido aspártico. Preferiblemente, el mimético de fosfopéptido es químicamente estable (p.ej., resistente a la desfosforilación por fosfatasas). Por ejemplo, el mimético de fosfopéptido contiene un

ligamiento no hidrolizable entre el esqueleto de carbono y el átomo de fósforo. Esto se consigue con una molécula sintética que comprende la estructura atómica aminoácida con un ligamiento no hidrolizable con un resto fosfato, en lugar del puente de oxígeno de origen natural. Por ejemplo, un grupo CF₂ liga el aminoácido con el fosfato. Pueden generarse mediante este enfoque miméticos de varios aminoácidos que están fosforilados en la naturaleza.

Se generan miméticos de fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina disponiendo un ligamiento CF₂ desde el carbono apropiado al resto fosfato. Opcionalmente, la molécula mimética ácido L-2-amino-4-(dietilfosfono)-4,4-difluorobutanoico sustituye a la fosfoserina (Otaka *et al.*, *Tetrahedron Letters* 36: 927-930 (1995)), el ácido L-2-amino-4-fosfono-4,4-difluoro-3-metilbutanoico sustituye a la fosfotreonina y L-2-amino-4-fosfono(difluorometil)fenilalanina sustituye a la fosfotirosina. Son conocidos por los especialistas en la materia otros métodos de elaboración de un ligamiento no hidrolizable o fosfomimético estable de otro modo.

Los fosfomiméticos de serina, treonina y tirosina emplean especies que imitan las propiedades electrónicas del grupo fosfato así como evitan la hidrólisis del grupo fosfato por fosfatasas celulares endógenas, manteniendo por tanto las propiedades biológicas y la actividad del fosfopéptido. Hay dos enfoques que poseen las propiedades anteriores actualmente en uso establecido por la comunidad de investigación biomédica.

El ácido aspártico y el ácido glutámico se aproximan ambos a la cadena lateral y la carga negativa neta de fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina, y han encontrado utilidad por su facilidad de incorporación y simplicidad (Hao, Lowy *et al.* 1996; Fu, Subramanian *et al.* 2000; Modrof, Moritz *et al.* 2001). Las imitaciones más exactas de miméticos de fosfoserina/fosfotreonina/fosfotirosina no hidrolizables incluyen fosfonometilenalanina (Pma), (Shapiro, Buechler *et al.* 1993), fosfonodifluorometilenalanina (Pfa), (Berkowitz, Eggen *et al.* 1996), fosfonometilenfenilalanina (Pmp), (Burke, Russ *et al.* 1991) y fosfonodifluorometilenfenilalanina (F2Pmp), (Burke, Smyth *et al.* 1994), sustituyendo ambos el oxígeno lábil del grupo fosfato por un carbono no lábil. Estos fosfomiméticos más precisos son más útiles porque mantienen más del potencial de unión por hidrógeno nativo del que sería posible con fosfomiméticos de ácido aspártico y ácido glutámico.

Un péptido BAD de dominio BH3 incluye un dominio BH3 de hélice α de BAD. Un péptido BAD de dominio BH3 ejemplar incluye la secuencia:

[Xaa]_n YGR ELRX₁X₂X₃DX₁ [Xbb]_n (SEQ ID NO:1)

en la que X₁ y X₂ son cualquier aminoácido no natural, X₃ es G, D, E, S, T, Y o fosfomiméticos de los mismos. Por ejemplo, X₂ es norleucina.

Xaa y Xbb son independientemente un aminoácido y n es un entero de 0-10.

Son otros ejemplos de BH3 similar a BAD al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos de

1 11 21
NLWAAQRYGR ELRRMSDEFV DSFKK (SEQ ID NO:2);

1 11 21
NLWAAQRYGR ELRRMDDEFV DSFKK (SEQ ID NO:3)

o las secuencias mostradas en la Figura 18.

En ocasiones preferidas, X₁ es o bien S5 o ácido aminobutírico y X₂ es preferiblemente norleucina. Cuando X₁ es S5, los aminoácidos S5 pueden reaccionar formando una reticulación toda de hidrocarburo. Preferiblemente, el aminoácido X₃ está modificado de tal modo que contenga una carga negativa neta que imita un resto fosfato o está modificado de tal modo que se enmascare la carga negativa neta de modo que entre en la célula. Por ejemplo, el aminoácido X₃ está fosforilado, sulfonado, oxigenado, nitrado o fluorado o un equivalente funcional de los mismos. Opcionalmente, el aminoácido X₃ ha experimentado esterificación.

En diversas ocasiones, [Xaa]_a es R, QR, AQR, AAQR, WAAQR, LWAAQR o NLWAAQR y [Xbb]_a V, VD, VDS, VDSF, VDSFK o VDSFKK.

Un péptido BID de dominio BH3 incluye un dominio BH3 de hélice α de BID. Un péptido BID de dominio BH3 ejemplar incluye la secuencia:

EX₁QEDIIRNIARHLAX₂VGDX₃MDR X₄I (SEQ ID NO:4)

en la que X₁ y/o X₄ son G, D, E, S, T o Y y X₂ o X₃ es cualquier aminoácido natural o no natural. En ocasiones preferidas, X₂ y X₃ son ambos S5. Cuando X₂ y X₃ son ambos S5, el aminoácido S5 puede hacerse reaccionar formando una reticulación toda de hidrocarburo. Preferiblemente, el aminoácido X₁ está modificado de tal modo que contenga una carga negativa que imite un resto fosfato o está modificado de tal modo que se enmascare la carga negativa de modo que pueda entrar en la célula. Por ejemplo, el aminoácido X₁ y/o X₄ está fosforilado, sulfonado, oxigenado, nitrado o fluorado. Por ejemplo, X₁ es D, E, S, T o Y. En algunas ocasiones, X₂ es Q y/o X₃ es S, T o Y. Opcionalmente, cuando X₃ es S, T o Y, el aminoácido está fosforilado, sulfonado, oxigenado, nitrado o fluorado.

Se incluyen también en la invención péptidos BH3 derivados de otros péptidos que contienen el dominio BH3; estos péptidos y los fosfomiméticos de los mismos son útiles en la modulación de actividades enzimáticas (p.ej., cinasas y fosfatasas) e interacciones proteína-proteína (p.ej., interacciones MCL-I/BAK) y por lo tanto están implicados en la manipulación de muchas rutas homeostáticas celulares (véase la Figura 67). Los péptidos de BH3 ejemplares

5

BH3 de BNIP3 DIERRKEVEX₁ILKKNX₁X₁WIWX₁WX₁X₁R (SEQ ID NO: 5)

BH3 de HRK X₁X₁AAQLX₁AARLKALGDELHQRX₁MWRRRARX₁ (SEQ ID NO: 6)

BH3 de NIX X₁X₁QX₁EEEVVEGEKEVEALKKSADWVX₁DWX₁X₁RPENIPPKEF (SEQ ID NO: 7)

BH3 de BID X₁QEDIIRNIARHLAQVGDSDMRX₁I (SEQ ID NO: 8)

BH3 de NOXA AELEVECA₁QLRRFGDKLNFQRKLLNLIX₁ (SEQ ID NO: 9)

BH3 de SPIKE LEAELDALGDELLADEDX₁X₁Y (SEQ ID NO: 10)

BH3 de BAK LQPX₁X₁X₁MGQVGRQLAIIGDDINRRX₁DX₁E (SEQ ID NO: 11)

BH3 de BAX QDAX₁TKKLX₁ECLKRIGDELX₁N (SEQ ID NO: 12)

BH3 de BOK PGRLAEVCAVLLRLGDELEMIRPX₁ (SEQ ID NO: 13)

BH3 de BCL-2 X₁PVPPVVHLX₁RQAGDDFX₁RRYRRD (SEQ ID NO: 14)

BH3 de BCL-XL AVKQALREAGDEFELRX₁RAAF X₁ (SEQ ID NO: 15)

BH3 de BCL-W HQAMRAAGDEFETRFRRX₁FX₁D (SEQ ID NO: 16)

BH3 de MCL-1 X₁X₁RKALEX₁LRRVGDGVQRNH (SEQ ID NO: 17)

en las que X₁ es cualquier aminoácido natural o no natural. Preferiblemente, X₁ es, E, D S, T o Y.

En estas y otras ocasiones, los aminoácidos no naturales (p.ej., S5) en los péptidos BH3 están localizados o bien anterior o posteriormente a X₁, permitiendo el grapado de hidrocarburos. Los aminoácidos no naturales están 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos separados entre sí. Por ejemplo, los dos aminoácidos no naturales están uno o dos giros helicoidales (concretamente, aproximadamente 3, 4 o aproximadamente 7 aminoácidos) separados entre sí. Por consiguiente, los aminoácidos colocados en i e i+3; i e i+4 o i e i+7 son candidatos ideales para modificación química y reticulación. Por tanto, por ejemplo, cuando un péptido tiene la secuencia Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, Xaa₉, ... las reticulaciones entre Xaa₁ y Xaa₄, o entre Xaa₁ y Xaa₅, o entre Xaa₁ y Xaa₈ son útiles, así como las reticulaciones entre Xaa₂ y Xaa₅ o entre Xaa₂ y Xaa₆ o entre Xaa₂ y Xaa₉, etc.

Los péptidos BH3 pueden ser polímeros de L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de ambos. Por ejemplo, en diversas realizaciones, los péptidos son D-retroinversopéptidos. El término "isómero retroinverso" hace referencia a un isómero de un péptido lineal en que se invierte la dirección de la secuencia y se invierte la quiralidad de cada residuo aminoacídico. Véanse, p.ej., Jameson *et al.*, *Nature*, 368, 744-746 (1994); Brady *et al.*, *Nature*, 368, 692-693 (1994). El resultado neto de combinar enantiómeros D y síntesis inversa es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida están intercambiadas, mientras que se conserva la posición de los grupos de cadena lateral en cada carbono α . A menos que se afirme específicamente otra cosa, se supone que cualquier secuencia de L-aminoácido dada de la invención puede elaborarse hasta un D-retroinversopéptido sintetizando una inversión de la secuencia para la correspondiente secuencia de L-aminoácido nativo.

Opcionalmente, los péptidos BH3 incluyen aminoácidos modificados químicamente, incluyendo análogos aminoacídicos (tales como penicilamina, 3-mercapto-D-valina), aminoácidos no proteogénicos de origen natral (tales como por ejemplo norleucina, β -alanina, ornitina, taurina, hidroxiprolina o hidroxilisina) y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la materia por ser características de un aminoácido. El término "proteogénico" indica que el aminoácido puede incorporarse a la proteína de una célula mediante rutas metabólicas bien conocidas. Adicionalmente, los péptidos BH3 incluyen aminoácidos no naturales tales como los enantiómeros R y S del aminoácido olefínico en el carbono 5 y el enantiómero S del aminoácido olefínico en el carbono 8.

Se incluyen también en la divulgación péptidos que son biológica o funcionalmente equivalentes a los péptidos descritos en la presente memoria. El término "biológicamente equivalente" o "equivalente funcional" pretende

significar que las composiciones de la presente invención son capaces de demostrar algunos de o todos los mismos efectos moduladores de la secreción de insulina estimulada por glucosa o la regulación de la ruta homeostática, aunque no necesariamente en el mismo grado que el polipéptido de dominio BH3 deducido de secuencias identificadas en colecciones de ADNc de origen humano, de rata o ratón o producidas a partir de sistemas de expresión recombinantes.

Los péptidos BH3 pueden incluir también derivados de péptidos BH3 que se pretende que incluyan formas híbridas y modificadas de péptidos BH3, incluyendo proteínas de fusión y fragmentos de péptido BH3 y formas modificadas en que se han eliminado o reemplazado ciertos aminoácidos y modificaciones tales como cuando se han cambiado uno o más aminoácidos por un aminoácido modificado o aminoácido inhabitual y modificaciones tales como glucosilación, siempre que la forma híbrida o modificada retenga la actividad biológica de los péptidos BH3. Los términos inducido y estimulado se usan intercambiabilmente a lo largo de la memoria descriptiva. La actividad biológica de los péptidos BH3 incluye la simulación de la actividad fisiológica de BAD y la restauración de la homeostasis de insulina estimulada por glucosa y otras consecuencias de la deficiencia de BAD. La actividad biológica incluía también unión a su ligando natural.

Son variantes preferidas aquellas que tienen sustituciones aminoacídicas conservativas realizadas en uno o más residuos aminoacídicos no esenciales predichos. Una "sustitución aminoacídica conservativa" es aquella en que se reemplaza el residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la materia las familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p.ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p.ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p.ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales de ramificación beta (p.ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Además, pueden incorporarse aminoácidos no naturales. Por tanto, se reemplaza un residuo aminoacídico no esencial predicho en un polipéptido de dominio BH3 por otro residuo aminoacídico de la misma familia de cadena lateral. Como alternativa, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación de BH3 (por tanto, incluyendo mutación en sitios no esenciales y esenciales), tales como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para identificar los mutantes que retienen la actividad. Se incluye también en el significado de sustancialmente homólogo cualquier péptido BH3 que pueda aislarse en virtud de reactividad cruzada con anticuerpos del péptido BH3 descrito en la presente memoria o cuyas secuencias nucleotídicas codificantes que incluyen ADN genómico, ARNm o ADNc puedan aislarse mediante hibridación con la secuencia complementaria de secuencias nucleotídicas genómicas o subgenómicas o el ADNc de los péptidos BH3 de la presente memoria o fragmentos de los mismos.

Los derivados, variantes y análogos pueden ser de longitud completa o distintos de longitud completa, si el derivado o análogo contiene un ácido nucleico o aminoácido modificado. Los derivados o análogos de péptidos BH3 incluyen, p.ej., moléculas que incluyen regiones que son sustancialmente homólogas de los péptidos, en diversas ocasiones con al menos aproximadamente un 30 %, 50 %, 70 %, 80 % o 95 %, 98 % o incluso 99 % de identidad con una secuencia aminoacídica de tamaño idéntico o cuando se compara con una secuencia alineada en que se realiza el alineamiento por un programa informático de homología conocido en la materia. Por ejemplo, la identidad de secuencia puede medirse usando software de análisis de secuencia (Sequence Analysis Software Package del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705), con los parámetros por defecto de mismo.

En diversas ocasiones, el péptido BH3 mantiene su estructura secundaria, p.ej. estructura de hélice α . Son conocidos métodos de estabilización de hélice en la materia.

Preferiblemente, el péptido BH3 es un péptido estable. Se entiende por "estable" que el péptido posee suficiente estabilidad para permitir la fabricación y que mantiene la integridad del compuesto durante un periodo de tiempo suficiente para ser útil con los fines detallados en la presente memoria. Por ejemplo, los péptidos se estabilizan covalentemente usando reticulaciones polares y/o lábiles (Phelan *et al.* 1997 *J. Am. Chem. Soc.* 119: 455; Leuc *et al.* 2003 *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 100: 11273; Bracken *et al.*, 1994 *J. Am. Chem. Soc.* 116: 6432; Yan *et al.* 2004 *Bioorg. Med. Chem.* 14: 1403). Como alternativa, los péptidos se estabilizan usando el enfoque basado en metátesis, que empleaba aminoácidos no naturales alfa,alfa-disustituidos que contenían anclajes de alquilo (Schafmeister *et al.*, 2000 *J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891; Blackwell *et al.* 1994 *Angew Chem. Int. Ed.* 37: 3281). Preferiblemente, los péptidos se estabilizan usando grapado de hidrocarburos. Los péptidos grapados son péptidos químicamente reforzados o "grapados" de modo que su forma, y por lo tanto su actividad, se restaura y/o mantiene. La reticulación estable de un polipéptido que tiene al menos dos aminoácidos modificados (un proceso denominado "grapado de hidrocarburos") puede ayudar a otorgar conformacionalmente la estructura secundaria nativa de ese polipéptido. Por ejemplo, la reticulación de un polipéptido predispuesto a tener una estructura secundaria de hélice alfa puede restringir el polipéptido a su conformación de hélice alfa nativa. La estructura secundaria restringida puede aumentar la resistencia del polipéptido ante la escisión proteolítica y aumenta también la hidrofobicidad. Los péptidos BH3 grapados se producen, por ejemplo, como se describe en el documento WO05044839A2, incorporado a la presente memoria como referencia en su totalidad. Como alternativa, los péptidos BH3 son péptidos cíclicos. Los péptidos cíclicos se preparan mediante métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, la macrociclación está

acompañada a menudo por la formación de un enlace amida entre los extremos N y C del péptido, entre una cadena lateral y el extremo N o C [p.ej., con $K_3Fe(CN)_6$ a pH 8,5] (Samson *et al.*, Endocrinology, 137: 5182-5185 (1996)), o entre dos cadenas laterales aminoácidas. Véase, p.ej. DeGrado, Adv Protein Chem, 39: 51-124 (1988).

Como alternativa, el dominio BH3 es un ligando no natural, p.ej. un mimético. Los miméticos de BH3 ejemplares incluyen Gossypol, ABT263 y ABT 737. Otros miméticos de BH3 incluyen aquellos descritos en Cell Death and Differentiation (2006) 13: 1339-1350, cuyos contenidos se incorporan por la presente como referencia en su totalidad. Un mimético de dominio BH3 es un agente que es capaz de unirse a miembros de la familia de Bcl-2 e inducir una o más actividades de BH3. Los miméticos incluyen, por ejemplo, polipéptidos tales como anticuerpos, células fantasma o moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, péptidos, peptidomiméticos (p.ej., peptoides), aminoácidos, análogos de aminoácidos, ácidos peptidonucleicos, conjugados de péptido-ácido nucleico, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos e inorgánicos (incluyendo compuestos heterorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 2.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 500 gramos por mol y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

Los péptidos BH3 o miméticos de los mismos están ligados operativamente (p.ej. covalentemente) con un péptido no BH3 formando una especie quimérica. Un péptido no BH3 hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia aminoácida correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homóloga al péptido BH3. El péptido no BH3 permite la adición de una funcionalidad al péptido BH3. Por ejemplo, el péptido no BH3 es una secuencia de translocación, una proteína GST o una porción de una molécula de inmunoglobulina, p.ej. la región Fc, o un derivado de ácido nucleico.

Los péptidos BH3 descritos en la presente memoria pueden conjugarse igualmente con grupos detectables tales como biotina, radiomarcadores (p.ej., ^{35}S , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In), marcadores enzimáticos (p.ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina) y marcadores fluorescentes (p.ej., fluoresceína) de acuerdo con técnicas conocidas.

Los péptidos BH3 se preparan fácilmente usando técnicas de clonación modernas, o pueden sintetizarse mediante métodos en estado sólido o mutagénesis dirigida a sitio. Un péptido de dominio BH3 puede incluir formas negativas dominantes de un polipéptido. En una realización, los péptidos BH3 nativos pueden aislarse de fuentes de células o tejidos mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteína estándares. En otra realización, se producen polipéptidos de dominio BH3 mediante técnicas de ADN recombinante.

Como alternativa a la expresión recombinante, los péptidos BH3 se sintetizan químicamente usando técnicas de síntesis peptídica estándares. Las transformaciones de química sintética y metodologías de grupo protector (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos descritos en la presente memoria son conocidas en la materia e incluyen, por ejemplo, aquellas tales como se describen en R. Larock, "Comprehensive Organic Transformations", VCH Publishers (1989); T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, "Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons (1994) y L. Paquette, ed., "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons (1995), y posteriores ediciones de los mismos. Los péptidos de esta invención pueden elaborarse mediante métodos de síntesis química, que son bien conocidos por el especialista en la materia. Véanse, por ejemplo, Fields *et al.*, Capítulo 3 en "Synthetic Peptides: A User's Guide", ed. Grant, W. H. Freeman & Co., Nueva York, N.Y., 1992, pág. 77. Por ello, los péptidos pueden sintetizarse usando las técnicas de Merrifield automatizadas de síntesis en fase sólida con el α -NH₂ protegido por cualquiera de la química de Boc o F-moc usando aminoácidos protegidos en la cadena lateral, por ejemplo, en un sintetizador peptídico de Applied Biosystems modelo 430A o 431.

Es una manera de elaborar los péptidos descritos en la presente memoria usar la síntesis peptídica en fase sólida (SPFS). Se enlaza el aminoácido C-terminal con una resina de poliestireno reticulada a través de un enlace lábil a ácidos con una molécula ligadora. Esta resina es insoluble en los disolventes usados para la síntesis, haciendo relativamente sencillo y rápido retirar por lavado el exceso de reactivos y subproductos. El extremo N está protegido con el grupo Fmoc, que es estable ante ácido pero retirable por base. Cualquier grupo funcional de cadena lateral está protegido con grupos estables ante base lábiles ante ácido. Podrían elaborarse péptidos más largos juntando péptidos sintéticos individuales usando ligamiento químico nativo. Como alternativa, pueden sintetizarse péptidos sintéticos más largos mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Tales técnicas se proporcionan en manuales estándares bien conocidos con protocolos detallados. Para construir un gen que codifica un péptido de esta invención, se traduce de forma inversa la secuencia aminoácida para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia aminoácida, preferiblemente con codones que sean óptimos para el organismo en que se va a expresar el gen. A continuación, se elabora un gen sintético, típicamente sintetizando oligonucleótidos que codifican el péptido y cualquier elemento regulador, si es necesario. Se inserta el gen sintético en un vector de clonación adecuado y se transfecta a una célula hospedadora. Se expresa entonces el péptido en condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión y hospedador seleccionados. Se purifica el péptido y se caracteriza por métodos estándares.

Los péptidos pueden elaborarse de forma combinatoria de alto rendimiento, p.ej. usando un sintetizador combinatorio policanal de alto rendimiento de Advanced Chemtech.

Una proteína "aislada" o "purificada" o porción biológicamente activa de la misma está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejidos de la que deriva el péptido BH3, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de péptidos BH3 en que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o produce recombinantemente. En una realización, la frase "sustancialmente exento de material celular" incluye preparaciones de péptidos BH3 que tienen menos de aproximadamente un 30 % (en peso seco) de péptido no BH3 (al que se hace referencia también en la presente memoria como una "proteína contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente un 20 % del péptido no BH3 y/o péptidos de dominio de no transducción, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente un 10 % de péptido no BH3 y lo más preferiblemente menos de aproximadamente un 5 % de péptido no BH3 y/o péptidos de dominio de no transducción. Cuando el péptido BH3 o porción biológicamente activa del mismo se produce recombinantemente, preferiblemente está también sustancialmente libre de medio de cultivo, concretamente el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, más preferiblemente menos de aproximadamente un 10 % y lo más preferiblemente menos de aproximadamente un 5 % del volumen de la preparación de proteína.

La frase "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de péptidos BH3 en que la proteína está separada de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En una realización, la frase "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de péptidos BH3 que tienen menos de aproximadamente un 30 % (en peso seco) de precursores químicos o péptido no BH3 y/o productos químicos de péptidos de dominio no de transducción, más preferiblemente menos de aproximadamente un 20 % de precursores químicos o péptido no BH3 y/o productos químicos de péptidos de dominio de no transducción, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente un 10 % de precursores químicos o productos químicos de péptido no BH3 y lo más preferiblemente menos de aproximadamente un 5 % de precursores químicos o péptido no BH3 y/o productos químicos de péptidos de dominio de no transducción.

MÉTODOS TERAPÉUTICOS

Se describen métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto con riesgo (o susceptible) de un trastorno o que tienen un trastorno asociado a un metabolismo de glucosa aberrante (p.ej., insuficiente o excesivo) o anomalías de la ruta apoptótica extrínseca o intrínseca. Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado o estirpe celular de un paciente que tiene una enfermedad, un síntoma de enfermedad o una predisposición a una enfermedad, con el fin de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, recuperar, mejorar o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Se induce la secreción de insulina por exposición, p.ej. poniendo en contacto un tejido (p.ej. tejido de páncreas) o célula (p.ej. células β) con un péptido BH3 de BAD o mimético. Se entiende por inducción un aumento de la producción de insulina en comparación con un tejido o célula que no ha estado en contacto con el péptido BH3 de BAD o mimético. Se ponen en contacto los tejidos o células directamente con el péptido BH3 de BAD o mimético. Como alternativa, se administra por vía sistémica el péptido BH3 de BAD o mimético. Se administran el péptido BH3 de BAD o mimético en una cantidad suficiente para aumentar (p.ej., activar) la actividad glucocinasa, aumentar la concentración de Ca^{2+} intracelular o rebajar los niveles sanguíneos de glucosa. Se mide la secreción de insulina mediante ensayos conocidos en la materia, tales como por ejemplo un ELISA específico de insulina. Como alternativa, se evalúa la secreción de insulina midiendo los niveles sanguíneos de glucosa. Una vuelta a los niveles de glucosa basales (p.ej. normales) indica también un aumento de la secreción de insulina.

Se aumenta la supervivencia de las células β al exponer una célula de islote β a un péptido BH3 de BAD o mimético. Se entiende por aumento en la supervivencia una disminución de la muerte celular en comparación con una célula que no ha estado en contacto con el péptido BH3 de BAD o mimético. Se mide la muerte celular mediante métodos conocidos en la materia tales como exclusión con azul de tripano. Se ponen en contacto las células directamente con el péptido BH3 de BAD o mimético. Como alternativa, se administra el péptido BH3 de BAD o mimético por vía sistémica. Se pone en contacto la célula con el péptido BH3 de BAD o mimético antes, durante o después del trasplante de células en un sujeto.

Los métodos son útiles para tratar, aliviar los síntomas o retardar el inicio de diabetes o resistencia a la insulina. Diabetes incluye diabetes de tipo I o diabetes de tipo II. La diabetes de tipo I o diabetes insulino dependiente está causada por la destrucción gradual de las células beta en el páncreas, dando como resultado la incapacidad del páncreas de producir insulina. La diabetes de tipo II o diabetes no insulino dependiente es debida a una combinación de secreción defectiva de insulina y sensibilidad defectiva ante la insulina (a menudo denominada sensibilidad reducida a la insulina). La diabetes del adulto de inicio juvenil (MODY) es una forma genética de diabetes de tipo II.

La resistencia a la insulina (p.ej., prediabetes) es la afección en que las cantidades normales de insulina son

inadecuadas para producir una respuesta normal ante la insulina de células de grasa, músculo e hígado. La resistencia a la insulina en células de grasa da como resultado la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, lo que eleva los ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo. La resistencia a la insulina en el músculo reduce la captación de glucosa, mientras que la resistencia a la insulina en el hígado reduce el almacenamiento de glucosa, sirviendo
5 ambos efectos para elevar la glucosa sanguínea. Los altos niveles plasmáticos de insulina y glucosa debidos a la resistencia a la insulina a menudo conducen al síndrome metabólico y diabetes de tipo 2.

El sujeto padece o está en riesgo de desarrollar diabetes, enfermedad cardiovascular, hipertensión, obesidad, retinopatía diabética o neuropatías diabéticas. Los sujetos que padecen o están en riesgo de desarrollar diabetes, retinopatía diabética, neuropatías diabéticas, enfermedad cardiovascular, hipertensión u obesidad se identifican
10 mediante métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, la diabetes se diagnostica por ejemplo midiendo los niveles sanguíneos de glucosa en ayunas o la insulina o por la prueba de tolerancia a la glucosa. Los niveles de glucosa en adultos normales son de 60-126 mg/dl. Los niveles de insulina normales son de 7 mU/ml $\pm$ 3 mU. La hipertensión se diagnostica como una presión sanguínea consistentemente en o por encima de 140/90. La enfermedad cardiovascular se diagnostica midiendo los niveles de colesterol. Por ejemplo, un colesterol LDL por encima de 137
15 o colesterol total por encima de 200 es indicativo de enfermedad cardiovascular. La obesidad se diagnostica, por ejemplo, por el índice de masa corporal. El índice de masa corporal (IMC) se mide por (kg/m^2) (o $\text{lb}/\text{pulgada}^2 \times 704,5$). Como alternativa, se mide la circunferencia de la cintura (estima la distribución de grasa), la relación de cintura a caderas (estima la distribución de grasa), el grosor del pliegue cutáneo (si se mide en varios sitios, estima la distribución de grasa) o la bioimpedancia (basada en el principio de que la masa magra conduce la corriente mejor
20 que la masa grasa (concretamente, la masa grasa dificulta la corriente), estima el % de grasa). Los parámetros para individuos normales, con sobrepeso u obesos son los siguientes: bajo peso: IMC < 18,5; normal: IMC 18,5 a 24,9; sobrepeso: IMC = 25 a 29,9. Los individuos con sobrepeso se caracterizan por tener una circunferencia de cintura >94 cm para hombres o >80 cm para mujeres y relaciones de cintura a caderas $\geq$ 0,95 en hombres y $\geq$ 0,80 en mujeres. Los individuos obesos se caracterizan por tener un IMC de 30 a 34,9, tener más de un 20 % por encima del
25 peso "normal" para la altura, tener un porcentaje de grasa corporal > 30 % para mujeres y de 25 % para hombres y tener una circunferencia de cintura >102 cm (40 pulgadas) para hombres o 88 cm (35 pulgadas) para mujeres. Los individuos con obesidad grave o mórbida se caracterizan por tener un IMC $\geq$ 35.

Los métodos descritos en la presente memoria conducen a una reducción de la gravedad o al alivio de uno o más síntomas de diabetes, resistencia a la insulina, un trastorno asociado a la diabetes o un trastorno asociado a un
30 metabolismo aberrante de glucosa. Los síntomas de diabetes incluyen por ejemplo niveles de glucosa sanguínea en ayunas elevados, presión sanguínea a o por encima de 140/90 mmHg; niveles sanguíneos de grasa anormales, tales como lipoproteínas de alta densidad (HDL) menores o iguales a 35 mg/dl, o triglicéridos mayores o iguales a 250 mg/dl (mg/dl = miligramos de glucosa por decilitro de sangre). Se determina la eficacia del tratamiento en asociación con cualquier método conocido para el diagnóstico o el tratamiento de diabetes, resistencia a la insulina o
35 un trastorno asociado a diabetes. El alivio de uno o más síntomas de diabetes, resistencia a la insulina o un trastorno asociado a la diabetes indica que el compuesto confiere un beneficio clínico. Los trastornos asociados a la diabetes incluyen, por ejemplo, insuficiencia renal, ceguera, neuropatía y enfermedad arterial coronaria. Se diagnostican y/o monitorizan diabetes, resistencia a la insulina o un trastorno asociado a la diabetes típicamente por un médico usando metodologías estándares. Por ejemplo, se diagnostica la diabetes por una prueba de glucosa
40 plasmática en ayunas o una prueba de glucosa oral. Los niveles de glucosa en ayunas menores de 99 mg/dl son normales. Un nivel de glucosa en ayunas de 100 a 125 mg/dl indica prediabetes. Un nivel de glucosa de 126 mg/dl o mayor es indicativo de diabetes.

Se administran un péptido BH3 de BAD o mimético con un compuesto antidiabético. Los ejemplos de compuestos antidiabéticos incluyen, pero sin limitación, insulina, fármacos de sulfonilurea, meglitinidas, biguanidas, inhibidores
45 de alfa-glucosidasa, tiazolidindionas o compuestos activadores de GK (GKA). Los compuestos GKA ejemplares incluyen el compuesto de Roche RO-28-1675, el compuesto de Lilly LY2121260 y los compuestos de AstraZeneca GKA1 y 2 (Véanse Grimsby *et al.* *Science* (2003) 301: 370-373. McKerrecher, *et al.* *Bioorganic an Med Chem Letters* (2005) 2103-2106 y Brocklehurst *et al.* *Diabetes* (2004) 53: 535-541, cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad).

Se modulan, aumentan o disminuyen el crecimiento tumoral o la proliferación celular poniendo en contacto una célula tumoral con un péptido BH3 o mimético. Por ejemplo, al inhibir la utilización de glucosa en una célula tumoral, disminuye el crecimiento celular. Como alternativa, al aumentar la utilización de glucosa en una célula tumoral, aumenta el crecimiento celular. Tanto aumentar como disminuir el crecimiento tumoral tiene beneficio terapéutico. Disminuir el crecimiento tumoral retarda la progresión del tumor, mientras que aumentar el crecimiento tumoral
50 puede hacer al tumor más sensible ante agentes terapéuticos tales como quimioterapia o radiación. Como alternativa, puede conseguirse la modulación del crecimiento tumoral conmutando la función de BH3 entre las rutas homeostática y proapoptótica, y reactivando así la muerte celular en el cáncer.

Se modulan las rutas homeostáticas celulares poniendo en contacto una célula con un péptido BH3 o mimético del mismo. Por ejemplo, puede modularse la progresión de la célula por el ciclo celular mediante la administración de un
60 péptido BH3 de BID, un mimético o fosfomimético del mismo.

La célula es cualquier célula, tal como una célula de hígado o una célula de cerebro.

El sujeto puede ser, p.ej., un mamífero, p.ej. un ser humano, un primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo o cerdo.

