

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 922**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2013 PCT/EP2013/076917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14095875**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2013 E 13811451 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2936151**

54 Título: **Métodos para tratar y/o limitar el desarrollo de diabetes**

30 Prioridad:

18.12.2012 US 201261738835 P

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

16.11.2018

73 Titular/es:

**BIOCRINE AB (100.0%)
Box 3073
169 03 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**BERGGREN, PER OLOF y
YANG, SHAO-NIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 689 922 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para tratar y/o limitar el desarrollo de diabetes

5 Introducción

Los canales de calcio controlados por voltaje (Cav) son críticos en la fisiología y fisiopatología de las células β . No solo ocupan un lugar central en la regulación de la secreción de insulina, sino que también participan en el desarrollo, la supervivencia y el crecimiento de las células β a través de la regulación de la fosforilación de proteínas, la expresión génica y el ciclo celular. La función y densidad de los canales de Cav de células β están reguladas por una amplia gama de mecanismos ya sea compartidos por otros tipos de células o específicos para células β , por ejemplo, fosforilación de canales, interacción con otras moléculas y señalización derivada del metabolismo de la glucosa. Los canales de Cav disfuncionales causan el mal funcionamiento de las células β e incluso su muerte como se manifiesta en el desorden metabólico más común, la diabetes mellitus. De hecho, un ataque autoinmune mediado por linfocitos T juega un papel crucial en la muerte de células β en la diabetes tipo 1. Además, los factores en el suero diabético tipo 1 obligan a cantidades no fisiológicas de Ca^{2+} a entrar en las células pancreáticas β a través de la hiperactivación de los canales Cav de las células β , dando como resultado la apoptosis de las células β . Sin lugar a duda, este proceso agrava el desarrollo de la enfermedad además del ataque autoinmune. Dichos factores también se visualizan en suero diabético tipo 2, donde se comportan de la misma manera que en el suero diabético tipo 1. De hecho, la reducción de la masa de células β y la hiperactivación de los canales de Cav de células β aparecen bajo condiciones diabéticas tipo 2, tales como las de la rata Goto-Kakizaki. Berggren informó métodos para identificar compuestos candidatos para el tratamiento de la diabetes tipo I (documento US 2004/224304 A1, 11 de noviembre de 2004). Además, se informó que la apolipoproteína CIII promueve la muerte de células β dependientes de Ca^{2+} en diabetes tipo 1 (Juntti-Berggren L., et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 101, no. 27, July 6, 2004, p.10090-10094). Holmberg et al. describe que la disminución de la apolipoproteína CIII retrasa el inicio de la diabetes tipo I (Holmberg R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 108, no. 26, June 28, 2011, p.10685-10689). El papel de los canales de calcio controlados por voltaje en la fisiología y fisiopatología de las células beta pancreáticas fue evaluado por Yang S.-N. et al. en Endocrin. Rev., vol. 27, no. 6, October 2006, p.621-676. La identificación asistida por marcador o la selección de sujetos mamíferos con metabolismo o regulación de insulina normal o anormal y/o predisposición a o protección frente a enfermedades y afecciones en las que están implicadas la regulación y el metabolismo de insulina se reportó en WO 2009/128734 A1.

Sumario de la invención

35 En un primer aspecto, la presente invención proporciona métodos para identificar compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar diabetes, que comprende

40 (a) poner en contacto una primera población de células secretoras de insulina con una cantidad de apolipoproteína CIII (ApoCIII) eficaz para aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba.

45 (b) poner en contacto una segunda población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba, y contactar más a la segunda población de insulina que secreta células con una molécula que inhibe la expresión o actividad del receptor del secuestrante clase B tipo I (SRBI); e

50 (c) identificar compuestos de prueba positivos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en la densidad y/o conductividad de los canales Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la segunda población de células secretoras de insulina como compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

55 En una realización, el método comprende además poner en contacto una tercera población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más de los compuestos candidatos, y contactar adicionalmente la tercera población de células secretoras de insulina con un bloqueador de canales Ca_v2 y/o Ca_v3 , en el que el candidato que inhibe el aumento de densidad y/o conductividad inducido por ApoCIII en la tercera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la primera población de las células secretoras de insulina, son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

60 En una realización adicional que se puede combinar con cualquiera de las realizaciones aquí, el método comprende además poner en contacto una cuarta población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos candidatos y contactando adicionalmente con la cuarta población de células secretoras de insulina con un inhibidor de Src quinasa y/o un inhibidor de proteína quinasa A (PKA), en el que los compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 en la primera población de

células secretoras de insulina en mayor grado que en la cuarta población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones aquí, los métodos comprenden además poner en contacto una quinta población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para la densidad y/o conductividad de los canales Ca_v1 , en presencia de uno o más de los compuestos candidatos, y contactando adicionalmente a la quinta población de células secretoras de insulina con una molécula que inhibe la expresión o actividad de integrina $\beta 1$, en el que los compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en densidad y/o conductividad de canales Ca_v1 en la primera población de las células secretoras de insulina en mayor grado que en la quinta población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona métodos para identificar compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar diabetes, que comprende

a) poner en contacto una primera población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba; e

b) identificar aquellos compuestos de prueba positivos que inhiben la expresión o actividad de SRBI en la primera población de células secretoras de insulina en comparación con el control, en el que los compuestos de prueba positivos son compuestos candidatos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes.

En una realización, el control comprende poner en contacto una segunda población de células secretoras de insulina puestas en contacto con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1 , en ausencia de uno o más compuestos de prueba. Esta realización puede comprender, por ejemplo, poner en contacto la segunda población de células con una formulación, tal como un regulador, que sea similar o idéntica a la formulación en la que se disuelven los compuestos de prueba.

En diversas realizaciones de cualquiera de estos aspectos de la invención, cada uno de los cuales puede combinarse excepto que el contexto indique claramente lo contrario, el método comprende poner en contacto las células con ApoCIII durante al menos 6 horas; los compuestos candidatos son compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes tipo 1; y/o en el que los compuestos candidatos son compuestos candidatos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes de tipo 2. En un tercer aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar o limitar el desarrollo de diabetes, que comprende una combinación de un inhibidor de expresión y/o actividad de SRBI y un inhibidor de la activación de ApoCIII de células β pancreáticas. En diversas realizaciones, el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti SRBI, aptámeros anti SRBI, ARNsi de SRBI, ARNsh de SRBI, oligonucleótidos antisentido de SRBI y moléculas pequeñas que inhiben la expresión y/o actividad de SRBI.

Descripción de las figuras

Figura 1. La incubación de la apolipoproteína CIII aumenta tanto la densidad como la conductividad de los canales de Ca_v1 en las células β . (a) Ejemplos de corrientes de canal de Ca_v1 unitarias detectadas en parches de membrana plasmática de células β de islotes de ratón incubadas con solución de vehículo como control o apolipoproteína CIII (ApoCIII). (b) Número promedio, probabilidad abierta, tiempo cerrado medio y tiempo abierto medio de canales Ca_v1 unitarios medidos en parches de membrana plasmática unidos a células β de islotes de ratón expuestas a vehículo de control (n= 33) o ApoCIII (n= 32). (c) Ejemplos de corrientes de canal de Ca_v1 unitarias registradas en parches de membrana plasmática unidos a una célula control RINm5F o una célula tratada con ApoCIII. (d) Número medio, probabilidad abierta, tiempo medio cerrado y tiempo medio abierto de canales Ca_v1 unitarios detectados en parches de membrana plasmática de células control RINm5F (n= 34) o células incubadas con ApoCIII (n= 35). *P<0,05 y **P<0,01 versus control.

Figura 2. La incubación de la apolipoproteína CIII aumenta las corrientes de Ca^{2+} de las células enteras y la coincubación con el bloqueante de los canales de Ca_v1 , la nimodipina, anula el efecto de la incubación de la apolipoproteína CIII en las células RINm5F. (a) Muestra de trazas de corriente de Ca^{2+} de células enteras de una célula se incubaron con solución de vehículo como control (capacitancia de célula: 10,1 pF) y la célula tratada con apolipoproteína CIII (ApoCIII) (capacitancia de célula: 11,1 pF). (b) relaciones promedio de densidad:voltaje de corriente de Ca^{2+} en células de control (círculos abiertos, n= 26) y células tratadas con ApoCIII (círculos rellenos, n= 26). *P<0,05 y **P<0,01 versus control. (c) muestra de trazas de corriente de Ca^{2+} de células enteras a partir de una célula incubada con nimodipina (Nim) (capacitancia de célula: 10 pF) y una célula expuesta a Nim junto con ApoCIII (Nim/ApoCIII) (capacitancia de célula: 11,9 pF). (d) relaciones promedio de densidad:voltaje de corriente de Ca^{2+} en células tratadas con Nim (círculos abiertos, n= 20) y células incubadas con Nim/ApoCIII (círculos rellenos, n= 21). *P<0,05 y ** P<0,01 versus Nim solo.

Figura 3. La inhibición de PKA o Src quinasa reduce marginalmente, pero la inhibición de PKC no afecta la potenciación inducida por apolipoproteína CIII de las corrientes de Ca^{2+} de las células enteras en las células RINm5F. (a) Muestra de trazas de corriente de Ca^{2+} de células enteras de una célula incubada con solución de vehículo como control (capacitancia celular: 8,5 pF), una célula tratada con apolipoproteína CIII (ApoCIII) (capacitancia celular: 8,2 pF) y una célula expuesta a ApoCIII más el inhibidor de PKA H-89 (ApoCIII/H-89, capacitancia celular: 8,4 pF). (b) relaciones promedio de densidad:voltaje de corriente de Ca^{2+} en células de control (círculos abiertos, n= 37) y células tratadas con ApoCIII (círculos rellenos, n= 36) o ApoCIII/H-89 (triángulos rellenos, n= 36). *P<0,05 y **P<0,01 versus control. (c) muestra de trazas de corriente de Ca^{2+} de célula entera registradas en una célula de control (capacitancia celular: 12,5 pF), una célula incubada por ApoCIII (capacitancia celular: 12,0 pF) y una célula sometida a cotratamiento con ApoCIII y el inhibidor de PKC calfostin C (ApoCIII/CalpC, capacitancia celular: 12,1 pF). (d) relaciones promedio de densidad:voltaje de corriente de Ca^{2+} en células de control (círculos abiertos, n= 33), células tratadas con ApoCIII (círculos rellenos, n= 33) y células expuestas a ApoCIII/CalpC (triángulos rellenos, n= 33). *P<0,05 y **P<0,01 ApoCIII versus control. *P<0,05 y **P <0,01 ApoCIII/CalpC versus control. (e) muestra de trazas de Ca^{2+} de células enteras adquiridas en una célula de control (capacitancia celular: 9,5 pF), una célula incubada por ApoCIII (capacitancia celular: 9,2 pF) y una célula expuesta a ApoCIII junto con el inhibidor de cinasa Src PP2 (ApoCIII/PP2, capacitancia celular: 10,0 pF). (f) relaciones promedio de densidad:voltaje de corriente de Ca^{2+} en células de control (círculos abiertos, n= 40) y células incubadas con ApoCIII (círculos rellenos, n= 40) o ApoCIII/PP2 (triángulos rellenos, n= 40). **P<0,01 ApoCIII versus control. *P<0,05 ApoCIII/PP2 versus control.

Figura 4. La inhibición combinada de PKA, PKC y Src quinasa contrarresta el aumento inducido por apolipoproteína CIII de las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en células RINm5F y la co-inhibición de PKA y Src quinasa es suficiente para obtener esta resistencia. (a) muestra de trazas de corriente de Ca^{2+} de células enteras registradas en una célula incubada con vehículo (control, capacitancia celular: 7,9 pF), una célula posterior al tratamiento con apolipoproteína (ApoCIII) (capacitancia celular: 7,0 pF) y una célula expuesta a ApoCIII en la presencia del cóctel inhibidor de proteína quinasa de H-89, calfostin C y PP2 (ApoCIII/H-89/CalpC/PP2, capacitancia celular: 7,2 pF). (b) relaciones promedio de densidad:voltaje de corriente de Ca^{2+} en células de control (n= 35) y células expuestas a ApoCIII (n= 34) o a ApoCIII/H-89/CalpC/PP2 (n= 35). *P<0,05 versus control y apoCIII/H-89/CalpC/PP2. (c) muestra trazas de corriente de Ca^{2+} de células enteras de una célula de control (capacitancia celular: 8,5 pF), una célula posterior al tratamiento ApoCIII (capacitancia celular: 8,2 pF) y una célula expuesta a ApoCIII en presencia de los inhibidores de la proteína quinasa H-89 y PP2 (ApoCIII/H-89/PP2, capacitancia celular: 8,7 pF). (d) relaciones promedio de densidad:voltaje de corriente de Ca^{2+} en células de control (n= 26) y células sometidas a ApoCIII (n= 26) o a ApoCIII/H-89/PP2 (n= 27). *P<0,05 y **P<0,01 versus control; *P <0,05 versus ApoCIII/H-89/PP2.

Figura 5. La incubación con apolipoproteína CIII no altera la expresión del canal Ca_v1 de las células β . (a) inmunoprecipitaciones representativas de homogenatos de células RINm5F, sometidas a incubación con vehículo como control o apolipoproteína CIII (ApoCIII), sondeadas con anticuerpos anti $Ca_v1,2$, anti $Ca_v1,3$ y antiGAPDH, respectivamente. (b) Cuantificación de inmunotransferencia de la abundancia relativa de las subunidades $Ca_v1,2$ (columna sombreada, n= 6) y $Ca_v1,3$ (columna rellena, n= 6) en homogeneizados de células RINm5F sometidos a incubación de ApoCIII en comparación con el control (columna abierta, n= 6). No hubo diferencias significativas en la abundancia relativa de las subunidades $Ca_v1,2$ y $Ca_v1,3$ totales entre las células de control y las células incubadas con ApoCIII (P> 0,05).

Figura 6. Anulación de la integrina $\beta1$ anula la exageración inducida por la apolipoproteína CIII de las corrientes de Ca^{2+} de las células enteras en las células RINm5F. (a) inmunoprecipitaciones representativas de las bandas inmunoreactivas de la integrina $\beta1$ y GAPDH en la integrina $\beta1$ ARNsi #1, ARNsi de control negativo (NC ARNsi) y células transfectadas con integrina $\beta1$ ARNsi #2. (b) cuantificaciones de inmunoprecipitación de proteína de integrina $\beta1$ en NC ARNsi (columna abierta, n= 6), integrina $\beta1$ ARNsi #1- (columna sombreada, n= 6) y células RINm5F transfectadas con ARNsi #2 de integrina $\beta1$ (columna rellena, n= 6). **P<0,01 versus NC ARNsi. (c) muestra de trazas de corriente de Ca^{2+} de células enteras registradas en células individuales después de transfección simulada e incubación con vehículo de control (NO ARNsi/Control, capacitancia celular: 12,1 pF), transfección NC ARNsi y tratamiento de vehículo de control (NC ARNsi/Control, capacitancia celular: 11,4 pF), transfección con NC ARNsi e incubación con apolipoproteína CIII (ApoCIII) (NC ARNsi/ApoCIII, capacitancia celular: 12,1 pF), transfección de ARNsi de integrina $\beta1$ y exposición a solución vehículo ($\beta1$ integrina ARNsi/Control, capacitancia celular: 11,9 pF) y la transfección de ARNsi de integrina $\beta1$ y la exposición a ApoCIII (integrina $\beta1$ siARN/ApoCIII, capacitancia celular: 12,4 pF), respectivamente. (d) relaciones de densidad-voltaje de corriente de Ca^{2+} en células sometidas a NO ARNsi/control (círculos rellenos, n= 29), NC ARNsi/control (círculos abiertos, n= 28), NC ARNsi/apoCIII (triángulos rellenos, n= 28), integrina $\beta1$ ARNsi/control (triángulos abiertos, n= 29) e integrina $\beta1$ ARNsi/apoCIII (cuadrados rellenos, n= 29). *P<0,05 y **P<0,01 versus NO ARNsi/Control, NC ARNsi/Control y $\beta1$ integrina ARNsi/Control. *P<0,05 versus integrina $\beta1$ ARNsi/ApoCIII.

Figura 7. Anulación de SRBI previene el aumento inducido por la apolipoproteína CIII de las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en las células RINm5F. (a) Inmunoprecipitaciones representativas de las bandas de GAPDH y GAPDH-ARNm en ARNsi de SRBI y células transfectadas de ARNsi de control negativo (NC ARNsi). (b) mediciones de inmunoprecipitación cuantitativa de la proteína SRBI en NC ARNsi- (columna abierta, n= 6) y células RINm5F transfectadas con ARNsi de SRBI (columna rellena, n= 6). **P <0,01 versus NC ARNsi. (c) inmunoprecipitaciones de

muestras de las bandas inmunorreactivas SRBI y GAPDH en ARNsi de SRBI y células transfectadas con control negativo ARNsi (NC ARNsi). (d) Cuantificaciones del ARNm de SRBI en NC ARNsi (columna abierta, n= 7) y células RINm5F transfectadas con ARNsi de SRBI (columna rellena, n= 7). **P<0,01 versus NC ARNsi. (e) Trazas de corriente de Ca²⁺ representativas de células enteras de células individuales posteriores a la transfección simulada e incubación con vehículo de control (NO ARNsi/control, capacitancia celular: 13,87 pF), transfección de ARNsi NC y tratamiento de vehículo de control (NC ARNsi/control, capacitancia celular : 13,18 pF), transfección con NC siRNA e incubación con apolipoproteína CIII (ApoCIII) (NC ARNsi/ApoCIII, capacitancia celular: 13,53 pF), SRBI ARNsi transfección y exposición a solución vehículo (SRBI ARNsi /Control, capacitancia celular: 12,90 pF) y transfección ARNsi de SRBI y exposición a ApoCIII (SRBI ARNsi/ApoCIII, capacitancia celular: 13,01 pF), respectivamente. (f) relaciones de densidad-voltaje de corriente de Ca²⁺ en células sometidas a NO ARNsi/control (círculos rellenos, n= 30), NC ARNsi/control (círculos abiertos, n= 29), NC ARNsi/apoCIII (triángulos rellenos, n= 30), SRBI ARNsi/control (triángulos abiertos, n= 29) y SRBI ARNsi/ApoCIII (cuadrados rellenos, n= 30). *P<0,05 y **P<0,01 versus NO ARNsi/Control, NC ARNsi/Control y SRBI ARNsi/Control. *P<0,05 versus SRBI ARNsi/ApoCIII.

Figura 8. La inhibición de PKA, PKC o Src quinasa no altera las corrientes de Ca²⁺ de las células enteras en células RINm5F bajo condiciones basales. (a) muestra de trazas de corriente de Ca²⁺ de células enteras desde una célula tratada con vehículo como control (capacitancia celular: 8,8 pF) y una célula expuesta a H-89 (capacitancia celular: 8,5 pF). (b) relaciones promedio de densidad-voltaje de corriente de Ca²⁺ en células de control (círculos abiertos; n= 20) y células incubadas con H-89 (círculos rellenos; n= 20). (c) muestra de trazas de corriente de Ca²⁺ de células enteras registradas en una célula de control (capacitancia celular: 10,4 pF) y una célula sometida a incubación con calfostin C (CalpC, capacitancia celular: 11,0 pF). (d) relaciones promedio de densidad-voltaje de corriente de Ca²⁺ en células control (círculos abiertos; n= 29) y células expuestas a CalpC (círculos rellenos, n= 29). (e) muestra de trazas de corriente de Ca²⁺ de células enteras obtenidas en una célula de control (capacitancia celular: 9,0 pF) y una célula tratada con PP2 (capacitancia celular: 9,1 pF). (f) relaciones promedio de densidad-voltaje de corriente de Ca²⁺ en células de control (círculos abiertos, n= 20) y células incubadas con PP2 (círculos rellenos, n= 19).

