

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 074**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/357** (2006.01)

**A61K 31/366** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 5/48** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2015 PCT/EP2015/057755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15155303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2015 E 15717842 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3129019**

54 Título: **Uso médico de compuestos de artemisinina y agonistas de gefirina**

30 Prioridad:

**11.04.2014 EP 14164471**

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

**19.03.2020**

73 Titular/es:

**CEMM - FORSCHUNGSZENTRUM FÜR  
MOLEKULARE MEDIZIN GMBH (100.0%)  
Lazarettgasse 14 / AKH BT 25.3  
1090 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**LI, JIN y  
KUBICEK, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 749 074 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

Uso médico de compuestos de artemisinina y agonistas de gefirina

- 5 La invención se refiere a un compuesto de artemisinina, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes para aumentar el nivel de insulina.

## Antecedentes

- 10 Los pacientes con diabetes de tipo 1 con frecuencia pierden todas sus células beta funcionales, como lo indica la ausencia total de péptido C de insulina en su suero. Se ha mostrado que el trasplante de islote pancreático en esencia es curativo, pero está limitado por la disponibilidad de donantes de islotes, por complicaciones inmunológicas y por la supervivencia al trasplante. Por lo tanto, se han realizado intentos para regenerar las células productoras de insulina específicas del paciente utilizando diferentes fuentes tisulares, incluyendo los embriocitoblastos (ES), los hemocitoblastos pluripotentes inducidos (iPS), los hepatocitos, las células exocrinas y las células alfa (Al-Hasani *et al.*, 2013; Collombat *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, los enfoques para aumentar la masa de células beta se han basado en la sobreexpresión de factores de transcripción reguladores maestros involucrados en el desarrollo normal del páncreas, y solo en pocos casos se han usado moléculas pequeñas o productos biológicos. Las células alfa son un punto de inicio particularmente atractivo, puesto que están relacionadas estrechamente con las células beta desde el punto de vista del desarrollo. Se ha demostrado que estas células son capaces de reponer la masa de células productoras de insulina después de una pérdida extrema de células beta. En un modelo genético, la sobreexpresión del factor de transcripción Pax4 puede convertir células alfa de ratón en células beta durante el desarrollo (Collombat *et al.*, 2009) y cuando se activan en la adultez (Al-Hasani *et al.*, 2013). Desde el punto de vista molecular, el factor de células beta Pax4, al reprimir directamente el factor de transcripción regulador maestro de células alfa Arx y la pérdida de Arx sola es suficiente para convertir células alfa en células beta (Courtney *et al.*, 2013).

- Algunos tratamientos antidiabéticos emplean extractos de plantas; se ha informado de más de 800 plantas que tienen efectos antihiper glucémicos con menos efectos adversos y con baja toxicidad en comparación con los compuestos sintéticos. Por ejemplo, la extracción de partes aéreas de *Artemisia indica* se describe por Ahmad *et al.* (2014). Se ha descubierto que las funciones principales de tales extractos se basan en los efectos protectores de tejidos principales, tales como los del riñón, el hígado y el páncreas.

- La artemisinina es un endoperóxido de lactona de sesquiterpeno que se extrae y se aísla de las hojas de *Artemisia annua*, y es bien conocida como un medicamento antipalúdico. La artemisinina y sus derivados se describen en la monografía de la OMS sobre buenas prácticas de agricultura y recolección (GACP) para *Artemisia annua* L. (monografía de la OMS, 2006).

- En un campo completamente distinto, concretamente en el campo de los receptores de GABA (es decir, los receptores del ácido gamma-aminobutírico, denominados GABAR en esta memoria descriptiva) que es un receptor ionotrópico y el canal iónico regulado por ligandos, y su ligando endógeno, que es el ácido gamma-aminobutírico (GABA), los mecanismos de formación de sinapsis GABAérgica y plasticidad, y el papel del receptor de GABA en la regulación de la neurogénesis en adultos fue sometido a investigaciones para entender la función del CNS (Tyagarajan *et al.*, 2010). La gefirina se considera una molécula de andamiaje de la sinapsis inhibitoria y que contribuye a la agrupación de GABAR. Se sabe que las proteínas del dominio BTB interactúan con las ligasas de ubiquitina de la familia Cullin, y son responsables de dirigir las proteínas a un sustrato específico para la ubiquitinación y la degradación subsiguiente. (Stogios *et al. Genome biology* 2005, Genau *et al. Mol. Cell* 2015). Se sabe que los receptores de GABA se ubiquitinan (Arancibia-Cárcamo *et al. PNAS* 2009).

- La patente WO 2012/033266 A1 describe derivados de artemisinina específicos que son derivados híbridos glucolípidos específicos, su actividad antiangiogénica y su uso en la prevención y en el tratamiento de enfermedad angiogénica, entre ellas, la enfermedad angiogénica asociada con la diabetes.

- Davis *et al.* (Br. J. Clin. Pharmacol. 1997, 44(1):1 -7) describen el efecto potencial de los fármacos antipalúdicos en la glucosa en plasma y en la concentración de insulina.

- 55 Suresh *et al.* (*International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2011, 3081) describen las propiedades fitoquímicas y farmacológicas de la *Artemisia pallens*, Walls. Ex DC, comúnmente conocida como Davana, una hierba aromática que se encuentra en India, que se ha usado para el tratamiento de la diabetes *mellitus*.

- 60 Ahmad *et al.* (*Journal of Ethnopharmacology* 2014, 151(1): 618-623) describen la actividad antidiabética de la *Artemisia indica linn* (partes aéreas) en las ratas con diabetes inducida por estreptozocina.

- Ribnicky *et al.* (*International Journal of Pharmaceutics* 2009, 370(1 -2):87-92) describen un extracto antidiabético de *Artemisia dracunculul*.

- 65 Mannan *et al.* (*Archives of Pharmaceutical Research* 2011, 34(10):1657-1661) describen la biosíntesis de artemisinina

en varias especies de *Artemisia*.

La patente WO2014/048788A1 describe la producción de células beta pancreáticas mediante la inhibición de la expresión o la actividad de *Arx* en una población de células alfa pancreáticas.

5 Suckow *et al.* (*Endocrinology* 2008, 149(12):6006-6017) describen la maquinaria exocítica de las células beta pancreáticas y la ruta del desarrollo de células beta.