ADMINISTRACION TERAPÉUTICA

5 Los compuestos, p.ej. péptidos BH3 o miméticos (a los que se hace referencia también en la presente memoria como "compuestos activos") descritos en la presente memoria y los derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Tales composiciones comprenden típicamente el péptido o mimético y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria, "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares compatibles con la administración farmacéutica. Se describen los portadores adecuados en la edición más reciente de "Remington's Pharmaceutical Sciences", un texto de referencia estándar en el campo, que se incorpora a la presente memoria como referencia. Los ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero sin limitación, agua, disolución salina, disoluciones de Finger, disolución de dextrosa y seroalbúmina humana al 5 %. Pueden usarse también liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. Pueden incorporarse también compuestos activos suplementarios en las composiciones.

20 Se formula una composición farmacéutica de la invención para ser compatible con su vía de administración pretendida. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, p.ej. intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p.ej., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyecciones, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples compuestos de vidrio o plástico.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones (cuando sean hidrosolubles) o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede conseguirse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Puede causarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo (p.ej. un péptido BH3 o mimético) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, son métodos de preparación secado a vacío y liofilización, que procuran un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución previamente filtrada por esterilización del mismo.

50 Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Con el fin de administración terapéutica oral, puede incorporarse el compuesto activo con excipientes y usarse en forma de comprimidos, comprimidos oblongos o cápsulas. Las composiciones orales pueden prepararse también usando un portador líquido para uso como colutorio, en el que el compuesto en el portador líquido se aplica oralmente y se enjuaga, expectora o traga. Pueden incluirse agentes aglutinantes y/o materiales coadyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, comprimidos oblongos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma

de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa; un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo o aroma de naranja.

- 5 Para administración por inhalación, se suministran los compuestos en forma de un pulverizador de aerosol desde un envase a presión o dispensador que contiene un propelente adecuado, p.ej. un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica puede ser también por medios transmucosos o transdérmicos. Para administración transmucosa o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para administración transdérmica, se formulan los compuestos activos en pomadas, ungüentos, geles o cremas como es generalmente conocido en la materia.

- 15 Los compuestos pueden prepararse también en forma de supositorios (p.ej. con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para suministro rectal.

En una ocasión, se preparan los compuestos activos con portadores que protegerán al compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como vinilacetato de etileno, polianhidridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para los especialistas en la materia. Los materiales pueden obtenerse también comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Pueden usarse también suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas orientados a células infectadas con anticuerpos monoclonales de antígenos víricos) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas pueden prepararse según métodos conocidos por los especialistas en la materia, por ejemplo, como se describen en la patente de EE.UU. n° 4.522.811, incorporada totalmente a la presente memoria como referencia.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación por la facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de unidad de dosificación como se usa en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidad de dosificación de la invención está dictada por y es directamente dependiente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular para conseguir.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para administración.

35 ENSAYOS DE CRIBADO

Se describen también métodos (a los que se hace referencia también en la presente memoria como "ensayos de cribado") para la identificación de agentes que modulan la actividad de glucocinasa o modulan el ciclo celular.

Puede exponerse un péptido BH3 marcado, p.ej. marcado fluorescentemente, o fragmento del mismo (p.ej., BID, BAD, BAK, BAX, etc.) en presencia de su proteína diana (p.ej. glucocinasa) a concentraciones variables de un compuesto candidato (p.ej., 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM y 10 mM) para identificar inhibidores moleculares de esta interacción. Opcionalmente, el péptido BH3 está fosforilado. Se analiza entonces el efecto de cada concentración de compuesto candidato para determinar el efecto del compuesto candidato sobre la actividad glucocinasa, el ciclo celular o la actividad de unión a proteína diana de BH3 *in vivo*. El compuesto candidato puede modular la actividad glucocinasa o el ciclo celular de manera competitiva o no competitiva. Pueden efectuarse también ensayos de unión directa entre proteínas de la familia de Bcl-2 y compuestos candidatos marcados fluorescentemente para determinar la K_d de la interacción de unión. También puede cribarse en los compuestos candidatos la actividad biológica *in vitro*, por ejemplo midiendo su eficacia de respuesta a la dosis y para desencadenar la liberación de citocromo c de mitocondrias purificadas, el potencial de membrana mitocondrial o la actividad glucocinasa como se valora por la producción de NADH mediada por glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Los ensayos descritos en la presente memoria pueden efectuarse con compuestos candidatos individuales o pueden efectuarse con una pluralidad de compuestos candidatos. Cuando los ensayos se efectúan con una pluralidad de compuestos candidatos, los ensayos pueden efectuarse usando mezclas de compuestos candidatos o pueden realizarse en reacciones paralelas, teniendo cada reacción un solo compuesto candidato. Los compuestos o agentes de prueba pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques de métodos de colección combinatoria conocidos en la materia.

En una ocasión, el ensayo es un ensayo bioquímico, mediante el que los polipéptidos grapados por hidrocarburos pueden ligarse con resina de afinidad para purificar o identificar copartícipes interactivos nuevos o conocidos en

rutas homeostáticas, tales como la ruta de glucocinasa o el ciclo celular. En otra ocasión, la proteína grapada con hidrocarburos contiene un resto fotoactivable que posibilita formar una reticulación covalente con un copartícipe nuevo o conocido en rutas homeostáticas, tales como la ruta de glucocinasa o el ciclo celular.

La invención se describirá además en los siguientes ejemplos.

5 Ejemplo 1. El papel de BAD en la función de células β

Para examinar el papel de BAD en células β , se valoró la secreción de insulina en una cohorte de ratones *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ usando análisis de pinzamiento hiperglucémico. Se realizó un pinzamiento de 2 horas con una infusión cebada y variable de 20 % de glucosa para elevar y mantener las concentraciones plasmáticas de glucosa a 300 mg/dl en ratones *Bad* $+/+$ ($n = 10$) y *Bad* $-/-$ ($n = 12$). (Fig. 5). El análisis de los niveles plasmáticos de insulina en múltiples puntos temporales durante el periodo de pinzamiento indicaba una alteración significativa de la secreción de insulina en ratones deficientes en *Bad* (Fig. 6). El área bajo la curva (AUC) para la respuesta a insulina a lo largo del experimento (0-120 min) mostraba un 32 % de reducción en ratones *Bad* $-/-$ ($p < 0,05$, Fig. 7). Las fases aguda (0-30 min) y tardía (30-120 min) de secreción estaban marcadas por un 37 % ($p < 0,01$) y 30 % ($p < 0,05$) de reducción, respectivamente (Fig. 7).

Para determinar si este defecto de secreción de insulina se manifiesta igualmente *in vitro*, se sometieron islotes purificados de ratones *Bad* $-/-$ a ensayos de perfusión (Cunningham BA. *et al.*, 1996. *Am J Physiol* 271, E702-10) (Fig. 8). Después de un periodo de preperfusión de 25 min con glucosa 3 mM, se perfundieron 120 islotes de cada genotipo con glucosa 3 mM y 25 mM como se indica. Después de 40 min, se alternó la solución de perfusión a KCl 30 mM para despolarizar la membrana plasmática y liberar el conjunto total de gránulos de insulina. El contenido de ADN por islote era de 12,4 ng y de 14,6 ng para ratones *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$, respectivamente. El AUC para la primera fase de liberación (min 8-15) era de 12,50 frente a 5,98, y para la segunda fase (min 15-40) de 15,05 frente a 8,44, en *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ respectivamente. Los islotes *Bad* $-/-$ perfundidos con glucosa 25 mM secretaban niveles significativamente menores de insulina durante ambas primera y segunda fases de la respuesta secretora. Sin embargo, el conjunto total de insulina liberada por KCl estaba inalterado (Fig. 8). Aunque la magnitud de la liberación de insulina era menor, el patrón oscilatorio de secreción en los islotes *Bad* $-/-$ era comparable a los islotes de control (datos no mostrados). Estos resultados indican que la deficiencia en *Bad* compromete la capacidad de las células β de secretar insulina en respuesta ante la glucosa, lo que puede haber contribuido en parte a la tolerancia anormal a la glucosa reseñada anteriormente en ratones *Bad* $-/-$ (Danial N.N. *et al.*, 2003. *Nature* 424, 952-6).

30 Ejemplo 2. El papel de los componentes de la ruta de secreción de insulina en el defecto secretor de insulina en células β *Bad* $-/-$

La ruta de secreción de insulina inducida por glucosa en células β consiste en eventos mitocondriales tanto proximales como distales (Wiederkehr A. y Wollheim C.B., 2006. *Endocrinology* 147, 2643-9). Las mitocondrias generan los factores de acoplamiento metabólico requeridos para la inducción de la liberación de insulina por glucosa y otros nutrientes. El aumento de la relación de ATP/ADP intracelular es un factor de acoplamiento metabólico importante en este proceso que conduce al cierre de los canales de K sensibles a ATP (K_{ATP}) en la membrana plasmática, seguido de despolarización de membrana y apertura de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (Ashcroft F.M. y Gribble F.M., 1999. *Diabetologia* 42, 903-19; Rorsman P, 1997. *Diabetologia* 40, 487-95). El aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_i$ estimula a su vez la liberación de insulina. Consistentemente con su defecto secretor en respuesta ante la glucosa, los islotes *Bad* $-/-$ no conseguían mostrar un aumento robusto de la relación de ATP/ADP (Fig. 9), sugiriendo la falta de un acoplamiento metabólico suficiente.

Para examinar si las etapas mitocondriales distal y proximal implicadas en la liberación de insulina están intactas en islotes *Bad* $-/-$, se probaron varios secretagogos bien caracterizados. El KIC (ácido α -cetoisocaproico) es un secretagogo nutriente que alimenta el ciclo de TCA mitocondrial independientemente de la fosforilación de glucosa por GK (Gao Z, *et al.*, 2003. *Endocrinology* 144, 1949-57). Se cultivaron islotes *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ en medios que contenían la cantidad indicada de glucosa en presencia o ausencia de ácido 2-cetoisocaproico (KIC) 10 mM, tolbutamida 0,25 mM o carbacol 0,25 mM. Se midió la secreción de insulina usando el método de incubación estática. El contenido de insulina por islote era de $115,1 \pm 4,64$ y $118,49 \pm 4,09$ ng, para *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$, respectivamente. La secreción de insulina inducida por KIC por islotes deficientes en *Bad* era robusta y comparable con la observada en controles (Fig. 10). Se probaron las etapas mitocondriales distales, incluyendo aquellas que culminan en el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y la activación de la maquinaria secretora, usando la sulfonilurea tolbutamida y el receptor de ácido muscarínico carbacol. La tolbutamida se une a y cierra el canal de K_{ATP} independientemente de los cambios en la relación de ATP/ADP (Proks P. *et al.*, 2002. *Diabetes* 51 Supl 3, S368-76), permitiendo el examen de la señalización posterior de este canal. Se usó carbacol para valorar si la liberación mediada por IP3 de los almacenes de Ca^{2+} intracelular ocurría apropiadamente. La respuesta de los islotes *Bad* $-/-$ tanto ante tolbutamida como carbacol era comparable a los islotes de tipo silvestre (Fig. 10). Este análisis farmacológico de la secreción de insulina sugiere que los islotes *Bad* $-/-$ no están globalmente alterados en su respuesta secretora.

La eficacia de la glucosa y otros secretagogos de alimentación para estimular la secreción de insulina se correlaciona estrechamente con su capacidad de hiperpolarizar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Antinozzi P.A. *et al.*, 2002. *J Biol Chem*. 277, 11746-55). En células β , los rasgos característicos de la respiración

impulsada por glucosa se correlacionan con los de la fosforilación de glucosa por GK (Liang Y, *et al.*, 1996. *Am J Physiol* 270, E846-57). Se valoró la hiperpolarización de membrana mitocondrial inducida por glucosa en células β *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$. Para calcular el $\Delta\Psi$, se analizaron los cambios en la intensidad de fluorescencia de éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE) en múltiples células individuales tras un aumento de glucosa de 3 mM a 8 mM o después de la adición de KIC 10 mM en presencia de glucosa 3 mM (Heart E. *et al.*, 2006. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E143-E148). Se cocargaron los islotes dispersados con Mitotracker y el tinte potenciométrico TMRE. Se registraron las alteraciones en $\Delta\Psi_m$ de células β *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$ individuales (Fig. 11). Un aumento de la intensidad de fluorescencia de TMRE refleja la hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial y se usa como índice de la respiración. Los cambios inducidos por glucosa en el $\Delta\Psi_m$ se reducían significativamente en células β *Bad* $-/-$ (Fig. 12, $1,84 \pm 1,58$ en *Bad* $-/-$ frente a $6,88 \pm 1,71$ en *Bad* $+/+$, $n = 10$), mientras que KIC inducía cambios comparables en el $\Delta\Psi_m$ en ambos genotipos (Fig. 12). Estos datos indican que el defecto de secreción de insulina en células β *Bad* $-/-$ implica un componente mitocondrial proximal selectivo de glucosa.

Ejemplo 3. Los efectos de BAD sobre la actividad GK y la sensibilización ante glucosa por células β

El aspecto selectivo de glucosa del defecto de células β *Bad* $-/-$ daba pie a un minucioso examen de GK en estas células. Se ha reseñado anteriormente por los inventores de que BAD se asocia con la isoforma hepática de GK en las mitocondrias, y que los hepatocitos nulos de *Bad* exhiben una actividad GK anclada a mitocondrias y respiración impulsada por glucosa debilitadas (Danial N.N. *et al.*, 2003. *Nature* 424, 952-6). Debido a que las isoformas hepática y de células β de GK se regulan diferentemente, se justificaba la evaluación del efecto regulatorio potencial de BAD sobre la isoforma de células β de la enzima. Para determinar la capacidad de la glucocinasa de asociarse con BAD en células β , se ligaron covalentemente anticuerpo anti-GK (carriles 1-3) o IgG de conejo de control (carriles 4-6) con gel de acoplamiento AminoLink Plus (Pierce) según las instrucciones del fabricante y se incubaron con fracción de membrana pesada (HM) enriquecida en mitocondrias solubilizada en CHAPS preparada a partir de células β MIN6 (Figura 31). Se eluyó secuencialmente el material unido, se resolvió por PAGE-SDS y se sometió a inmunotinción (WB) con anticuerpos anti-glucocinasa o anti-BAD. De forma similar, la Figura 32 muestra los resultados de la purificación por afinidad con microcistina de proteínas de interacción con PP1 en mitocondrias aisladas de células β MIN6. Se solubilizó la fracción HM enriquecida en mitocondrias en CHAPS 15 mM y se incubó con perlas de agarosa acopladas con microcistina (MC) (Danial N.N. *et al.*, 2003. *Nature* 424, 952-6). Se resolvieron las proteínas unidas por PAGE-SDS y se sometieron a inmunotinción (WB) con los anticuerpos indicados. La isoforma de células β de GK se asocia con BAD en las mitocondrias en un complejo similar al encontrado en hepatocitos (Danial N.N. *et al.*, 2003. *Nature* 424, 952-6).

La Figura 13 muestra la actividad glucocinasa en homogeneizados de islotes primarios aislados de ratones *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$. Se midió la actividad glucocinasa como la diferencia entre la actividad fosforilante de glucosa a glucosa 100 mM y 0,5 mM. Se midió la actividad fosforilante de glucosa como el aumento de la fluorescencia de NADH en una reacción impulsada por glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Trus M.D. *et al.*, 1981. *Diabetes* 30, 911-22). Los ensayos de GK en homogeneizados preparados a partir de islotes *Bad* $-/-$ primarios mostraban una actividad enzimática reducida en comparación con los islotes de control (Fig. 13). Es un sello característico de la disfunción de células β asociada a la actividad GK debilitada la pérdida de sensibilización ante glucosa, evidente por un desplazamiento a la derecha de la respuesta a la dosis de glucosa de la secreción de insulina (Byrne M.M. *et al.*, 1994. *J Clin Invest* 93, 1120-30). Para delimitar adicionalmente la importancia de la actividad GK debilitada en el defecto secretor de células β nulas de *Bad*, se perfundieron islotes pancreáticos con concentraciones crecientes de glucosa (Fig. 14). Se perfundieron 120 islotes de cada genotipo como en la Figura 8 y se recogieron las fracciones correspondientes al primer pico de liberación de insulina para medidas de insulina antes de alternar a la siguiente dosis de glucosa. Los islotes nulos de *Bad* requerían más glucosa para liberar la misma magnitud de insulina secretada por los islotes de control. Por ejemplo, la cantidad de insulina liberada por islotes *Bad* $-/-$ a glucosa 25 y 35 mM era comparable con la liberada por islotes *Bad* $+/+$ a glucosa 15 y 20 mM, respectivamente (Fig. 14). Los islotes de control mostraban la mayor inducción en veces de liberación de insulina de 10 a 15 mM, seguido por aumentos menores pero significativos con incrementos adicionales de glucosa de hasta glucosa 25 mM. El aumento de la liberación de insulina a estas mismas concentraciones de glucosa estaba significativamente debilitado en islotes *Bad* $-/-$ (Fig. 14). Estos resultados son consistentes con las anomalías en la sensibilización frente a GK y glucosa en islotes nulos de *Bad*.

Ejemplo 4. El papel del dominio BH3 de BAD en la secreción de insulina

Como prueba rigurosa para determinar si el defecto secretor en los islotes *Bad* $-/-$ está directamente relacionado con la función de BAD en células β o es producto de otros cambios en los ratones *Bad* $-/-$, se restauró la expresión de BAD en islotes *Bad* $-/-$ purificados usando adenovirus. Se ensayó la liberación de insulina como en la Figura 10. Antes de la corrección genética, los islotes *Bad* $-/-$ no conseguían exhibir un aumento por etapas de la liberación de insulina con aumentos incrementales de las concentraciones de glucosa (Fig. 15, *Bad* $-/-$ frente a *Bad* $+/+$ infectados con virus de GFP de control). La reintroducción de BAD en estos islotes era suficiente para corregir el defecto y confería un comportamiento secretor sensible a la dosis robusto con concentraciones crecientes de glucosa ($p < 0,001$, Fig. 15, *Bad* $-/-$: GFP-BAD, liberación a 12,5 mM frente a 5,5 mM y $p < 0,01$ a glucosa 25 mM frente a 12,5 mM). El contenido de insulina por islote era de $122,75 \pm 12,34$ y $127,13 \pm 5,09$ ng, para *Bad* $+/+$ y *Bad* $-/-$, respectivamente. Estos datos son consistentes con la conclusión de que la pérdida de BAD en las células β confiere

un defecto secretor de insulina.

Los mutantes de BAD permitían una disección adicional de los requisitos moleculares para la función novedosa de BAD. Como la propiedad bioquímica mejor establecida de BAD es la unión a alta afinidad a coparticipes antiapoptóticos, se justificaba un examen detallado de si el efecto de BAD sobre la secreción de insulina estaba mediado por su unión a BCL-2/X_L. El dominio BH3 de BAD es una hélice α anfipática que se une al bolsillo hidrófobo de BCL-2/X_L neutralizando así su actividad antiapoptótica (Zha J. *et al.*, 1997. *J Biol Chem* 272, 24101-4; Kelekar A. *et al.*, 1997. *Mol Cell Biol* 17, 7040-6; Petros A.M. *et al.*, 2000. *Protein Sci* 9, 2528-34). La leucina 151 (enumeración de BAD_L de ratón) del dominio BH3 es importante en la unión a BCL-2/X_L, por consiguiente la mutación L→A anula la actividad proapoptótica de BAD (Zha J. *et al.*, 1997. *J Biol Chem* 272, 24101-4). Al contrario que la BAD de tipo silvestre, la corrección genética con un BAD mutante L→A no era capaz de corregir el defecto de SIEG en islotes *Bad*^{-/-} (Fig. 15, $p > 0,05$ a todas las concentraciones de glucosa, *Bad*^{-/-}: GFP frente a *Bad*^{-/-}: GFP-BAD L→A), confirmando por tanto la especificidad del efecto de BAD de tipo silvestre observado.

Ejemplo 5. Fosforilación de BAD: un determinante molecular de la BAD apoptótica frente a las funciones metabólicas

El requisito de un dominio BH3 de BAD intacto en SIEG abría la posibilidad de que esta actividad pudiera estar mediada por la unión a BCL-2/X_L. Para explorar adicionalmente este mecanismo, se empleó un mutante de BAD en que los 3 sitios de fosforilación de serina (S112, S136 y S155) se convertían en alanina (BAD 3SA) (Datta S.R. *et al.*, 2002. *Dev Cell* 3, 631-43). Como la interacción entre BAD y BCL-2/X_L se inhibe por la fosforilación (Zha J. *et al.*, 1996. *Cell* 87, 619-28), BAD 3SA constituye un mutante no represible que rebaja el umbral para la apoptosis (Datta S.R. *et al.*, 2002. *Dev Cell* 3, 631-43). Debido a que los adenovirus portadores de este mutante eran tóxicos para los islotes en los ensayos de reconstitución genética, se estudiaron islotes aislados de ratones con inserción génica *Bad* 3SA no fosforilable. Es importante que los ratones *Bad* 3SA muestran actividad GK debilitada en los islotes (datos no mostrados) y en el hígado (Daniel N.N. *et al.*, 2003. *Nature* 424, 952-6). Como los islotes *Bad*^{-/-}, los islotes *Bad* 3SA exhibían SIEG alterada (Fig. 16). Se valoró la secreción de insulina usando el método de incubación estática como anteriormente. El contenido de insulina por islote era de $118,74 \pm 3,86$, $96,46 \pm 3,42$ y $106,5 \pm 6,24$ ng, para *Bad* +/+, *Bad* 3SA y *Bad* S155A, respectivamente. Aunque las mutaciones 3SA y L→A comparten defectos similares en la secreción de insulina, exhiben capacidades opuestas para interactuar con BCL-X_L. Estos hallazgos sugieren que la capacidad de BAD de regular la secreción de insulina y su capacidad de contrarrestar los coparticipes prosupervivencia no se cosegregan, destacando una función novedosa para el dominio BH3 de BAD aparte de su papel en la regulación de la apoptosis.

Ejemplo 6. El papel de compuestos miméticos de BAD en la liberación de insulina

Para determinar si el dominio BH3 de BAD mismo es suficiente para corregir el defecto de SIEG observado en islotes nulos de *Bad*, se trataron islotes pancreáticos con un panel de péptidos "grapados" correspondientes a esta región. Se modificaron las secuencias de BH3 por un método químico conocido como grapado de hidrocarburos, usado recientemente para generar hélices alfa estabilizadas de dominios de BCL-2 (SAHB) que resumen la bioactividad de BH3 (Fig. 17-18 y Figura 33) (Walensky L.D. *et al.*, 2004. *Science* 305, 1466-70).

La Figura 33 muestra un esquema de una estrategia sintética de grapado de hidrocarburos. Se efectuó la síntesis asimétrica de S-N-(carbamato de 9-fluorenilmetil)-2-(4'-pentenil)alanina ("S5") como se describe anteriormente (Schafmeister C. *et al.*, 2000. *J Am Chem Soc* 122, 5891-5892; Williams R.M. e Im M.N., 1991. *J Am Chem Soc* 113, 9276-9286). Se generaron los compuestos de SAHB reemplazado dos aminoácidos de la secuencia de BH3 por aminoácidos no naturales en localizaciones discretas que flanquean 3 aminoácidos naturales (posiciones i, i+4). Se efectuaron la síntesis peptídica, metátesis olefínica, derivatización de FITC, purificación por HPLC en fase inversa y microanálisis como se reseña anteriormente para SAHB de BID (Walensky L.D. *et al.*, 2004. *Science* 305, 1466-70). Se reemplazó la metionina nativa de BH3 de BID por norleucina (N_L) en SAHB de BID debido a la incompatibilidad del azufre con la reacción de metátesis catalizada por rutenio. La caracterización de los compuestos grapados revelaba una helicidad (Figura 34) y permeabilidad celular (datos no mostrados) comparables. Se evaluó también una colección de truncamiento para valorar la tolerancia al acortamiento del péptido bioactivo BH3 de BAD como se valora por la retención de una actividad de unión a BCL-X_L de alta afinidad (véanse las secuencias de la figura de truncamiento y la isoterma de unión en la Figura 18). Sorprendentemente, la SAHB_A de BAD restauraba el defecto de secreción en islotes *Bad*^{-/-} a 3 μ M, una concentración que no es tóxica para los islotes ($p < 0,001$, Fig. 17, secreción a glucosa 12,5 frente a 5,5 mM y $p < 0,05$ secreción a glucosa 25 frente a 12,5 mM en *Bad*^{-/-} tratados con SAHB_A de BAD). Aunque el efecto de SBHB_A de BAD sobre la restauración de la liberación de insulina no alcanzaba la magnitud de la observada al reemplazar por la proteína de longitud completa usada en la reconstitución genética, se observaba una corrección estadísticamente significativa. En contraposición, la SAHB_A de BAD, una SAHB distinta modelada según BH3 de BID, no corregía el defecto secretor en islotes *Bad*^{-/-} ($p > 0,05$, Fig. 17, *Bad*^{-/-}, DMSO frente a *Bad*^{-/-} tratados con SAHB_A de BID), demostrando por tanto la especificidad de secuencia del efecto de SAHB de BAD observado. Mutar los residuos L151 y D156 conservados de SAHB de BAD (SAHB_{A(L,D→A)} de BAD) anulaba su efecto sobre la liberación de insulina (Fig. 17, $p > 0,05$, *Bad*^{-/-} DMSO frente a *Bad*^{-/-} tratado con SAHB_{A(L,D→A)} de BAD). Estos resultados son consistentes con los estudios de reconstitución genética que usan el mutante L→A (Fig. 15). De forma importante, la eficacia de SAHB_A de BAD en la restauración de SIEG acompañaba a su efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial (Fig. 19). Se trataron islotes dispersados con 1 μ M de

compuestos durante 4 horas y se midieron los cambios de $\Delta\Psi$ como en la Fig. 12. A una concentración 1 μM , las SAHB de BAD pero no de BID conferían una hiperpolarización significativa del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) tras el tratamiento con glucosa, mientras que el efecto de SAHB de BID sobre el $\Delta\Psi_m$ era estadísticamente indistinguible de las células β tratadas con DMSO.

- 5 Estos hallazgos indican que el dominio BH3 de BAD es suficiente para restaurar el defecto de secreción de insulina en células β *Bad* $^{-/-}$ y predicen además que la administración de compuestos de SAHB de BAD mejorará la tolerancia a la glucosa de ratones *Bad* $^{-/-}$. De hecho, experimentos piloto indicaban que 60 minutos después de una exposición intraperitoneal a glucosa, los niveles sanguíneos de glucosa en ratones *Bad* $^{-/-}$ inyectados con SAHB de BAD eran un 66 % de los de los ratones *Bad* $^{-/-}$ inyectados con vehículo.

10 **Ejemplo 7. El papel de los compuestos fosfomiméticos de BAD en la liberación de insulina**

La especificidad del dominio BH3 de BAD en comparación con la secuencia BH3 de BID en la regulación de la liberación de insulina eleva la posibilidad de que puedan requerirse también residuos distintos de L151 y D156, que estén conservados por los dominios BH3 de todos los miembros de la familia de BCL-2. De forma interesante, la serina 155 es un rasgo distintivo de la secuencia de BH3 de BAD. La modelización estructural reveló que la Ser 155 de BAD apunta hacia la hendidura hidrófoba de BCL-X_L, que tras fosforilación por PKA crea un impedimento estérico significativo para la asociación de BAD/BCL-X_L (Datta S.R. *et al.*, 2000. *Mol Cell* 6, 41-51). Para probar el papel de S155 en la secreción de insulina, se generó un modelo genético de inserción génica en que se reemplazaba solo este residuo de serina por alanina (Figuras 36-38). Las células β *Bad* S155A muestran anomalías en la secreción de insulina tanto *in vitro*, cuando se examinaron islotes purificados (Fig. 16) como *in vivo*, cuando se valoraron los niveles de insulina en la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ip-GTT) (Figuras 39-40).

Estos hallazgos sugieren que la fosforilación en el dominio BH3 de BAD puede dictar el efecto regulador de BAD sobre la liberación de insulina. Para probar esta hipótesis, se generaron compuestos fosfomiméticos de SAHB de BAD (SAHB_{A(S₃PS)} y SAHB_{A(S₃D)}, Fig. 17-18 y Fig. 34). SAHB_{A(S₃PS)} contiene un residuo de serina fosforilado en posición 155 de la secuencia de BH3 de BAD, mientras que SAHB_{A(S₃D)} contiene un reemplazo de ácido aspártico que se muestra anteriormente que simula un residuo fosforilado constitutivamente al imitar la carga negativa de un grupo fosfato (Datta S.R. *et al.*, 2000. *Mol Cell* 6, 41-51). Ambos compuestos corregían el defecto de SIEG en islotes *Bad* $^{-/-}$ (Fig. 17). De forma importante, estos compuestos fosfomiméticos restauraban la secreción de insulina a pesar de su incapacidad de unirse a BCL-X_L (Fig. 35). Se efectuaron ensayos de unión de polarización por fluorescencia usando péptidos marcados con FITC (50 nM) y BCL-X_L ΔC a las concentraciones indicadas (Fig. 35). Se determinaron los valores de CE₅₀ para la unión por análisis de regresión no lineal de curvas de dosis y respuesta usando el software Prism 4.0 (Graphpad). Estas observaciones son consistentes con los datos de ratones con inserción génica *Bad* 3SA y S155A, proporcionando una confirmación farmacológica de que el efecto del dominio BH3 de BAD sobre la liberación de insulina no cosegrega con la unión a BCL-X_L.

Ejemplo 8. Compuestos miméticos de BAD: activadores de GK novedosos

35 Para averiguar el mecanismo mediante el que los compuestos de SAHB de BAD restauran la SIEG, se examinó su efecto sobre la activación de GK. La SAHB_A de BAD y sus análogos fosfomiméticos estimulan la actividad GK endógena en la estirpe de células β MIN6, mientras que SAHB_{A(L,D $\rightarrow$ A)} de BAD no lo hace (Fig. 20). Colectivamente, los datos presentados en la Fig. 19-20 sugieren que la capacidad del dominio BH3 de BAD de activar la liberación de insulina está en paralelo con sus efectos sobre la activación de GK y la hiperpolarización inducida por glucosa del potencial de membrana mitocondrial.

De forma importante, los efectos de los compuestos de SAHB de BAD sobre la activación de GK y SIEG están en paralelo con su capacidad de unirse directamente a GK (Fig. 70-71).

Ejemplo 9. El papel de BAD en la supervivencia de células β

45 La disfunción e incapacidad de compensar las demandas secretoras de la hiperglucemia de las células β contribuyen significativamente a la patofisiología de la diabetes de tipo 2. La destrucción de la masa de células β sucede cuando la apoptosis supera la tasa de replicación de células β . Los estudios de los inventores han identificado un papel para el dominio BH3 de BAD y el estado de fosforilación de la molécula en la liberación de insulina. Debido a que los mismos rasgos moleculares son conocidos por regular la función apoptótica de BAD, se investigó si esta proteína de solo BH3 afectaba a la supervivencia de células β .

50 Aunque la exposición a corto plazo de células β a glucosa estimula la secreción de insulina, la incubación crónica con altas concentraciones de glucosa activa la ruta apoptótica. Es importante que, en estas condiciones "glucotóxicas", se regula positivamente la expresión de varios genes proapoptóticos incluyendo *Bad* (Federici M. *et al.*, 2001. *Diabetes* 50, 1290-301). Los islotes deficientes en *Bad* estaban significativamente protegidos en estas condiciones ($p < 0,01$, Figura 41, % de viabilidad en glucosa alta, *Bad* $+/+$ frente a *Bad* $^{-/-}$). La corrección genética usando adenovirus de *Bad* restauraba la sensibilidad a la apoptosis (Fig. 41). Además, interferir con la fosforilación de BAD rebajaba el umbral para apoptosis como es evidente por la sensibilidad potenciada de los islotes *Bad* 3SA ante la apoptosis inducida por glucotoxicidad (Fig. 42). Colectivamente, estos datos proporcionan evidencias

genéticas de que BAD desempeña un papel en la muerte inducida por glucotoxicidad.