Figura 9. La inhibición combinada de PKA, PKC y Src quinasa o la coinhibición de PKA y Src quinasa no influye en las corrientes de Ca²⁺ de las células enteras en células RINm5F en condiciones basales. (a) muestra de trazas de corriente de Ca²⁺ de células enteras obtenidas en una célula incubada con solución de vehículo como control (capacitancia celular: 10,8 pF) y una célula tratada con el cóctel inhibidor de proteína quinasa compuesto por H-89, calfostin C y PP2 (H-89/CalpC/PP2, capacitancia celular: 9,7 pF). (b) relaciones promedio de densidad-voltaje de corriente de Ca²⁺ en células control (círculos abiertos; n= 30) y células tratadas con H-89/CalpC/PP2 (círculos rellenos, n= 30). (c) muestra de trazas de corriente de Ca²⁺ de células enteras obtenidas en una célula tratada con vehículo como control (capacitancia celular: 9,4 pF) y una célula tratada con los inhibidores de proteína quinasa H-89 y PP2 (H-89/PP2, capacitancia celular: 9,1 pF). (d) relaciones promedio de densidad-voltaje de corriente de Ca²⁺ en células de control (círculos abiertos; n= 24) y células tratadas con H-89/PP2 (círculos rellenos, n= 24).

Descripción detallada de la invención

Dentro de esta solicitud, a menos que se indique lo contrario, las técnicas utilizadas se pueden encontrar en cualquiera de varias referencias bien conocidas, tales como: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed. (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.), y el Ambion 1998 Catalog (Ambion, Austin, TX).

A menos que el contexto claramente requiera lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprender", "que comprende" y similares deben interpretarse en un sentido inclusivo en oposición a un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de "incluir, pero no limitarse a". Las palabras que usan el número singular o plural también incluyen el número plural o singular, respectivamente. Además, las palabras "aquí", "anteriormente" y "siguiente" y las palabras de importación similar, cuando se usan en esta solicitud, se referirán a esta solicitud como un todo y no a ninguna porción particular de esta solicitud.

Como se usa aquí, las formas singulares "un", "una" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. "Y" como se usa aquí se usa indistintamente con "o" a menos que se indique expresamente lo contrario.

Todas las realizaciones de cualquier aspecto de la invención se pueden usar en combinación, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona métodos para identificar compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar diabetes, que comprende

65

(a) poner en contacto una primera población de células secretoras de insulina con una cantidad de apolipoproteína CIII (ApoCIII) eficaz para aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba;

5 (b) poner en contacto una segunda población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba, y contactar adicionalmente a la segunda población de células secretoras de insulina con una molécula que inhibe la expresión o actividad del receptor del secuestrante clase B tipo I (SRBI), e

10 (c) identificar compuestos de prueba positivos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en la densidad y/o conductividad de los canales Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la segunda población de células secretoras de insulina como compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

15 Los inventores han descubierto que la incubación con ApoCIII causaba aumentos significativos en la probabilidad abierta y densidad del canal Ca_v1 a niveles de canal sencillo. El tratamiento mejoró significativamente las corrientes de Ca^{2+} de células enteras y el bloqueador de canales de Ca_v1 , la nimodipina, derogó por completo la mejora. Los inventores han descubierto además que la anulación del receptor de secuestrante clase B tipo I (SRBI) impidió que ApoCIII hiperactivara los canales de Ca_v de células β . Por lo tanto, los inhibidores de SRBI deberían subregular los
 20 compuestos candidatos positivos de la presente invención. Por lo tanto, aquellos compuestos de prueba positivos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en la densidad y/o conductividad de los canales Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la segunda población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos para limitar el desarrollo de y/o tratamiento de la diabetes. Por lo tanto, los métodos de este aspecto de la invención se pueden usar para identificar compuestos para limitar la muerte de
 25 células β pancreáticas dependientes de Ca^{2+} de una manera específica, y por lo tanto para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

30 Como se usa aquí, "ApoCIII" se refiere a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:2 (humana) (número de acceso NCBI CAA25233), SEQ ID NO:4 (rata) (número de acceso NCBI o SEQ ID NO:6 (macaco) (número de acceso NCBI CAA48419), o equivalentes funcionales de los mismos.

35 La ApoCIII puede ser ApoCIII sustancialmente purificada, disponible, por ejemplo, de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), en la que "sustancialmente purificado" significa que se elimina de su entorno celular normal in vivo. Alternativamente, la ApoCIII puede estar presente en una mezcla, tal como suero sanguíneo del tipo 1 diabético o parcial o totalmente purificado a partir de él, usando técnicas estándar, tales como las descritas a continuación. En una realización preferida, se usa ApoCIII sustancialmente purificada.

40 Como se discute a continuación, existen tres isoformas conocidas de ApoCIII humana que tienen la misma secuencia de aminoácidos, pero que difieren en su patrón de glicosilación. Por lo tanto, en una realización preferida, se usa ApoCIII glicosilada, en la que la glicosilación es preferiblemente sialilación. En otra realización preferida, se usa ApoCIII monosialilada o disialilada. Dichas formas glicosiladas se pueden comprar, por ejemplo, de Sigma Chemical Company, o se pueden purificar parcial o totalmente usando técnicas estándar, tales como las descritas a continuación.

45 El receptor de secuestrante clase B miembro 1 (SRB1) también conocido como SR-BI, está codificado por el gen SCARB1. SRBI es mejor conocido por su papel en facilitar la absorción de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad en el hígado.

50 La secuencia de aminoácidos de SRBI humano se proporciona en la SEQ ID NO:9. Se proporciona una secuencia de nucleótidos de ADNc como ejemplo en la SEQ ID NO:10.

Cualquier molécula adecuada que inhiba la expresión de SRBI (ARN o proteína) o actividad (que incluye, pero no se limita al bloqueo de SRBI) puede usarse en los métodos de la invención, que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos anti SRBI, aptámeros anti SRBI, ARNs de SRBI, ARNs de SRBI, oligonucleótidos antisentido SRBI e
 55 inhibidores de SRBI de molécula pequeña. Los anticuerpos anti SRBI están disponibles de una variedad de proveedores comerciales, incluidos ThermoFisher, Epitomics y OriGene. En una realización, el inhibidor comprende interferón alfa, que se ha demostrado que inhibe la expresión de SRBI (Gut. 2008 May; 57(5):664-71. Epub 2007 Nov 12). En otra realización, el inhibidor de SRBI comprende N-[4-(4-terc-Butoxicarbonilpiperazin-1-il)fenil]-(2-cloro-5-nitrofenil)carboxamida (R-138329), que se ha demostrado que bloquea la actividad del receptor de SRBI (J Pharm Pharmacol. 2006 Dec;58(12):1629-38). En otra realización, el inhibidor de SRBI comprende 2-Hexil-1-ciclopentanona tiosemicarbazona, 33M20, BLT1, transporte-1 en bloque de lípidos, número CAS 321673-30-7 (disponible de Sigma Aldrich). En otra realización, el inhibidor de SRBI es uno cualquiera o más de los inhibidores de SRBI divulgados en el documento US 20040171073; estos compuestos se observan en la solicitud US 20040171073 (Tablas 1-2) como
 60 números de compuestos MIT 9952-1, 9952-2, 9952-3, 9952-4, 9952-5, 9952-6, 9952-7, 9952-8, 9952-9, 9952-10, 9952-11, 9952-12, 9952-13, 9952-14, 9952-15, 9952-16, 9952-17, 9952-18, 9952-19, 9952-20, 9952-21, 9952-22, 9952-23, 9952-24, 9952-25, 9952-26, 9952-27, 9952-28, 9952-29, 9952-30, 9952-31, 9952-32, 9952-33, 9952-34,

5 9952-35, 9952-36, 9952-37, 9952-38, 9952-39, 9952-40, 9952-41, 9952-42, 9952-43, 9952-44, 9952-45, 9952-46, 9952-47, 9952-48, 9952-49, 9952-50, 9952-51, 9952-52, 9952-53, 9952-54, 9952-55, 9952-56, 9952-57, 9952-58, 9952-59, 9952-60, 9952-61, 9952-62, 9952-63, 9952-64, 9952-65, 9952-66, 9952-67, 9952-68, 9952-69, 9952-70, 9952-71, 9952-72, 9952-73, 9952-74, 9952-75, 9952-76, 9952-77, 9952-78, 9952-79, 9952-80, 9952-81, 9952-82, 9952-83, 9952-84, 9952-85, 9952-86, 9952-87, 9952-88, 9952-89, 9952-90, 9952-91, 9952-92, 9952-93, 9952-94, 9952-95, 9952-96, 9952-97, 9952-98, 9952-99, 9952-100, 9952-101, 9952-102, 9952-103, 9952-104, 9952-105, 9952-106, 9952-107, 9952-108, 9952-109, 9952-110, 9952-111, 9952-112, 9952-113, 9952-114, 9952-115, 9952-116, 9952-117, 9952-118, 9952-119, 9952-120, 9952-121, 9952-122, 9952-123, 9952-124, 9952-125, 9952-126, 9952-127, 9952-128, 9952-129, 9952-130, 9952-131, 9952-132, 9952-133, 9952-134, 9952-135, 9952-136, 9952-137, 9952-138, 9952-139, 9952-140, 9952-141, 9952-142, 9952-143, 9952-144, 9952-145, 9952-146, 9952-147, 9952-148, 9952-149, 9952-150, 9952-151, 9952-152, 9952-153, 9952-154, 9952-155, 9952-156, 9952-157, 9952-158, 9952-159, 9952-160, 9952-161, 9952-162, 9952-163, 9952-164, 9952-165, 9952-166, 9952-167, 9952-168, 9952-169, 9952-170, 9952-171, 9952-172, 9952-173, 9952-174, 9952-175, 9952-176, 9952-177, 9952-178, 9952-179, 9952-180, 9952-181, 9952-182, 9952-183, 9952-184, 9952-185, 9952-186, 9952-187, 9952-188, 9952-189, 9952-190, 9952-191, 9952-192, 9952-193, 9952-194, 9952-195, 9952-196, 9952-197, 9952-198, 9952-199, 9952-200, 9952-201, 9952-202, 9952-203, 9952-204, 9952-205, 9952-206, 9952-207, 9952-208, 9952-209, 9952-210, 9952-211, 9952-212, 9952-213, 9952-214, 9952-215, 9952-216, 9952-217, 9952-218, 9952-219, 9952-220, 9952-221, 9952-222, 9952-223, 9952-224, 9952-225, 9952-226, 9952-227, 9952-228, 9952-229, 9952-230, 9952-231, 9952-232, 9952-233, 9952-234, 9952-235, 9952-236, 9952-237, 9952-238, 9952-239, 9952-240, 9952-241, 9952-242, 9952-243, 9952-244, 9952-245, 9952-246, 9952-247, 9952-248, 9952-249, 9952-250, 9952-251, 9952-252, 9952-253, 9952-254, 9952-255, 9952-256, 9952-257, 9952-258, 9952-259, 9952-260, 9952-261, 9952-262, 9952-263, 9952-264, 9952-265, 9952-266, 9952-267, 9952-268, 9952-269, 9952-270, 9952-271, 9952-272, 9952-273, 9952-274, 9952-275, 9952-276, 9952-277, 9952-278, 9952-279, 9952-280, 9952-281, 9952-282, 9952-283, 9952-284, 9952-285, 9952-286, 9952-287, 9952-288, 9952-289, 9952-290, 9952-291, 9952-292, 9952-293, 9952-294, 9952-295, 9952-296, 9952-297, 9952-298, 9952-299, 9952-300, 9952-301, 9952-302, 9952-303, 9952-304, 9952-305, 9952-306, 9952-307, 9952-308, 9952-309, 9952-310, 9952-311, 9952-312, 9952-313, 9952-314, 9952-315, 9952-316, 9952-317, 9952-318, 9952-319, 9952-320, 9952-321, 9952-322, 9952-323, 9952-324, 9952-325, 9952-326, 9952-327, 9952-328, 9952-329, 9952-330, 9952-331, 9952-332, 9952-333, 9952-334, 9952-335, 9952-336, 9952-337, 9952-338, 9952-339, 9952-340, 9952-341, y 9952-342, o sales farmacéuticas de los mismos. Una persona experimentada en la técnica podrá identificar fácilmente la estructura del compuesto con base en los números de compuesto proporcionados aquí, a la luz de las enseñanzas de las estructuras compuestas en la solicitud US 20040171073 (véase la Tabla 1). En una realización, los compuestos son uno o más de 9952-53, 9952-61, 9952-19, 9952-29 y/o 9952-6, o sales farmacéuticas de los mismos.

35 Se puede usar cualquier célula de secreción de insulina adecuada, que incluye, pero no se limita a, células β pancreáticas. Como se usa aquí, las "células β pancreáticas" son cualquier población de células que contienen células de islotes β pancreáticos. Las células se pueden obtener de cualquier especie de mamífero, o pueden estar presentes dentro de la especie de mamífero cuando los ensayos se llevan a cabo in vivo. Tales poblaciones de células de islotes pancreáticos β incluyen el páncreas, islotes pancreáticos aislados de Langerhans ("islotes pancreáticos"), células aisladas de islotes pancreáticos β y líneas celulares secretoras de insulina. Los métodos para el aislamiento pancreático son bien conocidos en la técnica, y los métodos para aislar islotes pancreáticos se pueden encontrar, por ejemplo, en Cejvan et al., *Diabetes* 52:1176-1181 (2003); Zambre et al., *Biochem. Pharmacol.* 57:1159-1164 (1999), y Fagan et al., *Surgery* 124:254-259 (1998), y las referencias citadas allí. Las líneas celulares secretoras de insulina están disponibles en la Colección Americana de Cultivo Tisular ("ATCC") (Rockville, MD). En una realización adicional en la que se usan células β pancreáticas, se obtienen a partir de ratones ob/ob, que contienen más del 95% de células β en sus islotes, y están disponibles comercialmente.

50 La medición de la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 se puede llevar a cabo mediante métodos estándar en la técnica, que incluyen pero no se limitan a mediciones de pinzamiento de parche de un solo canal y células enteras (técnicas de pinzamiento de parche de células enteras, unido a la célula y perforado). Como se usa aquí, "aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1 " se refiere a aumentar durante el transcurso del ensayo anterior que se observa en ausencia de compuestos de prueba. El método no requiere una cantidad específica de aumento en la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 sobre la línea de base, siempre que el compuesto o los compuestos promuevan un aumento en la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 por encima del visto en ausencia de compuestos de prueba. En una realización preferida, el aumento es un aumento estadísticamente significativo según se juzga por análisis estadístico estándar.

60 El contacto de la primera población de células secretoras de insulina con la ApoCIII puede ocurrir antes, después o simultáneamente con el contacto de las células con uno o más compuestos de prueba. De manera similar, la puesta en contacto de la segunda población de células secretoras de insulina con el inhibidor o inhibidores de SBIR puede ocurrir antes, después o simultáneamente con el contacto de las células con uno o más compuestos de prueba. El contacto puede ser in vitro o in vivo (por ejemplo, en un modelo animal experimental). Se puede usar cualquier condición de cultivo adecuada para llevar a cabo los métodos de cualquiera de los métodos de identificación candidatos de la invención; preferiblemente, se usan las mismas condiciones experimentales para poner en contacto la primera y la segunda población de células con ApoCIII y el uno o más compuestos de prueba, siendo la única diferencia la puesta en contacto de la segunda población de células con el inhibidor o inhibidores de SBIR. En una

realización, las células se ponen en contacto con ApoCIII durante al menos 6 horas. En otra realización, las células se hacen crecer en un medio que comprende entre 1 mM y 15 mM de glucosa; preferiblemente entre 3 mM y 12 mM; preferiblemente aproximadamente glucosa 11 mM. En una realización adicional, las células se cultivan a aproximadamente 37 °C (preferiblemente en una incubadora humidificada, tal como CO₂ al 5%) antes de registrar la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 a aproximadamente la temperatura ambiente. Cantidades apropiadas del uno o más compuestos de prueba y los inhibidores de SBIR) pueden ser determinados por una persona experimentada en la técnica en base a las características específicas del ensayo a usar, a la luz de las enseñanzas aquí. Estas y otras condiciones de ensayo adecuadas están dentro del nivel de las personas experimentadas en la técnica, en base a las enseñanzas aquí.

En una realización, los compuestos candidatos son compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes tipo 1. En otra realización, los compuestos candidatos son compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes tipo 2. La presente invención proporciona además compuestos identificados por los métodos anteriores de cribado, y su uso para tratar sujetos que lo necesitan.

En otra realización, los métodos comprenden además una síntesis a gran escala de los compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII de la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 en las células β pancreáticas.

Cuando los compuestos de prueba comprenden secuencias polipeptídicas, tales polipéptidos pueden sintetizarse químicamente o expresarse de manera recombinante. La expresión recombinante se puede lograr usando métodos estándar en la técnica, como se divulga anteriormente. Dichos vectores de expresión pueden comprender vectores de expresión bacterianos o virales, y tales células hospedadoras pueden ser procariotas o eucariotas. Los polipéptidos sintéticos, preparados usando las técnicas bien conocidas de fase sólida, fase líquida o técnicas de condensación de péptidos, o cualquier combinación de los mismos, pueden incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos utilizados para la síntesis de péptidos pueden ser resina Boc (α -t-butiloxicarbonil α -amino protegido) aminoácido estándar con protocolos estándar de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado, o aminoácidos estándar 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) α -amino protegido lábil a bases. Tanto los aminoácidos protegidos con Fmoc como con Boc α -amino pueden obtenerse de Sigma, Cambridge Research Biochemical u otras compañías químicas familiares para las personas experimentadas en la técnica. Además, los polipéptidos se pueden sintetizar con otros grupos protectores de α que son familiares para las personas experimentadas en esta técnica. La síntesis de péptidos en fase sólida se puede llevar a cabo mediante técnicas familiares para las personas experimentadas en la técnica y proporcionadas, tal como mediante el uso de sintetizadores automatizados.

Cuando los compuestos de prueba comprenden anticuerpos, dichos anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos pueden ser formas humanizadas, completamente humanas o murinas de los anticuerpos. Dichos anticuerpos pueden prepararse por métodos bien conocidos, tales como los descritos en Harlow and Lane, *Antibodies; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988).

Cuando los compuestos de prueba comprenden secuencias de ácido nucleico, tales ácidos nucleicos pueden sintetizarse químicamente o expresarse recombinantemente también. Las técnicas de expresión recombinante son bien conocidas por las personas experimentadas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, et al., 1989, supra). Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, y pueden ser de una cadena o dobles. De manera similar, tales ácidos nucleicos pueden sintetizarse química o enzimáticamente mediante reacciones manuales o automáticas, usando técnicas estándar en la técnica. Si se sintetiza químicamente o mediante síntesis enzimática in vitro, el ácido nucleico puede purificarse antes de la introducción en la célula. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden purificar a partir de una mezcla mediante extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden usarse sin o con un mínimo de purificación para evitar pérdidas debidas al procesamiento de la muestra.

Cuando los compuestos de prueba comprenden compuestos distintos de polipéptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos, tales compuestos se pueden preparar mediante cualquiera de la variedad de métodos en la técnica para llevar a cabo la síntesis química orgánica.

En una realización, el método comprende además poner en contacto una tercera población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1, en presencia de uno o más de los compuestos candidatos, y contactar adicionalmente a la tercera población de células secretoras de insulina con un bloqueador de canales Ca_v2 y/o Ca_v3, en el que los compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en densidad y/o conductividad en la tercera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la primera población de las células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes. En esta realización, el bloqueador de canales Ca_v2 y/o Ca_v3 es selectivo para el canal Ca_v2 y/o Ca_v3, y no sirve como un bloqueador de canales Ca_v1. Los bloqueadores de los canales de Ca_v2 y/o Ca_v3 adecuados incluyen, pero no se limitan a, ω -agatoxina IVA, ω -conotoxina GVIA y SNX 482 (bloqueadores de los canales de Ca_v2); y mibefradil y NNC 55-0396 (bloqueadores de los canales de Ca_v3). Está dentro del nivel de las personas experimentadas en la técnica determinar, en base a las

enseñanzas aquí, la cantidad de cualquier bloqueador o bloqueadores de canales de Ca_v2 y/o Ca_v3 que puede usarse de forma útil en un ensayo dado.