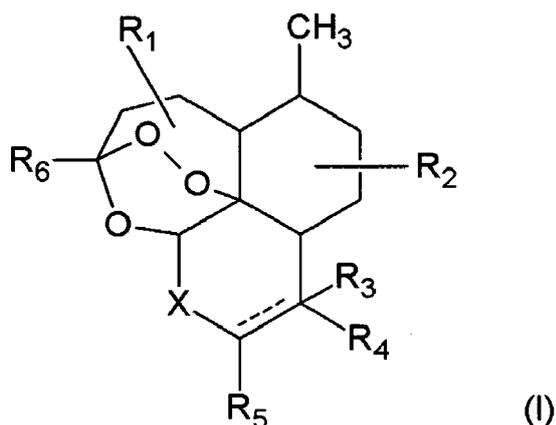
10 La patente WO2014/007853A1 describe la dihidromiricitina para el tratamiento de enfermedades y trastornos del sistema glutamatérgico.

### Sumario de la invención

15 El objetivo de la presente invención es identificar compuestos que tienen un potencial para inducir o mejorar la producción de insulina en células pancreáticas, y que tienen el potencial de ser utilizados como medicamento con base en un modo de acción novedoso.

El objeto se resuelve mediante la materia objeto de la presente invención.

20 De acuerdo con la invención, se proporciona un compuesto de artemisinina para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes, por ejemplo, tal como para aumentar el nivel de insulina, en particular para aumentar el número de células beta, la expresión de insulina o el nivel de insulina en sangre dependiente de glucosa en el paciente, en el que el compuesto de artemisinina es un compuesto de fórmula general I



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

donde

30 es un enlace simple o doble;

35  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ , y  $R_6$  representan independientemente entre sí H, halógeno,  $-\text{CF}_3$ ,  $=\text{CH}_2$ ,  $-\text{OR}^a$ ,  $-\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{COOR}^a$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{CONR}^a\text{R}^a$ , alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alquenido  $\text{C}_{2-6}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-6}$ , cicloalquilo  $\text{C}_{3-7}$ , heteroarilo, arilo o heterocicloalquilo  $\text{C}_{3-7}$ ; y

40  $R_5$  representa H, halógeno,  $=\text{O}$ ,  $-\text{OR}^a$ ,  $-\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{CF}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{CHF}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}^a$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{COOR}^a$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^a$ , alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alquenido  $\text{C}_{2-6}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-6}$ , cicloalquilo  $\text{C}_{3-7}$ , heteroarilo, arilo o heterocicloalquilo  $\text{C}_{3-7}$ ; y

X representa O o  $-\text{NR}^a$ ;

$R^a$  representa H o alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alquenido  $\text{C}_{2-6}$  o alquinilo  $\text{C}_{2-6}$  opcionalmente sustituido; y

45  $R^b$  representa H o un alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alquenido  $\text{C}_{2-6}$ , alquinilo  $\text{C}_{2-6}$ , cicloalquilo, arilo, heteroarilo o aralquilo opcionalmente sustituido; o

$R^a$  y  $R^b$  junto con el átomo de nitrógeno interyacente representan un grupo heterocíclico, donde el átomo heterocíclico es N, O o S; y donde el átomo heterocíclico está opcionalmente sustituido (artemisona); y

50 n es 0, 1, 2 o 3.

Específicamente, el compuesto de artemisinina no es ningún derivado de artemisinina, que es un híbrido con un componente glucolípido.

5 El compuesto de artemisinina se usa específicamente en un método para tratar a un paciente que sufre de diabetes o un trastorno asociado a la diabetes, por ejemplo, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, una diabetes negativa o positiva al péptico C, o trastornos asociados a la diabetes.

10 Específicamente, el compuesto se administra al paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva para aumentar la expresión o el nivel de insulina, en particular, para tratar la hipoinsulinemia, preferiblemente mediante administración sistémica o local.

15 De acuerdo con un aspecto específico, el compuesto se selecciona del grupo compuesto por ácido artelínico, artemetero, artemotil (arteéter,  $\beta$ -arteéter), artenimol (dihidroartemisinina,  $\beta$ -dihidroartemisinina), artemisona y artesunato, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Específicamente, el compuesto está acoplado a una porción de portador o ligando.

20 Realizaciones específicas se refieren al tratamiento en el que el compuesto se administra en una preparación farmacéutica para su uso oral, parenteral, sistémico, mucoso, tópico, rectal, sublingual, bucal o como implante, cuya preparación comprende un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en el que la preparación farmacéutica es una tableta, formulación dérmica o transdérmica, ungüento, gel, crema, loción, parche, solución, inyectable, solución oftálmica, sistema disperso, emulsión, sistema de fármaco microencapsulado, bomba osmótica, implante subdérmico, gránulo, microsfera, sistema de liberación modificada, sistema de liberación dirigida, gránulos o píldora.

25 Según un aspecto específico, el compuesto se administra en una dosis de al menos una vez al día, preferiblemente en una dosis de 0,01–2000 mg/día, preferiblemente 0,1 – 500 mg/día, en una sola dosis o en múltiples dosis, o donde la dosis se proporciona en una formulación o dispositivo de liberación lenta. Tales dosis están indicadas específicamente para administración oral.

30 De acuerdo con una realización específica, el tratamiento se combina con otra terapia antidiabética, preferiblemente tratamiento con un agente antidiabético, preferiblemente cualquiera de insulina, sulfonilureas, incretinas, otros secretagogos, glitazonas, metformina, agonistas de GLP-1 o inhibidores de DPP4, inhibidores de glucosidasa, análogos de amilina, inhibidores de SGLT2, cirugía de derivación gástrica o trasplante de islotes pancreáticos.

35 De acuerdo con otra realización específica, el tratamiento se combina con un fármaco inmunomodulador, incluyendo enfoques basados en vacunas que usan autoantígenos de células beta, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CTLA4, nicotinamida, rapamicina, ciclosporina A, azatiopirina, globulina antitimocito (ATG) o prednisolona.

Específicamente el compuesto se administra en combinación con otro agonista de gefirina o un inhibidor del dominio BTB humano (POZ) que contiene 9 (BTBD9, ID del gen 114781).