La toxina de células β , estreptozotocina (STZ), agota específicamente las células β y se usa comúnmente en modelos animales de diabetes inducida experimentalmente. Los islotes deficientes en BAD eran resistentes a la muerte inducida por STZ, mientras que aquellos aislados de animales BAD 3SA mostraban una sensibilidad potenciada ante STZ (Fig. 41-42). Se probó el requisito de BAD en la destrucción de células β inducida por STZ examinando una cohorte de ratones *Bad*^{-/-} y *Bad*^{+/+} después de la inyección intraperitoneal de este compuesto. La resistencia de los ratones deficientes en Bad a la STZ era evidente cuando se examinaban los islotes en secciones pancreáticas (Fig. 43). La STZ causaba el colapso de la arquitectura de los islotes en ratones *Bad*^{+/+} marcado por una reducción significativa de la señal de insulina concomitante con la tinción de glucagón dentro de los islotes (Fig. 43). En notable contraste, las secciones pancreáticas nulas de *Bad* demostraban una conservación casi completa de los islotes (Fig. 43). Estos resultados son consistentes con las diferencias en la actividad caspasa 3 en células β *Bad*^{+/+} frente a *Bad*^{-/-} el día 7 (Fig. 44). La resistencia de las células β *Bad*^{-/-} ante la apoptosis era también evidente a los niveles de insulina y glucosa detectados después del tratamiento con STZ. El día 0, los niveles sanguíneos de insulina eran cerca de 1,5 veces mayores en ratones *Bad*^{-/-} en comparación con controles *Bad*^{+/+} ($p < 0,01$, Fig. 45). Para el día 7, cuando los islotes experimentaban apoptosis, el nivel de insulina en animales *Bad*^{+/+} se desplomaba un 86 %, mientras que los ratones deficientes en Bad mantenían una disminución del 44 % de la hormona. El valor absoluto de insulina sérica el día 7 era ~6 veces mayor en ratones *Bad*^{-/-} frente a *Bad*^{+/+} (Fig. 45, $p < 0,01$). Además, los ratones deficientes en BAD están protegidos frente al efecto hiperglucémico de STZ (Fig. 46, día 7, glucosa a $434,29 \pm 53,34$ mg/dl en *Bad*^{+/+} frente a $239,83 \pm 50,86$ mg/dl en *Bad*^{-/-}, $p < 0,05$). Por tanto, la deficiencia en *Bad* procura protección frente a la destrucción de células β inducida por STZ y el fenotipo diabético resultante.

Ejemplo 10. BAD: un determinante de la diabetes inducida por dieta rica en grasas

Las células β experimentan normalmente cambios compensatorios para satisfacer la demanda secretora en estado resistente a la insulina. Estos mecanismos adaptativos incluyen cambios en las rutas de señalización de células β y programas de expresión génica que dan como resultado hiperplasia e hipertrofia de células β . Por consiguiente, una falta de adaptación apropiada da como resultado diabetes (Bell G.J. y Polonsky K.S., 2001. *Nature* 414, 788-91; Weir G.C. *et al.*, 2001. *Diabetes* 50 Supl. 1, S154-9; DeFronzo R.A., 1988. *Diabetes* 37, 667-87; Accili D. *et al.*, 2001. *Curr Mol Med* 1, 9-23). Además, la exposición crónica a alta glucosa y lípidos puede conducir eventualmente a una alteración de la secreción de insulina (glucolipotoxicidad) y la apoptosis de células β (Prentki M. *et al.*, 2002. *Diabetes* 51 Supl. 3, S405-13).

Los estudios descritos anteriormente han identificado un papel para el dominio BH3 de BAD y su derivado fosforilado en la regulación de la liberación de insulina. De forma interesante, es conocido que el mismo motivo peptídico regula la función apoptótica de BAD y las pruebas sugieren que BAD es un centinela importante en la supervivencia de células β con exposición crónica a alta glucosa o tratamiento con estreptozotocina (Fig. 41-46) y en la muerte de células β neonatales (Hettiarachchi K.D. *et al.*, 2006, enviado).

Para examinar cómo las funciones metabólicas y apoptóticas de BAD en células β pueden ser relevantes para la patofisiología de la diabetes, se investigó su papel en la adaptación de células β asociada a un modelo de resistencia a la insulina asociado a una dieta rica en grasas (HFD). Los niveles relativos de ARNm de BAD aumentan significativamente en islotes aislados de ratones de tipo silvestre sometidos a HFD (Fig. 21). Para examinar la importancia de esta observación, se sometió una cohorte de ratones *Bad*^{+/+} y *Bad*^{-/-} a HFD durante 16 semanas. Se mantuvo una cohorte paralela con dieta de control. Con la dieta de control, el peso corporal y los niveles de glucosa con alimentación en ratones *Bad*^{+/+} y *Bad*^{-/-} eran comparables a lo largo del estudio (datos no mostrados). Con dieta HFD, sin embargo, los ratones *Bad*^{-/-} eran resistentes al desarrollo de hiperglucemia (Fig. 22) a pesar de ganar peso a una tasa similar a los animales de control (Fig. 23). Esta resistencia estaba asociada a un aumento del área porcentual de islote, que era significativamente mayor en ratones *Bad*^{-/-} en comparación con controles (Fig. 24-25).

Se determinó a continuación si el aumento del área total de células β con HFD es dependiente de BAD y su estado de fosforilación. En las Figuras 47-50, cada rombo representa un islote que se inmunoteñía con anticuerpo anti-insulina. El eje vertical demuestra el área de píxeles asignada a los islotes rastreada por el programa de software MetaMorph. El eje horizontal denota islotes. Para cada par representativo de genotipos mostrado (*Bad*^{+/+} frente a *Bad*^{-/-} y *Bad*^{+/+}), era comparable el área de sección total. Las secciones *Bad*^{-/-} contienen significativamente más islotes para el mismo área de tejido total. Se analizaron múltiples secciones de al menos 3 animales por grupo de forma similar. El análisis de las secciones pancreáticas *Bad*^{-/-} reveló que el aumento derivaba de un mayor número de islotes en comparación con las secciones *Bad*^{+/+} HFD (Fig. 47-48). Paralelamente a estas observaciones, los niveles sanguíneos de insulina eran mayores en ratones *Bad*^{-/-} en comparación con controles *Bad*^{+/+} ($p < 0,05$, Fig. 26). Por tanto, las células β *Bad*^{-/-} parecen tener una respuesta adaptativa ventajosa independientemente de su defecto en SIEG.

BAD es una diana de las rutas de señalización de supervivencia que incluyen las redes de AKT y S6P70, que son conocidas por afectar a la supervivencia de células β (Tuttle R.L. *et al.* 2001. *Nat Med* 7, 1133-7; Pende M. *et al.*,

2000. *Nature* 408, 994-7). Tanto AKT como S6P70 pueden fosforilar e inactivar la función proapoptótica de BAD. Para valorar si el efecto de BAD en la adaptación de células β en el modelo de HFD se cosegrega con su función apoptótica, se examinó una cohorte paralela de ratones *Bad* 3SA y sus correspondientes controles de camada como se describe anteriormente. Al contrario que los ratones *Bad* $-/-$, los animales *Bad* 3SA eran más sensibles a la exposición a HFD, mostrando de media mayores niveles sanguíneos de glucosa (Fig. 27). Los pesos corporales de los ratones *Bad* 3SA eran inicialmente menores que en las cohortes de control ($p < 0,05$, semanas 0 y 1, Fig. 28) pero no mostraban ninguna diferencia significativa durante las posteriores semanas de estudio. El área porcentual de islote en las secciones pancreáticas era significativamente menor en ratones *Bad* 3SA en comparación con los controles de camada, sugiriendo que la adaptación de la masa de células β puede haber sido ineficaz (Fig. 29). Las secciones *Bad* 3SA contienen significativamente menos islotes (Figura 49-50). Estos datos eran consistentes con las medidas de los niveles sanguíneos de insulina, que eran significativamente menores en ratones *Bad* 3SA con HFD (Fig. 30). Colectivamente, los hallazgos sugieren que la compensación de células β y la sensibilidad ante HFD acompañantes están influidas por el estado de fosforilación de BAD. Además, la respuesta opuesta de *Bad* $-/-$ y *Bad* 3SA frente a exposición a HFD, a pesar de las anomalías metabólicas comunes en estos modelos genéticos, sugiere que el papel de la BAD en la determinación de la sensibilidad a HFD es paralelo a su función apoptótica en lugar de a su efecto sobre GK, destacando además el papel dual de BAD, y teniendo cada uno importantes consecuencias fisiológicas.

Explotar el papel de las proteínas de BCL-2 en la manipulación terapéutica de la función de islotes requiere una cuidadosa valoración del impacto de distintos miembros de la familia tanto sobre el metabolismo como la supervivencia de células β . Esto es especialmente relevante considerando los papeles emergentes de las proteínas de la familia de BCL-2 en las mitocondrias (Green D.R. y Kroemer G., 2004. *Science* 305, 626-9) y el RE (Thomenius M.J. y Distelhorst C.W., 2003. *J Cell Sci* 116, 4493-9). El papel de BAD en la liberación de insulina estimulada por glucosa por células β es consistente con su capacidad de afectar a GK y regular la respiración impulsada por glucosa. El dominio BH3 de BAD, que se requiere para la función proapoptótica de la molécula, se requiere también para la secreción de insulina. Es más, los compuestos de SAHB derivados del dominio BH3 de BAD probaron ser sondas moleculares ideales de la regulación por BAD de la secreción de insulina. Usando mutantes y péptidos de BAD que son o bien defectivos en la unión a BCL-X_L (SAHB_{A(L,D $\rightarrow$ A,A)}, SAHB_{A(S $\rightarrow$ PS)} de BAD y SAHB_{A(S $\rightarrow$ D)} de BAD) o aquellos cuya unión no puede reprimirse (BAD 3SA y 155A), se demostró que BH3 de BAD tiene funcionalidades distintas en la regulación de la secreción de insulina y la unión a BCL-X_L. Estos hallazgos son consistentes con la observación de que la pérdida de BAD no fenocopia enteramente la sobreexpresión de BCL-X_L. En un modelo transgénico de BCL-X_L específico de células β la supervivencia de islotes potenciada estaba acompañada por perturbaciones en la función mitocondrial, el manejo de Ca²⁺ y la secreción de insulina (Zhou Y.P. *et al.*, 2000. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E340-51). Los islotes transgénicos de BCL-X_L exhibían defectos secretorios significativos en respuesta a secretagogos movilizadores de Ca²⁺ (KCl y tolbutamida) y combustibles de mitocondria, tales como KIC (Zhou Y.P. *et al.*, 2000. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E340-51). Por otro lado, los islotes *Bad* $-/-$ tienen una robusta respuesta a todos estos mismos secretagogos. Por tanto, aunque la supervivencia potenciada de células β es común en ambos modelos genéticos, la naturaleza del defecto secretor de islote no lo es. Esto puede ser debido a su vez a los efectos de BCL-X_L sobre la bioenergética celular, que no son dependientes de su interacción con BAD.

La BAD sienta un precedente por la posibilidad de que moléculas solo de BH3 funcionen como componentes integrales de distintas rutas de señalización, regulando procesos fisiológicos más allá de controlar la apoptosis. Al adquirir un dominio BH3, estas proteínas han evolucionado para integrar la apoptosis con otras rutas homeostáticas. Debido a su capacidad de regular la respiración mitocondrial impulsada por glucosa, la BAD está en posición única para registrar el metabolismo de la glucosa y cualquier consecuencia bioenergética celular que siga a la utilización de glucosa. El dominio BH3 de BAD tiene la capacidad de intervenir selectivamente en interacciones de proteínas discretas que regulan el metabolismo de glucosa/secreción de insulina (Figura 4). Esta capacidad dual está determinada por el estado de fosforilación del dominio BH3. Aunque BCL-X_L sea la diana de BH3 a través de la cual BAD interviene en la maquinaria apoptótica, la naturaleza de la diana de BH3 que le permite activar la GK espera investigaciones adicionales. Estudios futuros evaluarán si la SAHB de BAD funciona desplazando un regulador negativo en el complejo o poniendo a disposición de GK un activador, y determinarán cómo estos eventos están orquestados por el estado de fosforilación de BH3 de BAD. Caracterizar los rasgos específicos de las dianas de BH3 de BAD que funcionan en distintas condiciones y las señales metabólicas precisas implicadas en su selección proporcionará importantes perspectivas del mecanismo subyacente en la decisión binaria dependiente de BAD entre metabolismo y apoptosis. Estos hallazgos sugieren también que las dos funciones de BAD pueden orientarse separadamente con fines terapéuticos. Debido a que la fosforilación de BAD tiene efectos opuestos sobre la unión a BCL-X_L y la SIEG, un mimético de BH3 de BAD fosforilado que facilite la SIEG pero sea incapaz de unirse a BCL-X_L para promover la apoptosis puede servir como terapia prototípica en diabetes y trasplante de islotes.

Ejemplo 11: Resistencia periférica a la insulina

La diabetes de tipo 2 proviene de deficiencias tanto en la acción de la insulina como en la función de células β pancreáticas. Tres tejidos, a saber músculo esquelético, adipocitos e hígado, constituyen los sitios de resistencia a la insulina con papeles críticos en la captación de glucosa, lipólisis y producción hepática de glucosa, respectivamente. Sin embargo, el sitio primario de resistencia a la insulina se ha sometido a investigación activa (Accili D. 2003.

Diabetes 53, 1633-42). Las pruebas genéticas sugieren que el fracaso del hígado en regular apropiadamente el metabolismo de la glucosa en respuesta a la insulina constituye el sitio primario de resistencia a la insulina en diabetes de tipo 2 (Lauro D. *et al.*, 1998. *Nat Genet* 20: 294-8; Bruning J.C. *et al.*, 1998. *Mol Cell* 2: 559-69). La incapacidad de equilibrar la producción hepática de glucosa frente a la captación y almacenamiento de glucosa tiene un efecto drástico sobre los niveles sanguíneos de glucosa. Por consiguiente, se han centrado esfuerzos significativos para el control terapéutico de la diabetes en la supresión de la producción hepática de glucosa (PHG). Por ejemplo, el rasgo prominente del fármaco antidiabético metformina usado comúnmente para el tratamiento de diabetes de tipo 2 es su efecto sobre la PHG (Kirpichnikov D, 2002, *Ann Intern Med* 137: 25-33).

El equilibrio entre la producción hepática de glucosa y la eliminación/almacenamiento de glucosa depende en gran medida de la función opuesta de dos enzimas importantes, respectivamente a saber glucocinasa, que controla la fosforilación de glucosa, y glucosa 6-fosfatasa, que convierte el 6-fosfato de glucosa de vuelta en glucosa. Además, al utilizar glucosa, la glucocinasa afecta directamente a la transcripción de genes gluconeogénicos en el hígado implicados en la PHG, cuya expresión requiere la presencia de glucosa (Vaulont D., 2001. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9116-21; Scott D.K., 1998. *J Biol Chem* 273: 24145-51). Este efecto de la GK sobre la expresión génica es consistente con su papel como sensor de glucosa en el hígado. Por consiguiente, los activadores de molécula pequeña de GK tienen eficacia en la supresión de PHG en diversos modelos de murido de diabetes (Grimsby J. *et al.*, 2003. *Science* 301: 370-3)

Para delimitar el papel de BAD en la resistencia periférica a insulina, se valoró la sensibilidad de hígado, músculo y grasa frente a insulina en ratones deficientes en BAD usando el análisis de pinzamiento euglicémico-hiperinsulinémico (Fig. 51-52). Se determinan las tasas de infusión de glucosa requeridas en estas condiciones por la respuesta a la insulina en tejidos de músculo, hígado y adiposo. Se encuentra una pequeña (pero estadísticamente significativa) disminución de la tasa de infusión de glucosa (~17 %) en animales *Bad -/-* frente a *Bad +/-* (Figura 53). Esta diferencia puede atribuirse enteramente a la falta de supresión de la producción hepática de glucosa (Figura 54). No se encontraron diferencias en la síntesis de glucógeno como se indica por los estudios de flujo de glucosa (Figura 55) o en la captación de glucosa en músculo y WAT (Figura 56 y 57). Estos datos indican que BAD desempeña un papel importante en la mediación de la acción de la insulina en hígado que es consistente con su efecto sobre la actividad GK. Por lo tanto, activar la GK a través de compuestos miméticos de BAD (Figura 18) puede probarse eficaz para suprimir la producción hepática de glucosa y normalizar los niveles sanguíneos de glucosa.

Además, se disminuía la supresión mediada por insulina de los ácidos grasos plasmáticos (Figura 58) y se detectaban mayores niveles de lípidos en ratones *Bad -/-* durante el pinzamiento de insulina (Figura 59). Estos datos indican perfiles lipídicos anormales en ratones deficientes en BAD y sugieren un papel para BAD en la mediación del efecto de la insulina en tejidos adiposos.

Ejemplo 12: Hipoglucemia ligada a glucocinasa

Aunque las mutaciones inactivadoras en glucocinasa, como aquellas aisladas en pacientes de MODY 2 (diabetes del adulto de inicio juvenil de tipo 2), están asociadas a trastornos metabólicos marcados por la pérdida de sensibilización ante glucosa y la pérdida de efecto de la insulina sobre la supresión de la producción hepática de glucosa, las mutaciones activadoras en glucocinasa están asociadas a hiperinsulinemia congénita (Byrne M.M. *et al.*, 1994. *J Clin Invest* 93,1120-30; Clement K., 1996. *Diabetologica* 39: 82-90), un subtipo de trastorno clínico de hipoglucemia hiperinsulinémica de la infancia (Glaser B., 1998. *N Engl J Med* 338: 226-30; Christesen H.B.T., 2000. *Diabetes* 51: 1240-6).

Evitar la fosforilación de BAD disminuye la actividad glucocinasa (Danial N.N. *et al.*, 2003. *Nature* 424, 952-6). Los derivados de compuestos de SAHB de BAD que imitan la mutación de serina 155 a alanina (Figura 18), que vuelve este residuo aminoacídico no fosforilable, pueden probarse herramientas terapéuticas importantes en la inhibición de glucocinasa en este entorno patológico. Esta modificación, en combinación con la mutación de L151 y D156 en el dominio BH3 de BAD, que bloquea su capacidad de activar la apoptosis y la secreción de insulina, puede servir como base para compuestos miméticos de BAD que puedan evitar la activación de GK sin inducir la apoptosis en células diana en este entorno patológico.

Ejemplo 13: Sensibilización ante glucosa en el cerebro

Las neuronas glucosensibles son neuronas especializadas encontradas principalmente en el hipotálamo y la médula (Yang X., 1999. *Diabetes* 48: 1763-72; Dunn-Maynell A.A., 2002. *Diabetes* 51:2056-65) que, al contrario que otras neuronas, usan la glucosa como molécula de señalización para regular su actividad. Las neuronas glucosensibles funcionan de modo muy análogo a las células β pancreáticas, sirviendo la GK como vía de acceso a la actividad neuronal inducida por glucosa. Además, de forma similar a la ruta de células β para la secreción acoplada a estímulo, la producción de ATP es el factor metabólico principal que acopla el metabolismo de la glucosa con la actividad neuronal inactivando los canales K_{ATP} y dando pie al posterior flujo de entrada de Ca^{2+} seguido de propagación del potencial de acción (Levin B., 2006. *Physiol Behav* en prensa). Esta actividad neuronal regula a su vez la ruta neuronal integrada que controla la captación, gasto y almacenamiento de energía.

Como la actividad GK en las neuronas glucosensibles es esencial para su función fisiológica (Kang L., 2006. Diabetes 55: 412-20), se predice que los activadores de GK, incluyendo los compuestos de SAH_B de BAD (Figura 18), afectan a la regulación neuroendocrina de la homeostasis de la energía, que a su vez se ha mostrado que tiene una importante implicación en trastornos metabólicos asociados a diabetes y obesidad (Schwartz M.W., 2005. Science 307: 375).

Ejemplo 15: Enfermedad hepática crónica

El hígado desempeña un papel fundamental en el control de la utilización de glucosa/lípido de todo el cuerpo. Mediante la síntesis de glucógeno y la gluconeogénesis, el hígado determina la producción y almacenamiento de glucosa en el cuerpo (Dentin, R., 2005. Biochimie 87:81). Por otro lado, mediante la oxidación β (la ruta mitocondrial a cargo de degradar la grasa para la producción de energía) y la síntesis de ácidos grasos, el hígado afecta al metabolismo lipídico. Las anormalidades en el metabolismo de glucosa y lípidos en el hígado son integrales al estado de resistencia a la insulina (RI) y se cree que contribuyen a la enfermedad hepática crónica, incluyendo enfermedad del hígado grado no alcohólica (EHGNA) y su forma más grave esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Bugianesi, E., 2005. Hepatology 42: 987).

La EHGNA es la presentación hepática del síndrome metabólico, un grupo de trastornos metabólicos que incluyen RI, obesidad, diabetes de tipo II, hipertensión, hiperlipidemia (Falck-Ytter, Y. 2001. Semin Liver Dis 21: 17). En la forma más grave de la enfermedad, EHNA, se observa la pérdida de la arquitectura propia del hígado debido a lesión celular (cirrosis hepática) (Brunt, E.M. 2005. Hepathol Res 33: 68). El hígado graso, también conocido como esteatosis o esteatohepatitis, es un distintivo histológico de EHGNA/EHNA, marcado por altos niveles de acumulación de triglicéridos en hepatocitos. Las estrategias de tratamiento actuales para EHGNA/EHNA incluyen agentes que rebajan los lípidos o aquellos que sensibilizan a los hepatocitos ante la acción de la insulina.

Estos hallazgos proporcionan pruebas de que la exclusión de *Bad* en ratones está asociada a resistencia a la hiperglucemia inducida en un modelo de HFD de RI y diabetes de tipo II (Figuras 22). La respuesta diferencial de ratones *Bad* +/- y *Bad* -/- ante este tratamiento es también evidente por la notable diferencia en la emergencia de hígados grasos (Fig. 60-63). Los animales nulos de BAD no desarrollan hígados grasos. De forma importante, esta resistencia está asociada al estado de fosforilación de BAD (Fig. 64-65). Los ratones que expresan una forma mutante de BAD que no puede nunca fosforilarse (*Bad* 3SA) son más sensibles a la hiperglucemia inducida por HFD (Figura 27) y tienen más tendencia a desarrollar hígados grasos en comparación con sus controles de camada de tipo silvestre (Fig. 64-65).

Dados estos hallazgos, evitar la función apoptótica de BAD puede probar ser una estrategia terapéutica eficaz en EHGNA/EHNA al evitar la lesión y función hepática. De forma importante, esta estrategia puede considerarse en combinación del tratamiento farmacológico actual para EHNA (Portincasa, P. 2006. Curr Med Chem 13: 2889).

Ejemplo 16: La alternancia glucolítica en tumores

Los tumores son conocidos por ser altamente glucolíticos (Gatenby, R.A. y Gillies, R.J. 2004. Nat Rev Cancer 4, 891-99). Esto se ha atribuido a una fosforilación oxidativa (OXPHOS) defectiva mediante mitocondrias o a un "recableado" de las rutas metabólicas en tumores para utilizar la glucólisis y sus intermedios como fuente principal de ATP, reduciendo la síntesis equivalente y macromolecular para soportar sus altas demandas bioenergéticas (Mazurek S. y Eigenbrodt E. 2003. Anticancer Res 23,1149-54). Los ejemplos de dichos desplazamientos metabólicos o "recableado" incluyen un ciclo de TCA (ácidos tricarboxílicos) truncado mediante el que el intermedio de TCA citrato, que se genera mediante la utilización de piruvato por las mitocondrias, proporciona acetil-CoA citosólico para la síntesis de ácidos grasos (Figura 3) (Hatzivassiliou G. et al. 2005. Cancer Cell 8, 311-21). Otro ejemplo de desplazamiento metabólico de células tumorales es la utilización de piruvato para generar lactato mediante una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (Figura 3) (Fantin, V.R. et al., 2006. Cancer Cell 9, 425-34).

Mediante su capacidad de regular la eficacia mediante la que las mitocondrias utilizan la glucosa como fuente de carbono para la respiración, la BAD puede determinar la disponibilidad del piruvato para usar en las rutas metabólicas anteriores. Los ratones deficientes en *Bad* avanzan hasta linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) (Ranger, A.M. et al., 2003. Proc Natl Acad Sci USA 100, 9324-29), tumores conocidos por ser altamente glucolíticos. Esto puede ser indicativo tanto de pérdida del control apoptótico apropiado como de potenciación de la alternancia metabólica de OXPHOS a glucólisis en LDCBG deficiente en *Bad*.

Ejemplo 17: Métodos generales

Modelos animales. Los modelos genéticos de inserción génica *Bad* -/- y *Bad* 3SA se han descrito anteriormente (Datta S.R. et al., 2002. Dev Cell 3, 631-43; Ranger A.M et al., 2003. Proc Natl Acad Sci USA 100, 9324-9). El modelo de inserción génica *Bad* S155A se generó como se describe en la Fig. 7.

Estudios de pinzamiento hiperglucémico. Los estudios de pinzamiento hiperglucémico se efectuaron en ratones macho de 10 semanas de edad siguiendo los procedimientos estandarizados establecidos en el Mouse Metabolic Phenotyping Center de la Universidad de Yale. Al menos 5 días antes del análisis de pinzamiento, se anestesiaron

los ratones y se insertó un catéter permanente en la vena yugular interna derecha para infusión intravenosa de glucosa. Se hicieron ayunar los ratones durante una noche y se realizó el análisis de pinzamiento en animales en estado despierto y mínimamente estresado. Se enlazó un conector de 3 vías con el catéter de la vena yugular para infusión intravenosa y se obtuvieron muestras de sangre. Se realizó un pinzamiento hiperglucémico de 2 horas con una infusión cebada y variable de glucosa al 20 % para elevar y mantener las concentraciones plasmáticas de glucosa a ~300 mg/dl. Se recogieron muestras de sangre (20 µl) a intervalos de 10-20 min para la medida inmediata de las concentraciones plasmáticas de glucosa usando el analizador de glucosa Beckman II (Beckman, Fullerton, CA). Se midió la insulina plasmática mediante radioinmunoensayo usando el kit suministrado por Linco Research (St. Charles, MO).

Estudios de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico. Cuatro días antes de los estudios hiperinsulinémicos-euglucémicos, se valoró la composición corporal de los ratones por espectroscopia de resonancia magnética de ^1H (Broker BioSpin, Billerica, MA). Se implantaron catéteres venosos yugulares y se dejaron recuperar los ratones durante 4 días. Después de una noche de ayuno, se infundió $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-glucosa}$ (purificada por HPLC; Perkin Elmer, Boston, MA) a una tasa de 0,05 µCi/min durante 2 h para valorar el recambio de glucosa basal. Después del periodo basal, se realizó el pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico durante 120 min con una infusión cebada/continua de insulina humana (300 pmol/kg de cebado, 15 pmol·kg $^{-1}$ ·min $^{-1}$ de infusión (Novo Nordisk, Princeton, NJ) y una infusión variable de dextrosa al 20 % para mantener la euglucemia (~100-120 mg/dl). Se obtuvieron muestras de plasma de la cola a 20, 40, 55, 70, 75, 80, 95 y 120 min. Se infundió $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-glucosa}$ a una tasa de 0,1 µCi/min a lo largo de los pinzamientos y se inyectó 2-desoxi-D- $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{-glucosa}$ (DOG; Perkin Elmer) como bolo en el minuto 75 del pinzamiento para estimar la tasa de captación de glucosa en tejido estimulada por insulina como se describe anteriormente (Youn J.H., 1993. *Diabetes* 42: 757-63). Al final del pinzamiento, se anestesiaron los ratones con inyección de pentobarbital de sodio (150 mg/kg) se tomaron todos los tejidos a los 4 min, se congelaron inmediatamente usando lengüetas de aluminio enfriadas con N $_2$ líquido y se almacenaron a -80 °C para análisis posterior.

Preparación de islotes. Se perfundieron páncreas de ratón con colagenasa y se aislaron los islotes como se describe anteriormente (Larsson O. *et al.*, 1996. *J Biol Chem* 271, 10623-6). Se cultivaron los islotes rutinariamente durante 1-2 días antes de los ensayos de secreción de insulina (perfusión o incubación estática).

Ensayos de perfusión de islotes. Se llevaron a cabo ensayos de perfusión como se describe en (Cunningham B.A. *et al.*, 1996. *Am J Physiol* 271, E702-10). Brevemente, se emparejaron 120 islotes en una columna entre dos capas de perlas Cytodex-3 micro-carrier (Farmacia) y se perfundieron con tampón de Krebs (NaCl 119 mM, KCl 4,6 mM, MgSO $_4$ 1 mM, Na $_2$ HPO $_4$ 0,15 mM, KH $_2$ PO $_4$ 0,4 mM, NaHCO $_3$ 25 mM, CaCl $_2$ 2 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4, seroalbúmina bovina al 0,05 %) que contenía la concentración indicada de glucosa o KCl. Se bombeó la disolución de perfusión usando una bomba multicanal de alta precisión (IP Istamec modelo n° 78023-02, Cole-Parmer Instruments Co.) a un caudal de 0,3 ml/min para asegurar que los islotes no se expusieran a una presión excesiva durante el curso de la perfusión. Antes de la recogida de fracciones, se preperfundieron los islotes con glucosa 3 mM durante 25 min. Se recogieron las fracciones eluidas cada 15 s usando un recolector de fracciones BioRad (modelo n° 2128). Se mantuvo el sistema entero en una cámara a 37 °C. Se cambió la concentración de glucosa en la disolución de perfusión a los tiempos indicados (Fig. 1d). Para la valoración de la respuesta a la dosis de glucosa de la secreción de insulina (Fig. 2f), se recogieron las fracciones correspondientes al primer pico de insulina para medidas de insulina antes de aumentar la concentración de glucosa al siguiente incremento. Se midió la insulina por radioinmunoensayo.

Medidas de la relación de ATP/ADP. Se lavaron lotes de 50 islotes de tamaño coincidente y se preincubaron en tampón de Krebs que contenía glucosa 3 mM durante 30 min. Se alternó entonces el tampón a disolución de Krebs que contenía glucosa 5,5 mM o 25 mM seguido de 1 hora de incubación a 37 °C en tampón de Krebs. Se midieron los contenidos de ATP y ADP como se describe en (Schultz V. *et al.*, 1993. *Anal Biochem* 215, 302-04) usando un enfoque basado en la bioluminiscencia.

Síntesis de SAHB. Para generar derivados de SAHB de BID y BAD, se efectuaron la síntesis peptídica basada en Fmoc, la metátesis de olefina, la derivatización de FITC, la purificación por HPLC en fase inversa y los microanálisis como se reseña anteriormente (Walensky L.D. *et al.*, 2004. *Science* 305, 1466-70; Walensky L.D. *et al.*, 2006. *Mol Cell* en prensa). Se sintetizó un panel inicial de derivados de fosforilo de SAHB de BID y BAD como se describe (Figura 18).

Identificación de diana por inmunoprecipitación basada en SAHB o reticulación. Se emplean SAHB sintetizadas con un "asa" para inmunoprecipitación (p.ej. FITC, biotina) para identificar la diana o dianas intracelulares de la unión basada en BH3 y actividades biológicas como se describe anteriormente (Walensky L.W. *et al.*, 2006. *Mol Cell* 24, 199-210). Se ha empleado también una metodología de reticulación *in situ* alternativa en que los compuestos de SAHB se derivatizan para reticular directamente con dianas intracelulares tras fotoestimulación u otros desencadenantes (Seghatelian, A. *et al.*, 2004. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 10000-5). (Fig 68-69).

Método de incubación estática (liberación por lotes) para la liberación de insulina en islotes β primarios aislados. Se lavaron los islotes 3 veces y se recolectaron a 5 islotes por tubo en tampón de Krebs que contenía

glucosa 3 mM. Se incubaron los tubos durante 30 min a 37 °C. Se sedimentaron entonces los islotes y se reemplazó el tampón por disolución de Krebs que contenía la concentración indicada de glucosa o secretagogos. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, se sedimentaron los islotes y se recogió el sobrenadante para la medida de insulina. Se solubilizó el sedimento para valorar el contenido de insulina intracelular. Se midió la insulina por ELISA usando insulina de ratón como patrón (kit ELISA de insulina, n° de cat. INSKR020, Crystal Chem. Inc.; Chicago, IL). Para ensayos de reconstitución genética, se incubaron lotes de 150 islotes recién aislados en medio RPMI que contenía glucosa 11 mM y 10 % de suero en presencia de adenovirus a 10^5 unidades formadoras de placa durante 90 min a 37 °C (Zhou Y.P. *et al.*, 2003. *J Biol Chem* 278, 51316-23). A estas ufp, las infecciones no causaban una apoptosis significativa de los islotes. Se reemplazó entonces el medio por RPMI reciente y se cultivaron los islotes durante 24-48 h antes de los ensayos de liberación de insulina. Se recolectaron a mano los islotes que expresan GFP en cada grupo para los ensayos de liberación por lotes como se describe anteriormente. Para el tratamiento con los compuestos de SAHB, se incubaron 150 islotes recién aislados durante una noche en medio RPMI que contenía glucosa 11 mM, 10 % de suero y 3 μ M de los compuestos indicados o control de vehículo DMSO. Se lavaron los islotes y se efectuaron los ensayos de liberación de insulina en tampón de Krebs como anteriormente.