En una realización adicional que se puede combinar con cualquiera de las realizaciones aquí, el método comprende además poner en contacto una cuarta población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos candidatos y contactando adicionalmente con la cuarta población de células secretoras de insulina con un inhibidor de Src quinasa y/o un inhibidor de proteína quinasa A (PKA), en el que los compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la cuarta población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, los inventores han descubierto que la ApoCIII hiperactiva los canales de Ca_v1 de células β a través de la coactivación dependiente de integrina SRBI/ $\beta1$ de PKA y Src quinasa. Por lo tanto, los inhibidores de PKA y/o Src deberían subregular los compuestos candidatos positivos de la presente invención. Por lo tanto, aquellos compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en un grado mayor que en la cuarta población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes. Se puede usar cualquier inhibidor de PKA y/o Src quinasa adecuado, que incluye, pero no se limita a, los divulgados en los ejemplos que siguen. Los ejemplos de inhibidores de Src quinasa incluyen análogos de PP1, PP2 y compuestos divulgados en los ejemplos que siguen. Los ejemplos de inhibidores de PKA incluyen adenosina 3',5'-cíclico monofosforato-R, H-7, H-8, H-9, H-89 y compuestos divulgados en los ejemplos que siguen. Está dentro del nivel de las personas experimentadas en la técnica determinar, en base a las enseñanzas aquí, la cantidad de cualquier inhibidor o inhibidores de Src quinasa y/o un inhibidor o inhibidores de PKA que pueden usarse de manera útil en un ensayo dado.

En otra realización que puede combinarse con cualquiera de las realizaciones aquí, los métodos comprenden además poner en contacto una quinta población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para la densidad y/o conductividad de los canales Ca_v1 , en presencia de uno o más de los compuestos candidatos, y contactando adicionalmente a la quinta población de células secretoras de insulina con una molécula que inhibe la expresión o actividad de integrina $\beta1$, en la que los compuestos de prueba positivos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en densidad y/o conductividad de canales Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la quinta población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

Como se muestra en los ejemplos que siguen, los inventores han descubierto que la ApoCIII hiperactiva los canales de Ca_v1 de las células β a través de una coactivación dependiente de la integrina SRBI- $\beta1$ de PKA y Src quinasa. Por lo tanto, los inhibidores de la integrina $\beta1$ deberían subregular los compuestos candidatos positivos de la presente invención. Por lo tanto, aquellos compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en un grado mayor que en la quinta población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo de y/o tratamiento de la diabetes. Puede usarse cualquier inhibidor de integrina $\beta1$ adecuado (anticuerpos, antisentido, ARNsi, ARNsh, etc.), que incluye, pero no se limita a, los divulgados en los ejemplos que siguen. Está dentro del nivel de las personas experimentadas en la técnica determinar, en base a las enseñanzas aquí, la cantidad de cualquier inhibidor o inhibidores de integrina $\beta1$ que puede usarse de manera útil en un ensayo dado.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona métodos para identificar compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar diabetes, que comprende

(a) poner en contacto una primera población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba; e

(b) identificar aquellos compuestos de prueba positivos que inhiben el aumento de densidad y/o conductividad de Ca_v1 inducido por ApoCIII y también inhiben la expresión o actividad de SRBI en la primera población de células secretoras de insulina en comparación con el control, en la que los compuestos de prueba positivos son compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes.

Los métodos para medir la expresión y/o actividad de SRBI son conocidos en la técnica. En realizaciones no limitantes, la expresión de ARN y/o proteína puede monitorizarse usando la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa estándar, inmunoprecipitación Northern, inmunoprecipitación Western, inmunofluorescencia u otras técnicas. La actividad de SRBI puede monitorizarse usando una variedad de técnicas, que incluyen, pero no se limitan a, ensayos para el bloqueo del receptor, como se muestra, por ejemplo, en J Pharm Pharmacol. 2006 Dec;58(12):1629-38. Está dentro del nivel de las personas experimentadas en la técnica usar otras técnicas para medir la expresión y/o actividad de SRBI.

Cualquier cantidad de expresión y/o actividad de SRBI relativa al control se considera "inhibición"; en diversas realizaciones, la inhibición comprende al menos 10%, 20%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de expresión y/o actividad de SRBI en comparación con el control.

5 En una realización, el control comprende poner en contacto una segunda población de células secretoras de insulina puestas en contacto con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1, en ausencia de uno o más compuestos de prueba. Esta realización puede comprender, por ejemplo, poner en contacto la segunda población de células con una formulación, tal como un regulador, que sea similar o idéntica a la formulación en la que se disuelven los compuestos de prueba.

10 Todas las realizaciones del primer aspecto de la invención se pueden usar en este segundo aspecto a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

15 En una realización, el control comprende poner en contacto una segunda población de células secretoras de insulina puestas en contacto con ApoCIII en ausencia de compuestos de prueba. Esta realización puede comprender, por ejemplo, poner en contacto la segunda población de células con una formulación, tal como un regulador, que sea similar o idéntica a la formulación en la que se disuelven los compuestos de prueba.

20 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar o limitar el desarrollo de diabetes, que comprende una combinación de un inhibidor de expresión y/o actividad de SRBI y un inhibidor de la activación de ApoCIII de células β pancreáticas. En diversas realizaciones, el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti SRBI, aptámeros anti SRBI, ARNsi de SRBI, ARNsh de SRBI, oligonucleótidos antisentido de SRBI y moléculas pequeñas que inhiben la expresión y/o actividad de SRBI.

25 Cualquier molécula adecuada que inhiba la expresión o actividad de SRBI puede usarse en los métodos terapéuticos de la invención, incluidos, pero no limitados a, anticuerpos anti SRBI, aptámeros anti SRBI, ARNsi de SRBI, ARNsh de SRBI, oligonucleótidos antisentido de SRBI e inhibidores de SRBI de moléculas pequeñas. Los anticuerpos anti SRBI están disponibles de una variedad de proveedores comerciales, incluidos ThermoFisher, Epitomics y OriGene. En una realización, el inhibidor comprende interferón alfa, que se ha demostrado que inhibe la expresión de SRBI (Gut. 2008 May;57(5):664-71. Epub 2007 Nov 12). En otra realización, el inhibidor de SRBI comprende N-[4-(4-terc-Butoxicarbonilpiperazin-1-il)fenil]-[2-cloro-5-nitrofenil]carboxamida (R-138329), que se ha demostrado que bloquea la actividad del receptor de SRBI (J Pharm Pharmacol. 2006 Dec;58(12): 1629-38). En otra realización, el inhibidor de SRBI comprende 2-Hexil-1-ciclopentanona tiosemicarbazona, 33M20, BLT1, transporte-1 en bloque de lípidos, Número CAS 321673-30-7 (disponible de Sigma Aldrich). En otra realización, el inhibidor de SRBI es uno cualquiera o más de los inhibidores de SRBI divulgados en el documento US 20040171073 y se identifica como MIT 9952-1, 9952-2, 9952-3, 9952-4, 9952-5, 9952-6, 9952-7, 9952-8, 9952-9, 9952-10, 9952-11, 9952-12, 9952-13, 9952-14, 9952-15, 9952-16, 9952-17, 9952-18, 9952-19, 9952-20, 9952-21, 9952-22, 9952-23, 9952-24, 9952-25, 9952-26, 9952-27, 9952-28, 9952-29, 9952-30, 9952-31, 9952-32, 9952-33, 9952-34, 9952-35, 9952-36, 9952-37, 9952-38, 9952-39, 9952-40, 9952-41, 9952-42, 9952-43, 9952-44, 9952-45, 9952-46, 9952-47, 9952-48, 9952-49, 9952-50, 9952-51, 9952-52, 9952-53, 9952-54, 9952-55, 9952-56, 9952-57, 9952-58, 9952-59, 9952-60, 9952-61, 9952-62, 9952-63, 9952-64, 9952-65, 9952-66, 9952-67, 9952-68, 9952-69, 9952-70, 9952-71, 9952-72, 9952-73, 9952-74, 9952-75, 9952-76, 9952-77, 9952-78, 9952-79, 9952-80, 9952-81, 9952-82, 9952-83, 9952-84, 9952-85, 9952-86, 9952-87, 9952-88, 9952-89, 9952-90, 9952-91, 9952-92, 9952-93, 9952-94, 9952-95, 9952-96, 9952-97, 9952-98, 9952-99, 9952-100, 9952-101, 9952-102, 9952-103, 9952-104, 9952-105, 9952-106, 9952-107, 9952-108, 9952-109, 9952-110, 9952-111, 9952-112, 9952-113, 9952-114, 9952-115, 9952-116, 9952-117, 9952-118, 9952-119, 9952-120, 9952-121, 9952-122, 9952-123, 9952-124, 9952-125, 9952-126, 9952-127, 9952-128, 9952-129, 9952-130, 9952-131, 9952-132, 9952-133, 9952-134, 9952-135, 9952-136, 9952-137, 9952-138, 9952-139, 9952-140, 9952-141, 9952-142, 9952-143, 9952-144, 9952-145, 9952-146, 9952-147, 9952-148, 9952-149, 9952-150, 9952-151, 9952-152, 9952-153, 9952-154, 9952-155, 9952-156, 9952-157, 9952-158, 9952-159, 9952-160, 9952-161, 9952-162, 9952-163, 9952-164, 9952-165, 9952-166, 9952-167, 9952-168, 9952-169, 9952-170, 9952-171, 9952-172, 9952-173, 9952-174, 9952-175, 9952-176, 9952-177, 9952-178, 9952-179, 9952-180, 9952-181, 9952-182, 9952-183, 9952-184, 9952-185, 9952-186, 9952-187, 9952-188, 9952-189, 9952-190, 9952-191, 9952-192, 9952-193, 9952-194, 9952-195, 9952-196, 9952-197, 9952-198, 9952-199, 9952-200, 9952-201, 9952-202, 9952-203, 9952-204, 9952-205, 9952-206, 9952-207, 9952-208, 9952-209, 9952-210, 9952-211, 9952-212, 9952-213, 9952-214, 9952-215, 9952-216, 9952-217, 9952-218, 9952-219, 9952-220, 9952-221, 9952-222, 9952-223, 9952-224, 9952-225, 9952-226, 9952-227, 9952-228, 9952-229, 9952-230, 9952-231, 9952-232, 9952-233, 9952-234, 9952-235, 9952-236, 9952-237, 9952-238, 9952-239, 9952-240, 9952-241, 9952-242, 9952-243, 9952-244, 9952-245, 9952-246, 9952-247, 9952-248, 9952-249, 9952-250, 9952-251, 9952-252, 9952-253, 9952-254, 9952-255, 9952-256, 9952-257, 9952-258, 9952-259, 9952-260, 9952-261, 9952-262, 9952-263, 9952-264, 9952-265, 9952-266, 9952-267, 9952-268, 9952-269, 9952-270, 9952-271, 9952-272, 9952-273, 9952-274, 9952-275, 9952-276, 9952-277, 9952-278, 9952-279, 9952-280, 9952-281, 9952-282, 9952-283, 9952-284, 9952-285, 9952-286, 9952-287, 9952-288, 9952-289, 9952-290, 9952-291, 9952-292, 9952-293, 9952-294, 9952-295, 9952-296, 9952-297, 9952-298, 9952-299, 9952-300, 9952-301, 9952-302, 9952-303, 9952-304, 9952-305, 9952-306, 9952-307, 9952-308, 9952-309, 9952-310, 9952-311, 9952-312, 9952-313, 9952-314, 9952-315, 9952-316, 9952-317, 9952-318, 9952-319, 9952-320, 9952-321, 9952-322, 9952-323, 9952-324, 9952-325, 9952-326, 9952-327, 9952-328, 9952-329, 9952-330, 9952-331, 9952-332, 9952-333, 9952-334, 9952-335, 9952-336, 9952-337,

9952-338, 9952-339, 9952-340, 9952-341, y 9952-342, o sales del mismo. En una realización, los compuestos son uno o más de 9952-53, 9952-61, 9952-19, 9952-29, y/o 9952-6, o sales farmacéuticas del mismo.

5 En una realización de este tercer aspecto, los métodos comprenden además administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de PKA y Src quinasa para tratar o limitar el desarrollo de diabetes. Los ejemplos de inhibidores de Src quinasa incluyen análogos de PP1, PP2 y compuestos divulgados en los ejemplos que siguen. Los ejemplos de inhibidores de PKA incluyen adenosina 3',5'-cíclico monofosforotioato-R, H-7, H-8, H-9, H-89 y compuestos divulgados en los ejemplos que siguen.

10 Se divulga que los métodos comprenden además la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de la expresión y/o actividad de la integrina $\beta 1$. En diversas realizaciones, el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de integrina anti $\beta 1$, un aptámero de integrina anti $\beta 1$, ARNsi de integrina $\beta 1$, ARNsh de integrina $\beta 1$ y oligonucleótidos antisentido de integrina $\beta 1$.

15 En una realización adicional de este tercer aspecto, los métodos comprenden además administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de la activación de ApoCIII de células β pancreáticas. Como se usa aquí, un "inhibidor" de la activación de apoCIII incluye compuestos que reducen la transcripción de ADN apoCIII en ARN, compuestos que reducen la traducción del ARN apoCIII en proteína y compuestos que reducen la función de proteína apoCIII. Dicha inhibición puede ser una inhibición completa o una inhibición parcial, de modo que la expresión y/o actividad de la apoCIII se reduce, dando como resultado una capacidad reducida para aumentar la concentración de calcio intracelular. Dichos inhibidores se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos que se enlazan a apoCIII; aptámeros que pueden interferir con la actividad apoCIII; oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la proteína apoCIII, ADN o ARNm; ARN de interferencia pequeños (ARNsi) o ARN de horquilla corta (ARNsh) dirigidos contra la proteína apoCIII, ADN o ARNm y cualquier otro compuesto químico o biológico que pueda interferir con la actividad apoCIII.

20

25

30 En una realización de cada uno de estos aspectos terapéuticos, el método es para tratar diabetes. En esta realización, el sujeto ha sido diagnosticado con diabetes tipo 1 o tipo 2. Tal como se usa aquí, la "diabetes" se caracteriza por la producción insuficiente o nula de insulina por parte del páncreas, que conduce a niveles elevados de azúcar en la sangre.

35 Como se usa aquí, "tratar la diabetes" significa lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad de la diabetes o las complicaciones diabéticas; (b) limitar o prevenir el desarrollo de complicaciones diabéticas; (c) inhibir el empeoramiento de las complicaciones diabéticas o de los síntomas característicos de la diabetes; (d) limitar o prevenir la recurrencia de complicaciones diabéticas o de los síntomas característicos de la diabetes; (e) limitar o prevenir la recurrencia de complicaciones diabéticas o de los síntomas característicos de la diabetes en pacientes que previamente eran sintomáticos.

40 Los síntomas característicos de la diabetes incluyen, pero no se limitan a, niveles elevados de glucosa en sangre, disminución de la producción de insulina, resistencia a la insulina, proteinuria y disminución del aclaramiento glomerular. Las complicaciones diabéticas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, complicaciones en los nervios (como la neuropatía diabética) y complicaciones asociadas con la disregulación de células del músculo liso (que incluyen, pero no se limitan a, disfunción eréctil, disfunción de la vejiga y complicaciones vasculares que incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, apoplejía y enfermedad vascular periférica).

45

50 En otra realización, el método es para limitar el desarrollo de diabetes. En este aspecto, el sujeto está en riesgo de diabetes tipo 1 o tipo 2, y un beneficio es limitar el desarrollo de diabetes y/o complicaciones diabéticas. Cualquier sujeto con riesgo de desarrollar diabetes puede ser tratado, incluidos, pero no limitados a, los sujetos con uno o más de síndrome metabólico, factores de riesgo genéticos conocidos para la diabetes, antecedentes familiares de diabetes y obesidad.

55 En una realización adicional, los métodos para tratar o limitar el desarrollo de diabetes y/o complicaciones diabéticas comprenden además tratar a aquellos individuos que se han identificado como que sobreexpresan apoCIII en comparación con el control. Los aumentos en la expresión de apoCIII preceden al desarrollo de complicaciones diabéticas, y por lo tanto esta realización permite la detección temprana de pacientes adecuados para el tratamiento usando los métodos de la invención.

60 Como se usa aquí, "sobreexpresión" es cualquier cantidad de expresión de apoCIII por encima del control. Se puede usar cualquier control adecuado, incluyendo niveles de expresión de apoCIII de un sujeto que se sabe que no padece diabetes, o niveles de expresión estandarizados previamente determinados de apoCIII a partir de una población de muestras de pacientes similares. Cualquier cantidad de expresión de apoCIII aumentada en relación con el control se considera "sobreexpresión"; en diversas realizaciones, la sobreexpresión comprende al menos 10%, 20%, 50%, 100%, 200%, o mayor expresión de apoCIII aumentada en comparación con el control. En una realización preferida, la expresión de apoCIII se detecta en muestras de sangre o suero. En una realización para evaluar los niveles de apoCIII en sueros, la albúmina se elimina de las muestras de suero usando técnicas estándar,

65

tal como mediante el uso de Montage Albumin Deplete Kit (Millipore) o AlbuSorb™ (Biotech Support Group). Las muestras de suero recogidas se pueden liofilizar durante la noche y se pueden ejecutar en sep-Pak C18. Las proteínas eluidas pueden liofilizarse y luego disolverse en 100 µL de TFA al 0,1% y ejecutar en una columna ACE C18 de 10x0,21 cm 20-60%, y el área bajo la curva, donde se eluye el apoCIII, se evalúa. La ApoCIII puede identificarse usando cualquier técnica adecuada, que incluye, pero no se limita a la espectrometría de masas MALDI.

Como se usa aquí, el término "sujeto" o "paciente" significa cualquier sujeto para el que se desea terapia, incluidos humanos, ganado, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, insectos, caballos, pollos, etc. Más preferiblemente, el sujeto es humano.

El agente terapéutico puede administrarse mediante cualquier ruta adecuada, que incluye, pero no se limita a, oral, tópico, parenteral, intranasal, pulmonar o rectal en formulaciones de unidades de dosificación que contienen portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. El término parenteral como se usa aquí incluye técnicas de inyección o infusión percutánea, subcutánea, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular o intratecal y similares. Además, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El agente terapéutico puede estar presente en asociación con uno o más portadores y/o diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos y, si se desea, otros ingredientes activos. El agente terapéutico puede estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como tabletas, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires.

El agente terapéutico se puede combinar con un portador farmacéuticamente aceptable. Los ácidos adecuados que son capaces de formar tales sales incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociánico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares; y ácidos orgánicos como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido cinámico, ácido naftaleno sulfónico, ácido sulfanílico y similares. Las bases adecuadas capaces de formar tales sales incluyen bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y similares; y bases orgánicas tales como mono, di y tri alquilo y arilaminas (por ejemplo, trietilamina, diisopropilamina, metilamina, dimetilamina y similares) y aminas de etanol opcionalmente sustituidas (por ejemplo, etanolamina, dietanolamina y similares).

El intervalo de dosificación depende de la elección del compuesto, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la condición del sujeto y el juicio del profesional que lo atiende. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera mayores dosificaciones que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para la optimización, como se entiende bien en la técnica.

Ejemplo 1. La apolipoproteína CIII hiperactiva los canales de Ca_v1 de células β a través de la coactivación dependiente de integrinas SRBI/ $\beta1$ de PKA y Src

Sumario

La apolipoproteína CIII (ApoCIII) no solo sirve como un inhibidor de la hidrólisis de triglicéridos, sino que también participa en eventos patológicos relacionados con la diabetes, como la hiperactivación de los canales de Ca^{2+} (Ca_v) controlados por voltaje en la célula β pancreática. Sin embargo, no se sabe nada sobre los mecanismos moleculares por los cuales ApoCIII hiperactiva los canales de Ca_v de células β . Ahora demostramos que ApoCIII aumentó la probabilidad abierta y densidad del canal de Ca_v1 . Las corrientes de Ca^{2+} de célula entera mejoradas por ApoCIII y el bloqueador de canales de Ca_v1 nimodipina anuló por completo esta mejora. El efecto de ApoCIII no fue influenciado por la inhibición individual de PKA, PKC o Src. Sin embargo, la inhibición combinada de PKA, PKC y Src contrarrestaron el efecto de ApoCIII, resultados similares obtenidos por coinhibición de PKA y Src. Además, la anulación de la integrina $\beta1$ o del receptor de secuestrante de clase B tipo I (SRBI) impidió que ApoCIII hiperactivara los canales de Ca_v de células β . Estos datos revelan que la ApoCIII hiperactiva los canales de Ca_v1 de células β a través de la coactivación dependiente de integrinas SRBI/ $\beta1$ de PKA y Src.