45 En la presente memoria descriptiva, se da a conocer además un método para identificar un agente candidato a prototipo que es efectivo para tratar la diabetes en un paciente; comprendiendo el método: cribar uno o más agentes experimentales en un ensayo basado en células, que comprende las etapas de:

50 a) proporcionar una célula alfa pancreática o una célula beta pancreática que sobreexpresa ARX;

b) poner en contacto la célula con un agente experimental; y

c) detectar si el agente experimental

55 i) aumenta la expresión de insulina por dicha célula; y/o

ii) reprime ARX en dicha célula; y/o

60 iii) inhibe la interacción de BTBD9 con CUL3

iv) aumenta el nivel o agrupamiento de gefirina; y/o

v) aumenta la señalización del GABAR mediada por gefirina;

65 identificando de este modo un agente candidato a prototipo para el tratamiento de la diabetes.

Específicamente, el agente experimental se selecciona del grupo compuesto por moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, dominios de proteína, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, aptámeros y ácidos nucleicos, preferiblemente un agente experimental obtenido mediante selección de una biblioteca de agentes experimentales.

5 En la presente memoria descriptiva, también se da a conocer un método para identificar un agente candidato a prototipo para uso médico; comprendiendo el método: cribar uno o más agentes experimentales en un ensayo basado en células, que comprende las etapas de:

10 a) poner en contacto una célula de mamífero con un agente experimental en condiciones que permiten la interacción del agente experimental con BTBD9 o gefirina producida por la célula; y

b) determinar si el agente experimental

15 i) aumenta la estabilidad térmica de BTBD9; y/o

ii) inhibe la unión de BTBD9 a CUL3; y/o

iii) aumenta el nivel o agrupamiento de gefirina; y/o

20 iv) aumenta, mejora, estimula o promueve la unión de gefirina a GABAR; y/o

v) aumenta la señalización del GABAR mediada por gefirina;

25 identificando de este modo un agente candidato a prototipo para su uso médico, en particular para el tratamiento de la diabetes o para su uso como antidiabético.

De acuerdo con la invención, se proporciona además una un agente activo de unión a gefirina o unión a BTBD9, para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes para aumentar el nivel de insulina, donde el agente activo es cualquiera de los compuestos de artemisinina de la invención. Tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva, moléculas pequeñas alternativas pueden cribarse de fuentes apropiadas, por ejemplo, grandes bibliotecas de moléculas pequeñas que emplean ensayos de unión y pruebas funcionales. Tales agentes activos particularmente podrían inhibir BTBD9 para actuar como agonista de gefirina de manera indirecta mediante la inhibición de su degradación al activar funcionalmente la gefirina, o uniéndose directamente a y actuando como agonista de gefirina.

35 Se describe además en la presente memoria descriptiva un producto de combinación farmacéutica que comprende:

a) un agente de unión a BTBD9 o de unión a gefirina, tal como, preferiblemente, un compuesto de artemisinina; y

40 b) un agente antidiabético, tal como, preferiblemente, cualquiera de insulina, sulfonilureas, incretinas, otros secretagogos, glitazonas, metformina, agonistas de GLP-1, inhibidores de DPP4, inhibidores de glucosidasa, análogos de amilina o inhibidores de SGLT2,

y/o

45 c) un fármaco inmunomodulador, que incluye enfoques basados en vacunas que usan autoantígenos de células beta, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-CTLA4, nicotinamida, rapamicina, ciclosporina A, azatiopirina, globulina antitímocito (ATG) o prednisolona.

50 Tal producto de combinación puede proporcionarse específicamente como una mezcla, o como un kit de partes.

## Figuras

Figura 1. Un modelo celular para la transdiferenciación pancreática por PAX4 y ARX. a. Inducibilidad de GFP (control), PAX4 y ARX después de 24 horas de inducción de las construcciones de sobreexpresión marcadas con Myc mediante 1  $\mu$ g/ml de doxiciclina en Min6-tet condicional en líneas celulares. Se usa histona H2B como control de carga. b. Se detectaron proteínas ARX y PAX4 sobreexpresadas mediante inmunoelectrotransferencias con anticuerpos. La sobreexpresión de ARX parece reducir los niveles de PAX4 endógena detectada después de una exposición prolongada. c. Análisis de datos de secuenciación de ARN en estas líneas de células, lo que indica abundancia de transcrito de PAX4 y ARX determinada mediante lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (RPKM). d. Diagrama de Venn que representa cambio significativo en los genes (valor de  $p < 0,05$ ) entre el factor de transcripción inducido y las células inducidas mediante GFP a las 24 horas. e. Los niveles de ARN de Ngn3 se regulan de forma opuesta después de 24 h de sobreexpresión de ARX y PAX4. f. La proteína Ngn3 detectada mediante inmunofluorescencia se regula hacia arriba después de la sobreexpresión de ARX durante 24 h. g. Cambio de expresión de factor de log2 en la expresión de factores endocrinos pancreáticos con la sobreexpresión de Arx durante 65 144 horas, investigado mediante secuenciación de ARN en tres diferentes clones de células solas.

Figura 2. Un cribado de alta capacidad para represores funcionales de ARX a. La sobreexpresión de ARX durante 3 días en células Min6 disminuye los niveles de proteína insulina detectados mediante tinción con inmunofluorescencia. \*,  $p < 0,01$  en comparación con células no inducidas. b. Vista general de los datos de cribado en células Min6 inducidas para sobreexpresar ARX. c. Validación de aciertos del cribado primario mediante tinción con inmunofluorescencia de la línea de células alfa aTC1 para proteína insulina. d. El tratamiento con artemetero aumenta los niveles de proteína insulina en las células TC1 alfa, detectado mediante inmunofluorescencia. \*,  $p < 0,01$  en comparación con el control.

Figura 3. Actividad de artemisininas en células alfa. a. El artesunato también es activo para inducir la expresión de insulina en célula alfa. b. El análogo de artemisina desoxiarteéter que carece de la porción de endoperóxido es inactivo. c. Respuesta a la dosis del artemetero en las células Min6 que sobreexpresan ARX, detectada mediante inmunofluorescencia. d. Respuesta a la dosis del artemetero en la inducción de la expresión de insulina en célula alfa, detectada mediante inmunofluorescencia.

Figura 4. Btd9 y gefirina son dianas de mamíferos de artemisininas a. Vista general del ensayo químico de proteómica. b. Lista de proteínas identificadas con enriquecimiento significativo sobre el experimento de competencia. c. Resultados del artemetero en los cambios en la estabilidad térmica de Btd9 y Cul3 en un ensayo de cambio térmico celular. d. El artemetero reduce la estabilidad térmica de la gefirina en un ensayo de cambio térmico celular.