Medida del potencial de membrana mitocondrial. Se dispersaron los islotes, se sembraron en cubreobjetos y se incubaron durante una noche a 37 °C. El día del experimento, se preincubaron células β en glucosa 3 mM durante 3 horas. Antes de formar imágenes, se cargaron las células con éster efílico de tetrametilrodamina (TMRE) 7 nM y MitoTracker Green (MTG) 100 nM (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 45 min y 30 min, respectivamente. Se retiró el MTG del medio y se tomaron imágenes de las células usando un microscopio confocal Leica TCS SP2 invertido (Wetzlar, Alemania). Se tomaron cuatro imágenes apiladas de múltiples células individuales antes y después de elevar la concentración de glucosa extracelular de 3 mM a 8 mM o antes de la adición de KIC 10 mM. Se analizó la intensidad de fluorescencia de TMRE como se describe anteriormente (Heart E. *et al.*, 2006. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E143-E148). En estudios que valoran los efectos de los compuestos de SAHB sobre $\Delta\Psi$, se incubaron células β dispersadas con control de vehículo DMSO o con 1 μ M del compuesto de SAHB indicado durante 4 horas antes de formar imágenes. Se tomaron cuatro imágenes apiladas de múltiples células individuales antes y después de elevar la concentración de glucosa extracelular de 3 mM a 8 mM.

Ensayos de glucocinasa en islotes primarios y la estirpe de células β MIN6. Se siguió el procedimiento descrito por Trus *et al.* (Trus M.D. *et al.*, 1981. *Diabetes* 30,911-22). Se adaptaron los ensayos a un formato de 96 pocillos usando un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Brevemente, se homogeneizaron ~900-1000 islotes de ratón (Fig. 2e) o $5-6 \times 10^6$ células β MIN6 (Fig. 3f) en tampón que contenía Tris-HCl 30 mM pH 8,2, EDTA 4 mM, KCl 150 mM, $MgCl_2$ 4 mM, DTT 2,5 mM, 5'AMP 1 mM, fosfato de potasio 3 mM pH 7,4, K_2SO_4 1 mM, β -mercaptoetanol 15 mM y 0,2 % de BSA usando un mortero de teflón y un homogeneizador giratorio. Se apartó una pequeña alícuota de homogeneizado para la medida del contenido de ADN o proteína. Se detectó la actividad fosforilante de glucosa en una reacción de producción de NADH impulsada por glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Se calculó la actividad glucocinasa como la diferencia en el NADH producido a concentraciones de glucosa de 100 mM (actividad glucocinasa) y 0,5 mM (actividad hexocinasa) en un tampón de reacción que, además de glucosa, contenía HEPES-HCl 50 mM pH 7,7, KCl 100 mM, $MgCl_2$ 7,4 mM, β -mercaptoetanol 15 mM, NAD^+ 0,5 mM, 0,05 % de BSA, G6PDH 2,5 μ g/ml (0,7 U/ml) (Sigma) y ATP 5 mM. Se incubaron las reacciones durante 90 min a 31 °C en un volumen total de 100 μ l (Trus M.D. *et al.*, 1981. *Diabetes* 30, 911-22). Los valores obtenidos rutinariamente en estos ensayos están dentro del intervalo de los reseñados anteriormente para GK en islotes primarios (Trus M.D. *et al.*, 1981. *Diabetes* 30, 911-22) y en la estirpe de células β MIN6 (Iizuka K. *et al.*, 2000. *J Endocrinol* 164, 307-14). Para los estudios presentados en la Fig. 3f, se trataron células MIN6 con 3 μ M de los compuestos de SAHB durante 4 horas antes de la preparación de homogeneizados.

Preparación de disoluciones madre adenovíricas. Se generaron adenovirus recombinantes que expresan GFP sola o GFP y BAD de tipo silvestre o mutante usando el sistema de ensayo pAdEasy como se describe en (He T.C. *et al.*, 1998. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2509-14). Se efectuaron la amplificación, purificación, titulación y verificación víricas en el Vector Core of the Harvard Gene Therapy Initiative, Harvard Medical School, Boston, MA.

Ensayos de PCR instantánea. Se preparó el ARN total a partir de islotes usando el kit Rneasy Plus Mini (Qiagen). Se usaron al menos tres animales separados para las preparaciones de ARN, se prepararon las muestras de ARN por duplicado o triplicado y se efectuaron las reacciones de síntesis de ADNc de control que no contienen enzima transcriptasa inversa para cada muestra. Se realizaron las reacciones PCR por triplicado. Se usó 1 μ g de ARN total en 20 μ l de reacciones de síntesis de ADNc usando técnicas estándares. Se diluyó el ADNc 20 veces y se usaron 2 μ l en una reacción PCR de 25 μ l usando cebadores para BAD. Otro conjunto de reacciones de control contenía cebadores para proteína ribosómica (RPL4), que servía como control interno para la calidad del ARN. La mezcla de reacción contenía 300 nM de cada cebador y 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Se detectaron los productos de PCR con el detector de secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) y se determinaron los valores de umbral (C_T) como la medida del número de ciclos al que se detecta por primera vez un aumento estadísticamente significativo de la intensidad de fluorescencia. Se calculó la abundancia del gen amplificado usando los valores de C_T y se normalizó a los valores medios de RPL4 para obtener la abundancia relativa. Se normalizó entonces la abundancia relativa a la del grupo de control (muestras de *Bad* +/-) y se representaron las relaciones. La secuencia de cebadores está disponible a petición.

Estudio de la dieta rica en grasas y químicas de la sangre. Se dispusieron ratones macho *Bad* ^{-/-} y *Bad* 3SA y sus correspondientes controles de camada con una dieta rica en grasas (58 % de energía grasa, D12331, Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ) 16 semanas (Winzell M.S. y Ahren B., 2004. *Diabetes* 53 Supl. 3, S215-9). Se mantuvo una cohorte paralela con dieta normal. Se monitorizaron semanalmente los pesos corporales y niveles sanguíneos de glucosa con alimentación. Se midieron los niveles sanguíneos de glucosa usando un glucómetro (One Touch, Lifescan, Milpitas, CA). Se valoraron las concentraciones séricas de insulina usando insulina de ratón como patrón (kit de ELISA de insulina, n° de cat.INSKR020, Crystal Chem. Inc., Chicago, IL).

Inmunotinción y medidas del área de islote. Se fijaron páncreas con formalina al 10 % y se embebieron en parafina. Se tiñeron secciones pancreáticas en serie de 5 µm como se describe a continuación. Se efectuó la inmunohistoquímica usando un suero de insulina de conejillo de Indias anti-humano n° 4011-01 (Linco Research Inc., St. Charles, MO), seguido de incubación con anticuerpos secundarios AffiPure conjugados con peroxidasa (Jackson Immuno Research). Se revelaron las secciones usando tetraclorhidrato de 3,3-diaminobenzidina y se contratiñeron entonces con hematoxilina y eosina. Para las medidas del área de islote, se tiñeron las secciones con el anticuerpo anti-insulina anterior seguido de anticuerpo secundario biotinilado y se marcaron con estreptavidina conjugada con rojo de Tejas (Molecular Probes). Para cada sección, se examinaron una media de 14 campos de bajo aumento bajo el microscopio y se capturaron en imágenes digitales, que se analizaron entonces usando el software MetaMorph. Brevemente, se rastrearon los islotes de cada sección, se halló el umbral usando el software MetaMorph y se calculó el área positiva de insulina. Se dividió la suma del área positiva de insulina (área de islote total) entre el área de tejido total en cada portaobjetos y se expresó el número como área porcentual de islote. Se analizaron múltiples secciones de al menos tres ratones por grupo.

Generación de ratones con inserción génica *Bad* S155A. La estrategia de inserción génica era similar a la usada en la generación de los alelos 3SA (Datta S.R. *et al.*, 2002. *Dev Cell* 3, 631-43). Brevemente, se introdujo la mutación de serina a alanina de S155 en el dominio BH3 de BAD con codificación por RFLP silenciosa y se introdujo un sitio EcoRI en el exón 3 de BAD por QuickChange usando pBR322BAD como molde. Se permutó un fragmento SexA1/RsrII de 900 pb que contenía esta mutación en un nuevo constructo pBR322BAD. Se clonó un módulo FRT-PGK-NEO-FRT en un sitio NsiI 1,4 kB distal de la 3'UTR de BAD, y se introdujo un módulo de selección negativo de toxina de la difteria en la unión genómica de BAD/pBR322 en el extremo 5' del locus de BAD. Se electroporó este vector en 129 células J1 ES y se inyectó en blastocitos C57B6. Se identificaron los recombinantes homólogos por procedimientos estándares. Se realsó el fragmento SexA1/RsrII de ratones positivos del marcador RFLP y se secuenció para verificar que los ratones portaban la mutación correcta.

Ensayo de unión por polarización de fluorescencia. Se expresó una proteína de fusión de glutathion-S-transferasa de BCL-X_L (residuos 1-212) que carece del dominio transmembrana C-terminal (GST-BCL-X_L ΔC) en *E. coli* BL21 usando pGEX2T (Pharmacia Biotech), y se purificó por cromatografía de afinidad usando perlas de glutathion-agarosa (Sigma) y cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC). Se determinó la concentración de proteína usando el ensayo de Bradford. Se incubaron SAHB fluorescinadas (50 nM) con GST-BCL-X_L ΔC (0,25-1000 nM) en tampón de unión (NaCl 140 mM; Tris-HCl 50 mM [pH 7,4]) a temperatura ambiente. Se midió la actividad de unión por polarización de fluorescencia usando un lector de microplacas POLARstar OPTIMA (BMG labtech). Se determinaron los valores de CE₅₀ por análisis de regresión no lineal usando el software Prism (Graphpad).

Dicroísmo circular. Se disolvieron los péptidos de SAHB en agua a pH neutro a concentraciones de 25-50 µM. Se obtuvieron los espectros de DC en un espectropolarímetro Jasco J-710 a 20 °C usando los siguientes parámetros de medida estándares: longitud de onda, 190-260 nm; resolución de etapa, 0,5 nm; velocidad, 20 nm/s; acumulaciones, 10; respuesta, 1 s; ancho de banda, 1 nm; longitud de paso, 0,1 cm. Se calculó el contenido de hélice α de cada péptido a partir del valor de elipticidad molar del residuo medio a 222 nm ([θ]222) (Chen Y.H. *et al.*, 1974. *Biochemistry* 13, 3350-9; Yang JT, *et al.*, 1986. *Methods Enzymol* 130, 208-269).

REIVINDICACIONES

1. Un péptido BAD de dominio BH3 de menos de 195 aminoácidos para uso en el tratamiento o retardo del inicio de la diabetes.
2. Un péptido para uso según la reivindicación 1 para tratar diabetes de tipo I.
- 5 3. Un péptido para uso según la reivindicación 1 para tratar diabetes de tipo II.
4. Un péptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso es con respecto a un sujeto que es hiperglucémico.
5. Un péptido para uso según la reivindicación 1, en el que el uso es con respecto a un sujeto que es obeso.
- 10 6. Un péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se aumenta el tiempo de supervivencia de células β .
7. Un péptido para uso según la reivindicación 6, en el que se pone en contacto el péptido con la célula β *in vitro* y se trasplanta entonces la célula β a un sujeto.
8. Un péptido para uso según la reivindicación 6, en el que se pone en contacto la célula β con el péptido después de trasplantar la célula β a un sujeto.
- 15 9. Un péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que aumenta la secreción de insulina.
10. Un péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que aumenta la actividad glucocinasa.
11. Un péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que está fosforilado.
12. Un péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que está estabilizado en la hélice alfa.
- 20 13. Un péptido para uso según la reivindicación 12, en el que la estabilización se efectúa reticulando por grapado de hidrocarburos o reticulación química.
14. Un péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende una secuencia aminoacídica expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 3.
15. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende una secuencia aminoacídica: [Xaa]_n YGR ELRX₁X₂X₃DX₁ [Xbb]_n (SEQ ID NO:1), en la que:
25 X₁ y X₂ son independientemente cualquier aminoácido natural o no natural, X₃ es G, D, E, S, T o Y o fosforilado, cada Xaa y Xbb es independientemente un aminoácido y n es un entero de 0 a 10.
16. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que es menor o igual a 25 aminoácidos de longitud.
17. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, en el que el aminoácido no natural es S5.
- 30 18. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que X₂ es norleucina.
19. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que X₁ es ácido aminobutírico o S5.

 BH4
  BH3
  BH1
  BH2
  TM

MULTIDOMINIO ANTIAPOPTÓTICO	MCL-1	
	BCL-2	
	BCL-X	
	BCL-B	
	BCL-w	
	BFL-1/A1	
MULTIDOMINIO PROAPOPTÓTICO	BOK/MTD	
	BAK	
	BAX	
	BCL-rambo	
SOLO BH3	BCL-G	
	BIM	
	BID	
	PUMA	
	BMF	
	BAD	
	BIK	
	HRK	
	NOXA	
		