Resultados

La apolipoproteína CIII aumenta la densidad y conductividad del canal Ca_v1 en la célula β . Nuestro trabajo anterior revela que la incubación con ApoCIII mejora significativamente las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en la célula β de islotes de ratón⁵. Para aclarar qué tipo de canales Ca_v de células β y si la densidad o conductividad se vio afectada, analizamos las corrientes unitarias de Ca_v1 , caracterizadas por una gran conductancia unitaria de Ba^{2+} con aberturas de larga duración, en células β de islote de ratón (figura 1a) y células RINm5F (figura 1c), después de la incubación con ApoCIII. En experimentos con células β de islotes de ratón, observamos más canales de Ca_v1 , reflejados por más capas de corrientes de Ba^{2+} unitarias, en parches de membrana plasmática de células tratadas con ApoCIII que en los de células de control (figura 1a). El número promedio, la probabilidad de apertura y el tiempo abierto medio de los canales de Ca_v1 unitarios en células tratadas con ApoCIII (n= 32) fueron significativamente mayores que en las células expuestas al vehículo de control (n= 33) (figura 1b). El tiempo de cierre medio de los

canales de Ca_v1 unitarios registrados en parches de células incubadas con ApoCIII fue significativamente más corto que en los parches de control (figura 1b). Del mismo modo, se produjeron efectos similares de ApoCIII en los canales de Ca_v1 en las células RINm5F que secretan insulina. Los parches de membrana plasmática de células incubadas con ApoCIII acomodaron más canales de Ca_v1 en comparación con los de las células tratadas con vehículo (figura 1c). Los canales Ca_v1 en el primero se abrieron con mayor frecuencia que los del último (figura 1c). La incubación con ApoCIII (n= 35) aumentó significativamente el número de canales, elevó la probabilidad abierta, prolongó el tiempo abierto medio y redujo el tiempo cerrado medio de los canales de Ca_v1 en comparación con la incubación con solución de vehículo (n= 34) (figura 1d). Obviamente, los datos revelan que la ApoCIII aumentó la densidad y la conductividad de los canales de Ca_v1 de las células β .

La ablación farmacológica de los canales de Ca_v1 previene la hiperactivación inducida por apolipoproteína CIII de los canales de Ca_v de células β . La verificación de los efectos de ApoCIII en los canales de Ca_v1 por análisis de un solo canal no significa necesariamente que ApoCIII solo ataque los canales de Ca_v1 . Para examinar si los efectos también ocurren en otros tipos de canales de Ca_v , analizamos las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en células RINm5F después de la incubación con ApoCIII en ausencia y presencia del bloqueador de canales de Ca_v1 nimodipina. Las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en células incubadas con ApoCIII fueron mayores que las de las células tratadas con solución de vehículo (figura 2a). Las densidades de corriente de Ca^{2+} de células enteras observadas en el intervalo de voltaje de 10 a 30 mV en el grupo ApoCIII fueron significativamente más altas que las del grupo control (figura 2b). En contraste marcado, las corrientes de Ca^{2+} de células enteras fueron similares entre las células de control y las células incubadas con ApoCIII en presencia de nimodipina (figura 2c). No hubo diferencias significativas en la densidad de corriente de Ca^{2+} de células enteras entre los dos tratamientos (figura 2d). Los datos confirman que ApoCIII afecta únicamente a los canales de Ca_v1 de las células β .

La apolipoproteína CIII hiperactiva los canales de Ca_v de células β a través de la coactivación de PKA y Src quinasa. El aumento en la probabilidad de apertura de los canales Ca_v1 de las células β por ApoCIII y el papel mediador de las proteínas quinasas en la señalización ApoCIII sugieren que ApoCIII puede señalizar corriente arriba de algunas proteínas quinasas para hiperactivar los canales Ca_v de las células β ^{16,19-22}. Por lo tanto, exploramos la participación de PKA, PKC y Src quinasa en la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v de células β .

Primero, se examinó el efecto del inhibidor de PKA H-89 sobre la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v de células β en células RINm5F. Las corrientes de Ca^{2+} de células enteras registradas en las células de control fueron mayores que las de las células tratadas con ApoCIII, mientras que las corrientes de Ca^{2+} de las células enteras se registraron en las células incubadas con ApoCIII más H-89 de tamaño intermedio (figura 3a). Las densidades promedio de corriente de Ca^{2+} medidas en células tratadas con ApoCIII (círculos rellenos, n= 36) fueron significativamente más altas que aquellas en células de control tratadas con vehículo (círculos abiertos, n= 37) a voltajes que varían de 10 a 50 mV (figura 3b). Sin embargo, las células después del cotratamiento de ApoCIII y H-89 (triángulos rellenos, n= 36) no diferían significativamente de las células tratadas con ApoCIII o las células de control en términos de densidad de corriente de Ca^{2+} (figura 3b). Además, el tratamiento con H-89 no influyó significativamente en las densidades de corriente de Ca^{2+} bajo condiciones basales, es decir, en ausencia de ApoCIII (figura 8 a, b). Los resultados indican que la inhibición de PKA redujo marginalmente la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v de células β .

En segundo lugar, probamos el efecto del inhibidor de PKC calpofostin C (CalpC) sobre la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v de células β en células RINm5F. Observamos que las células incubadas con células ApoCIII y células cotratadas con ApoCIII/CalpC mostraron corrientes de Ca^{2+} de células enteras similares, que eran mayores que las adquiridas en células tratadas con vehículo (figura 3c). Las densidades de corriente de Ca^{2+} medias en células tratadas con ApoCIII (círculos rellenos, n= 33) en el intervalo de voltaje 10-50 mV y células expuestas a ApoCIII/CalpC (triángulos rellenos, n= 33) en un intervalo de voltaje de 20 a 50 mV aumentó significativamente en comparación con células de control tratadas con vehículo (círculos abiertos, n= 33) (figura 3d). No hay diferencia entre las células tratadas con ApoCIII y las células cotratadas con ApoCIII/CalpC con respecto a la densidad de corriente de Ca^{2+} (figura 3d). Además, las células expuestas al vehículo de control fueron similares a las células tratadas con CalpC en términos de densidad de corriente de Ca^{2+} (figura 8c, d). Estos datos demuestran que la inhibición de PKC no afecta la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v de células β .

En tercer lugar, evaluamos el efecto del inhibidor de Src quinasa PP2 sobre la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v de células β en células RINm5F. Encontramos corrientes de Ca^{2+} de células enteras más pequeñas y más grandes en las células después de la incubación con la solución del vehículo y las células incubadas con ApoCIII, respectivamente (figura 3e). Las células expuestas a ApoCIII y PP2 cayeron entre las células control tratadas con vehículo y las células tratadas con ApoCIII con respecto a las corrientes de Ca^{2+} de células enteras (figura 3e). Las densidades de corriente de Ca^{2+} de células enteras cuantificadas en células tratadas con ApoCIII (círculos rellenos, n= 40) en el intervalo de voltaje 10-50 mV fueron significativamente elevadas en comparación con las determinadas en células control con vehículo (círculos abiertos, n= 40) (figura 3f). Las células sometidas a cotratamiento de ApoCIII y PP2 (triángulos rellenos, n= 40) mostraron corrientes de Ca^{2+} significativamente mayores en el intervalo de voltaje de 20-40 mV en comparación con las células de control tratadas con vehículo (círculos abiertos, n= 40). Sin embargo, la diferencia en la densidad de corriente de Ca^{2+} entre células cotratadas con ApoCIII/PP2 y células incubadas con solución de vehículo es menos prominente que la existente

entre células tratadas con ApoCIII y células de control tratadas con vehículo (figura 3f). Además, las células tratadas con vehículo (círculos abiertos, n= 20) y las células incubadas con PP2 (círculos rellenos, n= 19) exhibieron densidades de corriente de Ca^{2+} similares (figura 8e, f). Los resultados sugieren que la inhibición de Src quinasa tiene una tendencia a disminuir la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β .

Los efectos marginales y nulos de los inhibidores de PKA, PKC o Src quinasa sobre la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β nos hicieron preguntarnos qué sucede si se aplica una inhibición más compleja de todas estas quinasas. Para abordar esta pregunta, se caracterizó el efecto del cóctel inhibitor de proteína quinasa H-89, CalpC y PP2 sobre la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β en células RINm5F. Corrientes más grandes de Ca^{2+} de células enteras aparecieron en células tratadas con ApoCIII, mientras que corrientes más pequeñas de Ca^{2+} de células enteras se produjeron en células de control tratadas con vehículo y células tratadas con ApoCIII en presencia de H-89, CalpC y PP2 (figura 4a). El tratamiento con ApoCIII (círculos rellenos, n= 35) aumentó significativamente las densidades de corriente de Ca^{2+} en el intervalo de voltaje 10-50 mV en comparación con las células control tratadas con vehículo (círculos abiertos, n= 35) y el tratamiento con ApoCIII junto con H-89, CalpC y PP2 (triángulos rellenos, n= 34). El perfil de las densidades de corriente de Ca^{2+} en células expuestas a ApoCIII en presencia de H-89, CalpC y PP2 se parecía al de las células de control tratadas con vehículo (figura 4b). Además, el tratamiento de células de control con el cóctel inhibitor de proteína quinasa H-89, CalpC y PP2 no tuvo un efecto significativo sobre las corrientes de Ca^{2+} de células enteras bajo condiciones basales, es decir, en ausencia de ApoCIII (figura 9 a, b). Los resultados demuestran que la inhibición combinada de PKA, PKC y Src quinasa suprime eficazmente la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β .

El efecto marginal de los inhibidores de PKA o Src quinasa solos en las corrientes de Ca^{2+} de células enteras inevitablemente planteó la pregunta si la cohibición de PKA y Src quinasa es suficiente para evitar la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales Cav de las células β . Respondimos la pregunta mediante el análisis de las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en células RINm5F después del cotratamiento con H-89 y PP2. Observamos que las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en las células tratadas con ApoCIII eran más grandes que las de las células de control o las células sometidas a tratamiento con ApoCIII en presencia de H-89 y PP2 (figura 4c). Significativamente mayores densidades de corrientes de Ca^{2+} de células enteras aparecieron en el grupo ApoCIII (círculos rellenos, n= 26) en comparación con el grupo de control (círculos abiertos, n= 26) o el grupo sometido a incubación con ApoCIII en presencia de H-89 y PP2 (triángulos rellenos, n= 27) (figura 4d). Además, las corrientes de Ca^{2+} de las células enteras en las células de control se parecían a las observadas en las células tratadas con H-89 y PP2 (figura 9c, d). Estos datos revelan que ApoCIII mejora las corrientes de Ca^{2+} de las células enteras a través de la coactivación de PKA y Src quinasa.

La apolipoproteína CIII no influye en la expresión del canal Ca_v1 de las células β . La incubación durante la noche con ApoCIII puede influir en la expresión del canal Ca_v1 de las células β . Para probar esta posibilidad, analizamos la expresión del canal Ca_v1 de las células β en células RINm5F después de la incubación con ApoCIII. Encontramos que los anticuerpos anti $Ca_v1,2$, anti $Ca_v1,3$ y anti GAPDH detectaron claras bandas inmunorreactivas $Ca_v1,2$, $Ca_v1,3$ y GAPDH, respectivamente. Las muestras tratadas con control y ApoCIII dieron intensidades similares de inmunorreactividades de $Ca_v1,2$, $Ca_v1,3$ y GAPDH (figura 5a). La figura 5b muestra que no hubo diferencias significativas en la abundancia relativa de las subunidades $Ca_v1,2$ (columna sombreada, n= 6) y $Ca_v1,3$ (columna rellena, n= 6) en homogeneizados celulares RINm5F sometidos a incubación con ApoCIII en comparación con incubación con vehículo (columna abierta, n= 6) ($P>0,05$). Los datos revelan que la incubación de ApoCIII no alteró la expresión del canal Ca_v1 de las células β al nivel de proteína.

La apolipoproteína CIII sobrerregula los canales de Ca_v de las células β a través de la integrina $\beta 1$. Se ha verificado que la integrina $\beta 1$ sirve como un mediador entre ApoCIII y un cierto número de proteína quinasas que incluyen PKA y quinasa Src^{16,19-22}. Esto junto con nuestros resultados que ApoCIII hiperactivó los canales de Cav de células β a través de la coactivación de PKA y Src quinasa aumentan la posibilidad de que la integrina $\beta 1$ sea mediadora de la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β . Investigamos esta posibilidad implementando interferencia de ARN en combinación con análisis de corriente de Ca^{2+} de células enteras en células RINm5F. Resultó que la transfección con dos ARNsi de integrina $\beta 1$ disminuyó significativamente la expresión de integrina $\beta 1$ a nivel de proteína (figura 6a,b). De manera importante, la pretransfección de ARNsi de integrina $\beta 1$ prevenía eficazmente la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β (figura 6c,d). Las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en células pretransfectadas con ARNsi de integrina $\beta 1$ incubadas con ApoCIII (integrina $\beta 1$ ARNsi/ApoCIII) fueron significativamente más pequeñas que las de las células pretransfectadas con ARNsi de control negativo expuestas a ApoCIII (NC ARNsi/apoCIII), pero similares a las de tres conjuntos de células de control (figura 6c). Estas células de control se sometieron a simulación (NO ARNsi/control), ARNsi de control negativo (NC ARNsi/control) y pretransfección ARNsi integrina $\beta 1$ (integrina $\beta 1$ ARNsi/control), respectivamente, seguido de incubación de vehículo control (figura 6c). Se observó una densidad de corriente de Ca^{2+} significativamente reducida en las células después de la integrina $\beta 1$ ARNsi/ApoCIII (n= 29) en comparación con las de NC ARNsi/apoCIII (triángulos rellenos, n= 28) (figura 6d). El primero mostraba una densidad de corriente de Ca^{2+} similar, pero el último exhibía una mayor densidad de corriente de Ca^{2+} en comparación con aquellos sometidos a NO ARNsi/control (n= 29), NC ARNsi/Control (n= 28) o integrina $\beta 1$ ARNsi/Control (n= 29) (figura 6d). Tomados en

conjunto, los resultados demuestran que ApoCIII depende críticamente en la integrina $\beta 1$ para hiperactivar los canales de Ca_v de células β .

La apolipoproteína CIII hiperactiva los canales de Ca_v de células β a través de SRBI. Estudios previos han demostrado que no hay interacción directa de ApoCIII con la integrina $\beta 1$ ^{16,18}. En la búsqueda de un puente molecular entre ApoCIII y la integrina $\beta 1$, centramos nuestro interés en SRBI ya que este receptor se asocia físicamente con ApoCIII e interactúa con la integrina $\beta 1$ ^{10,23}. Combinamos silenciamiento génico mediado por ARNsi y análisis de corriente de Ca^{2+} de células enteras para examinar si SRBI puede servir como un puente molecular entre ApoCIII y la integrina $\beta 1$ en hiperactivar canales de Ca_v1 de células β . Como se muestra en la figura 7a,b,c,d, la transfección de ARNsi de SRBI redujo significativamente el SRBI tanto a nivel de ARNm como de proteína en células RINm5F. Es importante observar que dicha subregulación suprimió suficientemente la potenciación de las corrientes de Ca^{2+} de células enteras por ApoCIII (figura 7e,f). La figura 7e muestra que las células SRBI pretransfectadas con ARNsi incubadas con ApoCIII (SRBI ARNsi/ApoCIII) exhibieron corrientes de Ca^{2+} de células enteras más pequeñas en comparación con las pretransfectadas con ARNsi de control negativo seguido de exposición a ApoCIII (NC ARNsi/ApoCIII). Las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en células sometidas a SRBI ARNsi/ApoCIII no difirieron de las células de control tratadas con vehículo sometidas a simulación (NO ARNsi/Control), ARNsi control negativo (NC ARNsi/Control) y pretransfección ARNsi SRBI (SRBI ARNsi/Control), respectivamente (figura 7e). Por el contrario, las corrientes de Ca^{2+} de células enteras en células tratadas NC ARNsi/ApoCIII fueron más grandes que las visualizadas en las células de control antes mencionadas (figura 7e). La densidad de corriente de Ca^{2+} en el grupo SRBI ARNsi/ApoCIII ($n=30$) disminuyó significativamente en comparación con la del grupo NC ARNsi/ApoCIII (triángulos rellenos, $n=30$) (figura 7f). El primero es similar a, pero el último es significativamente más grande que en NO ARNsi/control ($n=30$), NC ARNsi/control ($n=29$) o SRBI ARNsi/control ($n=29$) (figura 7f). Los datos verifican que ApoCIII emplea SRBI como un transportador indispensable para la señalización de esta apolipoproteína a los canales de Ca_v de células β .

Discusión

La conductividad bruta de los canales de Ca_v depende de la densidad y la actividad de los canales funcionales en la membrana plasmática de la célula. La potenciación de las corrientes de Ca^{2+} de células enteras por el suero diabético tipo 1 y su factor ApoCIII puede ser el resultado de la densidad enriquecida y/o el aumento de la conductividad de los canales de Ca_v funcionales en la membrana plasmática de las células β ^{4,5}. Sin embargo, todos los estudios^{1,2,5,24} excepto uno⁴ han examinado hasta el momento el efecto del suero diabético de tipo 1 en canales de Ca_v solo a nivel de células enteras. En el estudio de Juntti-Berggren et al., el aumento de la actividad del canal Ca_v de células β por el suero diabético tipo 1 se caracterizó tanto a nivel de canal sencillo como de células enteras⁴. Sin embargo, este trabajo no analizó si el suero diabético tipo 1 podría alterar la densidad de los canales de Ca_v funcionales en la membrana plasmática de las células β ⁴. Aunque hemos revelado previamente que ApoCIII sirve como un factor sérico diabético de tipo 1, que hiperactiva los canales de Ca_v de células β , solo se realizó un análisis de pinzamiento de parche de células enteras⁵. Sin lugar a duda, se debe implementar un examen detallado de las propiedades biofísicas de canales de Ca_v sencillos en células tratadas con ApoCIII para diseccionar mecánicamente la hiperactivación de los canales de Ca_v de células β por esta apolipoproteína. Curiosamente, los registros de un canal sencillo unido a la célula en el presente trabajo revelan que la incubación con ApoCIII no solo aumenta la actividad de canales individuales de Ca_v1 de células β , sino que también enriquece el número de canales Ca_v1 funcionales en el área registrada de la membrana plasmática de células β . El aumento de la actividad del canal de Ca_v1 sencillo se visualiza como una mayor probabilidad de apertura atribuida a la prolongación del tiempo abierto medio y a la reducción del tiempo cerrado medio. El enriquecimiento del número de canales de Ca_v1 funcionales se verifica por la aparición de más niveles de conductancia de canal de Ca_v1 sencillo.

La célula RINm5F secretora de insulina está equipada con canales de Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 ^{1,2}. Investigamos si ApoCIII hiperactiva selectivamente los canales de Ca_v1 o impacta de forma indiscriminada estos tres tipos de canales de Ca_v en esta célula secretora de insulina. Resultó que la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v de células β ya no tiene lugar después de la ablación farmacológica de los canales de Ca_v1 . Esto significa que la ApoCIII hiperactiva selectivamente los canales de Ca_v1 , que son los principales canales de Ca_v que juegan un papel predominante sobre otros tipos de canales de Ca_v en la fisiología y fisiopatología de las células β . La hiperactivación selectiva de los canales de Ca_v1 de las células β por ApoCIII explica el papel fisiopatológico de esta apolipoproteína en la muerte de las células β dependientes de Ca^{2+} ^{1,2,5}.

Una serie de proteínas quinasas, como PKA y PKC, pueden fosforilar de forma efectiva los canales de Ca_v , lo que resulta en un aumento de la densidad y la actividad del canal abierto debido a los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación en estos canales^{3,25,26}. Los aumentos en el número y la probabilidad de apertura de los canales de Ca_v funcionales por ApoCIII podrían estar mediados por proteína quinasas. Se ha demostrado que ApoCIII activa la PKC a través de la integrina $\beta 1$ en células monocíticas¹⁶. Además, la activación de la integrina $\beta 1$ también puede sobreregular los canales de Ca_v1 en neuronas, miocitos ventriculares y células de músculo liso vascular a través de la estimulación de PKA, PKC y Src quinasa¹⁹⁻²². Todos estos componentes están presentes en las células β ^{2, 27-30} y pueden sugerir que ApoCIII emplea la cascada de la integrina $\beta 1$ PKA/PKC/Src quinasa para hiperactivar los canales de Ca_v de las células β . De hecho, el presente trabajo muestra que la inhibición compleja de PKA, PKC y Src quinasa anula de manera efectiva la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v de

células β y que la cohibición de PKA y Src quinasa es suficiente para este efecto. Sin embargo, la inhibición individual de PKA, PKC o Src quinasa solo produjo, en el mejor de los casos, un efecto marginal sobre la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β . Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que la ApoCIII depende de las rutas paralelas de PKA y Src para sobreregular los canales de Cav de las células β .