Figura 5. Las artemisininas inhiben la interacción de Btd9-Cul3, estabilizan la gefirina y activan la señalización de GABA. a. Inmunoelctrotransferencias de gefirina y las subunidades del receptor de GABA en células aTC1 tratadas con artemetero. b. Inmunoelctrotransferencia de GABAR en células TC1 tratadas con artemetero. c. La inmunoprecipitación en lisados de aTC1 identifica el artemetero para inhibir la interacción entre Btd9 y Cul3. d. Análisis de enriquecimiento en grupos de genes de los términos de GO asociados con los genes regulados hacia arriba mediante tratamiento con artemetero de células TC1. e. El artemetero aumenta los niveles de proteína gefirina en células alfa, como se detecta mediante inmunofluorescencia. f. El tratamiento con artemetero aumenta la actividad de sintasa de MoCo de la gefirina. g. El artemetero aumenta la concentración intracelular de cloro. h. El antagonista de GABAR bicuculina inhibe los efectos del artemetero en las células aTC1, detectados mediante inmunofluorescencia. \*,  $p < 0,01$  en comparación con las células tratadas solamente con artemetero. i. El antagonista de GABAR gabazina inhibe los efectos del artemetero en las células aTC1, detectados mediante inmunofluorescencia. \*,  $p < 0,01$  en comparación con las células tratadas solamente con artemetero. j. El agonista de GABAR tiagabina aumenta la producción de insulina en las células aTC1, detectada mediante inmunofluorescencia. \*,  $p < 0,01$  en comparación con el control.

Figura 6. El artemetero induce cambios en el tipo de célula en los islotes pancreáticos humanos. a. Tinción con inmunofluorescencia para insulina y glucagón en los islotes humanos con tratamiento con artemetero y DMSO de control durante 72 horas. b. Cuantificación de gefirina y abundancia del receptor de GABA medida mediante tinción con inmunofluorescencia de islotes humanos después de 72 h de tratamiento con artemetero y DMSO de control. c. Secreción de insulina estimulada por glucosa medida mediante ELISA de sobrenadantes de islotes humanos después de 72 h de tratamiento con artemetero y DMSO de control. d. Cuantificación de células doble positivas a insulina/glucagón en islotes pancreáticos humanos.

Figura 7: Secuencias de cebador

#### Descripción detallada

El término “agente activo” se entiende en la presente memoria descriptiva de la siguiente forma. El agente activo como se describe en la presente memoria descriptiva para su uso médico es particularmente una molécula pequeña de cualquier péptido adecuado, que incluye polipéptidos, proteínas, que incluyen fragmentos de proteínas, tales como dominios de proteína, en particular anticuerpos y fragmentos de anticuerpo o dominios de anticuerpo, proteínas de unión al andamio alternativas, aptámeros y ácidos nucleicos.

Por ejemplo, un agente activo puede ser una molécula que se puede sintetizar mediante las técnicas de química orgánica, o mediante técnicas de biología molecular o bioquímica, y preferiblemente es una molécula pequeña, que puede ser de menos de 5000 Dalton y que puede ser soluble en agua. Un agente activo como se describe en la presente memoria descriptiva puede ser un compuesto de artemisinina y/o particularmente puede mostrar características de interacción selectiva con la gefirina, por ejemplo, similares a la actividad agonista de los compuestos de artemisinina de la invención.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “administración”, incluirá rutas de introducción de un agente activo, tales como un compuesto de artemisinina de la invención, a un sujeto que lo necesita, para realizar su función prevista. Los ejemplos de vías de administración que pueden usarse incluyen administración oral. El agente se puede administrar también por cualquier otra vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión continua o por inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal, vaginal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otro agente terapéutico. La administración puede ser sistémica o local. Se pueden usar diversos sistemas de administración conocidos, que incluyen la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas y cápsulas. Los sistemas de administración específicos emplean

parches para administración tópica, transdérmica o mucosa, o implantes. Las preparaciones o formulaciones preferidas específicamente son preparaciones o formulaciones de liberación lenta y sistemas de administración que proporcionan el tratamiento de acción prolongada.

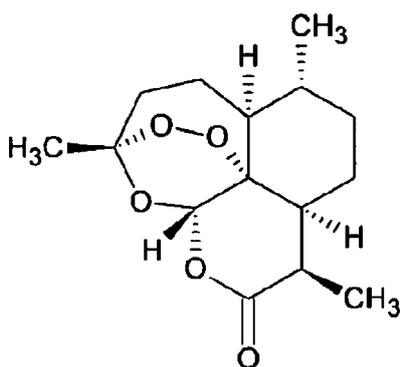
5 Los métodos de administración del agente activo de esta invención incluyen, pero no están limitados a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intracerebral, intravaginal, transdérmico, rectal, por inhalación o tópico. El agente activo se puede administrar solo, o en combinación  
10 o en conjunto con cualquier otro agente o cualquier otro tratamiento terapéutico que se utilice para la indicación, por ejemplo, para tratar pacientes con diabetes. El agente activo se puede administrar antes de la administración del otro agente, simultáneamente con el agente, o después de la administración del agente. Además, el agente activo de la invención también se puede administrar en forma de un profármaco, que se convierte en su metabolito activo, o un metabolito más activo *in vivo*. Un sistema de administración alternativo proporciona el agente activo asociado con, o unido a, una molécula portadora, que por ejemplo está dirigida a un sitio de acción específico. Los sistemas de administración ejemplares emplean compuestos de artemisinina que están unidos a moléculas de unión a hierro y moléculas dirigidas al receptor de célula para la administración selectiva de una cantidad terapéuticamente efectiva  
15 en células diana de la enfermedad; tales moléculas portadoras son para administración dirigida. Ejemplos adicionales se refieren a la administración de conjugados que comprenden al menos dos compuestos de artemisinina o a conjugados con otros agentes, que incluyen por ejemplo, (pro) hormonas o péptidos, tales como el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1).

20 El término "inhibidor" en relación con la actividad de BTBD9, como se usa en la presente memoria descriptiva, se referirá específicamente a un compuesto o un agente capaz de combinarse con (por ejemplo, unirse a, interactuar con) BTBD9 para iniciar acciones farmacológicas, en particular para aumentar el nivel y/o la actividad de la gefirina. La actividad agonista de un agente experimental está probada específicamente por cualquiera de los análisis ejemplares que se describen en la presente memoria descriptiva.