Fig.1

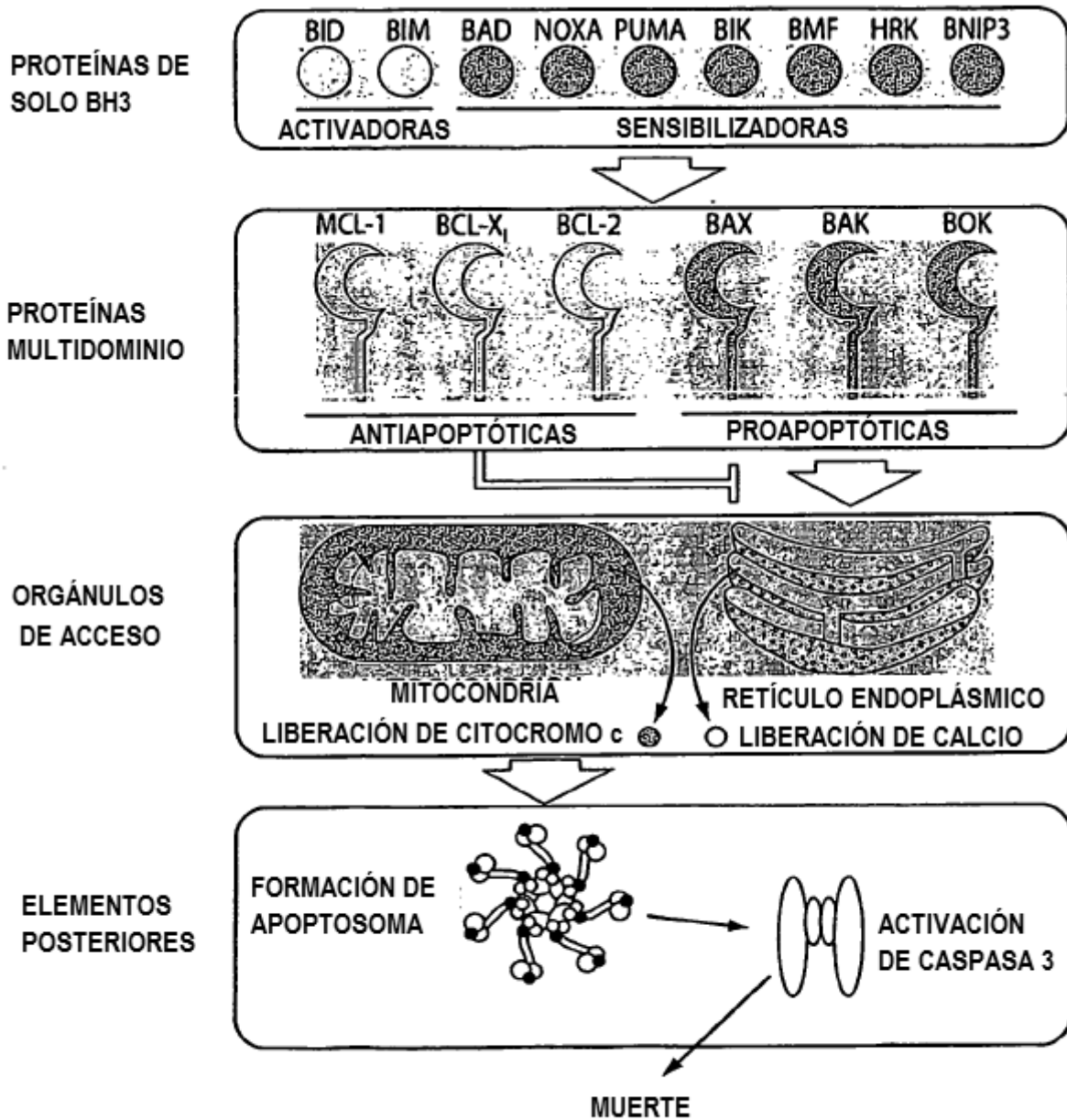


Fig. 2

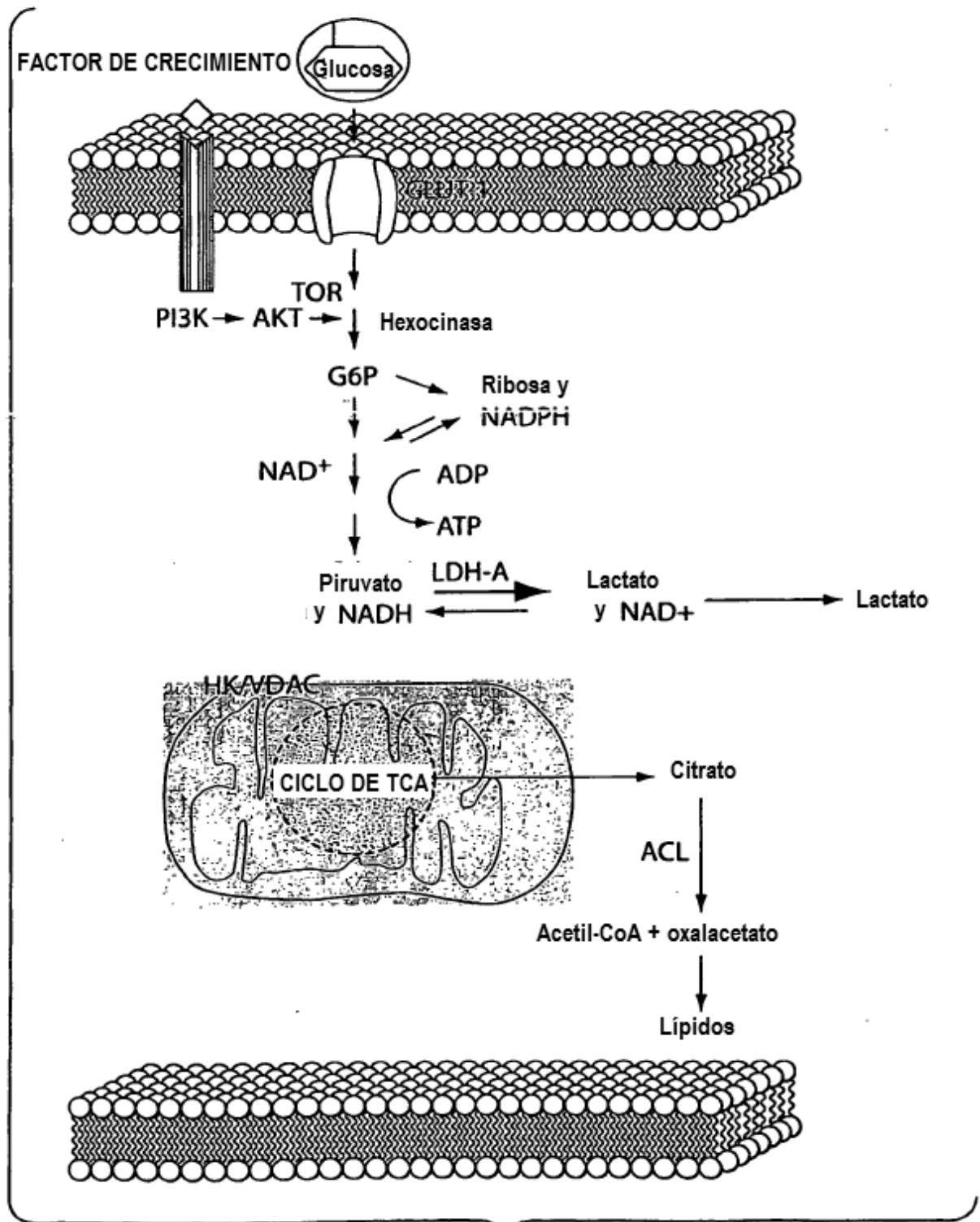


Fig. 3

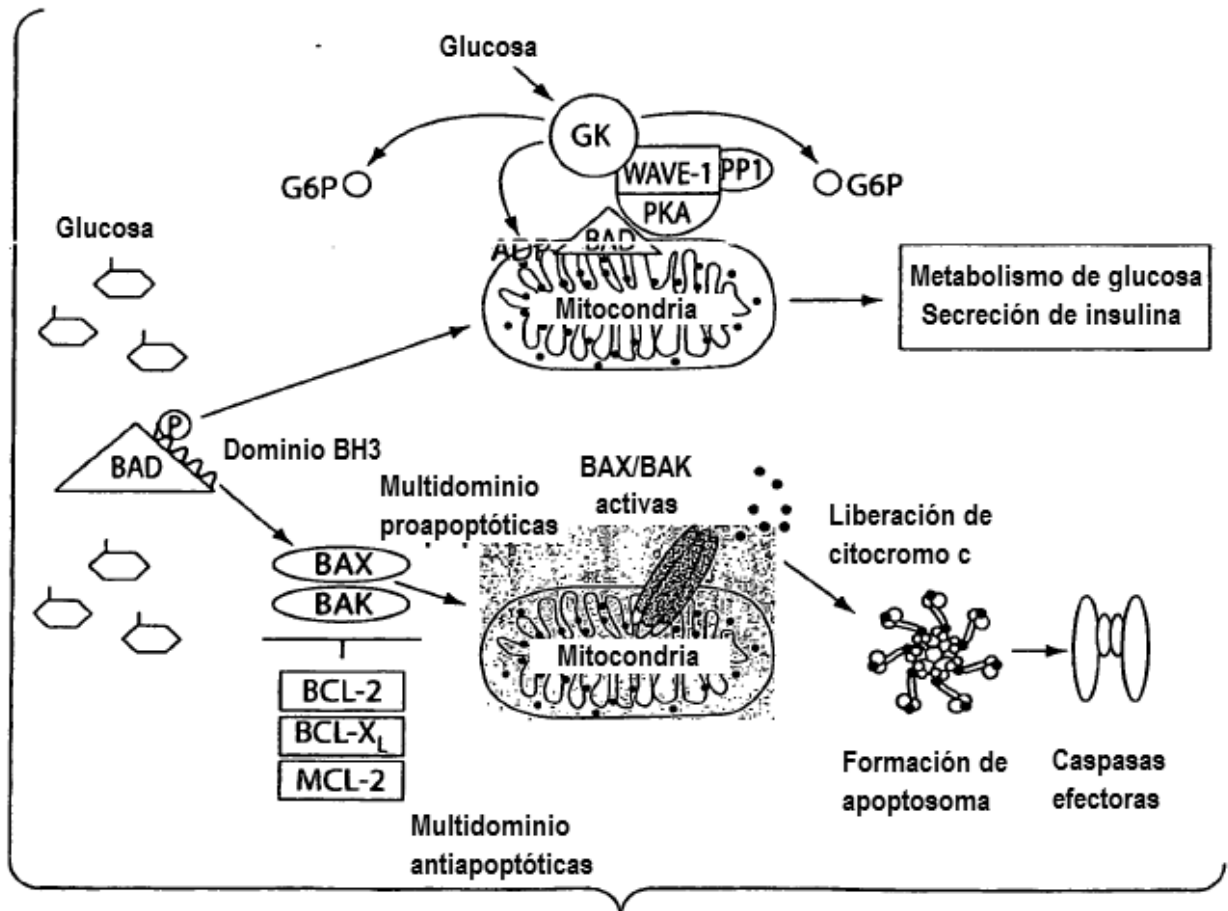


Fig. 4

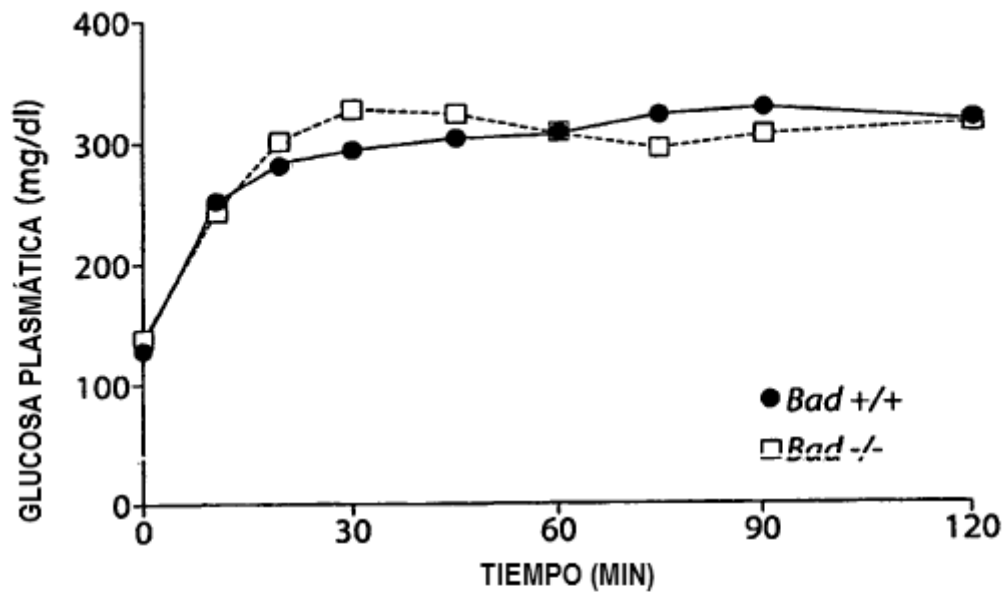


Fig. 5

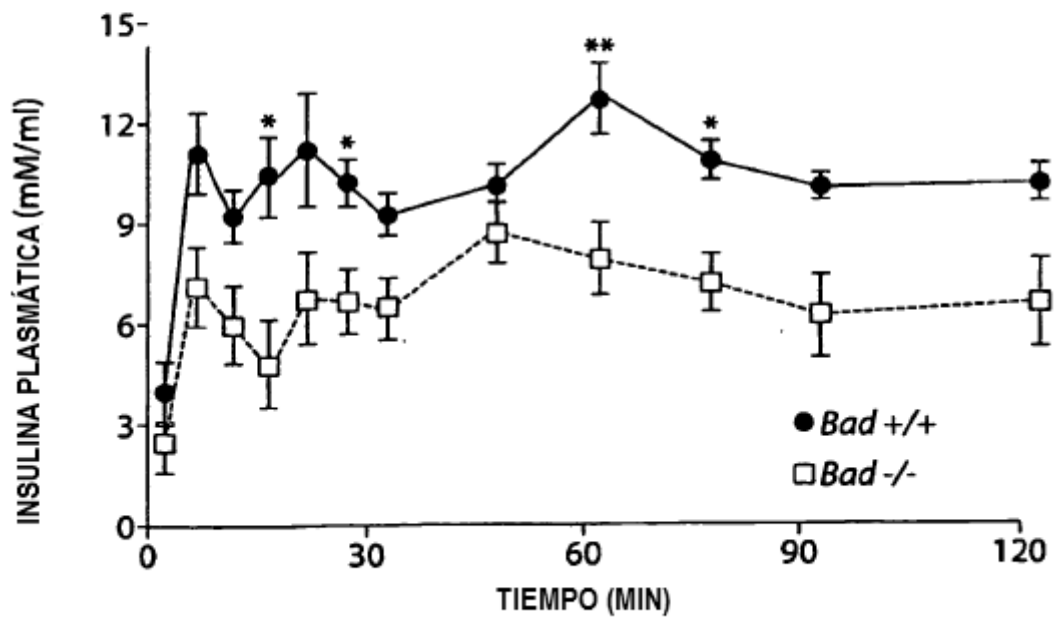


Fig. 6

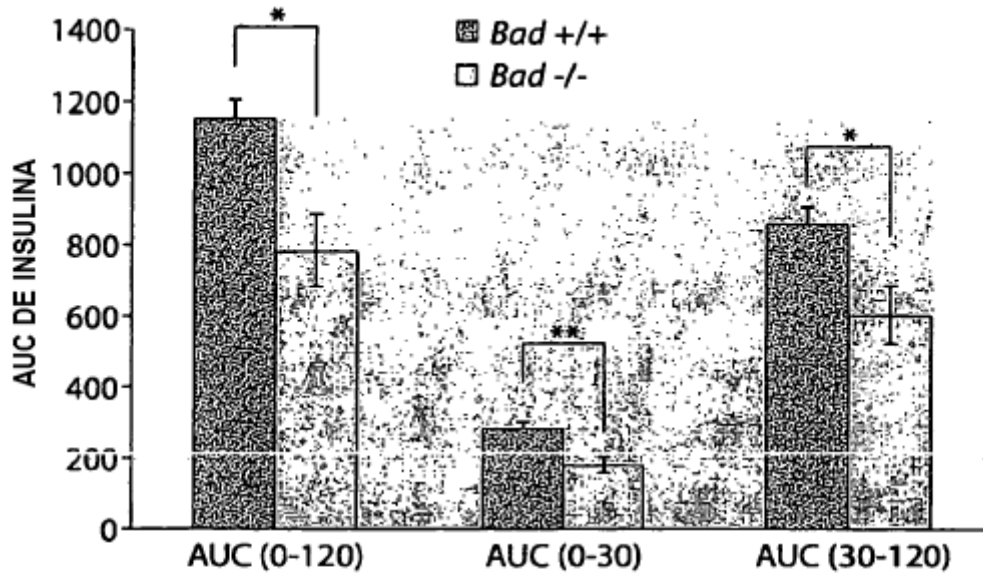


Fig. 7

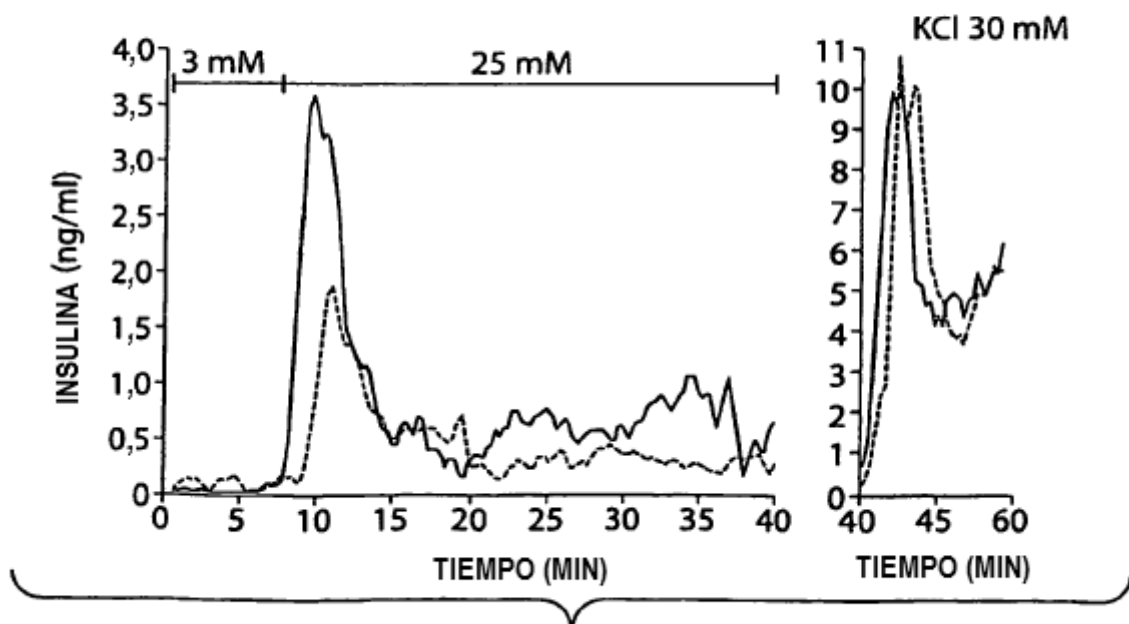


Fig. 8

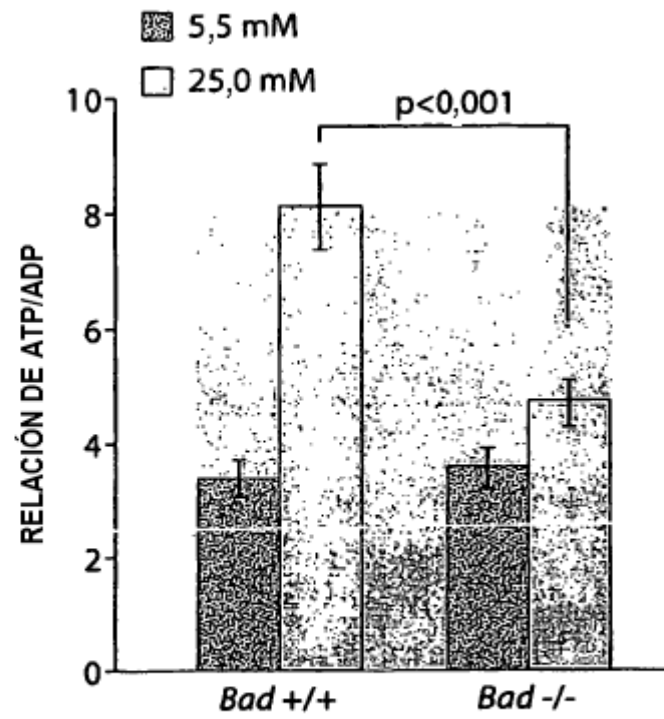


Fig. 9

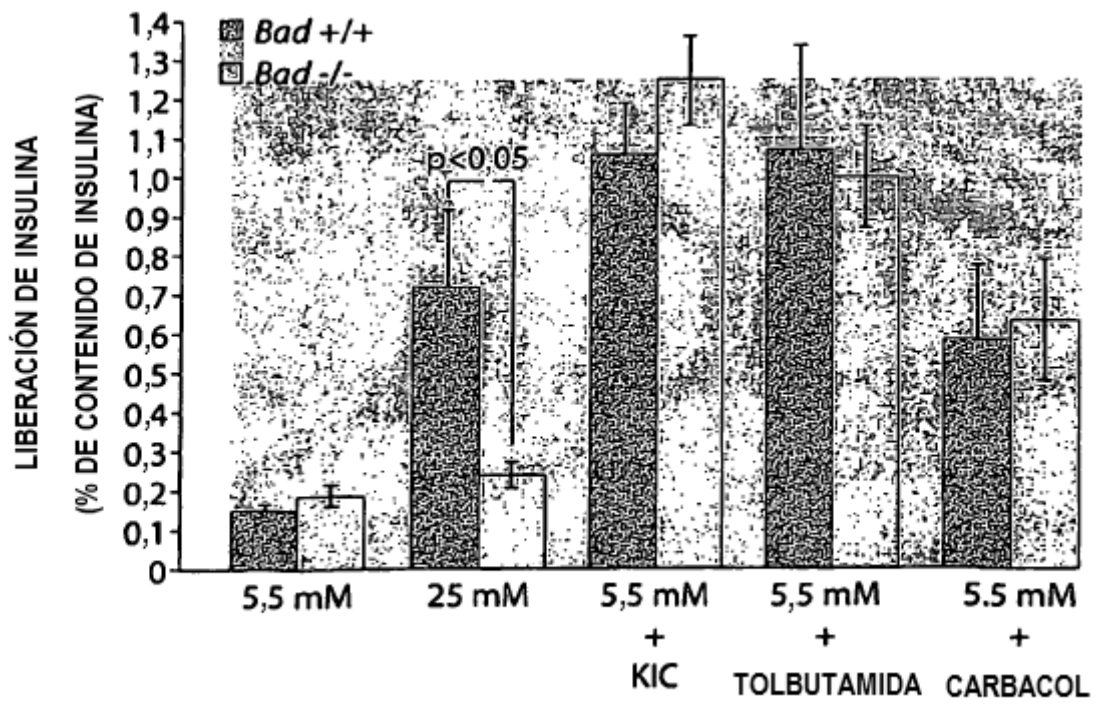


Fig. 10

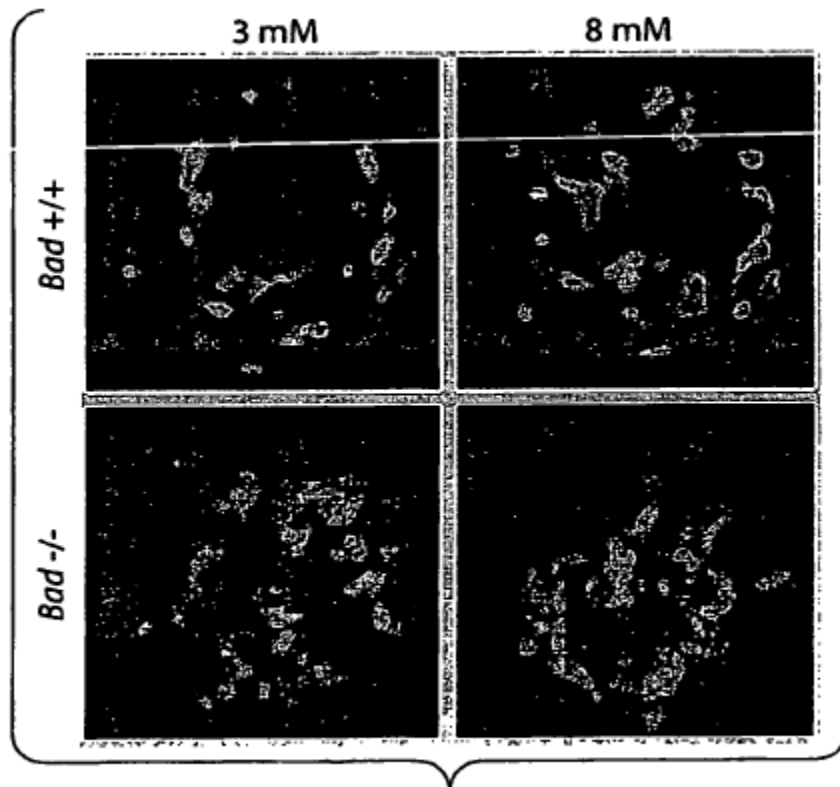


Fig. 11

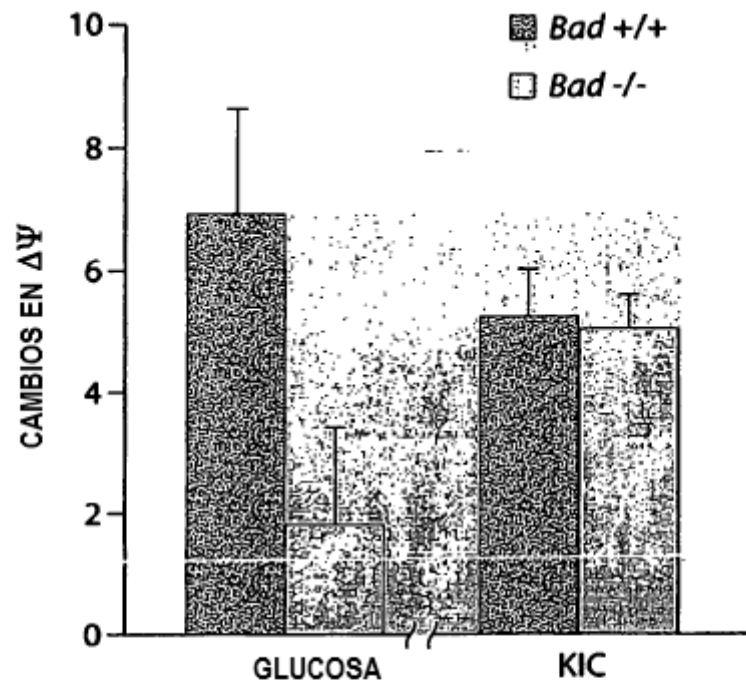


Fig. 12

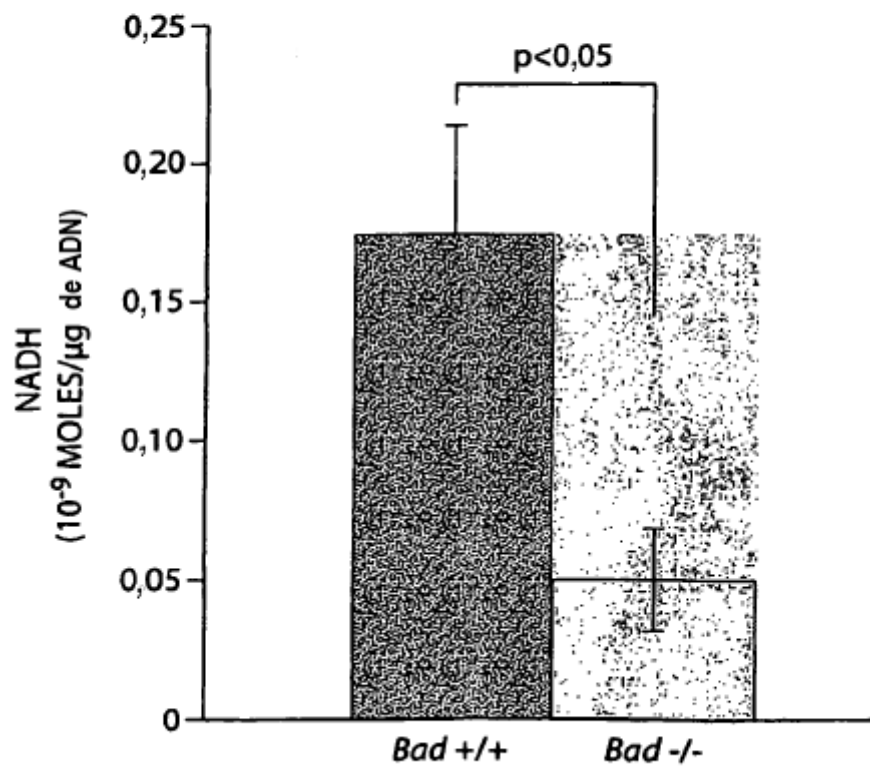


Fig. 13

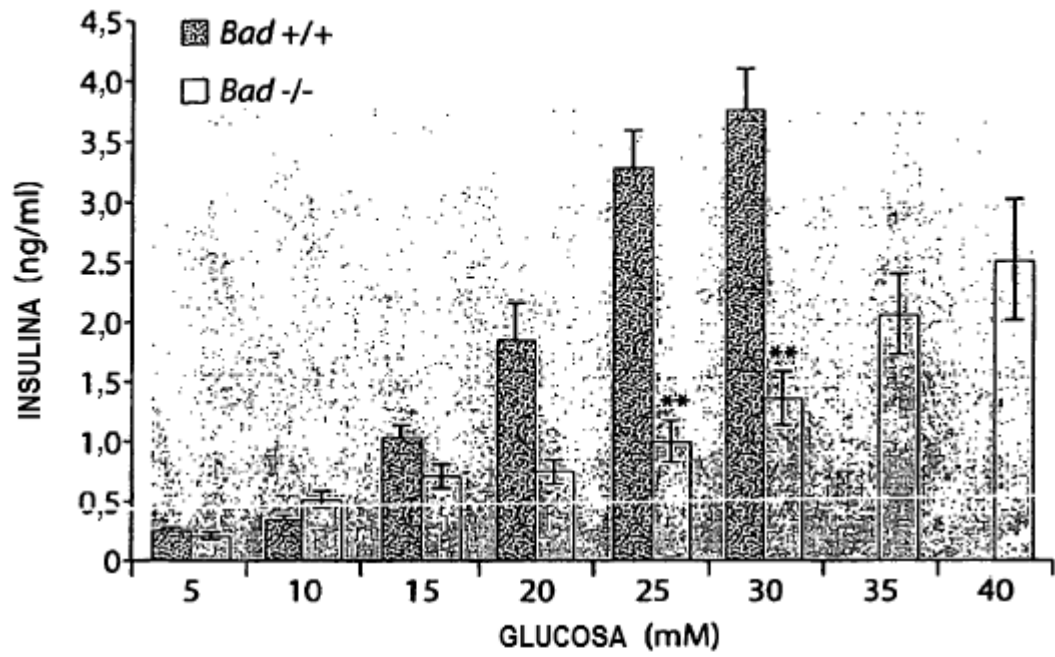


Fig. 14

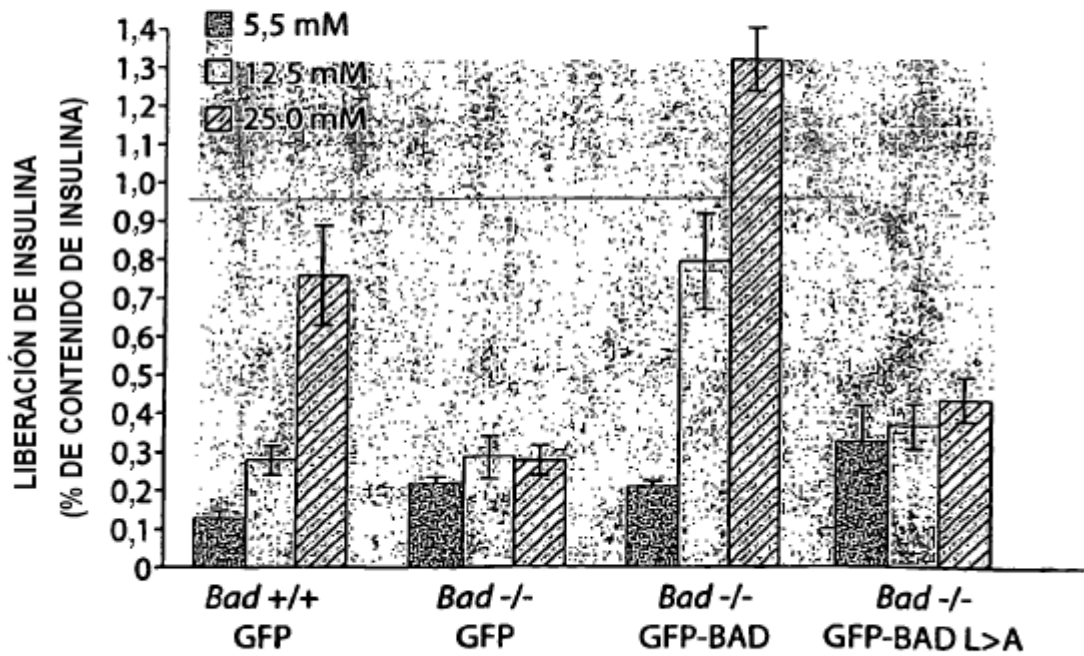


Fig. 15

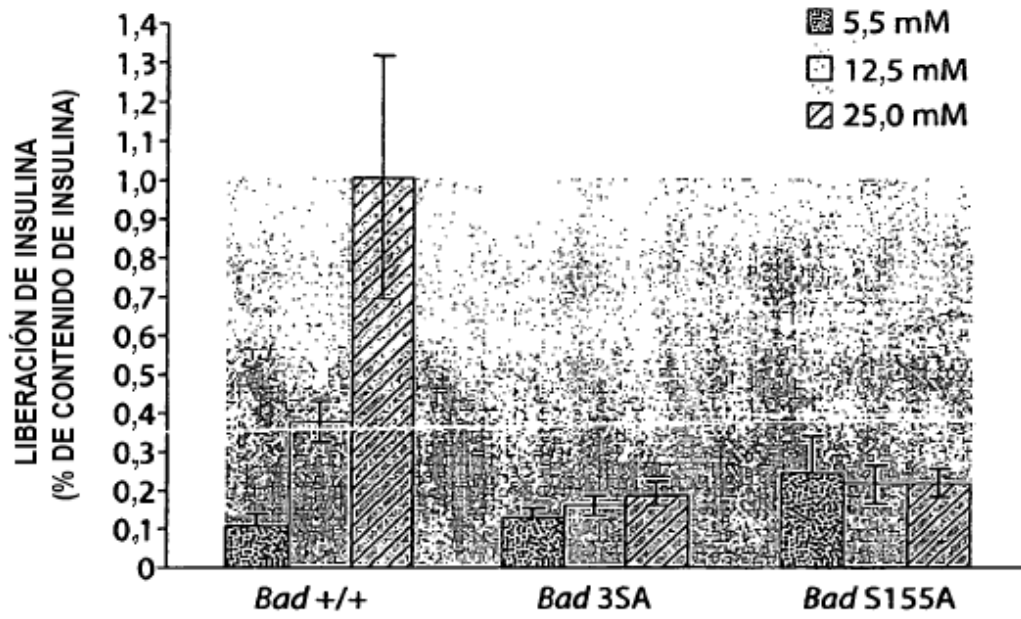


Fig. 16

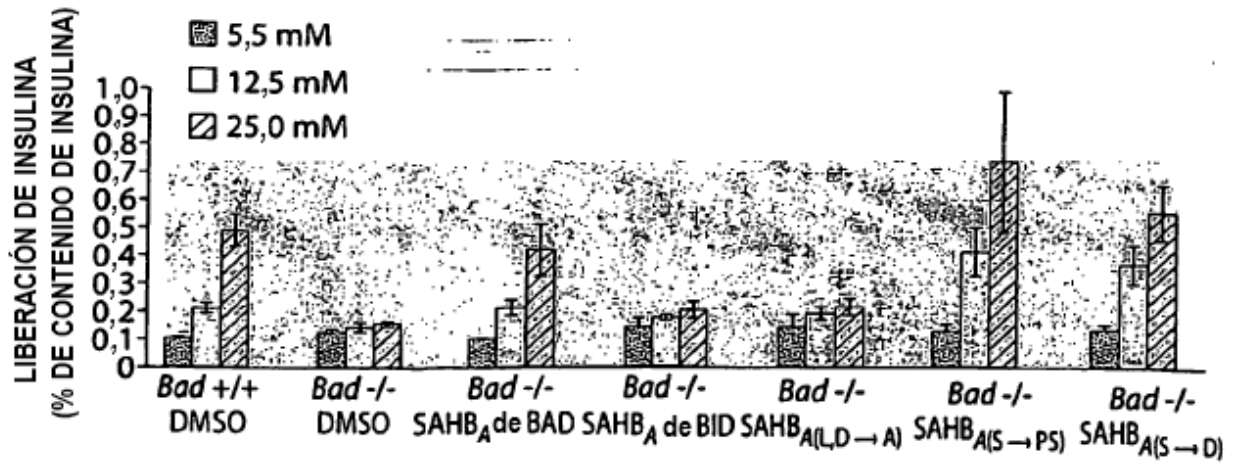


Fig. 17

COMPUESTO	SECUENCIA
SAHB _A de BAD	N L W A A Q R Y G R E L R * M S D * F V D S F K K
SAHB _A de BID	D I I R N I A R H L A * V G D * NL D R S I
SAHB _A (L,D→A) de BAD	N L W A A Q R Y G R E A R * M S A * F V D S F K K
SAHB _A (S→PS) de BAD	N L W A A Q R Y G R E L R * M PS D * F V D S F K K
SAHB _A (S→D) de BAD	N L W A A Q R Y G R E L R * M D D * F V D S F K K

Fig. 18-1

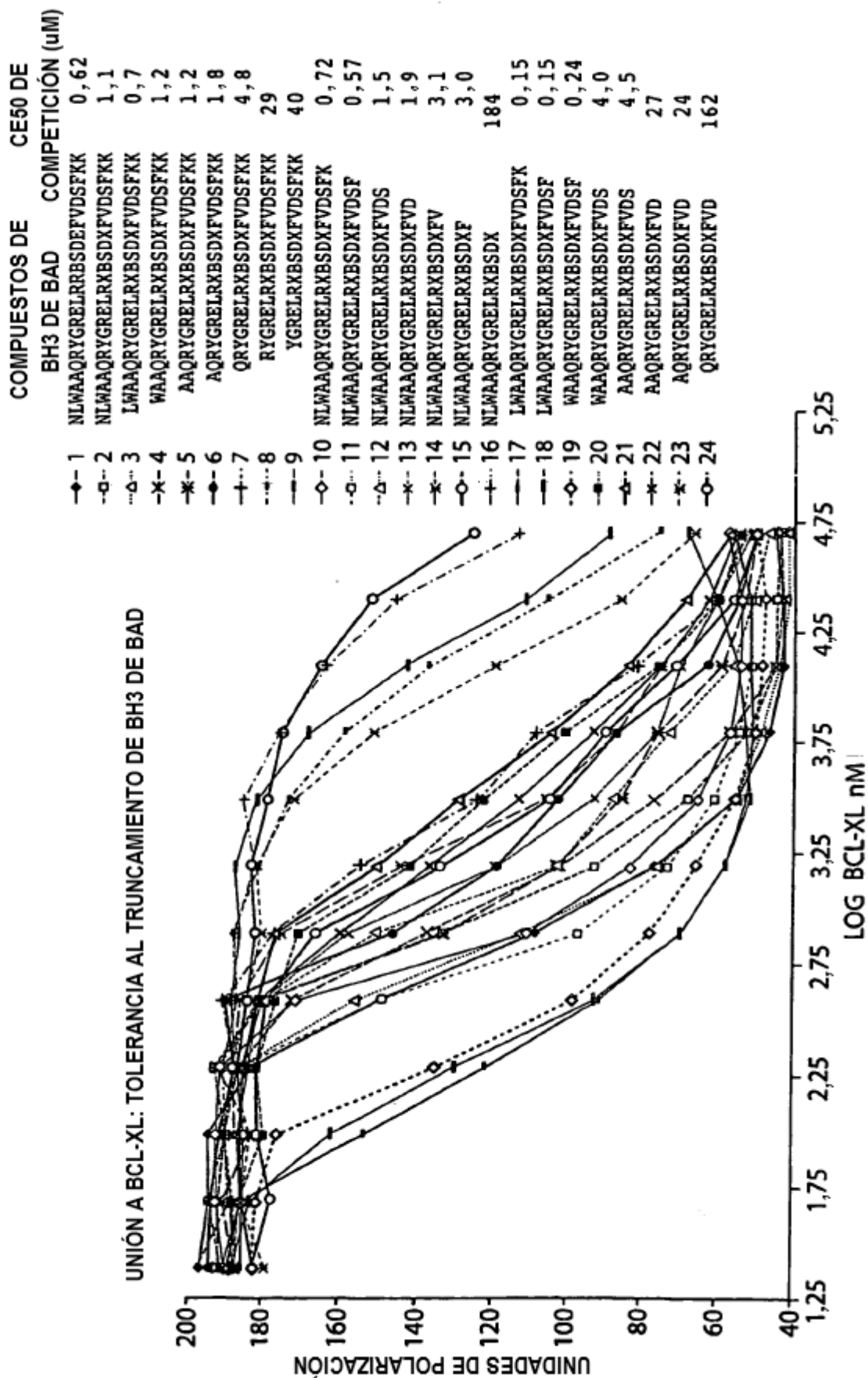


Fig. 18-2

DERIVADOS DE BH3 DE BAD GRAPADOS

a. PANEL FOSFOMIMÉTICO

NLWAAQRYGRELR*XSD*FVDSFKK
 FITC-BNLWAAQRYGRELR*XSD*FVDSFKK
 NLWAAQRYGRELR*XDD*FVDSFKK
 FITC-BNLWAAQRYGRELR*XDD*FVDSFKK
 NLWAAQRYGRELR*XZD*FVDSFKK
 FITC-BNLWAAQRYGRELR*XZD*FVDSFKK
 NLWAAQRYGREAR*XSA*FVDSFKK
 FITC-BNLWAAQRYGREAR*XSA*FVDSFKK

b. PANEL DE TRUNCAMIENTO

NLWAAQRYGRELR^{RR}BSDEFVDSFKK
 NLWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSFKK
 LWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSFKK
 WAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSFKK
 AAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSFKK
 AQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSFKK
 QRYGRELR[^]BSD[^]FVDSFKK
 RYGRELR[^]BSD[^]FVDSFKK
 YGRELR[^]BSD[^]FVDSFKK
 NLWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSFK
 NLWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSF
 NLWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDS
 NLWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVD
 NLWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FV
 NLWAAQRYGRELR[^]BSD[^]F
 NLWAAQRYGRELR[^]BSD[^]
 LWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSFK
 LWAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSF
 WAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDSF
 WAAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDS
 AAQRYGRELR[^]BSD[^]FVDS
 AAQRYGRELR[^]BSD[^]FVD
 AQRYGRELR[^]BSD[^]FVD
 QRYGRELR[^]BSD[^]FVD

Fig. 18-3

DERIVADOS DE BH3 DE BAD GRAPADOS. CONT.

b. PANEL DE CAPTURA DE DIANA

FITC-BBUNLWAAQRYGRELR*XSD*FVDSFKK
 FITC-BBNLUAAQRYGRELR*XSD*FVDSFKK
 FITC-BBNLWAAQRUGRELR*XSD*FVDSFKK
 FITC-BBNLWAAQRYGRELR*XSD*UVDSFKK
 FITC-BBNLWAAQRYGRELR*XSD*FVDSUKK
 FITC-BBNLWAAQRYGRELR*XSD*FVDSFKKU
 (y combinaciones de u de los mismos)

Biotin-NLWAAQRYGRELR*XSD*FVDSFKK
 Biotin-NLWAAQRYGRELR*XSD*FVDSFKK
 Biotin-NLWAAQRYGREAR^XSA^FVDSFKK
 Biotin-NLWAAQRYGREAR^XSA^FVDSFKK

DERIVADOS DE BH3 DE BID GRAPADOS

PANEL FOSFOMIMÉTICO

ESQEDIIRNIARHLA*VGD*MDRSI
 EZQEDIIRNIARHLA*VGD*MDRSI

Clave:

B=β- alanina

X= norleucina

*="S5" aminoácido no natural

= ácido aminoisobutírico (AIB)