La aparición de hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β requiere una incubación durante la noche. Por lo tanto, el efecto podría explicarse por un aumento en la expresión del canal de Cav. Por lo tanto, cuantificamos las inmunorreactividades de las subunidades $Ca_v1,2$ y $Ca_v1,3$ en células RINm5F después de la incubación durante la noche con ApoCIII. Sin embargo, la incubación no tuvo influencia en la expresión del canal de Ca_v1 de las células β . Por lo tanto, excluimos la posibilidad de que ApoCIII eleve la expresión del canal Ca_v1 de las células β .

La integrina $\beta 1$ del receptor transmembrana está asociada no covalentemente con otras integrinas para formar un conjunto de heterodímeros. Reconocen una gran cantidad de proteínas solubles y enlazadas a la superficie para mediar las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular y célula-patógeno³¹. La integrina $\beta 1$ se encuentra corriente abajo de ApoCIII y corriente arriba de PKA/PKC/Src quinasa en algunos tipos de células^{16,19-22}. Esto nos hizo investigar si la vía de la ApoCIII-integrina $\beta 1$ -PKA/PKC/Src quinasa opera en la célula β como el mecanismo mediante el cual esta apolipoproteína hiperactiva los canales de Ca_v1 . Curiosamente, la anulación de la integrina $\beta 1$ no influye en la actividad del canal de Cav de las células β en ausencia de ApoCIII, pero anula significativamente la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de las células β . Los resultados verifican claramente que la integrina $\beta 1$ desempeña un papel significativo en la mediación de la acción de ApoCIII sobre la actividad del canal Ca_v1 de la célula β .

Aunque la integrina $\beta 1$ puede acoplar ApoCIII a los efectores PKA, PKC y Src quinasa corriente abajo correspondientes, es poco probable que la integrina $\beta 1$ interactúe directamente con esta apolipoproteína^{16,19-22}. En el presente estudio demostramos que SRBI sirve como un puente molecular entre ApoCIII y la integrina $\beta 1$, ya que el silenciamiento del gen SRBI anula de manera eficiente la hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Cav de células β . Esto genera una imagen completa de la nueva cascada de hiperactivación del canal de Cav de células β , a saber, la ApoCIII-SRBI-pl integrina-PKA/Src.

La hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v1 de células β observada en el presente trabajo se produjo cuando las células se despolarizaron a potenciales más positivos que +10 mV. El efecto de ApoCIII se detectó utilizando el modo de registro de pinzamiento de parche, perforado de células enteras bajo condiciones experimentales donde se añadió Ca^{2+} 10 mM en solución extracelular para obtener corrientes óptimas de Ca^{2+} . Tal alta concentración de Ca^{2+} extracelular (10 mM) en comparación con la concentración fisiológica de Ca^{2+} extracelular (2,5 mM) puede cambiar significativamente la curva I-V a potenciales más positivos. El modo de registro de pinzamiento de parche, perforado de célula entera tiene un efecto similar. Por lo tanto, bajo condiciones in vivo, es probable que ApoCIII afecte a las corrientes de Ca_v1 de las células β dentro del intervalo de potencial de membrana fisiológica.

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que la ApoCIII hiperactiva selectivamente los canales de Ca_v1 de las células β a través de las rutas paralelas de PKA y Src quinasa en un modo dependiente de la SRBI/integrina $\beta 1$. La hiperactivación inducida por ApoCIII de los canales de Ca_v1 de las células β se caracteriza por la densidad enriquecida y la actividad aumentada de los canales de Ca_v1 funcionales en la membrana plasmática de las células β . Esta nueva vía de transducción de señales puede servir como una plataforma innovadora de descubrimiento de fármacos para la prevención de la muerte de células β dependientes de Ca^{2+} en asociación con la diabetes.

Métodos

Cultivo celular y tratamientos. Los islotes de Langerhans se aislaron de ratones adultos machos y hembras y se dispersaron en células β sencillas. Las células RINm5F a aproximadamente 70% de confluencia fueron tripsinizadas. La suspensión resultante de células se sembró en placas de Petri o placas de 12 pozos. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM y 100 U/100 μ g/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se mantuvieron a 37 °C en un incubador humidificado, con CO_2 al 5 %. Se cultivaron durante la noche y luego se sometieron a transfección de ARNs. Para el análisis de pinzamiento de parche, las células se sometieron a un tratamiento durante la noche con ApoCIII, el inhibidor de PKA H-89 (Calbiochem, La Jolla, CA), el inhibidor de PKC calfostin C (Calbiochem), el inhibidor de Src quinasa PP2 (Calbiochem) y el bloqueador de canal de Ca_v1 nimodipina (Calbiochem) en medio RPMI a concentraciones finales de 20 (μ g/ml, 0,5 μ M, 0,1 μ M, 0,1 μ M y 5 μ M, respectivamente). La ApoCIII se disolvió en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% para hacer una solución madre de 1 mg/ml, mientras que H-89, calfostin C, PP2 y nimodipina se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) para formar soluciones madre de 5 mM, 1 mM, 1 mM y 10 mM, respectivamente. TFA al 0,002% y/o DMSO al 0,03% fueron utilizados como controles de vehículos.

Diseño y transfección de ARNs. Dos pares de dúplex ARNs de 21 mer que se dirigen a la integrina $\beta 1$ de rata (integrina $\beta 1$ ARNs #1, ID127971 e integrina $\beta 1$ ARNs #2, ID127972) y SRBI (ID128929) se diseñaron y sintetizaron químicamente por Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX). Sus secuencias fueron sometidas a búsqueda BLAST

para asegurar su especificidad. ARNsi Silencer® Select Control Negativo (4390843), no dirigido a ningún producto génico, y ARNsi Silencer® Select GAPDH Control Positivo (4390849), silenciando eficazmente GAPDH en células humanas, de ratón y de rata, se compraron de Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX). Las células RINm5F se transfectoron de forma inversa con Lipofectamine™ RNAiMAX. Brevemente, ARNsi control negativo, integrina β1 ARNsi #1, integrina β1 ARNsi #2 o ARNsi de SRBI se mezcló con Lipofectamine™ RNAiMAX seguido de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron las células a las mezclas de ARNsi/Lipofectamine™ RNAiMAX seguido de agitación suave y se mantuvieron a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 % humidificada. Después de 72 horas, las células transfectadas se cultivaron hasta aproximadamente el 70% de confluencia y se sometieron a ensayo de inmunoprecipitación o a diferentes tratamientos.

RT-TCR semicuantitativo. Se aisló el ARN total de las células RINm5F usando el RNeasy Micro Kit según lo recomendado por el fabricante (Qiagen, Valencia, CA). Los pares de cebadores RT-PCR fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El par de cebadores SRBI consistió en el cebador directo 5'-CAAGAAGCCAAGCTGTAGGG-3'(SEQ ID NO:11) y el cebador inverso 5'-CCCAACAGGCTCTACTCAGC-3' (SEQ ID NO:12). El par de cebadores GAPDH comprendía el cebador directo 5'-TAGACAAGATGGTGAAGG-3'(SEQ ID NO:13) y el cebador inverso 5'-TCCTTGAGGCCATGTAG-3' (SEQ ID NO:14). Se transcribieron de forma inversa 500 ng de ARN total con SuperScript® II Transcriptasa inversa (Invitrogen) y cebador Oligo(dT)12-18 (Invitrogen). La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo usando la ADN polimerasa Platinum® Taq (Invitrogen). Se sometió por 90 segundos a 94 °C para desnaturalizar completamente plantillas y activar la ADN polimerasa Taq, seguido de 29 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, recocido a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos y terminando con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR amplificados se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

SDS-PAGE y análisis de inmunoprecipitación. Las células RINm5F después de diferentes tratamientos se sometieron a lisis en un regulador de lisis (pH 7,5) que consistía en HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 10%, tritón X-100 al 1%, PMSF 1 mM y un cóctel inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El lisado se centrifugó a 800 X g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar restos celulares y núcleos. La concentración de proteína de las muestras resultantes se determinó con reactivo de ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Las muestras se desnaturalizaron por calentamiento a 96 °C durante 3 minutos en regulador de muestra SDS y luego se sometieron a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y análisis de inmunoprecipitación. Brevemente, se separaron 50, 90 o 180 µg de proteínas en geles discontinuos que consisten en un gel de apilamiento de acrilamida al 4% (pH 6,8) y un gel separador de acrilamida al 8% (pH 8,8). A continuación, las proteínas separadas se electroprecipitaron a una membrana hidrófoba de difluoruro de polivinilideno (Hybond-P, GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Las precipitaciones fueron bloqueadas mediante incubación durante 1 hora con leche desnatada en polvo al 5% en un regulador de lavado, que contenía tris(hidroximetil)aminometano 50 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05% (pH 7,5). Luego se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad a la integrina β1 (1:500; Millipore, Billerica, MA), SRBI (1:2.500; Novus, Cambridge, Reino Unido), Ca_v1,2 (1:200) y Ca_v1,3 (1:200), respectivamente, y durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal de ratón a gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:4.000; Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX), respectivamente. Después de enjuagar con el regulador de lavado, las precipitaciones se incubaron con los anticuerpos secundarios (ya sea anti IgG de conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante o anti IgG de ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante; 1:50.000; Bio-Rad, Hercules, CA) a temperatura ambiente por 45 minutos. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron con el sistema de detección ECL plus de inmunoprecipitación Western (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

Electrofisiología. Las células de los islotes de ratón y las células RINm5F después de diferentes tratamientos se sometieron a mediciones de pinzamiento de parche de canal sencillo y de célula entera. Se emplearon configuraciones de pinzamiento de parche de célula entera unido a célula y perforado. Los electrodos estaban hechos de capilares de vidrio de borosilicato, pulidos al fuego y recubiertos con Sylgard cerca de sus puntas. Algunos de ellos se llenaron con una solución que contenía (en mM) 110 BaCh, 10 TEA-Cl y 5 HEPES (pH 7,4 con Ba(OH)₂) para mediciones de canal sencillo. Otros se llenaron con una solución compuesta por (en mM) Cs₂SO₄ 76, MgCl₂ 1, KCl 10, NaCl 10 y HEPES 5 (pH 7,35 con CsOH), así como también anfotericina B (0,24 mg/ml) para registros de corriente de células enteras. La resistencia del electrodo oscilaba entre 4 y 6 MΩ cuando se llenaban con soluciones de electrodo y se sumergían en soluciones de baño. El potencial de compensación del electrodo se corrigió en soluciones de lavado antes de la formación de gigasello. Se realizaron registros de canal sencillo con células lavadas en una solución de registro externa despolarizante, que contenía (en mM) KCl 125, KOH 30, EGTA 10, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1 y HEPES-KOH 5 (pH 7,15). Esta solución se usó para llevar el potencial intracelular a 0 mV. Para las mediciones de corriente de células enteras perforadas, las células se lavaron en una solución que contenía (en mM) NaCl 138, KCl 5,6, MgCl₂ 1,2, CaCl₂ 10, HEPES 5 (pH 7,4). Se registraron corrientes de canal sencillo y de células enteras con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Foster City, California) y un amplificador de pinzamiento de parche EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Alemania), respectivamente, a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). La adquisición y el análisis de los datos de corriente de canal sencillo y de célula entera se realizaron utilizando el programa de software pCLAMP 10 (Axon Instruments) y el programa de

software PatchMaster/FitMaster (HEKA), respectivamente. La amplitud de las corrientes de células enteras se normalizó mediante la capacitancia de la célula.

Análisis estadístico. Todos los datos se presentan como media \pm SEM. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de mínima diferencia significativa (LSD). Cuando se compararon dos grupos, se empleó la prueba t de Student no acoplada o la prueba U de Mann-Whitney. El nivel de significancia se estableció en 0,05 o 0,01.

Referencias

1. Yang, S. N. & Berggren, P. O. β -Cell Cav channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am. J. Physiol.* 288, E16-E28 (2005).
2. Yang, S. N. & Berggren, P. O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic β -cell physiology and pathophysiology. *Endocr. Rev.* 27, 621-676 (2006).
3. Catterall, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521-555 (2000).
4. Juntti-Berggren, L. et al. Increased activity of L-type Ca^{2+} channels exposed to serum from patients with type I diabetes. *Science* 261, 86-90 (1993).
5. Juntti-Berggren, L. et al. Apolipoprotein CIII promotes Ca^{2+} -dependent β cell death in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10090-10094 (2004).
6. Sol, E. M., Sundsten, T. & Bergsten, P. Role of MAPK in apolipoprotein CIII-induced apoptosis in INS-1E cells. *Lipids Health Dis.* 8, 3 (2009).
7. Holmberg, R. et al. Lowering apolipoprotein CIII delays onset of type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 10685-10689 (2011).
8. Gangabadage, C. S. et al. Structure and dynamics of human apolipoprotein CIII. *J. Biol Chem.* 283, 17416-17427 (2008).
9. Jong, M. C., Hofker, M. H. & Havekes, L. M. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 472-484 (1999).
10. Xu, S. et al. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J. Lipid Res.* 38, 1289-1298 (1997).
11. Clavey, V., Lestavel-Delattre, S., Copin, C., Bard, J. M. & Fruchart, J. C. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 963-971 (1995).
12. Huard, K. et al. Apolipoproteins C-II and C-III inhibit selective uptake of low- and high-density lipoprotein cholesteryl esters in HepG2 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1308-1318 (2005).
13. Chan, D. C., Watts, G. F., Redgrave, T. G., Mori, T. A. & Barrett, P. H. Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: associations with plasma apolipoprotein C-III concentration. *Metabolism* 51, 1041-1046 (2002).
14. Sundsten, T., Ostenson, C. G. & Bergsten, P. Serum protein patterns in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus--influence of diabetic environment and family history of diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24, 148-154 (2008).
15. Atzmon, G. et al. Lipoprotein genotype and conserved pathway for exceptional longevity in humans. *PLoS Biol.* 4, e113 (2006).
16. Kawakami, A. et al. Apolipoprotein CIII in apolipoprotein B lipoproteins enhances the adhesion of human monocytic cells to endothelial cells. *Circulation* 113, 691-700 (2006).
17. Fang, D. Z. & Liu, B. W. Apolipoprotein C-III can specifically bind to hepatic plasma membranes. *Mol. Cell. Biochem.* 207, 57-64 (2000).
18. Kawakami, A. et al. Apolipoprotein CIII-induced THP-1 cell adhesion to endothelial cells involves pertussis toxin-sensitive G protein- and protein kinase C α -mediated nuclear factor- κ B activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 219-225 (2007).

19. Rueckschloss, U. & Isenberg, G. Contraction augments L-type Ca²⁺ currents in adherent guinea-pig cardiomyocytes. *J. Physiol.* 560, 403-411 (2004).
- 5 20. Waitkus-Edwards, K. R. et al. $\alpha 4\beta 1$ Integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction. *Circ. Res.* 90, 473-480 (2002).
21. Wu, X., Davis, G. E., Meininger, G. A., Wilson, E. & Davis, M. J. Regulation of the L-type calcium channel by $\alpha 5\beta 1$ integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 30285-30292 (2001).
- 10 22. Gui, P. et al. Integrin receptor activation triggers converging regulation of Cav1.2 calcium channels by c-Src and protein kinase A pathways. *J. Biol Chem.* 281, 14015-14025 (2006).
23. Bamberger, M. E., Harris, M. E., McDonald, D. R., Husemann, J. & Landreth, G. E. A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J. Neurosci.* 23, 2665-2674 (2003).
- 15 24. Ristic, H., Srinivasan, S., Hall, K. E., Sima, A. A. & Wiley, J. W. Serum from diabetic BB/W rats enhances calcium currents in primary sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 80, 1236-1244 (1998).
- 25 25. Kavalali, E. T., Hwang, K. S. & Plummer, M. R. cAMP-dependent enhancement of dihydropyridine-sensitive calcium channel availability in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 17, 5334-5348 (1997).
26. Yang, J. & Tsien, R. W. Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron* 10, 127-136 (1993).
- 25 27. Mukai, E. et al. Exendin-4 suppresses Src activation and reactive oxygen species production in diabetic Goto-Kakizaki rat islets in an Epac-dependent manner. *Diabetes* 60, 218-226 (2011).
28. Kantengwa, S. et al. Identification and characterization of $\alpha 3\beta 1$ integrin on primary and transformed rat islet cells. *Exp. Cell Res.* 237, 394-402 (1997).
- 30 29. Bosco, D., Meda, P., Halban, P. A. & Rouiller, D. G. Importance of cell-matrix interactions in rat islet β -cell secretion in vitro: role of $\alpha 6\beta 1$ integrin. *Diabetes* 49, 233-243 (2000).
- 35 30. Nikolova, G. et al. The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and β cell proliferation. *Dev. Cell* 10, 397-405 (2006).
31. Luo, B. H., Carman, C. V. & Springer, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 619-647 (2007).
- 40 Listado de secuencias
- <110> Berggren, Per-Olof
- Yang, Shao-Nian
- 45 <120> Método para tratar y/o limitar el desarrollo de diabetes
- <130> 150-329 PCT
- 50 <150> US 61738835
- <151> 2012-12-18
- <160> 14
- 55 <170> PatentIn versión 3,5
- <210> 1
- <211> 487
- <212> ADN
- 60 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(300)
- 65

ES 2 689 922 T3

<400> 1

atg cag ccc cgg gta ctc ctt gtt gtt gcc ctc ctg gcg ctc ctg gcc	48
Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala	
1 5 10 15	
tct gcc cga gct tca gag gcc gag gat gcc tcc ctt ctc agc ttc atg	96
Ser Ala Arg Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met	
20 25 30	
cag ggt tac atg aag cac gcc acc aag acc gcc aag gat gca ctg agc	144
Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser	
35 40 45	
agc gtg cag gag tcc cag gtg gcc cag cag gcc agg ggc tgg gtg acc	192
Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr	
50 55 60	
gat ggc ttc agt tcc ctg aaa gac tac tgg agc acc gtt aag gac aag	240
Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys	
65 70 75 80	
ttc tct gag ttc tgg gat ttg gac cct gag gtc aga cca act tca gcc	288
Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala	
85 90 95	
gtg gct gcc tga gacctcaata cccaagtcc acctgcctat ccatacctgcc	340
Val Ala Ala	
agctccttgg gtccctgcaat ctccagggct gcccoctgtag gttgcttaaa agggacagta	400
ttctcagtgc tctcctaccc cacctcatgc ctggcccccc tccaggeatg ctggcctccc	460
aataaagctg gacaagaagc tgctatg	487

5 <210> 2
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 689 922 T3

Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Ala Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met
 20 25 30

Gln Gly Tyr Met Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser
 35 40 45

Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr
 50 55 60

Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
 65 70 75 80

Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala
 85 90 95

Val Ala Ala

- <210> 3
- <211> 2509
- <212> ADN
- <213> Rattus norvegicus

<400> 3

taaagagacg gatgacctac agccccaggc ccacccattc aacaggccta gtcattccc 60
 aagcccagac atcaaggcat gggacacca cgcattggcag cttcgtgtcc agctttatta 120
 gggacagcat gtttaggtga ggtctgggga gggataaagg catgagaata tactttcccc 180
 ttagagcaac cttcggaggc agcaggatag atggccagac acatctggaa catggaggtc 240
 tcacggetca agagttggtg ttgtagttg gtcctcaggc ccagactccc agaggccagt 300
 gaacttatca gtgaacttgc tccagtagcc tttcagggat ttgaagcgat tgtccatcca 360
 gccctgggg gttaaaacag taataggtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 420
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gaaaagatct cctgtgggca gctagacca ggggtgcacc 480
 taggcctcca ctggctccct aagccaccag caccacctta cctagacca ccctcagaat 540
 cacctgcagc taccactcaa ggtggaggag atggtaaagg ctaagaaaac ccaccttcat 600
 cagagcccca ttacctccg tccaatctct cttcaggcct gaggcaccaa ccaactggga 660
 ggtggatact aaggtcagct tgcctttgta gtccatagaa acagtgtcct tgaggtgtcc 720