30 El término "agonista" en relación con la gefirina o con la actividad de la gefirina, como se usa en la presente memoria descriptiva, se referirá específicamente a un compuesto o un agente capaz de combinarse con (por ejemplo, unirse a, interactuar con) gefirina para iniciar acciones farmacológicas, por ejemplo, ejercer acción agonista directamente en el nivel o la actividad de gefirina mediante la inhibición de cualquier antagonista, tal como BTBD9. La actividad agonista de un agente experimental está probada específicamente por cualquiera de los análisis ejemplares que se describen en la presente memoria descriptiva.

35 El término "compuesto de artemisinina", como se usa en la presente memoria descriptiva, se referirá específicamente a artemisinina y derivados de artemisinina.

40 La artemisinina ((3*R*,5*aS*,6*R*,8*aS*,9*R*,12*S*,12*aR*)-octahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12*H*-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10(3*H*)-ona) contiene una estructura de anillo 1,2,4-trioxano, y *Artemisia annua*, y se sabe que las especies relacionadas con *Artemisia* son la única fuente natural. Tiene la siguiente estructura:



45 Los derivados de artemisinina se entienden específicamente como endoperóxidos con una variedad de residuos, tales como los que se describen en la fórmula I de la presente memoria descriptiva. Los compuestos ejemplares se seleccionan del grupo compuesto por ácido artelínico, artemetero, artemoil (también denominado arteéter,  $\beta$ -arteéter), artemimol (también denominado dihidroartemisinina,  $\beta$ -dihidroartemisinina) y artesunato o una sal de los mismos, o, análogos de los mismos simplificados o derivados, farmacéuticamente aceptables.

50 Además de los compuestos de artemisinina naturales, se pueden usar derivados semisintéticos o sintéticos, por ejemplo, con solubilidad o biodisponibilidad mejorada. Específicamente, también se pueden usar compuestos sintéticos con una estructura de trioxolano similar, tales como el arterolano.

Los derivados específicos incluyen artemisona, hemisuccinato de dihidroartemisinina, succinato de

5 dihidroartemisinina, glucurónido de dihidroartemisinina, artesunato de sodio, formas estabilizadas de artesunato, formas estabilizadas de artesunato de sodio, dímeros de dihidroartemisinina, derivados de 11-aza-artemisinina, 1,2,4-trioxanos amino-funcionalizados, endoperóxidos de artemisinina, desoxi-artemisininas, espiro y diespiro 1,2,4-trioxolano, compuestos 1,2,4,5-tetraoxano esteroideos mixtos, 1,2,4-trioxanos sustituidos, extractos de *Artemisia annua* o fracciones de tales extractos, derivados de trioxano a base de artemisinina, seco-artemisininas, compuestos dímeros de trioxano, conjugados de ácido artelínico, arteéteres de dihidroartemisinina, artemisinina o derivados de artemisinina, compuestos de trioxano similares a artemisinina sustituidos con C-10 átomos de carbono, trioxanos de alfa arteéter solubles en agua, dímeros de artemisinina, (+)-desoxoartemisinina y análogos de (+)-desoxoartemisinina, y derivados 10-sustituidos de dihidroartemisinina, así como también sus sales u otros derivados de las mismas, como los conoce un experto en la técnica.

10 Se pueden obtener derivados específicos mediante dimerización u oligomerización, con o sin usar un enlazante, conjugación con otras porciones, tales como péptidos, portadores o agentes de administración, que incluyen moléculas dirigidas al receptor, combinación con quelantes que se unen a iones metálicos.

15 El término “diabetes” como se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende específicamente como una enfermedad o trastorno asociado con la diabetes *mellitus*, independientemente de la génesis, incluidos específicamente la diabetes de tipo I y de tipo II, diabetes negativa y positiva al péptido C, y trastornos asociados, que incluyen la cetoacidosis diabética, el estado hiperosmolar hiperglucémico, la cardiomiopatía diabética, la nefropatía diabética, la encefalopatía diabética, la neuropatía diabética, la retinopatía diabética, la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad vascular periférica, la mionecrosis diabética, el accidente cerebrovascular, el coma diabético y la obesidad.

20 La diabetes *mellitus* de tipo I (también denominada diabetes juvenil) es una forma de diabetes *mellitus* que es el resultado de la destrucción autoinmunitaria de las células beta productoras de insulina en el páncreas. La diabetes *mellitus* de tipo II, que tiene tanto el tipo dependiente de insulina como no dependiente de insulina, aparece típicamente en una etapa tardía en la vida de una persona como resultado de la predisposición genética, la dieta inadecuada, la falta de ejercicio o una combinación de los mismos. Ambas formas de diabetes *mellitus* alteran la capacidad del organismo para absorber y metabolizar la glucosa en sangre, lo que lleva a niveles elevados de glucosa en sangre.

30 Crónicamente, los niveles altos de glucosa en sangre pueden aumentar el riesgo de trastornos asociados a la diabetes, tales como complicaciones vasculares a largo plazo, por ejemplo, enfermedad coronaria, ataque cardíaco, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, ceguera, disfunción eréctil, neuropatía (pérdida de sensación, especialmente en los pies), gangrena y gastroparesia (vaciamiento gástrico retardado). El control inadecuado de la glucosa en sangre también aumenta el riesgo de complicaciones a corto plazo después de una cirugía, por ejemplo, una curación deficiente de la herida.

35 El péptido de conexión, o péptido C, es una proteína corta de 31 aminoácidos que conecta la cadena A de la insulina con su cadena B en la molécula proinsulina. A los pacientes con diabetes recién diagnosticada con frecuencia se les miden los niveles de péptido C como medio para distinguir la diabetes de tipo I y la diabetes de tipo II.

40 Realizaciones específicas de la invención se refieren al tratamiento de la diabetes, en particular diabetes tipo I o II, o diabetes negativa al péptido C, o un trastorno asociado con un aumento en el nivel de la glucosa en sangre, por ejemplo, que incluye los trastornos resistencia a la insulina y metabólicos, como cualquiera de los trastornos asociados a la diabetes, como se mencionó anteriormente, u obesidad en un paciente que sufre de diabetes o del respectivo trastorno. Tal tratamiento antidiabético emplea específicamente una preparación farmacéutica de cualquiera de los compuestos de artemisinina de la invención.

45 El término “prototipo molecular” con respecto a un agente activo o a un agente candidato es ampliamente conocido en la técnica, y se referirá a que un agente fue seleccionado para desarrollar un producto farmacéutico, porque su potencial fue probado mediante algunos análisis, sin embargo, será necesario caracterizarlo adicionalmente mediante pruebas adicionales e investigaciones (preclínicas o clínicas) para confirmar su idoneidad para usarlo como fármaco.