Z= fosfoserina

U= benzofenona

Fig. 18-4

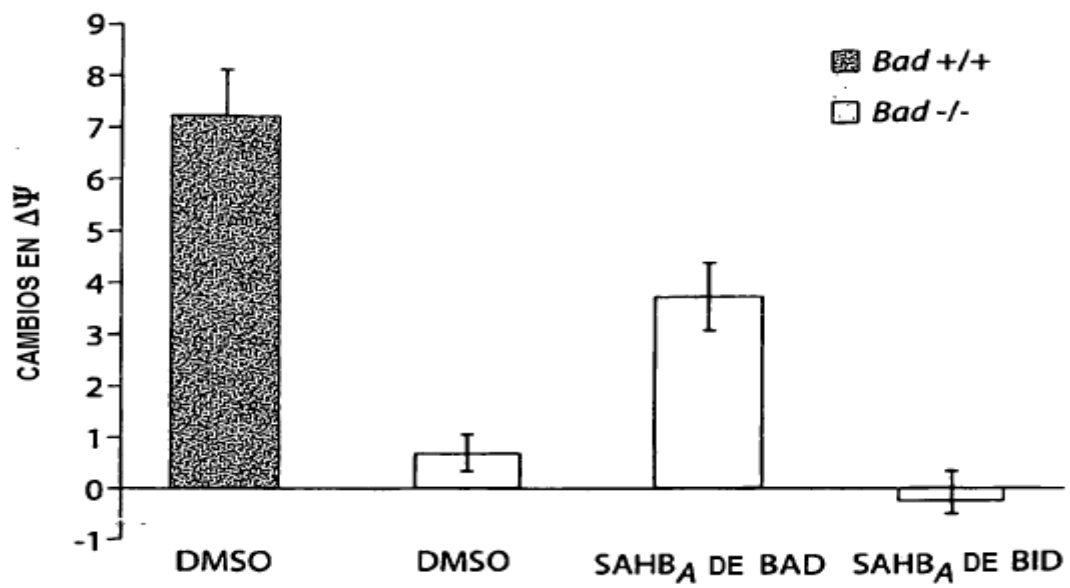


Fig. 19

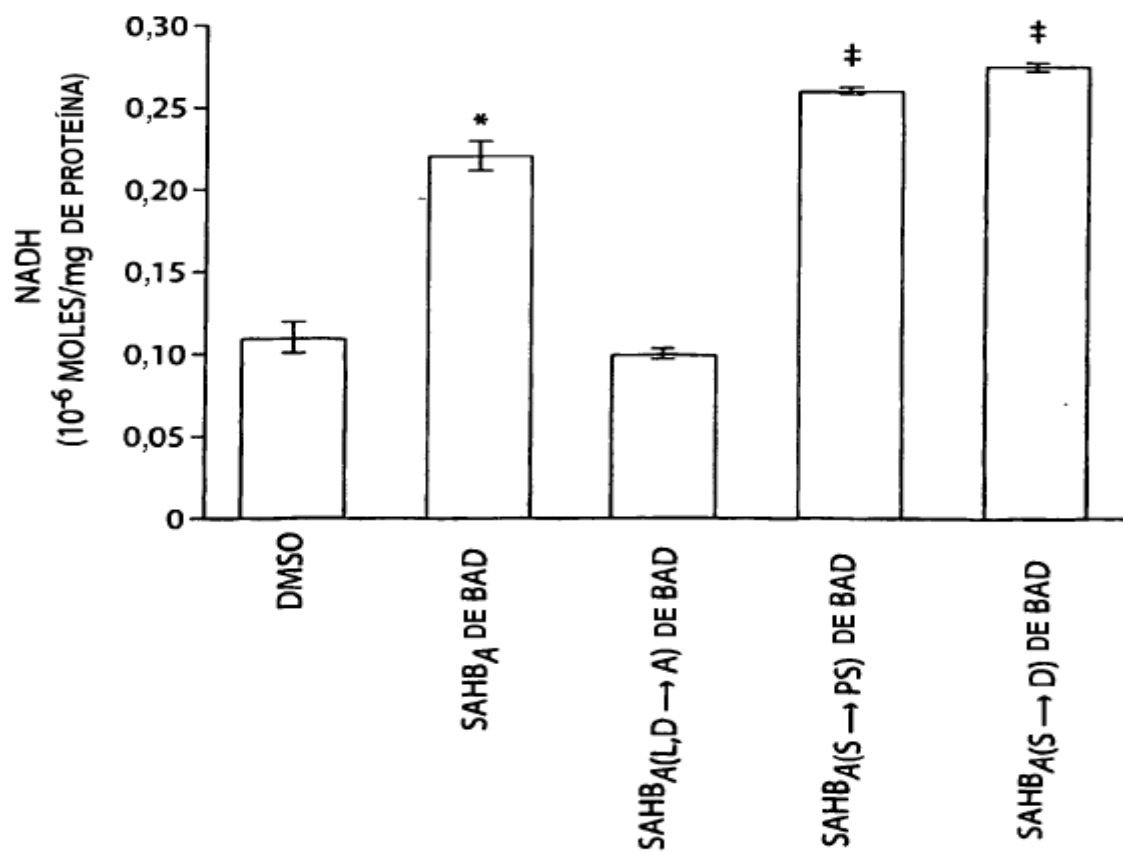


Fig. 20

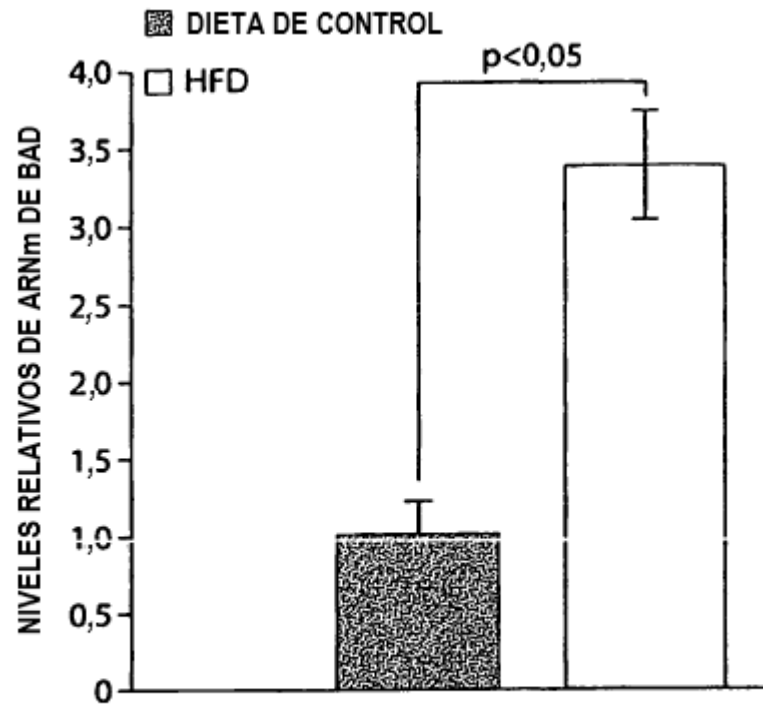


Fig. 21

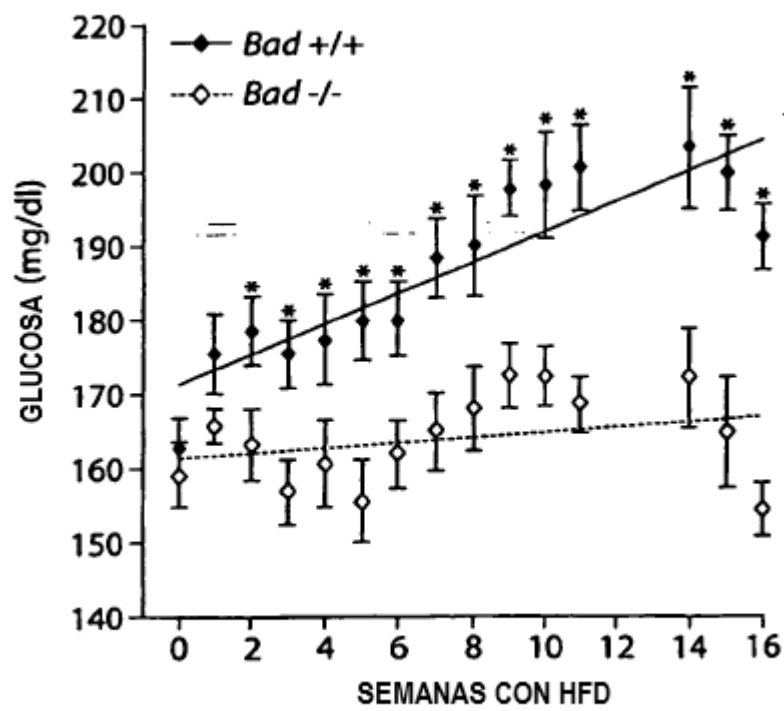


Fig. 22

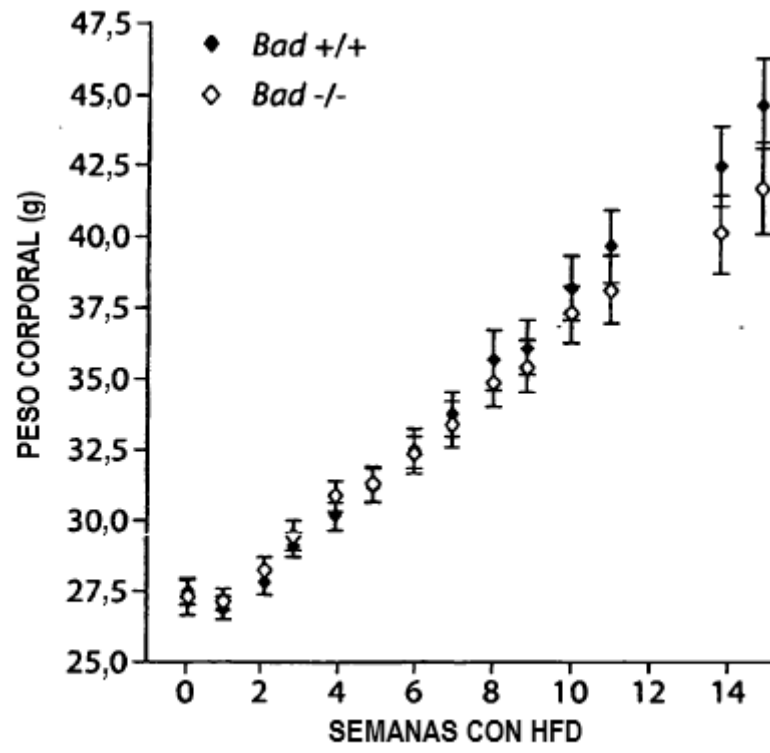


Fig. 23

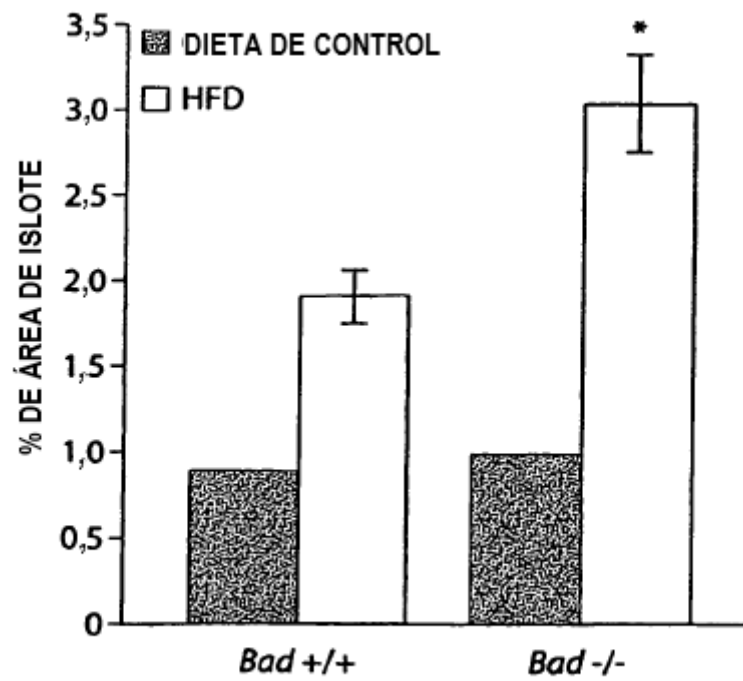


Fig. 24

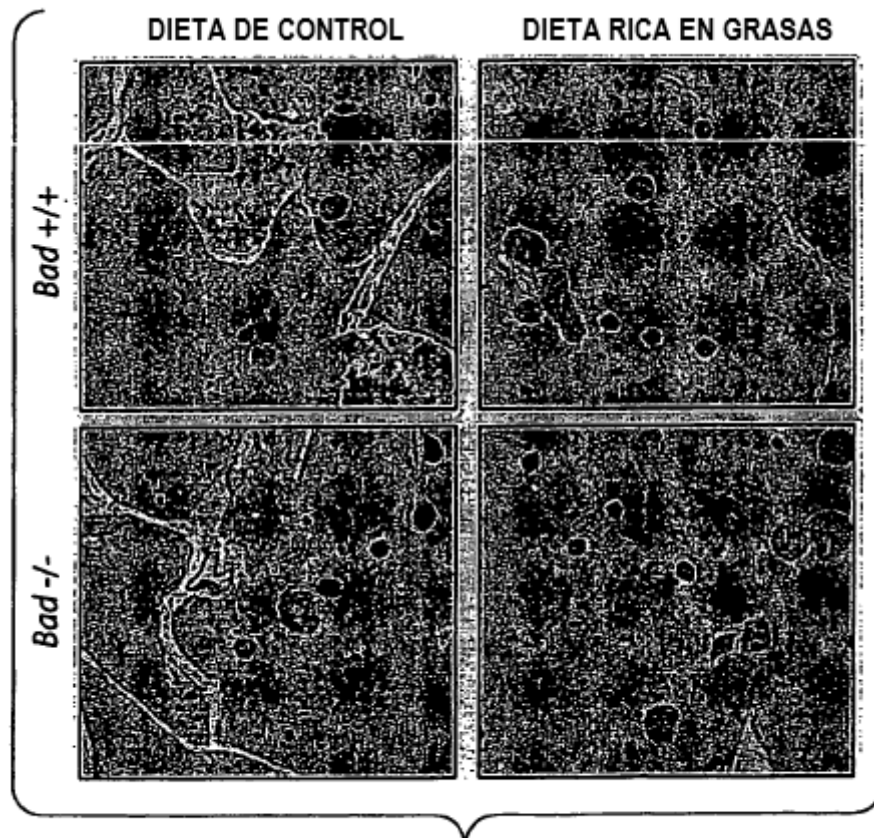


Fig. 25

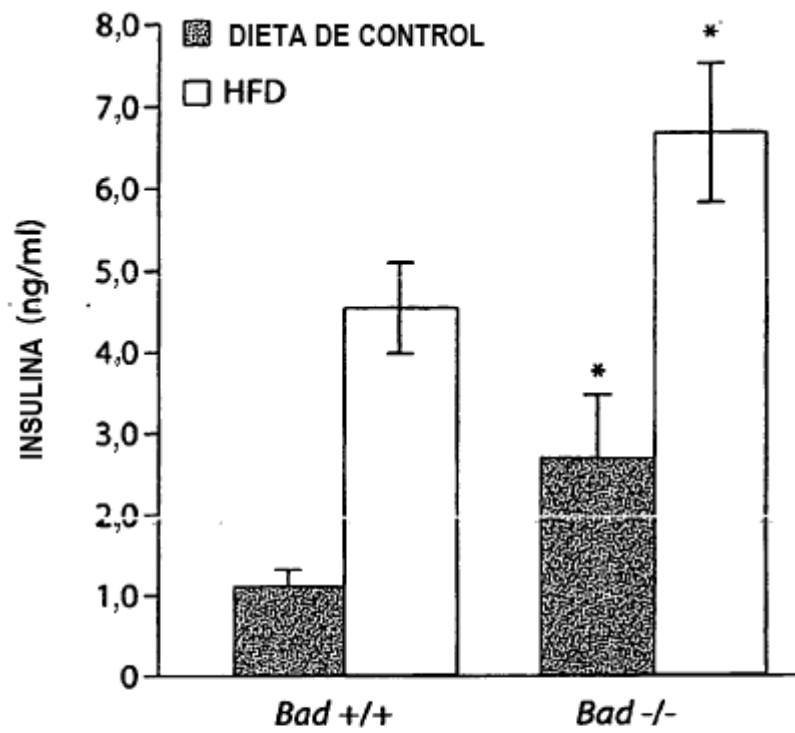


Fig. 26

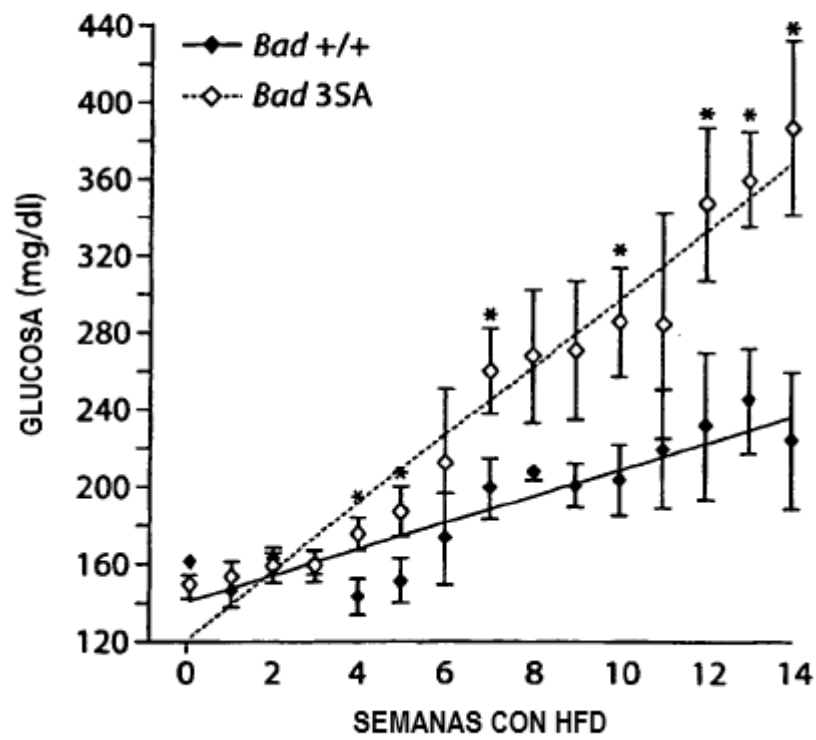


Fig. 27

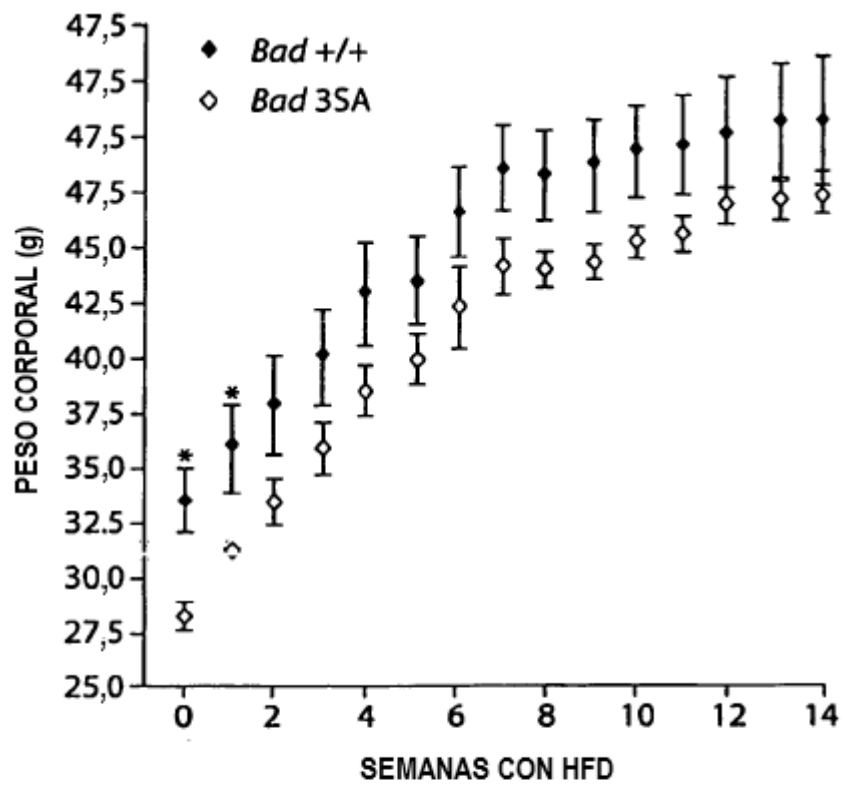


Fig. 28

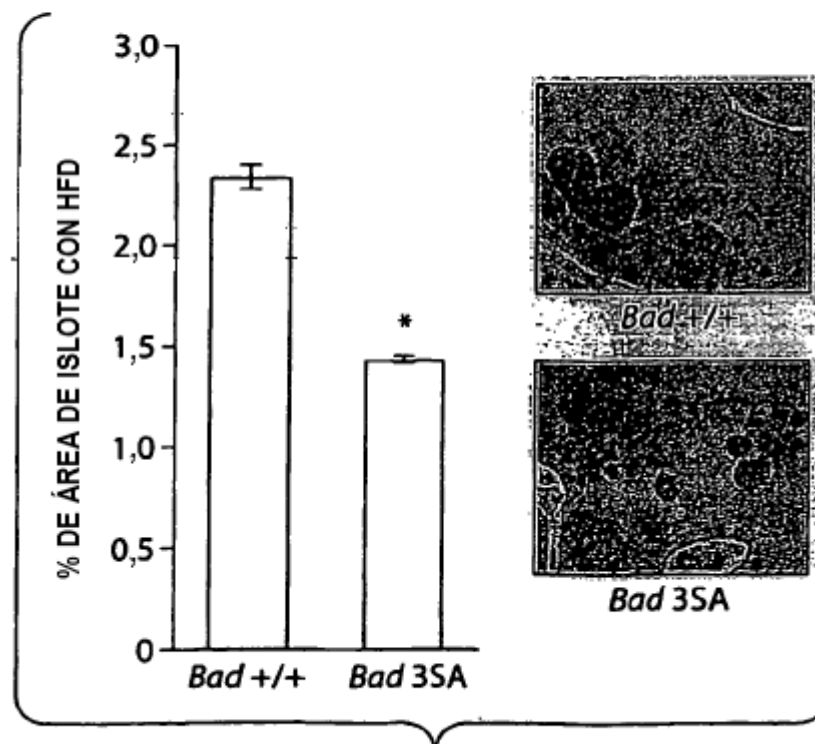


Fig. 29

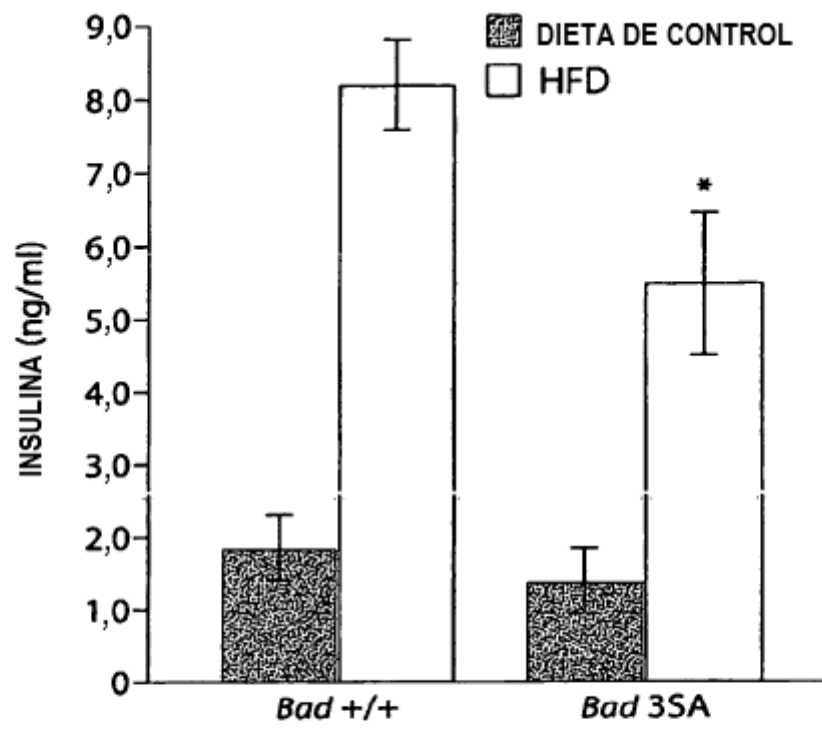


Fig. 30

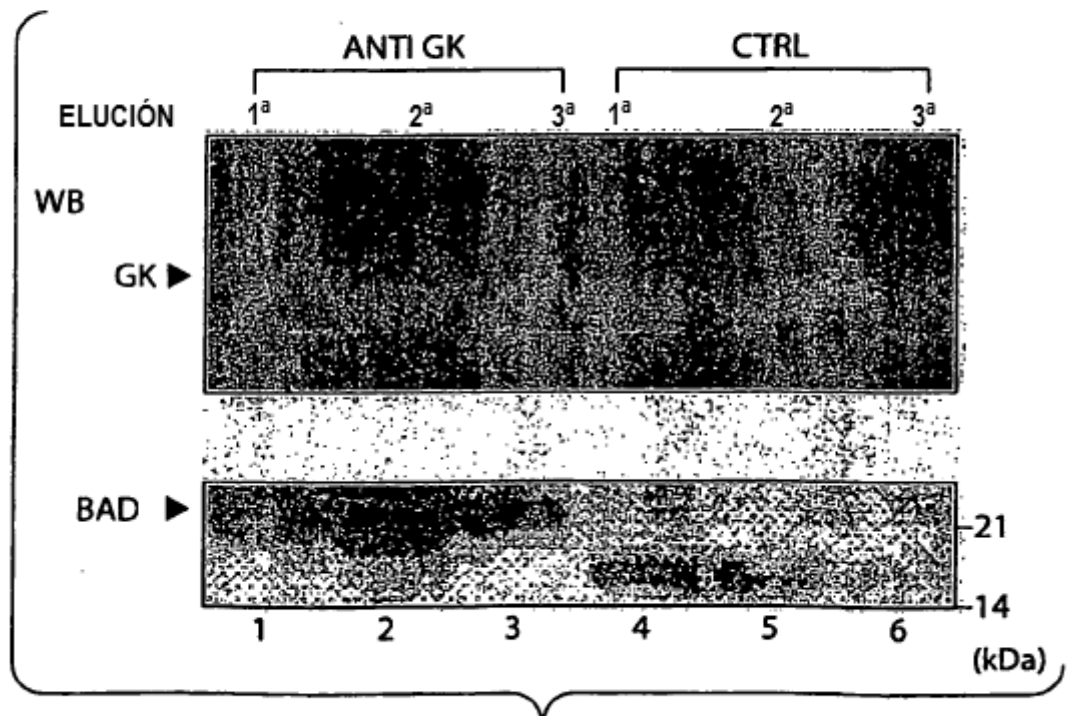


Fig. 31

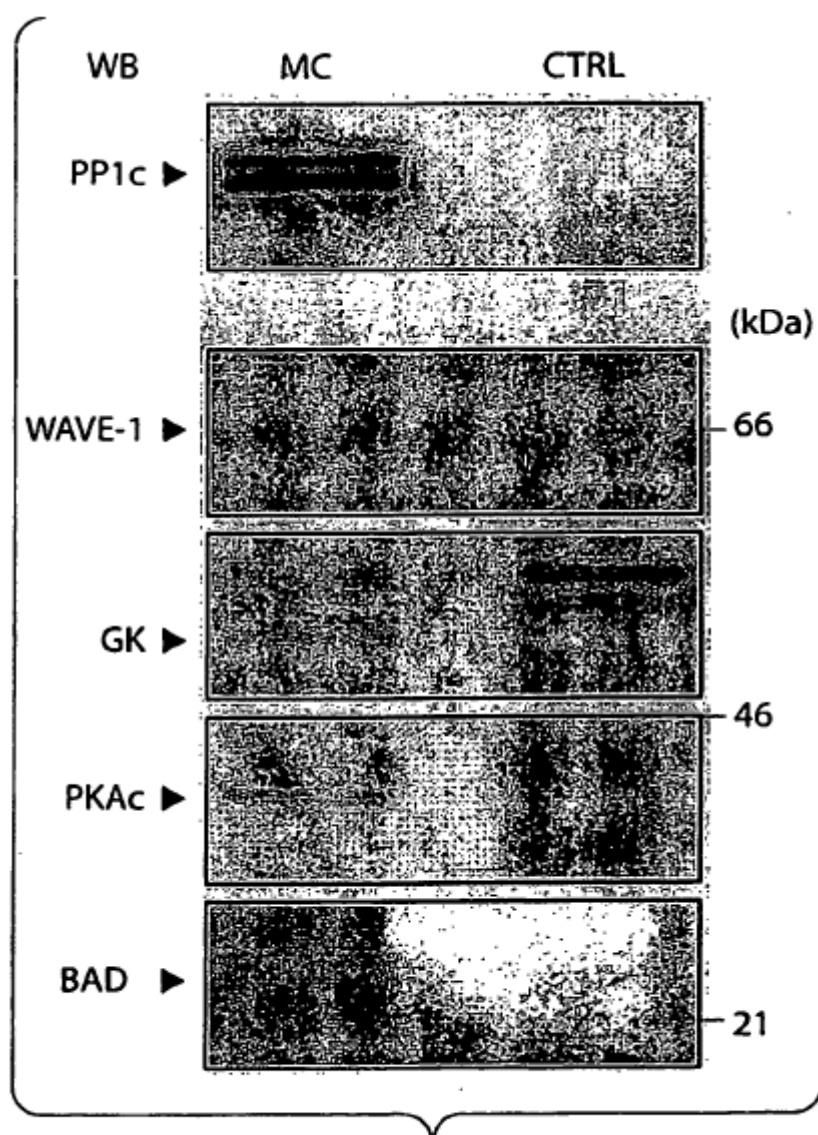


Fig. 32