10

ES 2 689 922 T3

catccctggc tctaagtgga tggatcaagg gaggggtgaa ctttctgttt ggaaacatta 780
 ccagagggct tctaagctct gtgatctagg ccaggttata taactctttc ccagctgogg 840
 aggtagatag tacctctcca caacctgttc tgggcacaga gactgtcaac atcttttgct 900
 acataggcaa tgatcaaatg tcacgtaaac gattggcagg gtaatgtttc atcacgggca 960
 agatgcctca cttaggttga gcccagggat ggaaacaggg cagaaccccc aaccogtaat 1020
 gctcaacctt ccaacttccc tgtaatcaga gcaggaaggc ctcccagagc acaccctaga 1080
 ccctgtgctc aaagaagaaa acctgcaggg aggctgaacg ctctcagggc tgctctgagg 1140
 agaagcagag gagatagaag aagtctgctt gcactgcctg tcatcttagt cacagtcccc 1200
 agcaaaggcc ccgtgagaga ctggatgctc agacgggccc aagaccctgg taaacttggg 1260
 gggccacagt ctccgtgtcc agggcctcag caccagggca ggaggggcca ggaccaggaa 1320
 aggaggtccg tgtgcatacc tggccaccac agctatatca gactcctgca tgctgcttag 1380
 tgcacctgag accgtcttgg aggcttgctc catgtagccc tgcatagagc ccagcagcaa 1440
 ggatccctct ccctcatcag ctctgcaag agagcagagt tgagccagggc cagccctcag 1500
 ctcttgccca gccatcgctt ttcagggtag ggtccccaga ccagctcccg cagaaatccc 1560
 agccccactt ccaccagctt acgggcagag gccaggagag ccacgagggc cacgatgagg 1620
 agcattcggg gctgcatggc acctgtgcac ctgcgggaga ccatcttgtg agaggggtatt 1680
 gtggatctcc acatctaagc ccttccctgg agaaccacac ggcccctctg tcatgaatcc 1740
 ccaagccttt ctctactga tatcagctct cggagagaga actaagaaga cccagaccca 1800
 ccccaagggg ctggaaggtg gaatgtggga atcctctgca aagcagaaca tctaccagc 1860
 ctctgcccc aatataggag aaacaacagg tttctttttc tctctaggct tcaggctttt 1920
 cagtctgggg taggcacgga tatcaaaggc ttctaatagc tcagagcaag acgaacaagg 1980
 ggcagcatga cccagttccc aatcagctct gccactacc agtgcaagggc ttttttgccc 2040
 agtggcctcc ctttctcag cttctagcct cccccacca ccaggatacc caagggctgg 2100
 aggccgtgaa ttccaagcat tctgtaggct agctggctga gtggccagag cgtcttctct 2160
 ctgtctctc cctcccttcc tctctcccc aggggcatta cctggagtag ctagctgctt 2220
 ctagggataa aactgggcag gcaagccggg acgctctgat ctgttttata ttggctccag 2280
 gatgggacag cgggcacaga aggcccagt agctggctca aggtcacctg ctgaacagtc 2340
 cagaccagag cccgaggcag ggaggccatg cagccagctg ccagaggagt tgagaaatcc 2400
 ctacagagatt gccacaccg ttcacttcca cctccgcagc caagagatca gctactgacc 2460
 tgctctgatg agactggtga gacaggaaaa gactcagggg acaagcctt 2509

<210> 4

ES 2 689 922 T3

<211> 101
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

5 <400> 4

Met Gln Pro Arg Met Leu Leu Ile Val Ala Leu Val Ala Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Arg Ala Asp Glu Gly Glu Gly Ser Leu Leu Leu Gly Ser Met
 20 25 30
 Gln Gly Tyr Met Glu Gln Ala Ser Lys Thr Val Gln Asp Ala Leu Ser
 35 40 45
 Ser Met Gln Glu Ser Asp Ile Ala Val Val Ala Ser Arg Gly Trp Met
 50 55 60
 Asp Asn Arg Phe Lys Ser Leu Lys Gly Tyr Trp Ser Lys Phe Thr Asp
 65 70 75 80
 Lys Phe Thr Gly Leu Trp Glu Ser Gly Pro Glu Asp Gln Leu Thr Thr
 85 90 95
 Pro Thr Leu Glu Pro
 100

10 <210> 5
 <211> 3262
 <212> ADN
 <213> Macaca fascicularis

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (858)..(912)

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1048)..(1171)

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (2871)..(2988)

<400> 5

ES 2 689 922 T3

ctgcagggct ggcgggacag cagcatggac acagtctcct ggggatttcc caactctccc	60
gccagcttgc tgcctctggc cgcctgcct caggccctgg tctctgatca gcaggtgacc	120
tttgcccagt gccctgggtc ctcagtgcct gctgccctgg agacaatata aaacaggctc	180
agaaccctcc tgcctgcctg ctctgttcat ccctagaggc agctgctcca ggtaatgccc	240
tctggggagg ggaaagagga ggggaggagg atgaagagga gcaagaggag ctccctgccc	300

ES 2 689 922 T3

agcccagcca gcaagcctgg agaaacactt gctagagcta aggaagcctc ggagctggac	360
gggtgcccc aaccctcat cataacctga agaaaatgga ggcccgggag gggtgtcact	420
tgcccaaagc tacacagggg gtggggctgg aaatggttcc aagtgcaggc ttccccgtca	480
ttctgcaggc ttagggctgg aggaagcctt agacagccca gtcctaccca gacagggaaa	540
ctgaggcctg gagaggcca gaaagcccca aagtacaca gcatggtggc tgcactggac	600
agagaccagt ccagaccgca ggtgccttga tgtccagtct ggtgggtttt ctgctccatc	660
ccacctacct ccctttgggc ccctcactag tccccttctg agagcccgta ttagcaggaa	720
gcaggcccct actccctctg gcagaccgag ctcagggtccc accttagggg ccatgccacc	780
tgtccaggga ggggtccaga ggcattgggg cctgggggtgc ccctcacagg acaattcctt	840
gcaggaacag aggcgcc atg cag ccc cgg gta ctc ctt gtt gct gcc ctg	890
Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Ala Ala Leu	
1 5 10	
ctg tca ctc ctg gcc tot gcc a gtaagcactt ggtgggactg ggctgggggc	942
Leu Ser Leu Leu Ala Ser Ala	
15	
aggatggagg tggcttgggg atcccagtcc taatgggtgg tcaagcagga gctcagggct	1002
cgcttagagg cogatccacc actctcagcc ctgctcttct ctcag ga gct tca gag	1058
Arg Ala Ser Glu	
20	
gcc gag gac acc tcc ctt ctt ggc ttc atg cag ggc tac atg cag cat	1106
Ala Glu Asp Thr Ser Leu Leu Gly Phe Met Gln Gly Tyr Met Gln His	
25 30 35	
gcc acc aag acc gcc aag gat gca ctg acc agc gtc cag gag tcc cag	1154
Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Thr Ser Val Gln Glu Ser Gln	
40 45 50	
gtg gcc cag cag gcc ag gtacaccgc tggcctccct ccccatccct	1201
Val Ala Gln Gln Ala Arg	
55 60	
catgccagct ccctccattc ccaccgcc tgccttgggt agatcccagc aatggaatgg	1261
aggtgccagc ctcccctggt cctgtgcctc tttggcctcc tctttcctca cagggccttg	1321
gtcaggctgc tgtgggagag acgacagagt tgagactgcg ttccccccgg gtcctcctt	1381
tctcccagag cagttctagg gtgggccatt ttagccctca tttccatttt cctttccttt	1441
tctttctttt tcttttcttt tttttcttt cttttctttt ttttttgag atggagtctc	1501
cctctgtcac ccaggctaga gtgcagtggg gcgatctcag cggatctcgg ctcaactgcaa	1561
cctctgcctc ccaggttcac ccattctcc tgcctcagcc tcccagtag ctgggattac	1621
agcgtgccca ccacatccag ctactttttg tatttttctc agagacgggg tttcccatg	1681
ttggacaggc tggctttgaa ctctgacct caggtgatct gcctacctcg gcctcccaa	1741
ttgctgggat tacaggcatg agccactgcg cctgaaccca ttttctttt ctgaaggctc	1801

ES 2 689 922 T3

ggctagagca gaggtcctca acctttttgg caccagggac cagttttgtg gtagacagtt 1861
 tttccatggg tcagcgggga tggttgggg atgaaactgc tccacctcag atcaccaggc 1921
 attggattct cctaagaagc cctccacccc gacccttggc atgctcagtt cacaacaggt 1981
 ttcacactcc tgtgagaatc taatgccgcc taacctgaca gaaggcgggg cttggggcgg 2041
 attcctctgt cacccatcac tcaactttgtg ctgtgcagcc tggctcctaa ctggccatgg 2101
 accagtacce atctgtgact tgggggctgg ggacccttgg gctagggggt tgccttggga 2161
 ggccccacct ggccaattc tagcctgggt atgagagtgc ttctgctttg ttccaagacc 2221
 tggggccagg gtgagtagaa gtgtgtcctt cctctcccat cctgccctg cccatcggtc 2281
 ctctcctctc cctactcctt tccccacctc accctgactg gcattggctg gcatagcaga 2341
 ggttgtttat aagcattctt aatcctcaga accggctttg gggtaggtgt tattttccca 2401
 ctttgcatat gagaaaattg aggctcagag cgattaggtg acctgcccc gatcacacaa 2461
 ctaatcaatc ctccaatgac tttccaaatg agaggtgcgc tccctctgtc ctaccctgct 2521
 cggaaccacc aggatataca actccagggg atactgtctg cacagaaaac aatgacagcc 2581
 ttgaccttc acatctcccc accctgtcac tctgtgcctc aagcccaggg gcaaaaacat 2641
 ctgaggtcac ctggagacgg cagggttcga cttgtgctgg ggttcctgta agggcatctc 2701
 ttctcccagg gtggcagctg tgggcagtcc tgctgaggt ctcagggctg ttgtccagtg 2761
 aagttgagag ggtggcaggg agagccagtg gggacatggg tgtgggtccc atagttgct 2821
 ccaaaggagt tctcatgccc tgctctgttg cttcccctta ctgatttag a ggc tgg 2877
 Gly Trp

 gtg acc gat ggc ttc agt tcc ctg aaa gac tac tgg agc acc gtt aag 2925
 Val Thr Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys
 65 70 75

 gac aag tta tct ggg ttc tgg gat ttg aac cct gag gcc aaa ccc act 2973
 Asp Lys Leu Ser Gly Phe Trp Asp Leu Asn Pro Glu Ala Lys Pro Thr
 80 85 90

 ctg gct gag gct gcc tgagacctca atacccaag tccacctgcc tgtccatcct 3028
 Leu Ala Glu Ala Ala
 95

 gccagctcct tgggtcctgc agcctccagg gctgcccctg taggttgett aaaagggaca 3088
 gtattctcag tgccctocta ccgcacctca tgctggccc cctccaggc aggggtgct 3148
 cccaataaag ctggacaaga agctgctatg agtgggcctg cacaagtgtg ccatctgtgt 3208
 ctgggtatgg gaaagggctc gaggtgttc tgtgggtagg cactggacga ctgc 3262

ES 2 689 922 T3

<210> 6
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

5

<400> 6

Met Gln Pro Arg Val Leu Leu Val Ala Ala Leu Leu Ser Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Ala Arg Ala Ser Glu Ala Glu Asp Thr Ser Leu Leu Gly Phe Met
 20 25 30

Gln Gly Tyr Met Gln His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Thr
 35 40 45

Ser Val Gln Glu Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr
 50 55 60

Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys
 65 70 75 80

Leu Ser Gly Phe Trp Asp Leu Asn Pro Glu Ala Lys Pro Thr Leu Ala
 85 90 95

Glu Ala Ala

10 <210> 7
 <211> 2411
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (54)..(350)

20 <400> 7

ES 2 689 922 T3

gctacatcag gggctgtgca gcgtcgccca tactccgagc aaagaactgt ggc cag	56
Gln	
1	
agg cag tcg agg tta gtg agg act gcg agg cag aca ctt tgc tgt gtt	104
Arg Gln Ser Arg Leu Val Arg Thr Ala Arg Gln Thr Leu Cys Cys Val	
5 10 15	
caa atc caa gtc aag ggt aca aaa atg cag agc aat aaa gcc ttt aac	152
Gln Ile Gln Val Lys Gly Thr Lys Met Gln Ser Asn Lys Ala Phe Asn	
20 25 30	
ttg gag aag cag aat cat act cca agg aag cat cat cag cat cac cac	200
Leu Glu Lys Gln Asn His Thr Pro Arg Lys His His Gln His His His	
35 40 45	
cag cag cac cat cag cag caa cag cag cag cag cag caa cag cca ccc	248
Gln Gln His His Gln Pro Pro	
50 55 60 65	

ES 2 689 922 T3

cca cca ata cct gca aat ggc cag cag gcc agc agc cag aat gaa ggc	296
Pro Pro Ile Pro Ala Asn Gly Gln Gln Ala Ser Ser Gln Asn Glu Gly	
70 75 80	
ttg act att gac ctg aag aat ttt agg aaa cca gga gag aag acc ttt	344
Leu Thr Ile Asp Leu Lys Asn Phe Arg Lys Pro Gly Glu Lys Thr Phe	
85 90 95	
aca cag cgtagccgtc tctttgtggg caatcttccc cctgatatca ctgaggagga	400
Thr Gln	
aatgaggaaa ctatttgaga aatatggaaa agcaggcgaa gttttcattc ataaggataa	460
aggctttggc tttattcgct tggaaacacg aacctagcg gaaattgtca aagtggagct	520
ggacaacatg ccctccgtg ggaagcagct gcgagtgcgc ttcgcctgtc acagtgcac	580
ccttacagtc cgcaaccttc ctacgtacgt gtcgaacgaa ctgctggaag aagccttttc	640
tgtgttcggc caggtggaga gggctgtagt cattgtggat gaccgaggaa ggccctcagg	700
gaaaggcatt gttgagttct caggggaagcc agctgctcgg aaagctctgg acagatgcag	760
tgaaggctcc ttcttgctga ctacatttcc ttggcctgtg actgtggagc ctatggacca	820
gttagatgat gaagaggac ttccagagaa actggttata aaaaaccagc aattccacaa	880
ggagagagaa cagccacca gatttgaca acctggctcc tttgagtatg agtatgccat	940
gcgctggaag gcaactcattg agatggagaa gcaacagcag gatcaagtgg atcggaacat	1000
caaggaggct cgtgagaagc tggagatgga gatggaggct gcacgtcatg agcaccaggt	1060
tatgctaatag aggcaggatt tgatgagacg tcaagaagag cttcggagaa tggaggagct	1120
gcataaccaa gaggttcaga agcgaaagca gttagaactc aggcaggaag aggaacgcag	1180
gcgccgtgag gaagagatgc ggcgacaaca agaggaaatg atgcgccgac agcaggaagg	1240
attcaaggga accttccctg atgcgagaga acaagagata cggatgggcc aatggctat	1300
gggagggtgct atgggcataa acaatagagg cgcgatgcc cctgctcctg tgccacctgg	1360
tactccagct cctccaggac ctgccactat gatgccagat ggaacccttg gattgacccc	1420
accaacaact gaacgttttg gccaaactgc aacaatggaa ggaattggag caattggtgg	1480
aactcctcct gcattcaacc gtccagctcc gggagctgaa tttgctccaa ataaacgccg	1540
ccgatattag ataaagttgc attgtctagt ttctgcagc ccttaaaaga agggcccttt	1600
ttggactagc cagaattcta ccctggaaaa gtgttagggg ttcttccaa tagataggcc	1660
ttccctgctt gtactactct agggatcatg cttgaagtca gaggggcaga gaaggggtgg	1720
tattcaacaa gtcaaagtct gtggtatatt gctttatcaa gactgtctgg tgcattcctg	1780
aactatatta attgttgagg gcctggagaa ccatgggaaa atgaactcag agctccatta	1840
atcttgatca ttcttctct ctctttctct ctctctgtt ttaattactt tctcatcttt	1900
attcccctca acccctgaga cactgccata tataaccacaa accataaaca tctccaatg	1960

ES 2 689 922 T3

acctagcccc atccctccat tcactcccag gtaagaattc agacaaatgt ccacagaggt 2020
 tacagcatac gtacgggtgt gttatatctc atatatgacc ccttcatgtc ctaaggaaga 2080
 cattttctct tagagggttt catttttagta tatcttaaaa gaatcttgtg ttaccttgcc 2140
 tccatctttt tcttgggtaa ggactacact ttgtgtctct gatggttgctg ttcacagctt 2200
 ttcttgatag gcctagtaca atcttgggaa cagggttgct gtgtggtgaa ggtctgacag 2260
 tagttcttag tcttgcctat cttaggtagc tacgctgtgc atttttattg gtatactatg 2320
 aattgttcca gataccttca gtttggaaag ttttctgaga aatggagacg tcatgcgga 2380
 tcaccttatt aaaatgcatt tgaagccttt t 2411

<210> 8
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 8

Gln Arg Gln Ser Arg Leu Val Arg Thr Ala Arg Gln Thr Leu Cys Cys
 1 5 10 15

Val Gln Ile Gln Val Lys Gly Thr Lys Met Gln Ser Asn Lys Ala Phe
 20 25 30

Asn Leu Glu Lys Gln Asn His Thr Pro Arg Lys His His Gln His His
 35 40 45

His Gln Gln His His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro
 50 55 60

Pro Pro Pro Ile Pro Ala Asn Gly Gln Gln Ala Ser Ser Gln Asn Glu
 65 70 75 80

Gly Leu Thr Ile Asp Leu Lys Asn Phe Arg Lys Pro Gly Glu Lys Thr
 85 90 95

10 Phe Thr Gln

<210> 9
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 9

Met Gly Cys Ser Ala Lys Ala Arg Trp Ala Ala Gly Ala Leu Gly Val
 1 5 10 15

ES 2 689 922 T3

Ala Gly Leu Leu Cys Ala Val Leu Gly Ala Val Met Ile Val Met Val
 20 25 30

Pro Ser Leu Ile Lys Gln Gln Val Leu Lys Asn Val Arg Ile Asp Pro
 35 40 45

Ser Ser Leu Ser Phe Asn Met Trp Lys Glu Ile Pro Ile Pro Phe Tyr
 50 55 60

Leu Ser Val Tyr Phe Phe Asp Val Met Asn Pro Ser Glu Ile Leu Lys
 65 70 75 80

Gly Glu Lys Pro Gln Val Arg Glu Arg Gly Pro Tyr Val Tyr Arg Glu
 85 90 95

Phe Arg His Lys Ser Asn Ile Thr Phe Asn Asn Asn Asp Thr Val Ser
 100 105 110

Phe Leu Glu Tyr Arg Thr Phe Gln Phe Gln Pro Ser Lys Ser His Gly
 115 120 125

Ser Glu Ser Asp Tyr Ile Val Met Pro Asn Ile Leu Val Leu Gly Ala
 130 135 140

Ala Val Met Met Glu Asn Lys Pro Met Thr Leu Lys Leu Ile Met Thr
 145 150 155 160

Leu Ala Phe Thr Thr Leu Gly Glu Arg Ala Phe Met Asn Arg Thr Val
 165 170 175

Gly Glu Ile Met Trp Gly Tyr Lys Asp Pro Leu Val Asn Leu Ile Asn
 180 185 190

Lys Tyr Phe Pro Gly Met Phe Pro Phe Lys Asp Lys Phe Gly Leu Phe
 195 200 205

Ala Glu Leu Asn Asn Ser Asp Ser Gly Leu Phe Thr Val Phe Thr Gly
 210 215 220

Val Gln Asn Ile Ser Arg Ile His Leu Val Asp Lys Trp Asn Gly Leu
 225 230 235 240

Ser Lys Val Asp Phe Trp His Ser Asp Gln Cys Asn Met Ile Asn Gly
 245 250 255

Thr Ser Gly Gln Met Trp Pro Pro Phe Met Thr Pro Glu Ser Ser Leu
 260 265 270

ES 2 689 922 T3

Glu Phe Tyr Ser Pro Glu Ala Cys Arg Ser Met Lys Leu Met Tyr Lys
 275 280 285

Glu Ser Gly Val Phe Glu Gly Ile Pro Thr Tyr Arg Phe Val Ala Pro
 290 295 300

Lys Thr Leu Phe Ala Asn Gly Ser Ile Tyr Pro Pro Asn Glu Gly Phe
 305 310 315 320

Cys Pro Cys Leu Glu Ser Gly Ile Gln Asn Val Ser Thr Cys Arg Phe
 325 330 335

Ser Ala Pro Leu Phe Leu Ser His Pro His Phe Leu Asn Ala Asp Pro
 340 345 350

Val Leu Ala Glu Ala Val Thr Gly Leu His Pro Asn Gln Glu Ala His
 355 360 365

Ser Leu Phe Leu Asp Ile His Pro Val Thr Gly Ile Pro Met Asn Cys
 370 375 380

Ser Val Lys Leu Gln Leu Ser Leu Tyr Met Lys Ser Val Ala Gly Ile
 385 390 395 400

Gly Gln Thr Gly Lys Ile Glu Pro Val Val Leu Pro Leu Leu Trp Phe
 405 410 415

Ala Glu Ser Gly Ala Met Glu Gly Glu Thr Leu His Thr Phe Tyr Thr
 420 425 430

Gln Leu Val Leu Met Pro Lys Val Met His Tyr Ala Gln Tyr Val Leu
 435 440 445

Leu Ala Leu Gly Cys Val Leu Leu Leu Val Pro Val Ile Cys Gln Ile
 450 455 460

Arg Ser Gln Glu Lys Cys Tyr Leu Phe Trp Ser Ser Ser Lys Lys Gly
 465 470 475 480

Ser Lys Asp Lys Glu Ala Ile Gln Ala Tyr Ser Glu Ser Leu Met Thr
 485 490 495

Ser Ala Pro Lys Gly Ser Val Leu Gln Glu Ala Lys Leu
 500 505

<210> 10
<211> 2603
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<400> 10