50 Los agentes experimentales típicamente se caracterizan mediante sistemas de ensayo apropiados si se utilizan como agente activo adecuado para su uso médico.

55 Típicamente, si el agente candidato inhibe BTBD9 o interactúa con la gefirina, de tal forma que actúa como agonista de su actividad o produce un aumento en la expresión de insulina por una célula pancreática, por ejemplo, como se determina en un sistema de ensayo que se describe en la presente memoria descriptiva adicionalmente en comparación con la actividad o la expresión en ausencia del agente candidato, ese agente candidato se caracteriza como “agente candidato a prototipo” Además, el agente candidato a prototipo se puede validar usando un ensayo capaz de demostrar actividades y propiedades ventajosas para determinar su potencial para su uso como agente terapéuticamente activo.

60 Tales análisis pueden ser cualitativos, cuantitativos o semicuantitativos.

65 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “sujeto” se referirá a un mamífero de sangre caliente,

particularmente a un ser humano o a un animal mamífero no humano, que incluyen perros, gatos, monos, cerdos, ovejas y caballos. En particular, el uso médico de la invención o el método de tratamiento respectivo se aplica a un paciente que necesita profilaxis o tratamiento de una condición de enfermedad (que incluye una enfermedad o trastorno asociado con dicha enfermedad). El sujeto puede ser un paciente que sufre de una enfermedad, que incluye una enfermedad en etapa temprana o en etapa tardía. El término "paciente" incluye a sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico. El término "tratamiento" se pretende por tanto que incluya tanto tratamiento profiláctico como terapéutico.

Un sujeto, por ejemplo, se trata por profilaxis o terapia de la diabetes o trastornos asociados a la diabetes. Por tanto, las realizaciones específicas se refieren al tratamiento de pacientes que sufren de diabetes.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere, por ejemplo, a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son adecuadas para su uso en contacto con o en seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas, u otros problemas o complicaciones, conmensurado con una relación beneficio/riesgo razonable.

El agente activo de la invención puede ser formulado, por ejemplo, en una cantidad efectiva con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables generalmente incluyen cualquier solvente, medio de dispersión, recubrimiento, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción adecuados, y similares, que sean compatibles fisiológicamente con un agente activo o una composición o combinación relacionada proporcionada por la invención. Ejemplos adicionales de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también combinaciones de cualesquiera de los mismos.

En un aspecto de este tipo, se puede combinar un agente activo con uno o más portadores apropiados para una vía de administración deseada, los agentes activos, por ejemplo, mezclados con cualquiera de lactosa, sacarosa, almidón, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, acacia, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirolidina, alcohol polivinílico, y opcionalmente, se pueden formar tabletas o se puede encapsular para su administración convencional.

Formulaciones de ejemplo que se usan para administración parenteral incluyen inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, por ejemplo, una solución o suspensión estéril. Formulaciones para aplicación tópica incluyen un número de formas, tales como cremas o ungüentos, parches, pastas y geles.

Portadores farmacéuticamente aceptables preferidos incluyen vehículos, como azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa, almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata, celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa, o polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol, u otros diluyentes y excipientes conocidos en la técnica que se emplean en formulaciones farmacéuticas. Ejemplos adecuados de portadores líquidos para administración oral y parenteral incluyen agua, en particular contienen aditivos como los anteriores, por ejemplo, derivados de celulosa, que incluyen solución de carboximetil celulosa de sodio, alcoholes, que incluyen alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos y sus derivados, y aceites. Excipientes aceptables fisiológicamente pueden ser solución salina, gelatina, almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizadores, espesantes, lubricantes y colorantes.

El/los agente(s) activo(s) también se pueden formular para proporcionar liberación prolongada o controlada del ingrediente activo que se usa en los mismos, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, recubrimientos en múltiples capas, micropartículas, liposomas, microesferas o una combinación de los mismos, para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. El agente activo también puede estar en forma microencapsulada, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Por ejemplo, se proporciona una cantidad efectiva en una formulación farmacéuticamente aceptable, que proporciona administración prolongada del compuesto de la invención a un sujeto al menos durante 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de que se administra la formulación farmacéuticamente aceptable al sujeto.

En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas con formulación de liberación lenta son adecuadas para administración mucosa, mediante bolos o implantes subcutáneos, tópica u oral, a un sujeto, que incluye comprimidos, pastillas, formas bucales, tabletas, suspensiones o soluciones acuosas o aceitosas, gránulos, polvos, pastas, emulsiones, cápsulas, jarabes, elixires, formulaciones liposómicas, conjugados de fármaco y polímero o formulaciones en nanopartículas.

Se conocen portadores farmacéuticamente aceptables y composiciones farmacéuticas adicionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento *Remington's pharmaceutical sciences*.

Se contemplan composiciones farmacéuticas específicas en las que se formulan un agente activo, tal como un compuesto de compuesto de artemisinina de la presente invención, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y opcionalmente uno o más agentes adicionales activos terapéuticamente. Se preparan formulaciones estables del agente activo para almacenamiento mezclando dicho agente que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “cribado” se referirá a la identificación de un agente candidato que pasa específicamente una prueba de cribado, por ejemplo, para inhibir la actividad de BTBD9 o actuar como agonista de la actividad de la gefirina, lo que indica que el agente candidato es un agente activo terapéutico potencial que puede ser útil en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como la diabetes. Por ejemplo, los ensayos de cribado que se describen en la presente memoria descriptiva son útiles para identificar un agente candidato a prototipo de una pluralidad de agentes experimentales. De acuerdo con un aspecto específico dado a conocer en la presente memoria descriptiva, se proporciona un ensayo de unión directa que determina la interacción de un agente experimental con la gefirina.

La capacidad de un agente experimental para unirse a o para interactuar con BTBD9 o con gefirina se puede medir mediante cualquier método para detectar/medir una interacción proteína/proteína u otra interacción compuesto/proteína. Métodos específicos para identificar un agente que es capaz de unirse a BTBD9 o a la gefirina son aquellos en los que el BTBD9 o la gefirina se expone al agente y cualquier unión del agente a la gefirina se detecta y/o se mide. Se puede determinar la constante de unión para la unión del agente a BTBD9 o a la gefirina. Métodos adecuados para detectar y/o medir (cuantificar) la unión de un agente a BTBD9 o a la gefirina son ampliamente conocidos en la técnica y se pueden poner en práctica, por ejemplo, usando purificación conjunta, ELISA, inmunoprecipitación conjunta, calorimetría de titulación isotérmica, fluorometría de barrido diferencial (Thermofluor), polarización de fluorescencia, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, ensayos de proximidad de destello y métodos de resonancia plasmónica de superficie, y específicamente un método capaz de operación de alto rendimiento, por ejemplo, un método basado en chip.