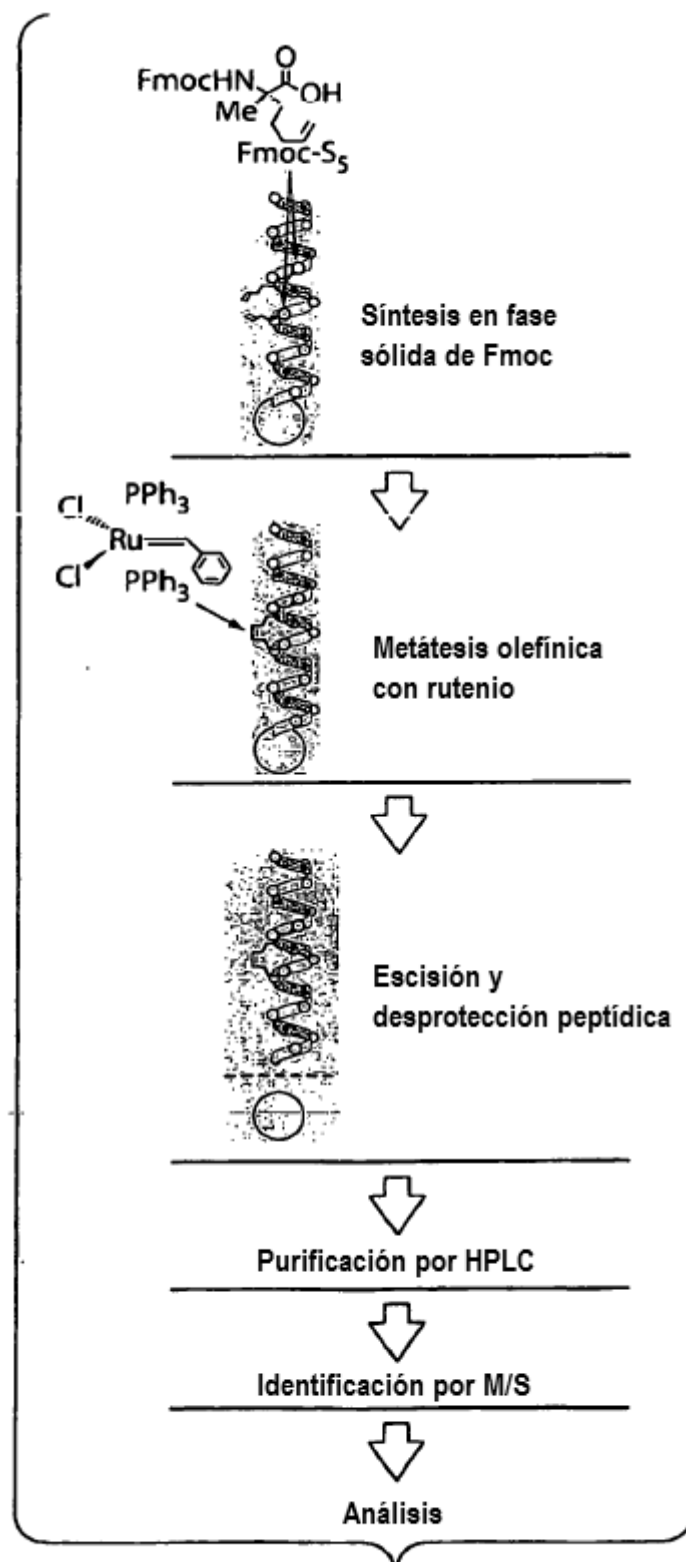


Fig. 33

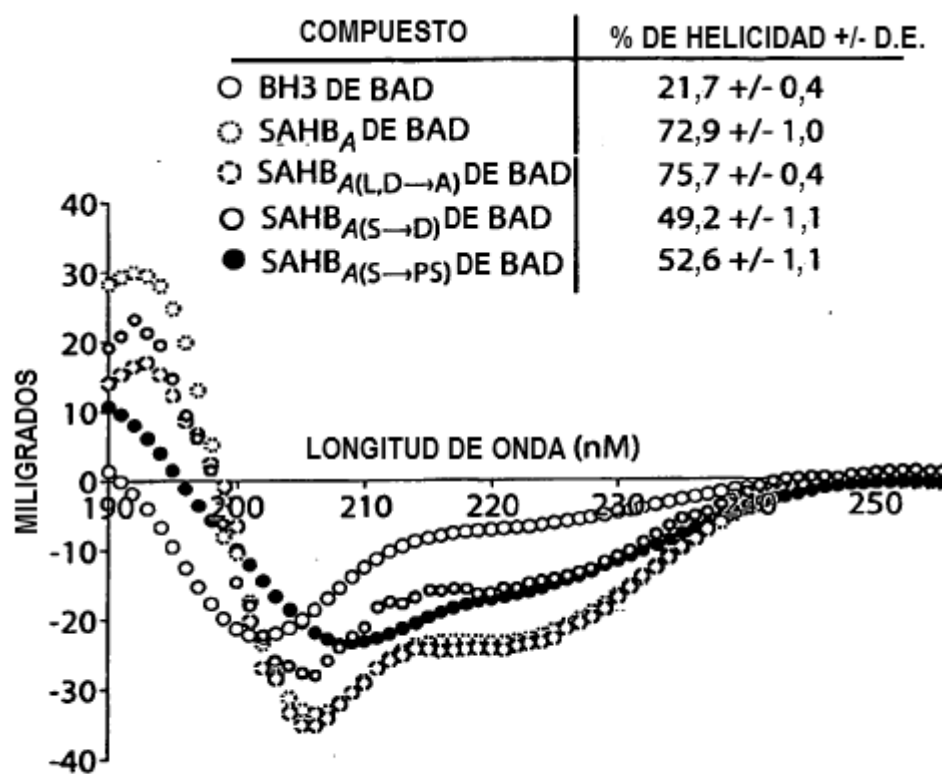


Fig. 34

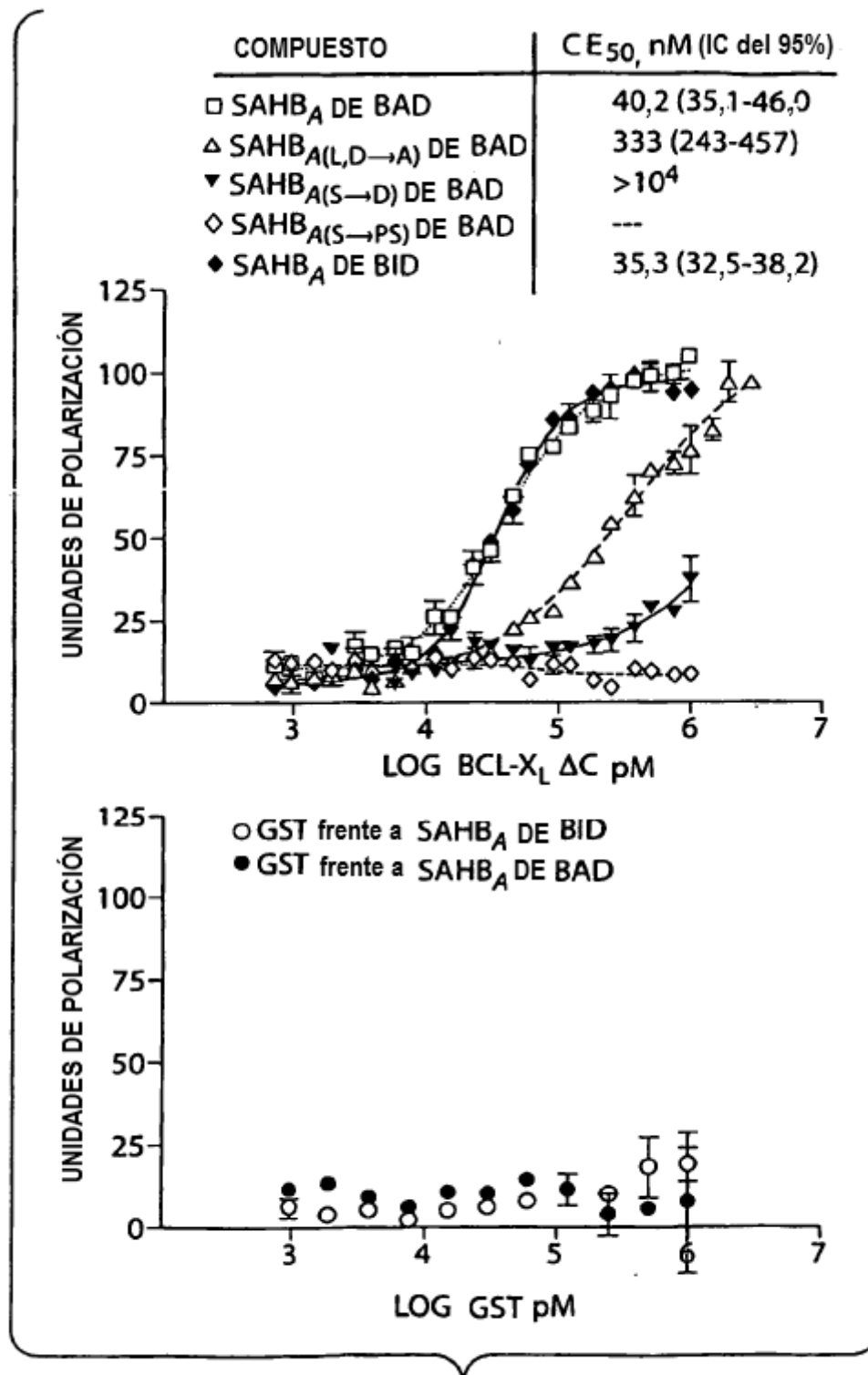


Fig. 35

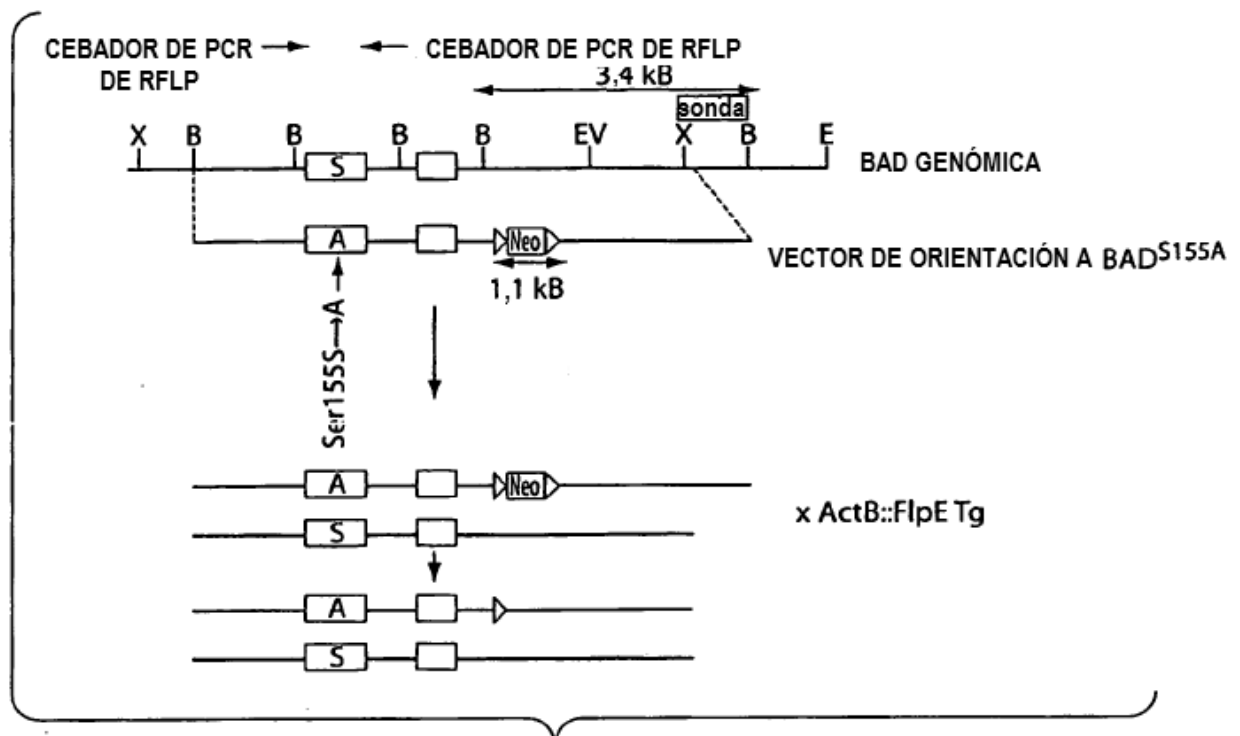


Fig. 36

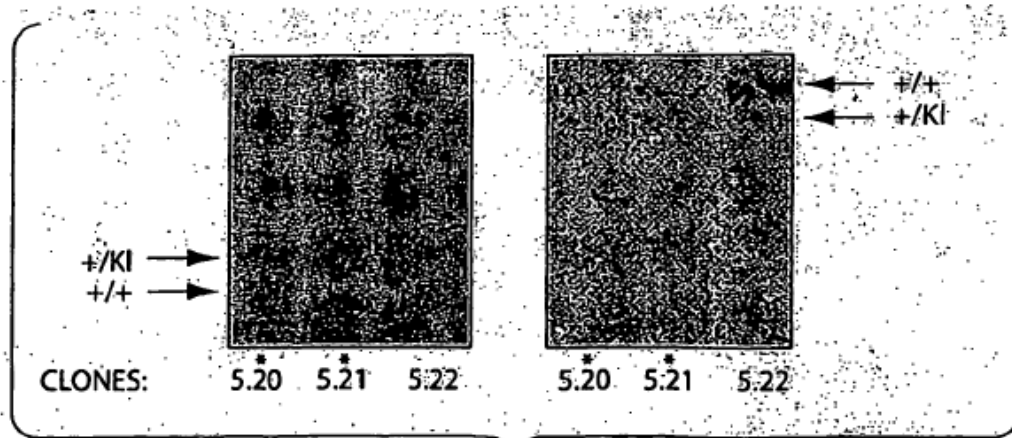


Fig. 37

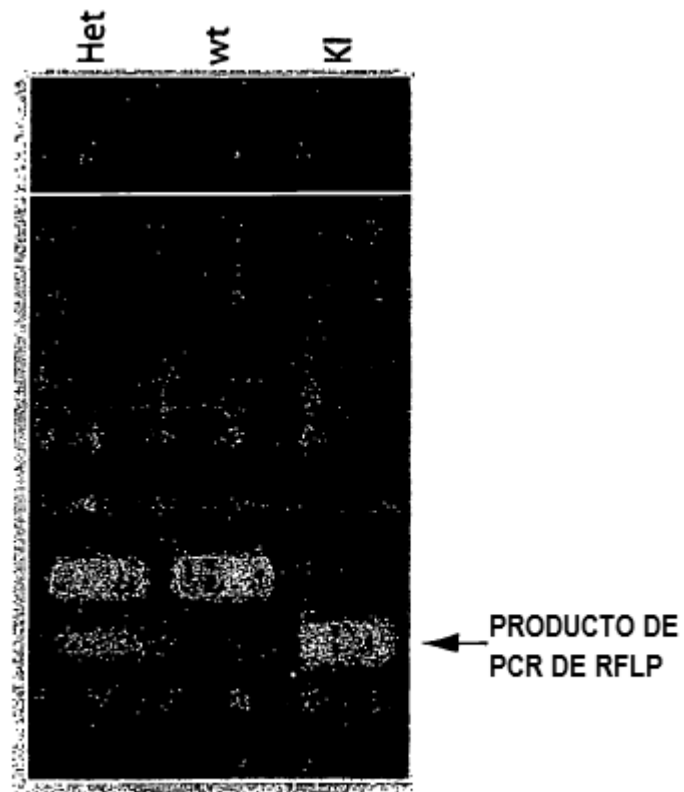


Fig. 38

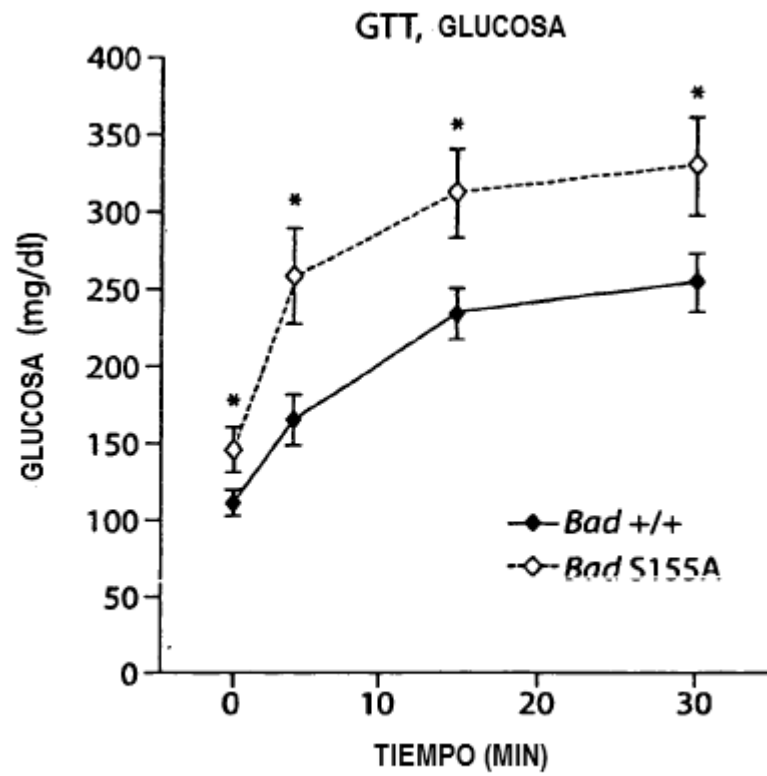


Fig. 39

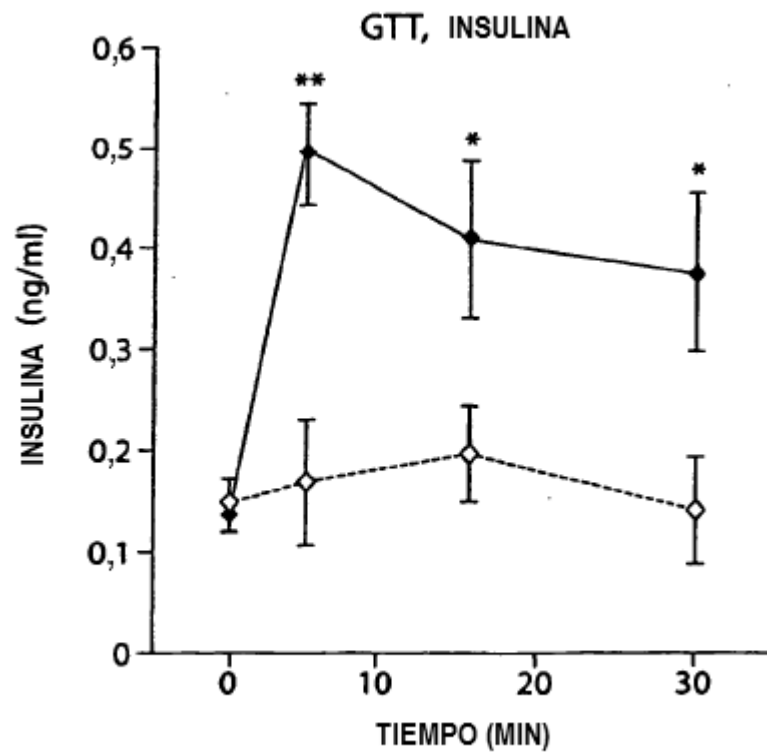


Fig. 40

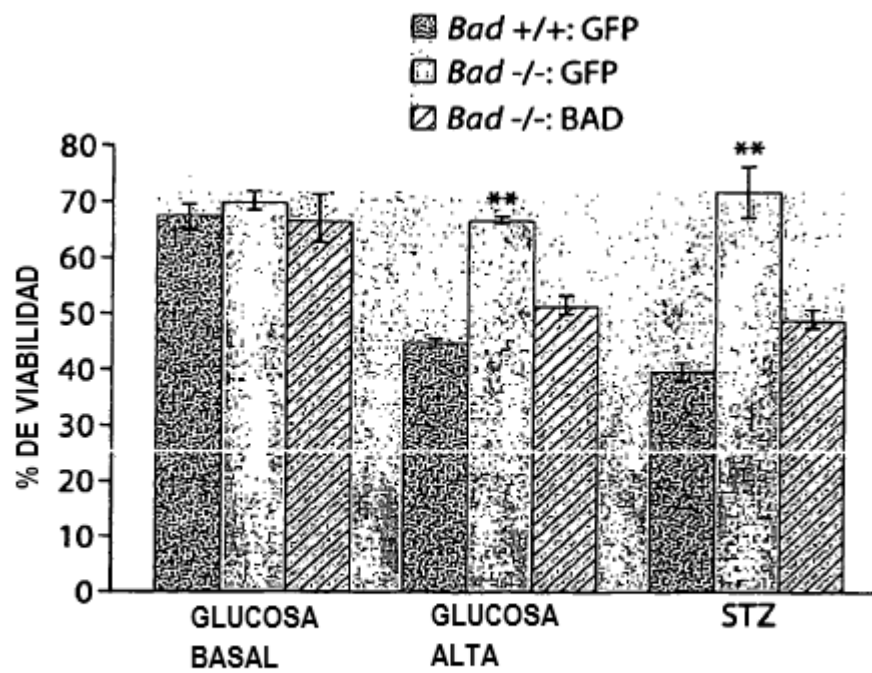


Fig. 41

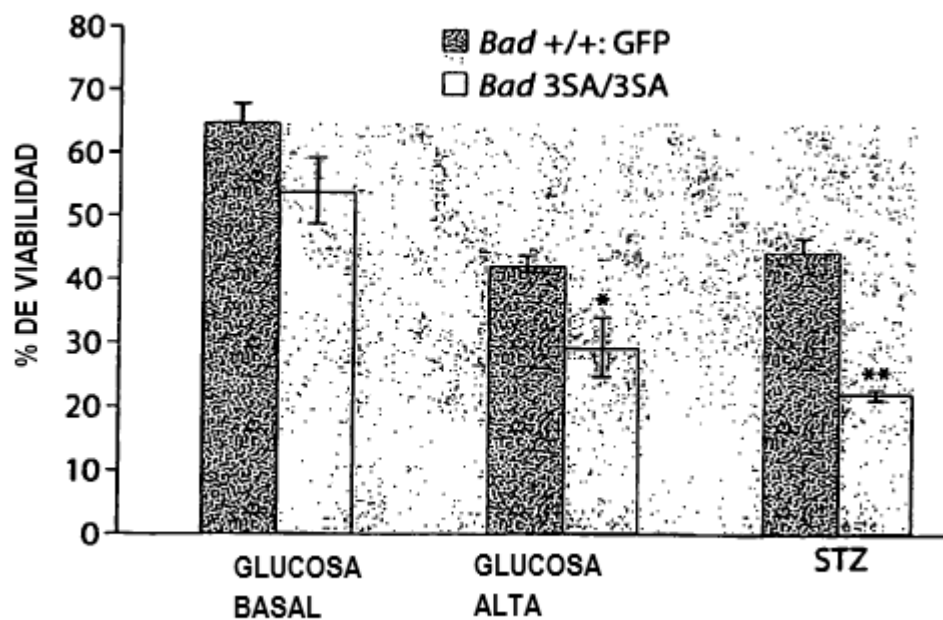


Fig. 42

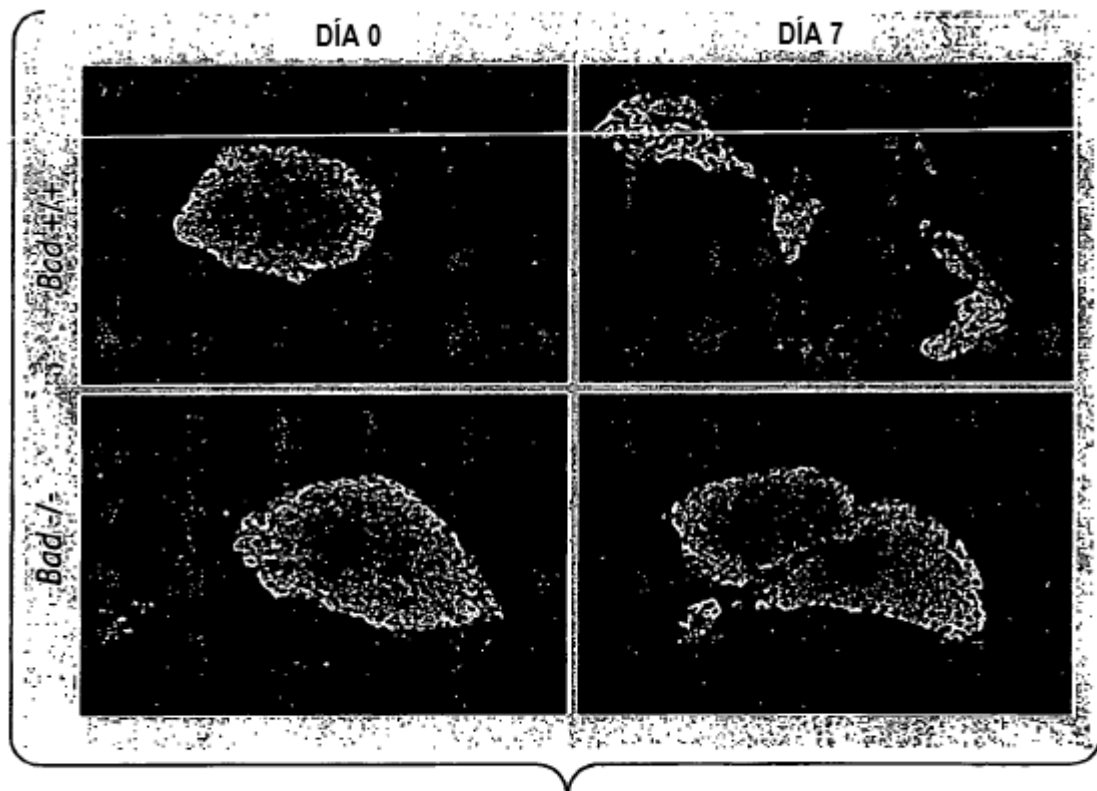


Fig. 43

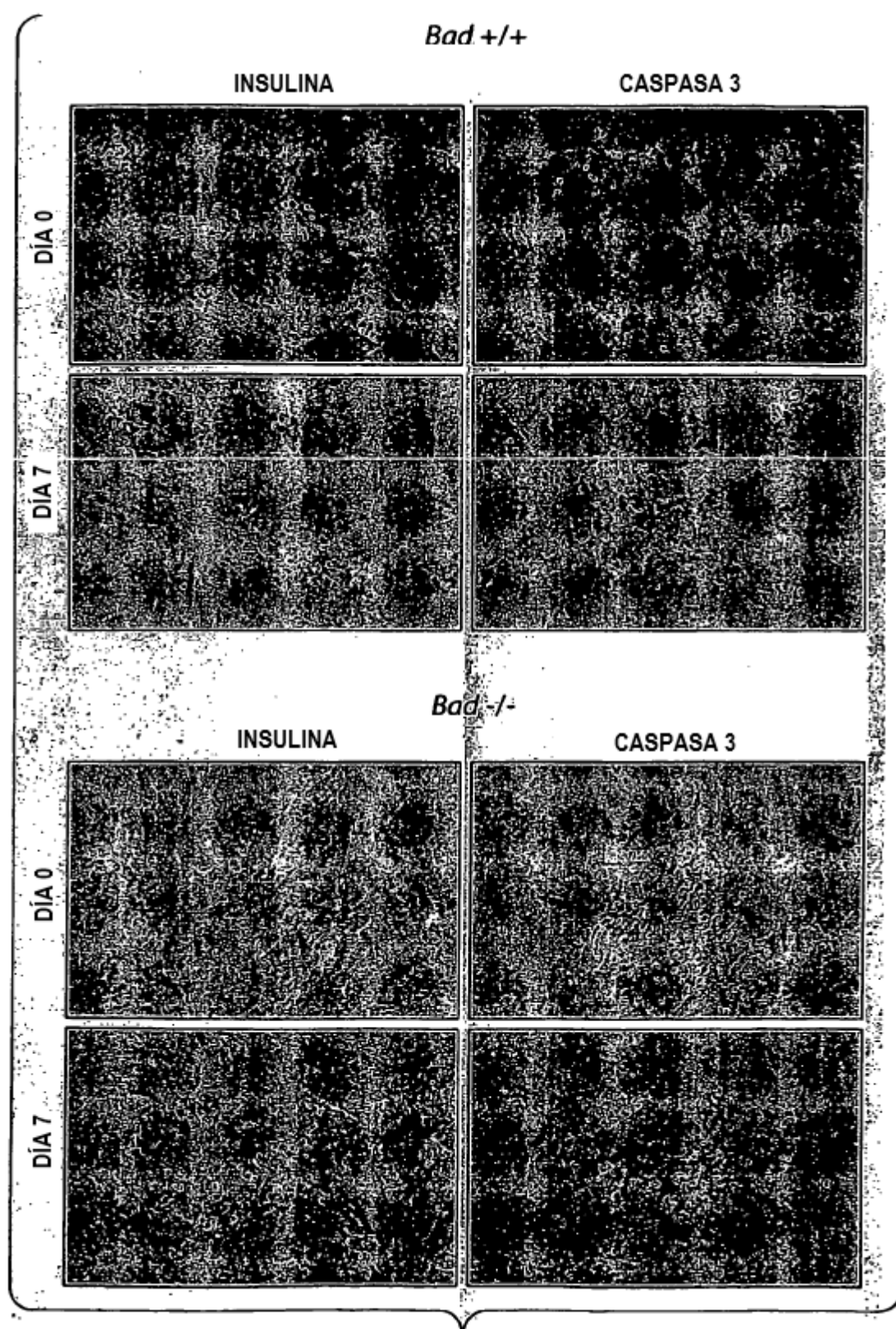


Fig. 44

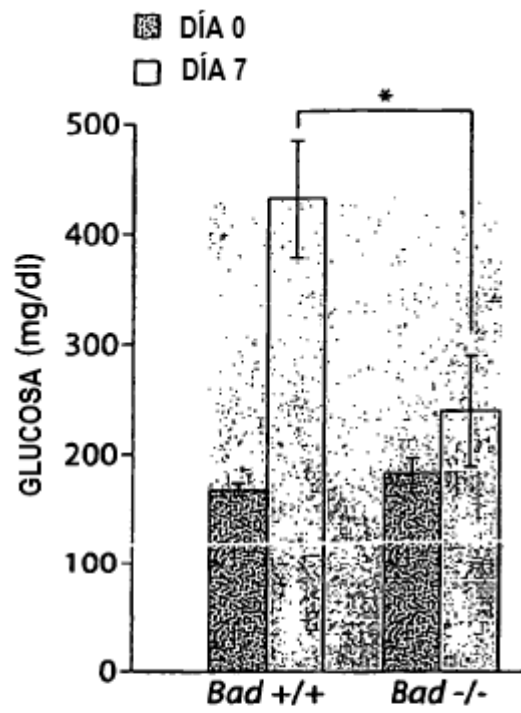


Fig. 45

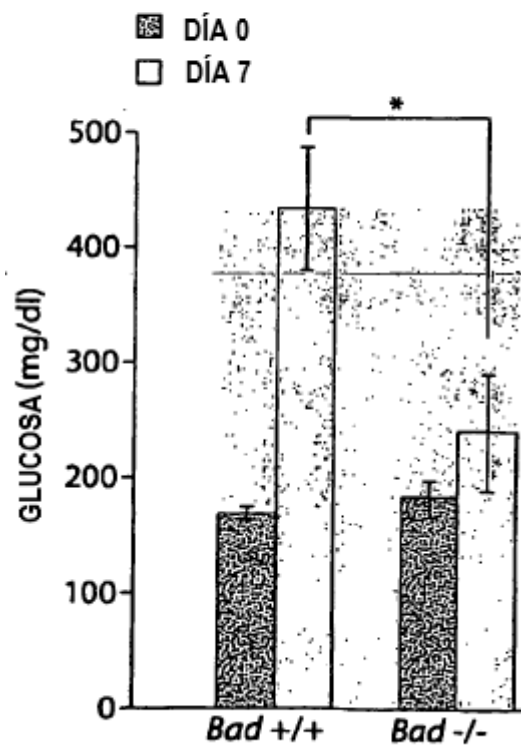
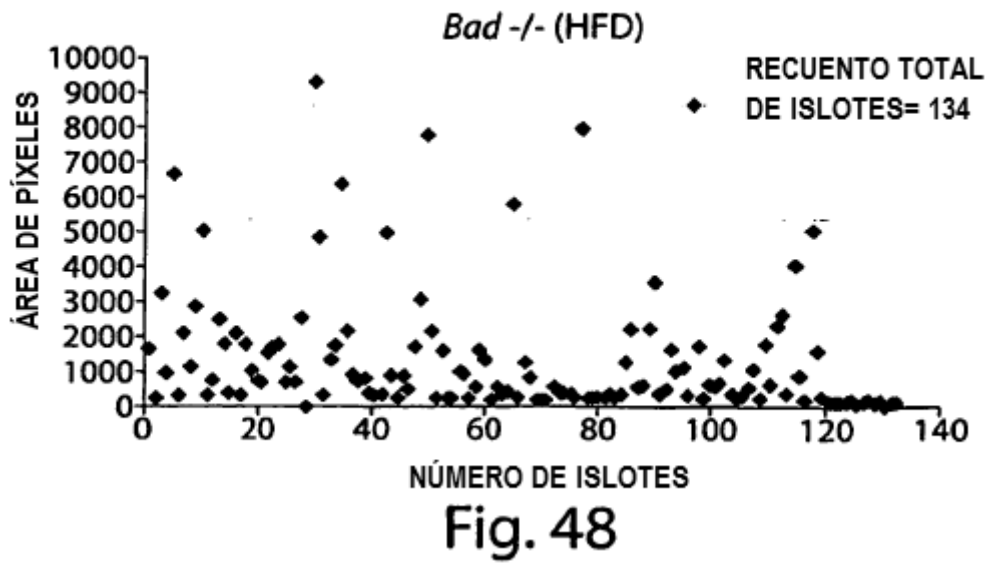
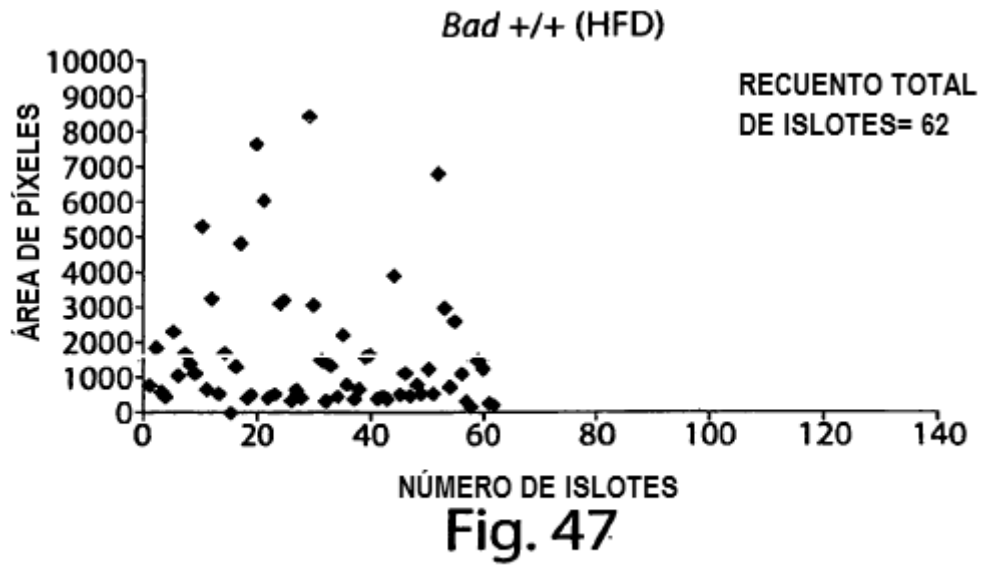