ES 2 689 922 T3

cccggatcca ccgtgcctct gcggcctgcg tgcccggagt ccccgctgt gtcgtctctg 60
 tcgccgtccc cgtctcctgc caggcgcgga gccctgocgag ccgcgggtgg gccccaggcg 120
 cgcagacatg ggctgctccg ccaaagcgcg ctgggctgcc ggggcgctgg gcgtcgcggg 180
 gctactgtgc gctgtgctgg gcgctgtcat gatcgtgatg gtgccgtcgc tcatcaagca 240
 gcaggtcctt aagaacgtgc gcatcgaccc cagtagcctg tccttcaaca tgtggaagga 300
 gatccctatc cccttctatc tctccgtcta cttctttgac gtcatgaacc ccagcgagat 360
 cctgaagggc gagaagccgc aggtgcggga gcgcgggccc tacgtgtaca gggagttcag 420
 gcacaaaagc aacatcacct tcaacaaca cgacaccgtg tccttcctcg agtaccgcac 480
 cttccagttc cagccctcca agtcccacgg ctccggagagc gactacatcg tcatgcccaa 540
 catcctggtc ttgggtgctg cggtgatgat ggagaataag cccatgaccc tgaagctcat 600
 catgacctg gcattcacca ccctcggcga acgtgccttc atgaaccgca ctgtgggtga 660
 gatcatgtgg ggctacaagg acccccttgt gaatctcacc aacaagtact ttccaggcat 720
 gttccccttc aaggacaagt tcggattatt tgctgagctc aacaactccg actctgggct 780
 cttcacggtg ttcacggggg tccagaacat cagcaggatc cacctcgtgg acaagtggaa 840
 cgggctgagc aaggttgact tctggcattc cgatcagtgc aacatgatca atggaacttc 900
 tgggcaaatg tggccgcctt tcatgactcc tgagtcctcg ctggagttct acagcccgga 960
 ggctgcccga tccatgaagc taatgtacaa ggagtcaggg gtgtttgaag gcatccccac 1020
 ctatcgcttc gtggctccca aaaccctggt tgccaacggg tccatctacc caccacaacga 1080
 aggcttctgc ccgtgcctgg agtctggaat tcagaacgtc agcacctgca ggttcagtgc 1140
 ccccttgttt ctctcccatc ctcaactcct caacgcocgac ccggttctgg cagaagcggg 1200
 gactggcctg caccctaacc aggaggcaca ctcttgttc ctggacatcc acccggtcac 1260
 gggaatcccc atgaactgct ctgtgaaact gcagctgagc ctctacatga aatctgtcgc 1320
 aggcatgga caaactggga agattgagcc tgtggctcctg ccgctgctct ggtttgcaga 1380
 gagcggggcc atggaggggg agactcttca cacattctac actcagctgg tgttgatgcc 1440
 caaggtgatg cactatgccc agtacgtcct cctggcgcctg ggctgcgtcc tgctgctggt 1500
 ccctgtcatc tgccaaatcc ggagccaaga gaaatgctat ttattttgga gtagtagtaa 1560
 aaagggctca aaggataagg aggccattca ggcctattct gaatccctga tgacatcagc 1620
 tcccaagggc tctgtgctgc aggaagcaaa actgtagggg cctgaggaca ccgtgagcca 1680
 gccaggcctg gccgctgggc ctgaccggcc ccccagcccc tacaccccgc ttctcccgga 1740

ES 2 689 922 T3

ctctcccagc ggacagcccc ccagccccac agcctgagcc tcccagctgc catgtgcctg 1800
 ttgcacacct gcacacacgc cctggcacac atacacacat gcgtgcagggc ttgtgcagac 1860
 actcagggat ggagctgctg ctgaagggac ttgtagggag aggctcgtca acaagcactg 1920
 ttctggaacc ttctctccac gtggcccaca ggccctgacca caggggctgt gggctcctgcg 1980
 tccccttctt cgggtgagcc tggcctgtcc cgttcagccg ttggggcccag gcttctctcc 2040
 ctccaagggtg aaacactgca gtcccgggtgt ggtggctccc catgcaggac gggccaggct 2100
 gggagtgccg ccttctctgtg ccaaattcag tggggactca gtgcccagggc cctggccacg 2160
 agctttggcc ttggtctacc tgccaggcca ggcaaagcgc ctttacacag gcctcggaaa 2220
 acaatggagt gagcacaaga tgccctgtgc agctgcccga gggctctccgc ccaccccggc 2280
 cggactttga tccccccgaa gtcttcacag gcaactgcac gggttgtctg gcgccctttt 2340
 cctccagcct aaactgacat catcctatgg actgagccgg ccactctctg gccgaagtgg 2400
 ccgcaggctg tgcccccgag ctgccccac cccctcacag ggtccctcag attataggtg 2460
 cccaggctga ggtgaagagg cctggggggc ctgccttccg ggcgctcctg gaccctgggg 2520
 caaacctgtg acccttttct actggaatag aaatgagttt tatcatcttt gaaaaataat 2580
 tcactcttga agtaataaac gtt 2603

<210> 11
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 11
 caagaagcca agctgtaggg 20

15 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 12
 cccaacaggc tctactcagc 20

25 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 13
 tagacaagat ggtgaagg 18

35

ES 2 689 922 T3

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Sintético

10 <400> 14
tccttgagg ccatgtag 18

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para identificar compuestos candidatos para limitar el desarrollo y/o tratar la diabetes, que comprende
- 5 a) poner en contacto una primera población de células secretoras de insulina con una cantidad de apolipoproteína CIII (ApoCIII) eficaz para aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba;
- 10 b) poner en contacto una segunda población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba, y poner en contacto adicionalmente a la segunda población de células secretoras de insulina con una molécula que inhibe la expresión o actividad del receptor de secuestrante clase B tipo I (SRBI), e
- 15 c) identificar compuestos de prueba positivos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la segunda población de células secretoras de insulina como compuestos candidatos para limitar el desarrollo de y/o tratamiento de la diabetes.
- 20 2. El método in vitro de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto una tercera población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales Ca_v1 , en presencia de uno o más de los compuestos candidatos, y contactar adicionalmente a la tercera población de células secretoras de insulina con un bloqueador de canales Ca_v2 y/o Ca_v3 , en el que los compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en densidad y/o conductividad en la tercera población de
- 25 células secretoras de insulina en mayor grado que en la primera población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes; y/o que comprende adicionalmente poner en contacto una cuarta población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más de los compuestos candidatos y poner en contacto adicionalmente a la cuarta población de células secretoras de insulina con un inhibidor de Src quinasa y/o un inhibidor de proteína quinasa A (PKA), en el que los compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 en la primera población de células secretoras de insulina en mayor grado que en la cuarta población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes; y/o
- 30 que comprende además poner en contacto una quinta población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más de los compuestos candidatos, y poner en contacto adicionalmente a la quinta población de células secretoras de insulina con un molécula que inhibe la expresión o actividad de integrina $\beta1$, en la que los compuestos candidatos que inhiben el aumento inducido por ApoCIII en densidad y/o conductividad de canales Ca_v1 en la primera población de
- 35 células secretoras de insulina en un grado mayor que en la quinta población de células secretoras de insulina son compuestos candidatos preferidos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes.
- 40 3. Un método in vitro para identificar compuestos candidatos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes, que comprende
- 45 a) poner en contacto una primera población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o la conductividad de los canales de Ca_v1 , en presencia de uno o más compuestos de prueba; y
- 50 b) identificar aquellos compuestos de prueba positivos que inhiben el aumento de densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 inducido por ApoCIII y que inhiben la expresión o actividad de SRBI en la primera población de células secretoras de insulina en comparación con el control, en la que los compuestos de prueba positivos son compuestos candidatos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes.
- 55 4. El método in vitro de la reivindicación 3, en el que el control comprende poner en contacto una segunda población de células secretoras de insulina con una cantidad de ApoCIII efectiva para aumentar la densidad y/o conductividad de los canales de Ca_v1 , en ausencia de compuestos de prueba.
- 60 5. El método in vitro de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que las células secretoras de insulina son células pancreáticas β .
6. El método in vitro de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el método comprende poner en contacto las células con ApoCIII durante al menos 6 horas.
- 65 7. El método in vitro de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que los compuestos candidatos son compuestos candidatos para limitar el desarrollo de y/o tratar la diabetes tipo 1 y/o la diabetes tipo 2.

8. El método in vitro de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el inhibidor de SRBI se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti SRBI, aptámeros anti SRBI, SRBI ARNsi, SRBI ARNsh, oligonucleótidos antisentido de SRBI, inhibidores de SRBI de molécula pequeña, interferón alfa, N-[4-(4-terc-Butoxicarbonilpiperazin-1-il)fenil]-(2-cloro-5-nitrofenil)carboxamida (R-138329), 2-Hexil-1-ciclopentanona tiosemicarbazona, 33M20, (BLT1), y uno o más inhibidores de SRBI seleccionados del grupo que consiste en MIT 9952-1, 9952-2, 9952-3, 9952-4, 9952-5, 9952-6, 9952-7, 9952-8, 9952-9, 9952-10, 9952-11, 9952-12, 9952-13, 9952-14, 9952-15, 9952-16, 9952-17, 9952-18, 9952-19, 9952-20, 9952-21, 9952-22, 9952-23, 9952-24, 9952-25, 9952-26, 9952-27, 9952-28, 9952-29, 9952-30, 9952-31, 9952-32, 9952-33, 9952-34, 9952-35, 9952-36, 9952-37, 9952-38, 9952-39, 9952-40, 9952-41, 9952-42, 9952-43, 9952-44, 9952-45, 9952-46, 9952-47, 9952-48, 9952-49, 9952-50, 9952-51, 9952-52, 9952-53, 9952-54, 9952-55, 9952-56, 9952-57, 9952-58, 9952-59, 9952-60, 9952-61, 9952-62, 9952-63, 9952-64, 9952-65, 9952-66, 9952-67, 9952-68, 9952-69, 9952-70, 9952-71, 9952-72, 9952-73, 9952-74, 9952-75, 9952-76, 9952-77, 9952-78, 9952-79, 9952-80, 9952-81, 9952-82, 9952-83, 9952-84, 9952-85, 9952-86, 9952-87, 9952-88, 9952-89, 9952-90, 9952-91, 9952-92, 9952-93, 9952-94, 9952-95, 9952-96, 9952-97, 9952-98, 9952-99, 9952-100, 9952-101, 9952-102, 9952-103, 9952-104, 9952-105, 9952-106, 9952-107, 9952-108, 9952-109, 9952-110, 9952-111, 9952-112, 9952-113, 9952-114, 9952-115, 9952-116, 9952-117, 9952-118, 9952-119, 9952-120, 9952-121, 9952-122, 9952-123, 9952-124, 9952-125, 9952-126, 9952-127, 9952-128, 9952-129, 9952-130, 9952-131, 9952-132, 9952-133, 9952-134, 9952-135, 9952-136, 9952-137, 9952-138, 9952-139, 9952-140, 9952-141, 9952-142, 9952-143, 9952-144, 9952-145, 9952-146, 9952-147, 9952-148, 9952-149, 9952-150, 9952-151, 9952-152, 9952-153, 9952-154, 9952-155, 9952-156, 9952-157, 9952-158, 9952-159, 9952-160, 9952-161, 9952-162, 9952-163, 9952-164, 9952-165, 9952-166, 9952-167, 9952-168, 9952-169, 9952-170, 9952-171, 9952-172, 9952-173, 9952-174, 9952-175, 9952-176, 9952-177, 9952-178, 9952-179, 9952-180, 9952-181, 9952-182, 9952-183, 9952-184, 9952-185, 9952-186, 9952-187, 9952-188, 9952-189, 9952-190, 9952-191, 9952-192, 9952-193, 9952-194, 9952-195, 9952-196, 9952-197, 9952-198, 9952-199, 9952-200, 9952-201, 9952-202, 9952-203, 9952-204, 9952-205, 9952-206, 9952-207, 9952-208, 9952-209, 9952-210, 9952-211, 9952-212, 9952-213, 9952-214, 9952-215, 9952-216, 9952-217, 9952-218, 9952-219, 9952-220, 9952-221, 9952-222, 9952-223, 9952-224, 9952-225, 9952-226, 9952-227, 9952-228, 9952-229, 9952-230, 9952-231, 9952-232, 9952-233, 9952-234, 9952-235, 9952-236, 9952-237, 9952-238, 9952-239, 9952-240, 9952-241, 9952-242, 9952-243, 9952-244, 9952-245, 9952-246, 9952-247, 9952-248, 9952-249, 9952-250, 9952-251, 9952-252, 9952-253, 9952-254, 9952-255, 9952-256, 9952-257, 9952-258, 9952-259, 9952-260, 9952-261, 9952-262, 9952-263, 9952-264, 9952-265, 9952-266, 9952-267, 9952-268, 9952-269, 9952-270, 9952-271, 9952-272, 9952-273, 9952-274, 9952-275, 9952-276, 9952-277, 9952-278, 9952-279, 9952-280, 9952-281, 9952-282, 9952-283, 9952-284, 9952-285, 9952-286, 9952-287, 9952-288, 9952-289, 9952-290, 9952-291, 9952-292, 9952-293, 9952-294, 9952-295, 9952-296, 9952-297, 9952-298, 9952-299, 9952-300, 9952-301, 9952-302, 9952-303, 9952-304, 9952-305, 9952-306, 9952-307, 9952-308, 9952-309, 9952-310, 9952-311, 9952-312, 9952-313, 9952-314, 9952-315, 9952-316, 9952-317, 9952-318, 9952-319, 9952-320, 9952-321, 9952-322, 9952-323, 9952-324, 9952-325, 9952-326, 9952-327, 9952-328, 9952-329, 9952-330, 9952-331, 9952-332, 9952-333, 9952-334, 9952-335, 9952-336, 9952-337, 9952-338, 9952-339, 9952-340, 9952-341, y 9952-342, o sales de los mismos.

9. Una combinación de (a) un inhibidor de la expresión y/o actividad de SRBI; y (b) un inhibidor de la activación de ApoCIII de células β pancreáticas, para uso en el tratamiento o limitación del desarrollo de diabetes.

10. La combinación para uso de la reivindicación 9, en la que el inhibidor de la expresión y/o actividad de SRBI se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti SRBI, aptámeros anti SRBI, SRBI ARNsi, SRBI ARNsh, oligonucleótidos antisentido de SRBI, inhibidores de SRBI de molécula pequeña, interferón alfa, N-[4-(4-terc-Butoxicarbonilpiperazin-1-il)fenil]-(2-cloro-5-nitrofenil)carboxamida (R-138329), 2-Hexil-1-ciclopentanona tiosemicarbazona, 33M20, (BLT1) y uno o más inhibidores de SRBI seleccionados del grupo que consiste en MIT 9952-1, 9952-2, 9952-3, 9952-4, 9952-5, 9952-6, 9952-7, 9952-8, 9952-9, 9952-10, 9952-11, 9952-12, 9952-13, 9952-14, 9952-15, 9952-16, 9952-17, 9952-18, 9952-19, 9952-20, 9952-21, 9952-22, 9952-23, 9952-24, 9952-25, 9952-26, 9952-27, 9952-28, 9952-29, 9952-30, 9952-31, 9952-32, 9952-33, 9952-34, 9952-35, 9952-36, 9952-37, 9952-38, 9952-39, 9952-40, 9952-41, 9952-42, 9952-43, 9952-44, 9952-45, 9952-46, 9952-47, 9952-48, 9952-49, 9952-50, 9952-51, 9952-52, 9952-53, 9952-54, 9952-55, 9952-56, 9952-57, 9952-58, 9952-59, 9952-60, 9952-61, 9952-62, 9952-63, 9952-64, 9952-65, 9952-66, 9952-67, 9952-68, 9952-69, 9952-70, 9952-71, 9952-72, 9952-73, 9952-74, 9952-75, 9952-76, 9952-77, 9952-78, 9952-79, 9952-80, 9952-81, 9952-82, 9952-83, 9952-84, 9952-85, 9952-86, 9952-87, 9952-88, 9952-89, 9952-90, 9952-91, 9952-92, 9952-93, 9952-94, 9952-95, 9952-96, 9952-97, 9952-98, 9952-99, 9952-100, 9952-101, 9952-102, 9952-103, 9952-104, 9952-105, 9952-106, 9952-107, 9952-108, 9952-109, 9952-110, 9952-111, 9952-112, 9952-113, 9952-114, 9952-115, 9952-116, 9952-117, 9952-118, 9952-119, 9952-120, 9952-121, 9952-122, 9952-123, 9952-124, 9952-125, 9952-126, 9952-127, 9952-128, 9952-129, 9952-130, 9952-131, 9952-132, 9952-133, 9952-134, 9952-135, 9952-136, 9952-137, 9952-138, 9952-139, 9952-140, 9952-141, 9952-142, 9952-143, 9952-144, 9952-145, 9952-146, 9952-147, 9952-148, 9952-149, 9952-150, 9952-151, 9952-152, 9952-153, 9952-154, 9952-155, 9952-156, 9952-157, 9952-158, 9952-159, 9952-160, 9952-161, 9952-162, 9952-163, 9952-164, 9952-165, 9952-166, 9952-167, 9952-168, 9952-169, 9952-170, 9952-171, 9952-172, 9952-173, 9952-174, 9952-175, 9952-176, 9952-177, 9952-178, 9952-179, 9952-180, 9952-181, 9952-182, 9952-183, 9952-184, 9952-185, 9952-186, 9952-187, 9952-188, 9952-189, 9952-190, 9952-191, 9952-192, 9952-193, 9952-194, 9952-195, 9952-196, 9952-197, 9952-198, 9952-199, 9952-200, 9952-201, 9952-202, 9952-203, 9952-204, 9952-205, 9952-206, 9952-207, 9952-208, 9952-209, 9952-210, 9952-211, 9952-212, 9952-213, 9952-214, 9952-215, 9952-216, 9952-217, 9952-218, 9952-219, 9952-220, 9952-221, 9952-222, 9952-223, 9952-

- 224, 9952-225, 9952-226, 9952-227, 9952-228, 9952-229, 9952-230, 9952-231, 9952-232, 9952-233, 9952-234, 9952-235, 9952-236, 9952-237, 9952-238, 9952-239, 9952-240, 9952-241, 9952-242, 9952-243, 9952-244, 9952-245, 9952-246, 9952-247, 9952-248, 9952-249, 9952-250, 9952-251, 9952-252, 9952-253, 9952-254, 9952-255, 9952-256, 9952-257, 9952-258, 9952-259, 9952-260, 9952-261, 9952-262, 9952-263, 9952-264, 9952-265, 9952-266, 9952-267, 9952-268, 9952-269, 9952-270, 9952-271, 9952-272, 9952-273, 9952-274, 9952-275, 9952-276, 9952-277, 9952-278, 9952-279, 9952-280, 9952-281, 9952-282, 9952-283, 9952-284, 9952-285, 9952-286, 9952-287, 9952-288, 9952-289, 9952-290, 9952-291, 9952-292, 9952-293, 9952-294, 9952-295, 9952-296, 9952-297, 9952-298, 9952-299, 9952-300, 9952-301, 9952-302, 9952-303, 9952-304, 9952-305, 9952-306, 9952-307, 9952-308, 9952-309, 9952-310, 9952-311, 9952-312, 9952-313, 9952-314, 9952-315, 9952-316, 9952-317, 9952-318, 9952-319, 9952-320, 9952-321, 9952-322, 9952-323, 9952-324, 9952-325, 9952-326, 9952-327, 9952-328, 9952-329, 9952-330, 9952-331, 9952-332, 9952-333, 9952-334, 9952-335, 9952-336, 9952-337, 9952-338, 9952-339, 9952-340, 9952-341, y 9952-342, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
11. La combinación para el uso de la reivindicación 9 o 10, en la que el inhibidor de la activación de ApoCIII de células pancreáticas β se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos que se enlazan a apoCIII; aptámeros que pueden interferir con la actividad apoCIII; oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la proteína apoCIII, ADN o ARNm; pequeños ARN interferentes (ARNsi) o ARN de horquilla corta (ARNsh) dirigidos contra la proteína apoCIII, ADN o ARNm.
12. La combinación para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que la diabetes es diabetes tipo 1.
13. La combinación para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que la diabetes es diabetes tipo 2.
14. La combinación para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en la que la combinación se administra a sujetos que sobreexpresan apoCIII con relación al control.