Métodos adicionales para detectar interacciones polipéptido/polipéptido incluyen ultrafiltración con métodos de espectroscopía de masas con pulverización iónica/HPLC u otros métodos físicos y analíticos. También se pueden usar, por ejemplo, métodos de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), en los cuales la unión de dos entidades marcadas con fluorescencia se puede medir al medir la interacción de las marcas fluorescentes cuando estén en proximidad cercana entre sí.

De acuerdo con un aspecto específico, la actividad de BTBD9 se determina mediante medición de la unión de BTBD9 a CUL3 por coimmunoprecipitación, usando un anticuerpo contra BTBD9 y detectando la cantidad de CUL3 unido con un anticuerpo primario que reconoce específicamente CUL3, ya sea marcado directamente con una fluorófora u otra molécula apropiada generadora de señal (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa) o detección indirecta con un anticuerpo secundario marcado de manera similar. Como alternativa, la inmunoprecipitación se realiza con un anticuerpo contra CUL3 y detectando la cantidad de BTBD9 unido con un anticuerpo primario que reconoce específicamente BTBD9, ya sea marcado directamente con una fluorófora u otra molécula apropiada generadora de señal (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa) o detección indirecta con un anticuerpo secundario marcado de manera similar. Métodos alternativos de detección incluyen cuantificación inmunoquímica o espectrométrica de masas de la misma interacción de unión. Un método alternativo adicional incluye el marcado directo de gefirina con proteína verde fluorescente u otra fluorófora codificada celularmente o de otro modo una marca fácilmente detectable mediante inactivación de la secuencia codificadora en el *locus* endógeno de gefirina, el marcado de CUL3 con otra fluorófora y la detección de la interacción mediante transferencia de energía de resonancia de Förster. Un método alternativo adicional incluye la cuantificación de la interacción de BTBD9 y CUL3 mediante resonancia plasmónica de superficie, calorimetría isotérmica o métodos biofísicos equivalentes.

El enlazante BTBD9 (por ejemplo, los compuestos de artemisinina como se describen en la presente memoria descriptiva) inhibirían específicamente la interacción entre BTBD9 y la ligasa de ubiquitina E3 CUL3, impidiendo la ubiquitinación y la degradación subsiguiente de la gefirina. De este modo, estos compuestos actúan como inhibidores de BTBD9, pero indirectamente también como agonistas de gefirina, puesto que ellos producen un aumento en los niveles de la proteína gefirina.

De acuerdo con otro aspecto específico, el nivel o agrupamiento de la gefirina se determina midiendo la cantidad y la ubicación intracelular de la gefirina en un ensayo de inmunofluorescencia usando un anticuerpo primario que reconoce específicamente la gefirina, ya sea marcado directamente con una fluorófora u otra molécula apropiada generadora de señal (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa) o detección indirecta con un anticuerpo secundario marcado de manera similar. Métodos de detección alternativos incluyen cuantificación inmunoquímica o espectrométrica de masas de la gefirina en lisados generados a partir de células enteras o fracciones específicas con membrana enriquecida. Un método alternativo adicional incluye el marcado directo de gefirina con proteína verde fluorescente u otra fluorófora codificada celularmente o de otra manera una marca fácilmente detectable mediante inactivación de la secuencia codificadora en el *locus* endógeno de gefirina.

De acuerdo con otro aspecto específico, el aumento, mejora, estimulación o promoción de unión de gefirina a GABAR se determina de la siguiente forma: usando coinmunoprecipitación, anticuerpos antigefirina se usan para inmunoprecipitar la gefirina, y el receptor de GABA asociado se mide mediante inmunoelctrotransferencia o ELISA. Métodos alternativos incluyen el uso de proteínas marcadas y la detección mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, FRET, o ensayos alternativos, por ejemplo, LUMIERE.

De acuerdo con otro aspecto específico, el aumento de la señalización mediada por gefirina del GABAR se determina de la siguiente forma: Directamente midiendo el flujo de iones de cloro resultante en la célula con el uso, por ejemplo, de colorantes sensibles al cloro, por ejemplo, éster de N-(6-metoxiquinolil)-acetoetilo (MQAE) o indirectamente mediante medición electrofisiológica del potencial de la membrana de las células o los cambios intracelulares resultantes en la expresión génica.

Ensayos ejemplares para probar la actividad de agonista de gefirina de un agente experimental se basan en la determinación de su actividad para

i) aumentar la estabilidad térmica de BTBD9; y/o

ii) inhibir la unión de BTBD9 a CUL3; y/o

iii) aumentar el nivel o agrupamiento de la gefirina; y/o

iv) aumentar, mejorar, estimular o promover la unión de la gefirina a GABAR; y/o

v) aumentar la señalización mediada por gefirina del GABAR;

Tales ensayos son, por ejemplo, ensayos de unión directa, ensayos de tinción por inmunofluorescencia, métodos inmunoquímicos, métodos biofísicos o métodos electrofisiológicos.

Por ejemplo, en los ejemplos que siguen se describe con detalle un ensayo de unión adecuado.

Los agentes experimentales específicos se pueden cribar por su potencial de uso para el tratamiento de la diabetes. Por lo tanto, se pueden usar pruebas de cribado específicas que son ensayos basados en células. Los ensayos ejemplares para probar la actividad antidiabética de un agente experimental se basan en su actividad para expresar insulina en una célula pancreática, particularmente, una célula alfa o una célula beta que sobreexpresa ARX, para determinar si el agente experimental

i) aumenta la expresión de insulina por dicha célula; y/o

ii) reprime ARX en dicha célula; y/o

iii) inhibe la unión de BTBD9 a CUL3; y/o

iv) aumenta el nivel o agrupamiento de gefirina; y/o

v) aumenta la señalización mediada por gefirina del GABAR.

Por ejemplo, en los ejemplos que siguen se describe con detalle un ensayo de expresión de insulina adecuado.