Fig. 46



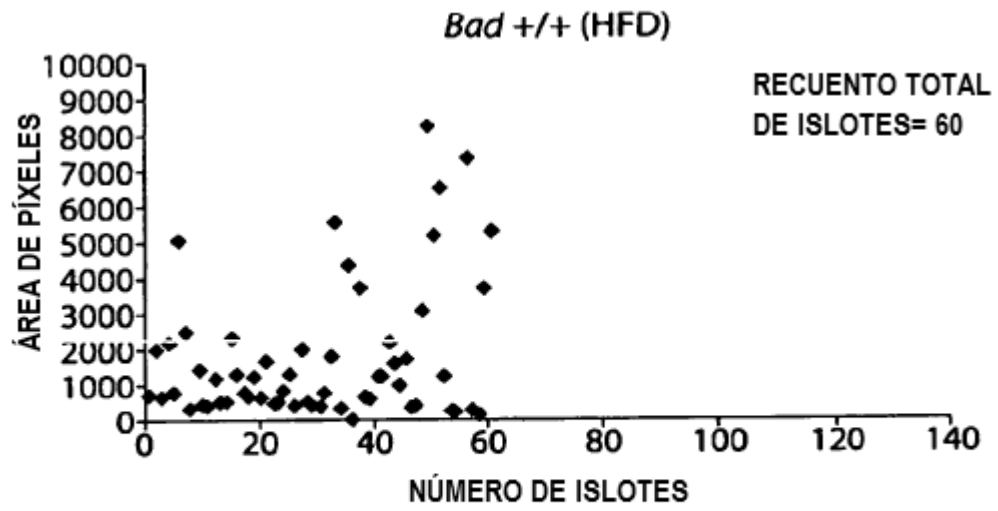


Fig. 49

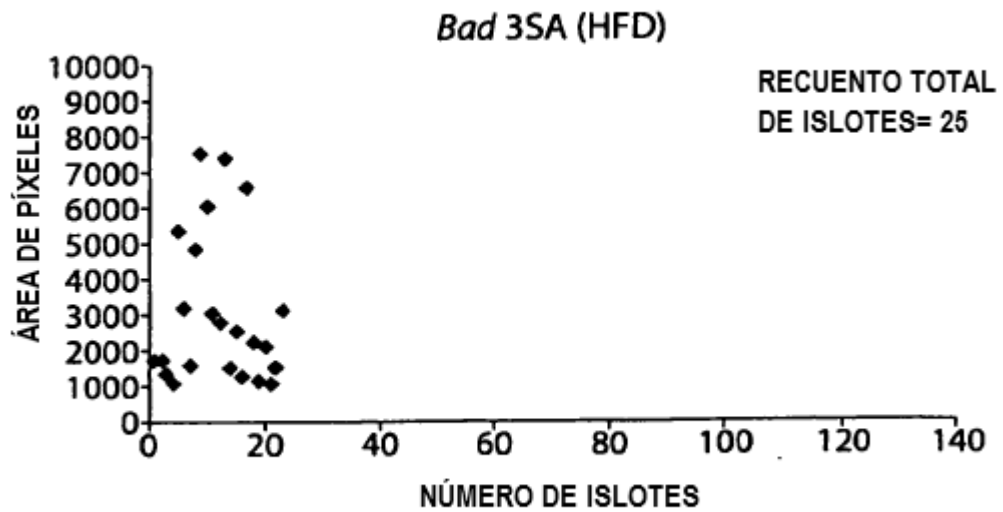


Fig. 50

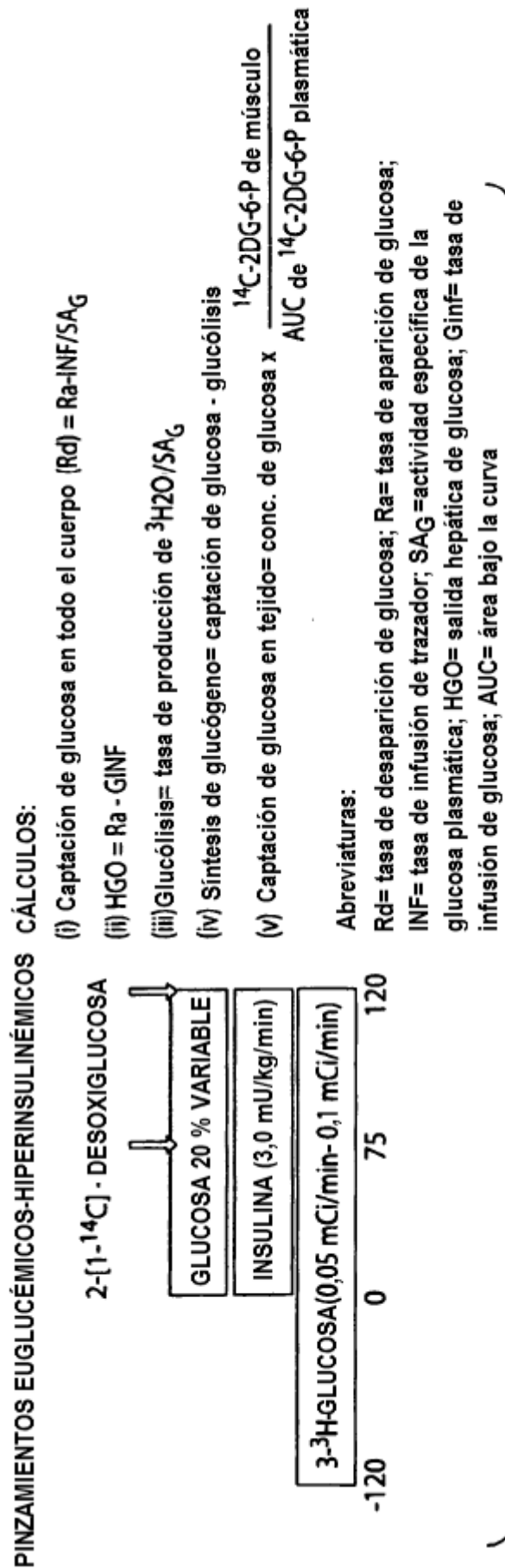


Fig. 51

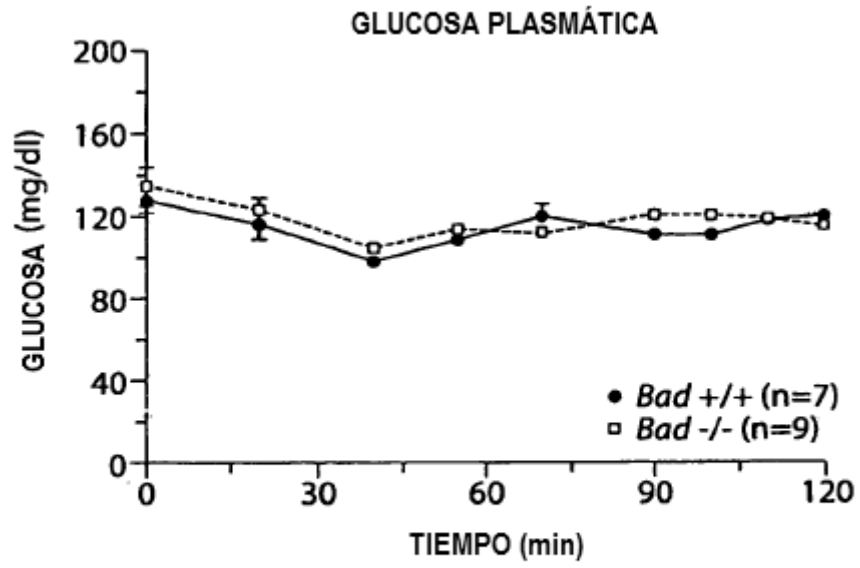


Fig. 52

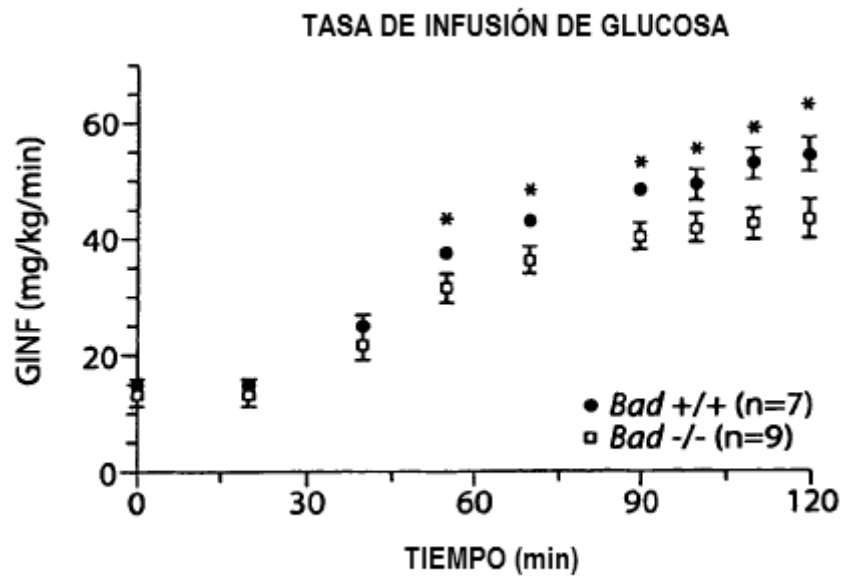
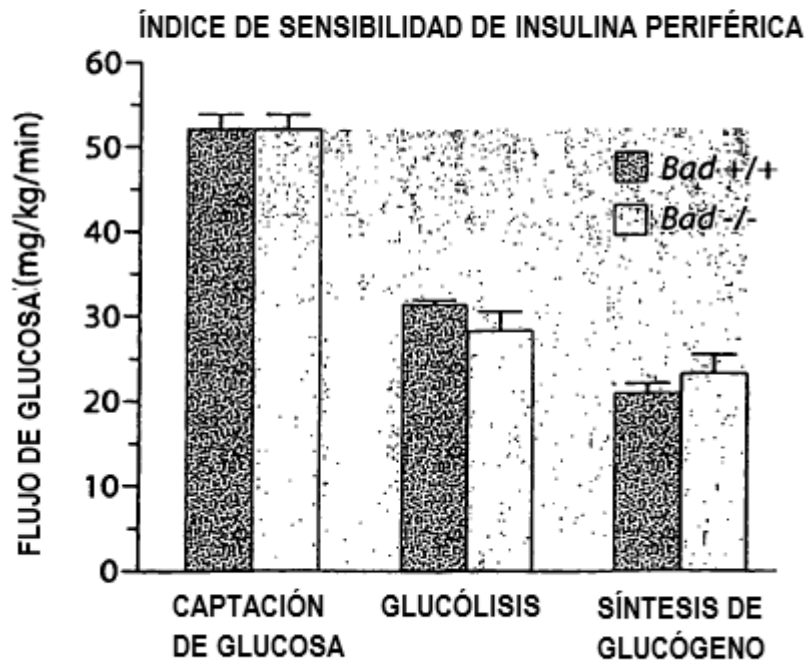
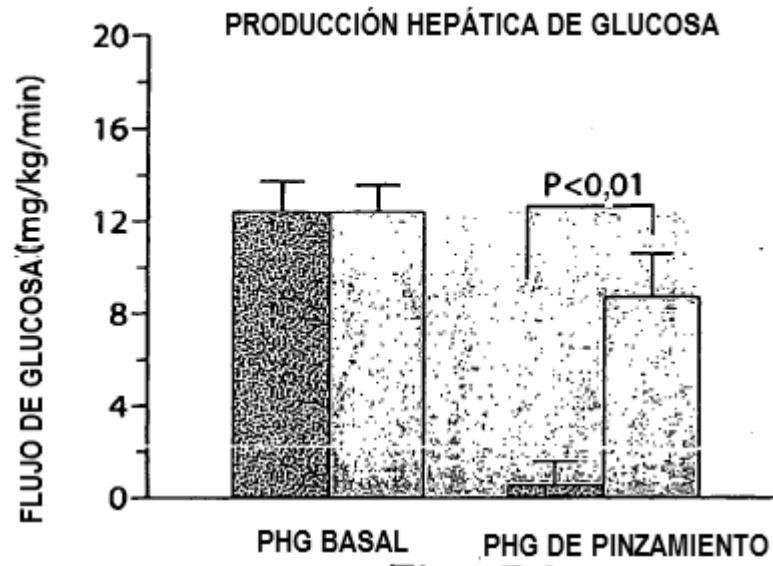


Fig. 53



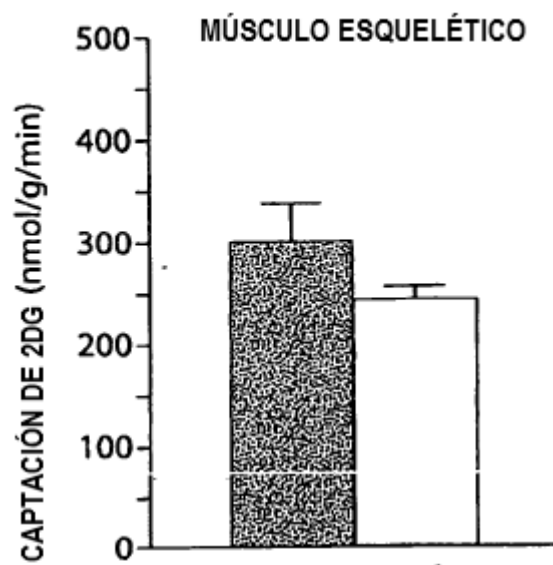


Fig. 56

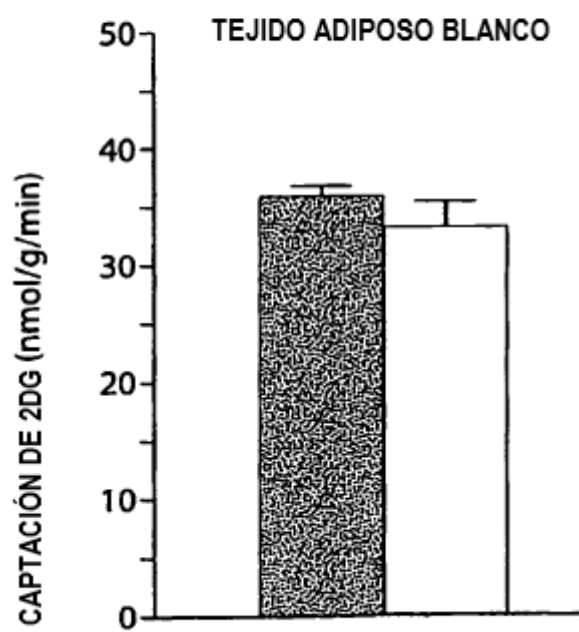


Fig. 57

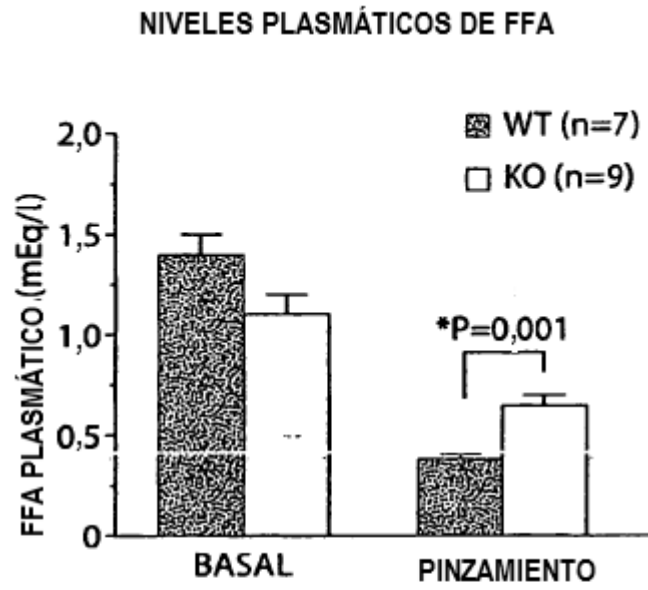


Fig. 58

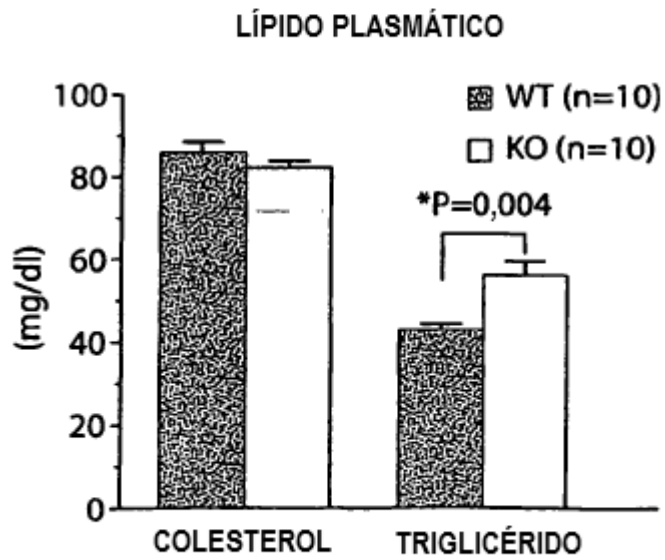
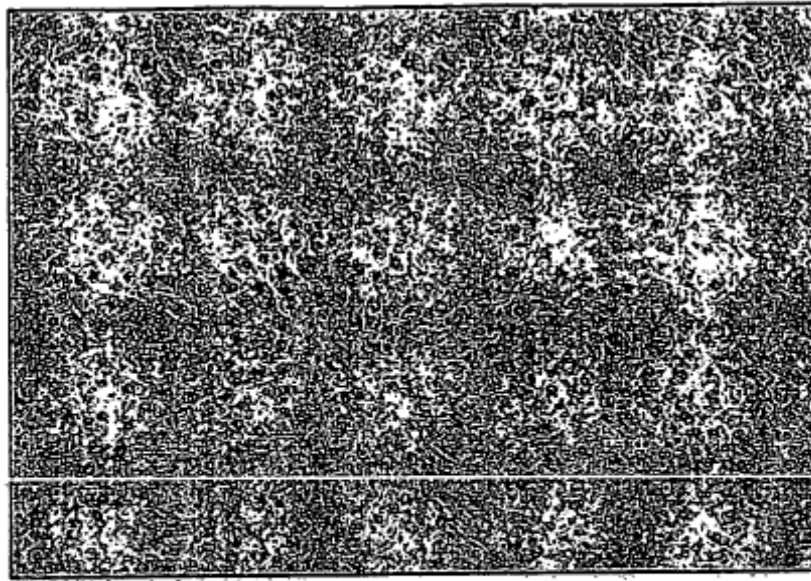
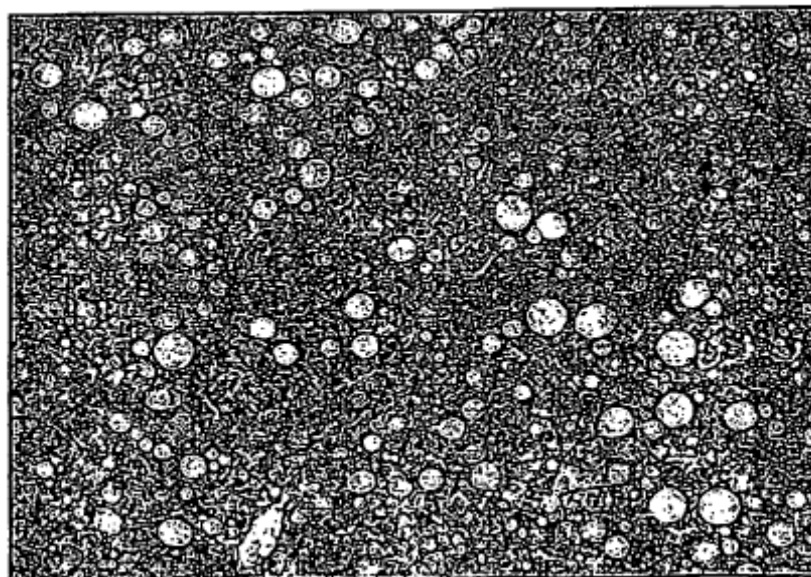


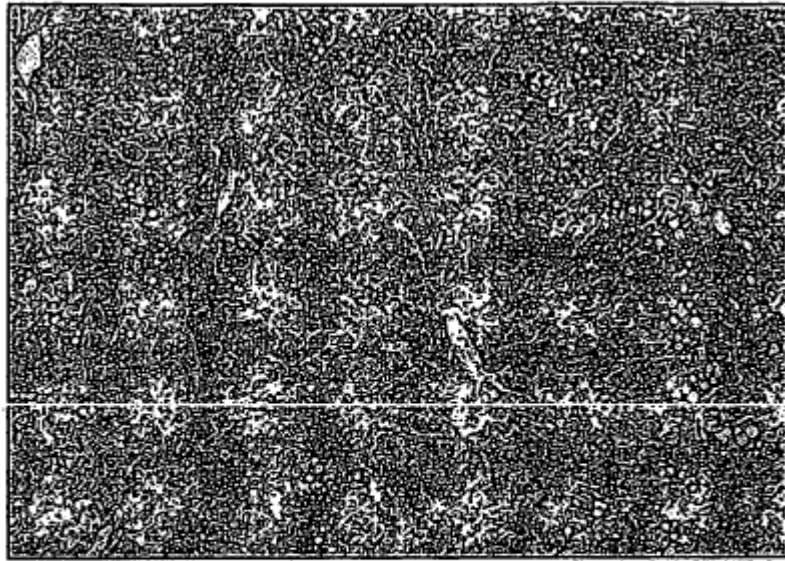
Fig. 59



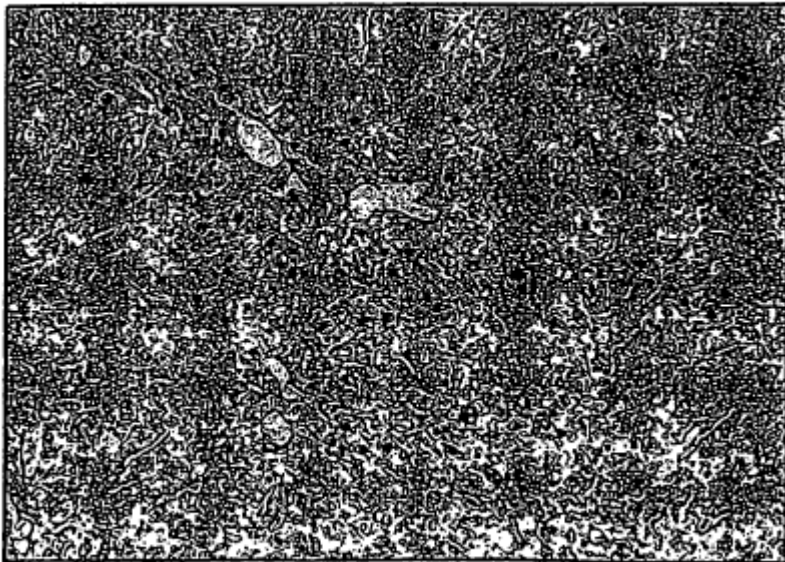
K25965L
Fig. 60



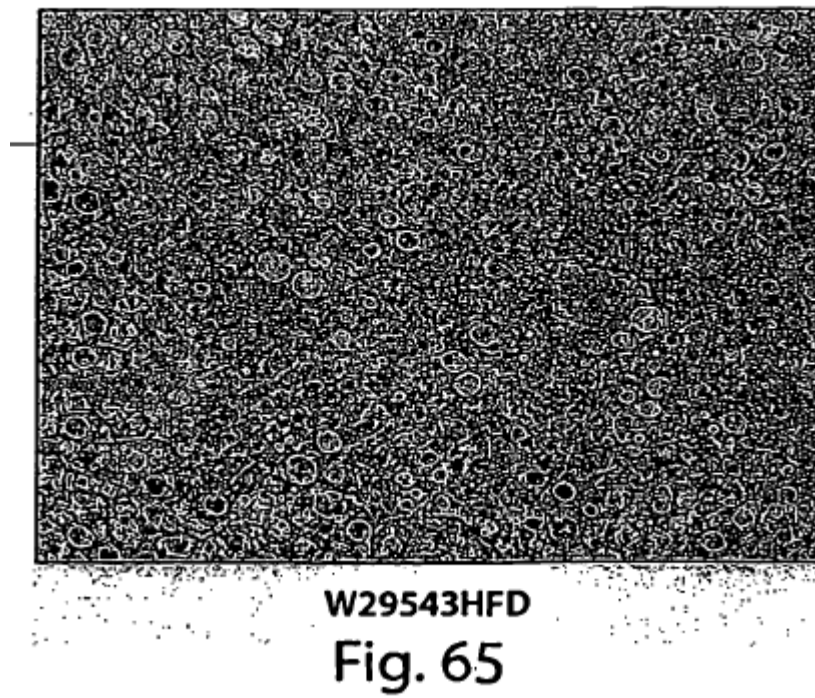
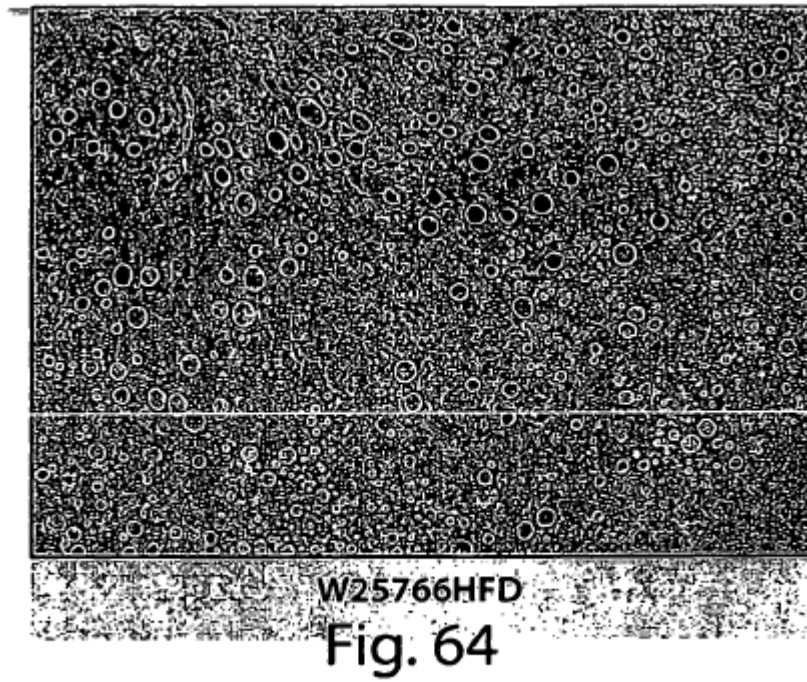
KI30928HFD
Fig. 61



W1RCL
Fig. 62



K18678HFD
Fig. 63



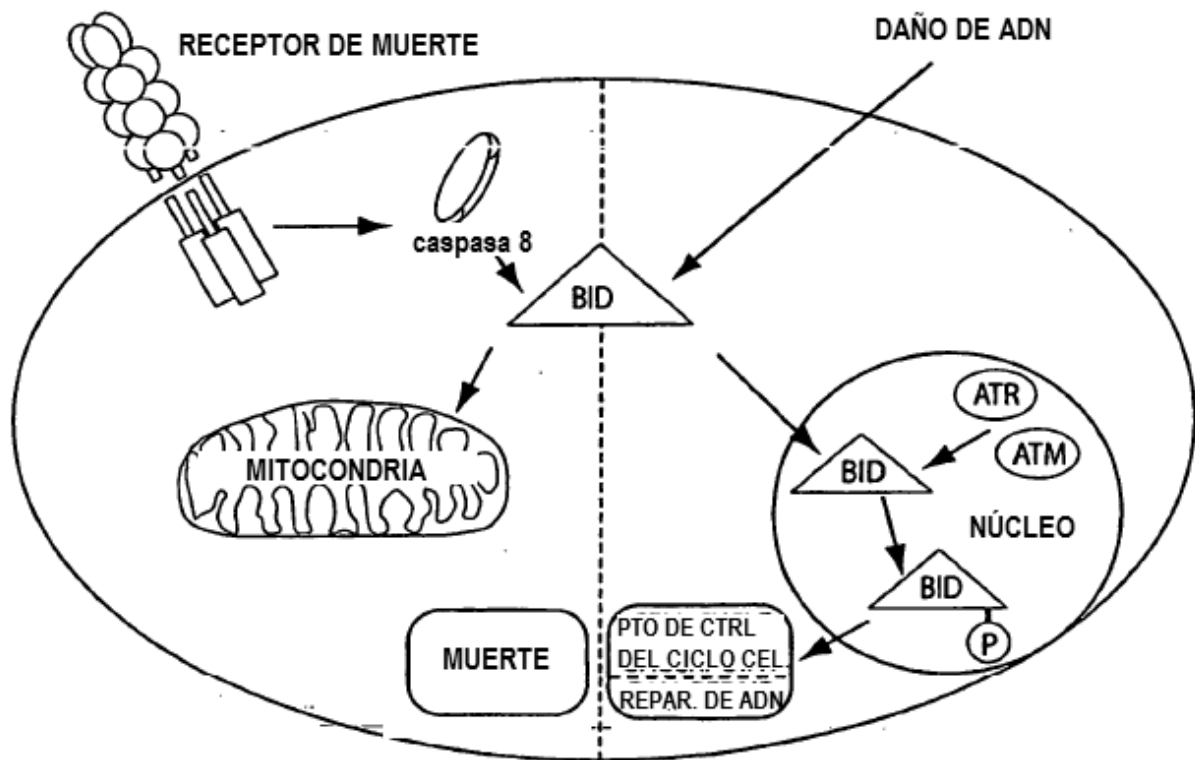


Fig. 66

MIEMBROS DE LA FAMILIA DE BCL-2	CINASAS AFECTADAS
BH3 DE BAD NLHAAQRYGRELRRMSDEEVDSFKK	PKA, PKC, CAM DEP K2, AKT, CLK, DOMINIO D DE ERK, PIP3 PH
BH3 DE BNIP3 DIERRREVEESILKKNSDWIWDHSSR	PKC, CAM DEP K2, DOMINIO D DE ERK, PKA, UNIÓN A PDK1
BH3 DE HRK SSAAQLTAARLKALGDELHQRTWRRRARS	DOMINIO D DE ERK, PKC, PKC, CLK2, AKT
BH3 DE NIX SSQSEEEVVEGEKEVEALTKSADWVSDWSSRPENIPPKKF	AKT, CLK2, DNA PK, ATM, CK2, CINASA CLK2, DNA PK, CK2, CK2, INTERSECTINA SH3A, PIP3 PH
BH3 DE BID SQEDIRRIARHLAQVGDSDHRSI	ATM, DNA PK, CK2
BH3 DE NOXA AELEVECATQLRRFGDKLNFQKLNLIIS	DNA PK, PKC MU, PH DE UNIÓN A PIP3
BH3 DE SPIKE LEAELDALGDELLADESSY	CK2, P85 SH2, PLCG SH2
BH3 DE BAK LQPSSTWCGVGRQLAIIIGDDINRRYDSE	DOMINIO D DE ERK, PKC MU, 14-3-3 MODO 1
BH3 DE BAX QDASTKKLSECLKRIGDELDQN	GSK3, PKA
BH3 DE BOK PGRLEAVCAVLLRLGLDELEMTIPS	INTERSECTINA SH3A, CAPC-SH3, DOMINIO D DE ERK, PKA
BH3 DE BCL-2 SPVPPVWHLTLRQAGDDFSRRYRDD	ERK1, PLCG SH3, INTERSECTINA SH3A, NCK 2ND SH3, SRC SH3, CAPC-SH3, PLCG SH3, ERK1, CDC2, DOMINIO D DE ERK, PIP3 PH
BH3 DE BCL-XL AVKQALREAGDEFELRYRRAFS	PIP3 PH, CLK2
BH3 DE BCL-W HQANRAAGDEFETFRRTFSD	PIP3 PH, PKA, PKC, PKA, AKT, CLK2
BH3 DE MCL-W TSRKALETTLRRVGDGVQRNH	PKC, PKC, PKC, AKT

Fig. 67

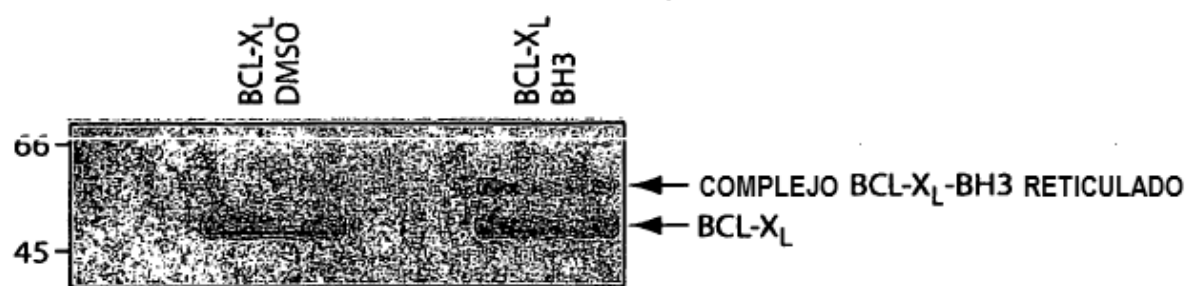


Fig. 68

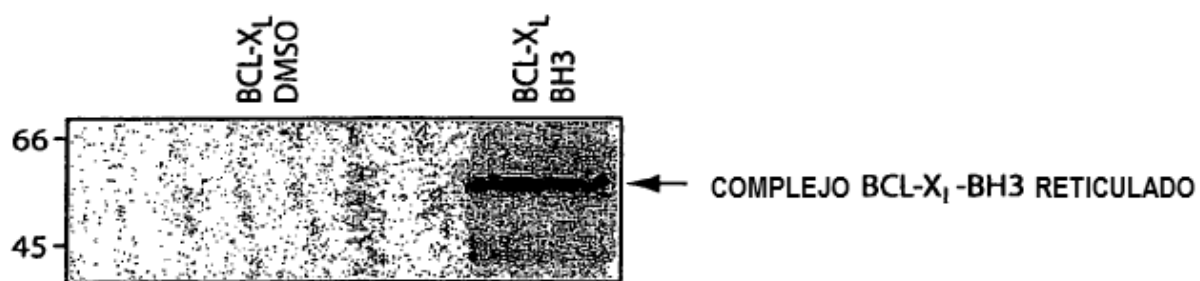


Fig. 69

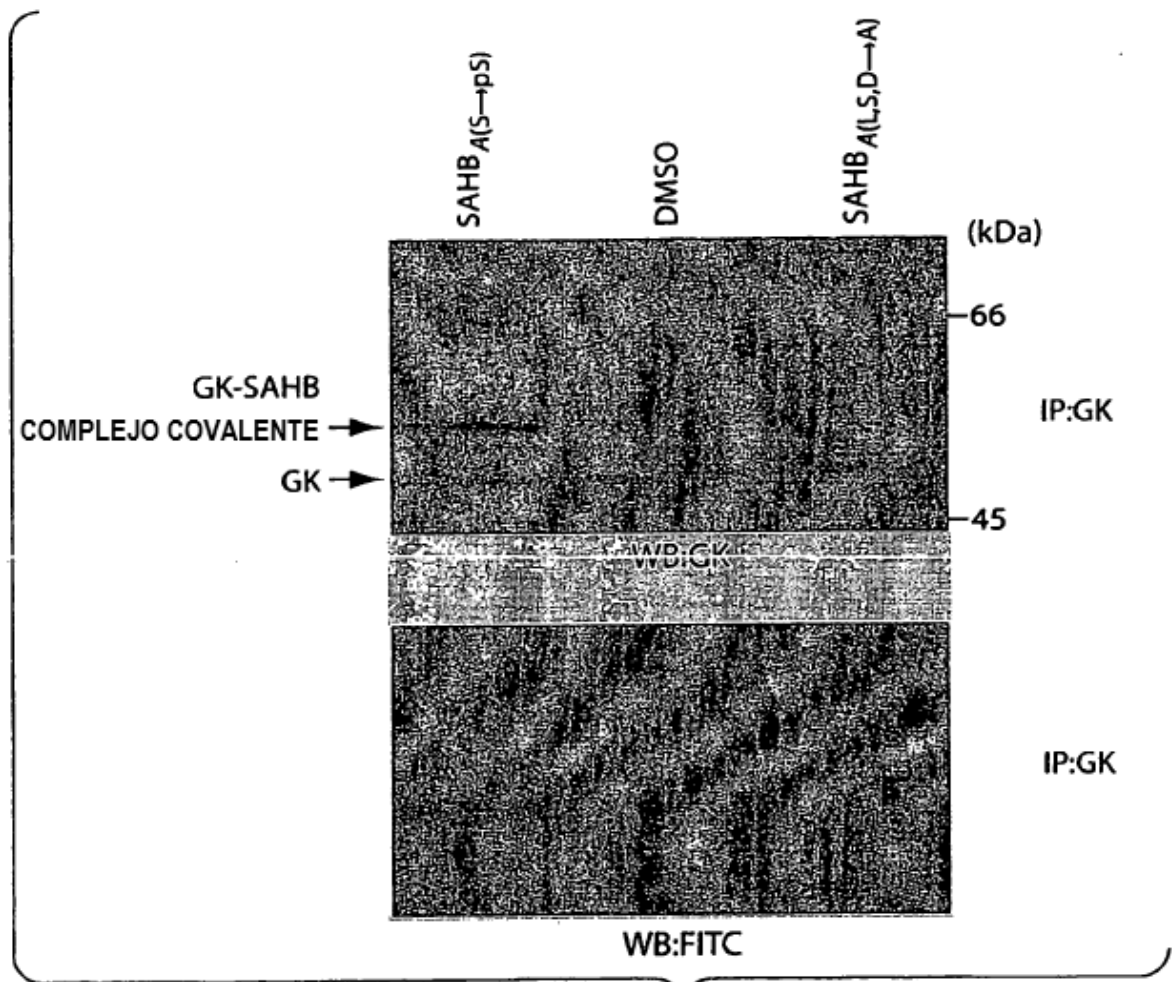


Fig. 70

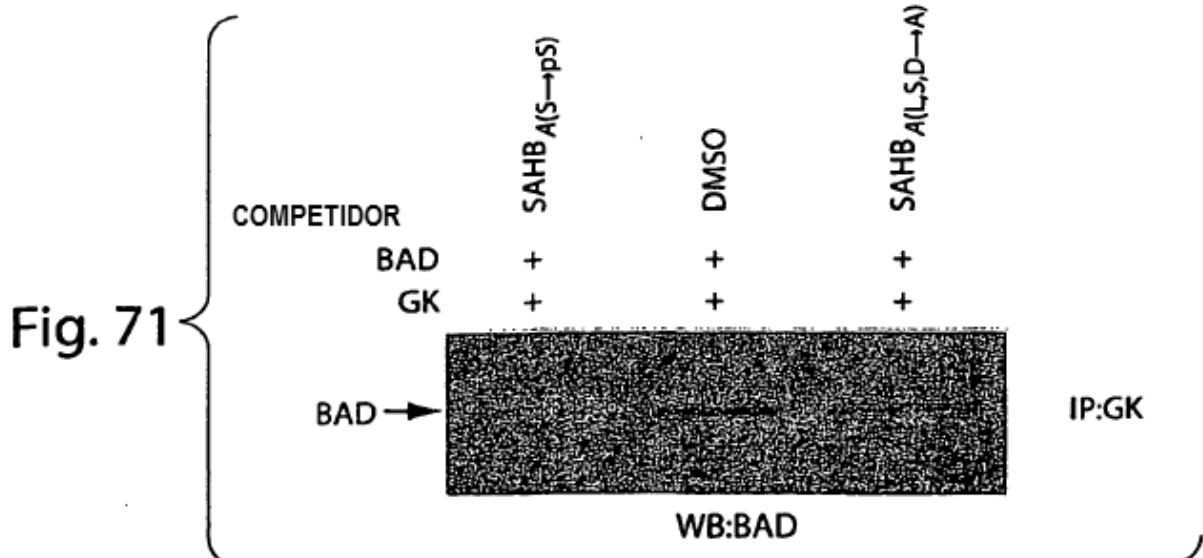


Fig. 71