Figura 1

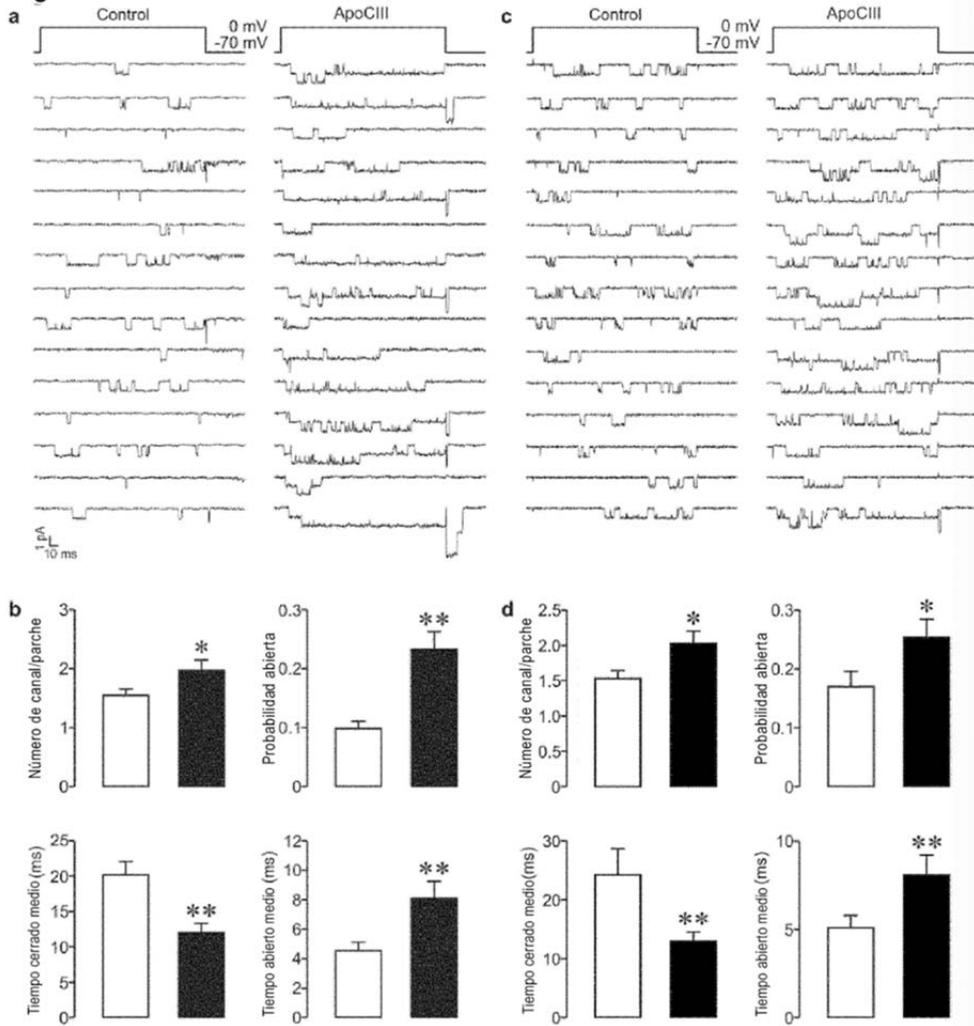
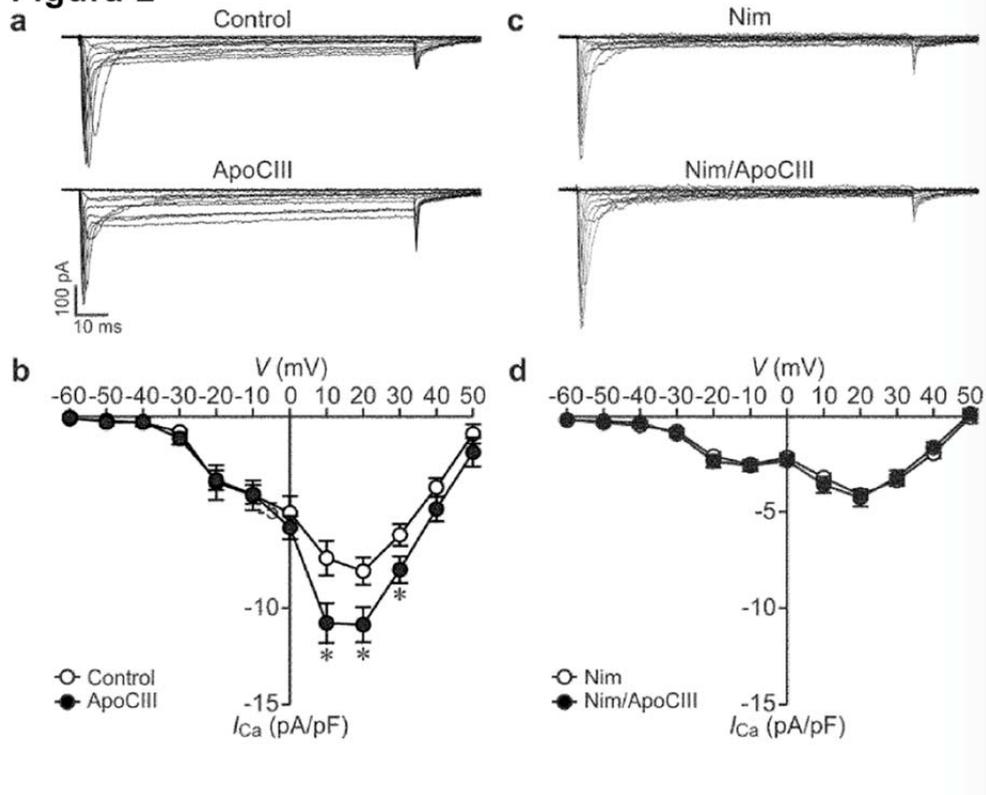


Figura 2



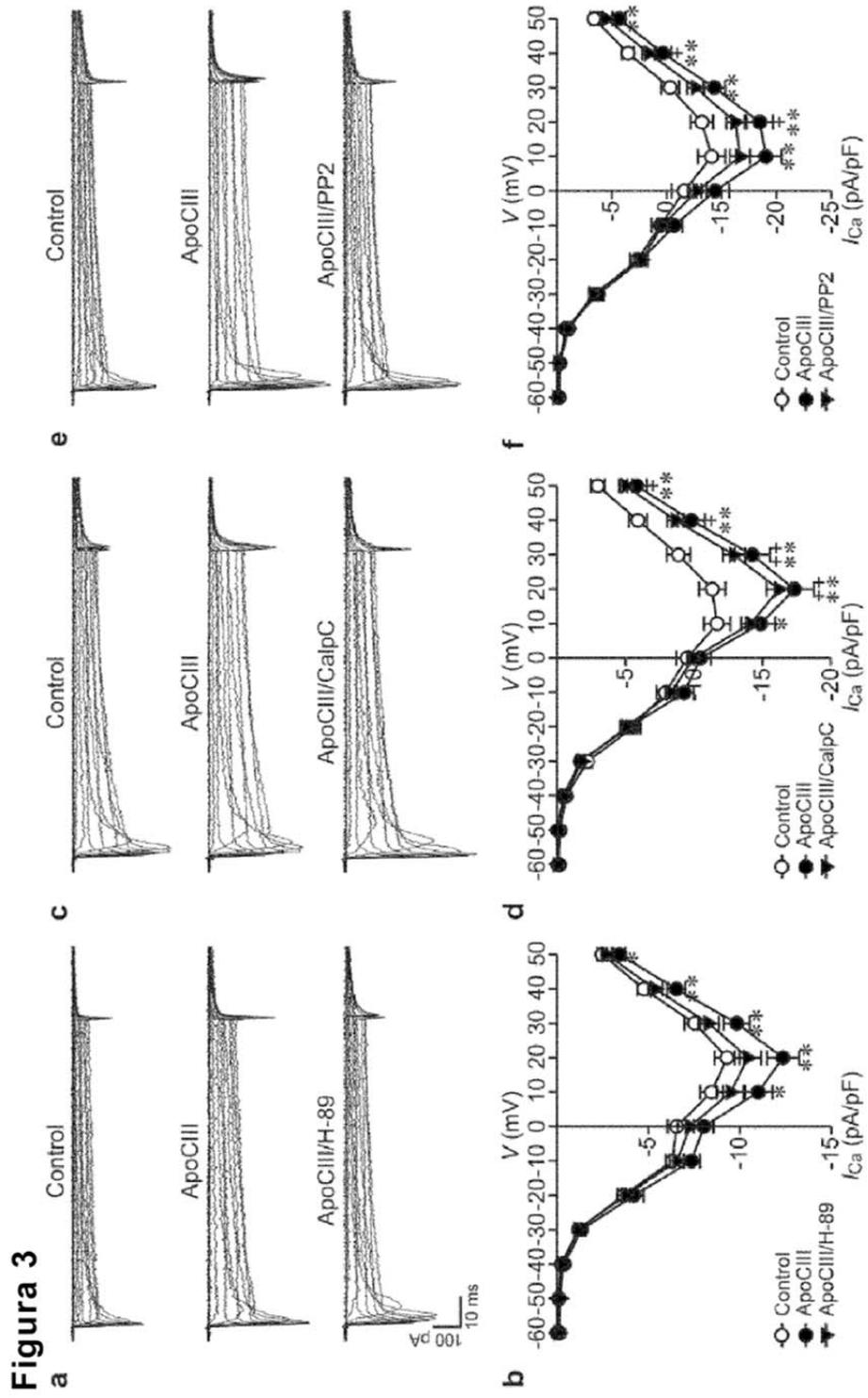


Figura 4

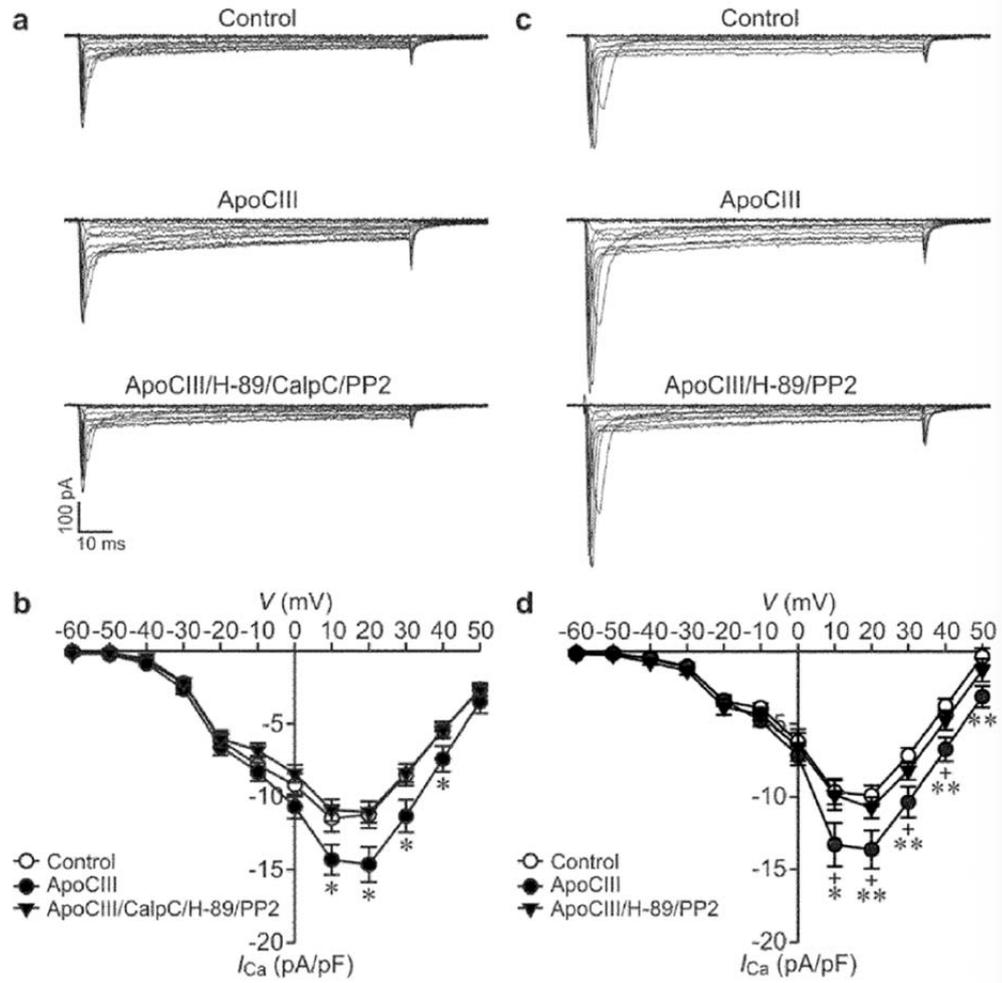
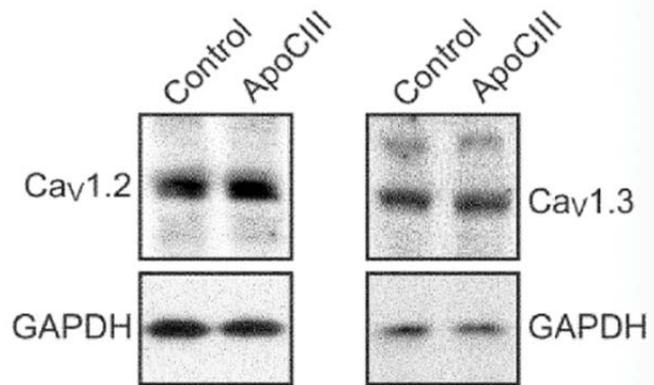


Figura 5

a



b

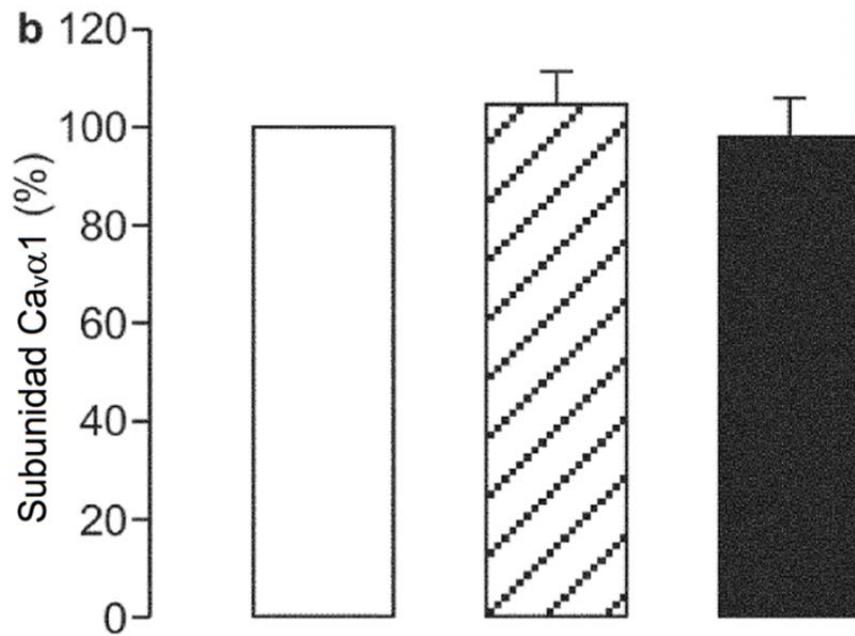


Figura 6

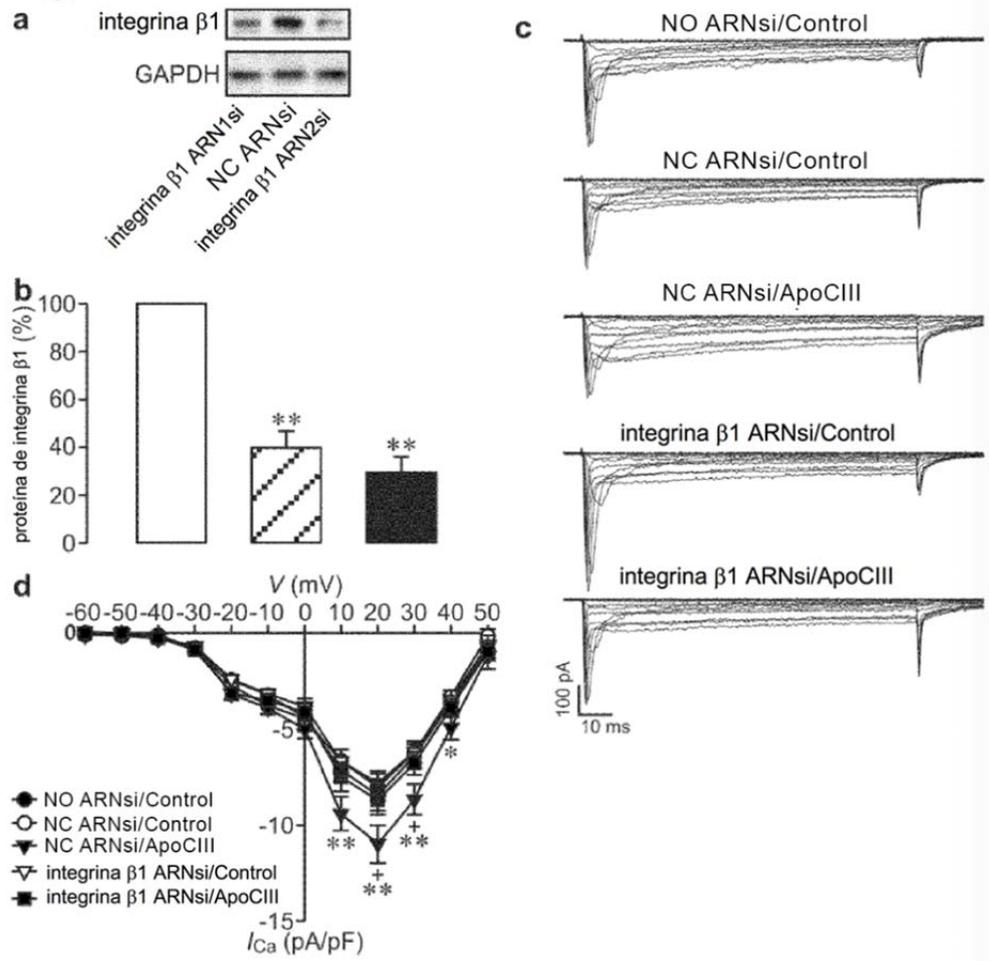


Figura 7