Opcionalmente, el método de cribado dado a conocer en la presente memoria descriptiva puede incluir repetir las etapas del método de una prueba, por ejemplo, en un cribado de alta capacidad. Por este medio, se puede probar una pluralidad de agentes candidatos para identificar un agente candidato a prototipo para su uso médico.

Por ejemplo, se pueden usar bibliotecas químicas combinatorias o bibliotecas químicas, que incluyen colecciones de diversos compuestos químicos generados o bien por síntesis química o bien por síntesis biológica, por ejemplo, bibliotecas químicas combinatorias lineales, tales como bibliotecas de polipéptidos o péptidos, como fuente de agentes experimentales. Se pueden seleccionar miembros de tal biblioteca, especies o subclases químicas, que presenten una actividad característica deseada, por ejemplo, capaz de unirse de forma agonista a la gefirina, o aumentar la expresión de insulina en las células pancreáticas (en un ensayo *in vitro* o *ex vivo*).

Se aprecia que la identificación de un agente que se une o que interactúa con BTBD9 o gefirina puede ser una etapa inicial en una ruta de cribado de fármaco, y el agente identificado se puede caracterizar y seleccionar, además, por ejemplo, por la capacidad para actuar como agonista de la actividad de gefirina. Por lo tanto, el método dado a conocer en la presente memoria descriptiva puede incluir además someter a ensayo un agente candidato a prototipo en un ensayo de actividad para determinar si el agente candidato a prototipo podría cumplir los requisitos para ser un agente terapéuticamente activo.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “cantidad efectiva” se pretende que signifique que cantidad de un compuesto que es suficiente para tratar, prevenir o inhibir tales enfermedades o trastorno. En el contexto de la enfermedad, cantidades efectivas terapéuticamente de un agente activo como se describe en la presente memoria descriptiva, se usan específicamente para prevenir, tratar, modular, atenuar, revertir o afectar a una enfermedad o condición que se beneficia de una interacción del agente activo con componentes celulares o moléculas, por ejemplo, que incluyen interacciones con BTBD9 o gefirina, y específicamente la diabetes. El término incluye específicamente cantidades efectivas, tanto terapéuticamente, como profilácticamente.

El término “cantidad efectiva profilácticamente” se refiere específicamente a una cantidad de un agente activo, que es efectiva, con la administración al paciente de una sola dosis o de múltiples dosis, para prevenir o tratar una enfermedad o un trastorno.

La cantidad del agente activo que corresponderá a una cantidad efectiva de este tipo variará dependiendo de diversos factores, tales como el fármaco o el compuesto administrado, la formulación farmacéutica, la vía de administración, el tipo de enfermedad o trastorno, la identidad del sujeto o el huésped que se está tratando, y similares, pero, sin embargo, puede ser determinada rutinariamente por un experto en la técnica.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente activo que es un compuesto de artemisinina como se describe en la presente memoria descriptiva, tal como el que se proporciona a un paciente humano que lo necesita, puede estar específicamente en el intervalo de 0,01 a 2000 mg/día, preferiblemente de 0,1 a 500 mg/día, en una sola dosis o en múltiples dosis. Realizaciones específicas se refieren a formulaciones o dispositivos de liberación lenta, que se pueden emplear ventajosamente para administrar el agente activo durante un periodo de tiempo prolongado, tal como para el tratamiento de enfermedad crónica, por ejemplo, un tratamiento al menos durante 2 semanas, al menos 3 semanas o al menos 4 semanas. En una realización específica, una formulación de liberación lenta proporciona un nivel en sangre de un compuesto de artemisinina que está en el intervalo de 0,01 a 500 mg/día constantemente durante el periodo de tratamiento completo. En otra realización específica, tales concentraciones se alcanzan intermitentemente, por ejemplo, en una pauta posológica repetida de 1 semana con tratamiento, 1 semana sin tratamiento. En otra realización, la formulación específica origina el enriquecimiento selectivo del agente activo en el páncreas o en los islotes pancreáticos en ausencia de niveles de sangre detectables.

Una pauta posológica de tratamiento o prevención de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva del principio activo de la presente invención puede consistir en una sola administración, o como alternativa, puede comprender una serie de aplicaciones. Por ejemplo, el agente activo se puede administrar al menos una vez al año, al menos una vez en un semestre o al menos una vez al mes. Sin embargo, en otra realización, el agente activo se puede administrar al sujeto desde aproximadamente una vez por semana hasta aproximadamente una administración diaria para un tratamiento dado. La longitud del periodo de tratamiento depende de una variedad de factores, tales como la gravedad de la enfermedad, ya sea enfermedad aguda o crónica, la edad del paciente, la concentración y la actividad del agente activo. También se apreciará que la posología efectiva utilizada para el tratamiento o profilaxis puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento o una pauta posológica de profilaxis particular. Los cambios en la posología pueden resultar y hacerse evidentes mediante ensayos estándar de diagnóstico conocidos en la técnica. En algunos casos, se puede requerir la administración crónica.

Las propiedades biológicas del compuesto de artemisinina o del agente activo y las preparaciones farmacéuticas de la invención se pueden caracterizar *ex vivo* en experimentos en células, tejido y en el organismo entero. Como se sabe en la técnica, con frecuencia los fármacos se prueban *in vivo* en animales, que incluyen, pero no se limitan a los mismos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, con el fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o un modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, la farmacodinamia, la toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Se puede hacer referencia a los animales como modelos de enfermedad. Con frecuencia la terapéutica se prueba en ratones, que incluyen pero no se limitan a los mismos, ratones desnudos, ratones SCID, ratones diabéticos no obesos (NOD), ratones con xenoinjerto y ratones transgénicos (que incluyen los que tienen inserción génica y los inactivados). Tal experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial de un agente activo para su uso como terapéutico o como profiláctico. Se puede usar cualquier organismo, preferiblemente los mamíferos, para la prueba. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los primates, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y por consiguiente se pueden usar para probar la eficacia, la toxicidad, la farmacocinética, la farmacodinamia, la semivida, u otra propiedad del agente o composición deseado. Por último, se requieren pruebas en humanos para su aprobación como fármacos, y por consiguiente estos experimentos están contemplados. Así, el agente activo y las composiciones farmacéuticas respectivas de la presente invención se pueden probar en humanos para determinar su eficacia terapéutica o profiláctica, la toxicidad, la inmunogenicidad, la farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

De acuerdo con la invención, agentes activos preferidos, tales como los compuestos de artemisinina de molécula pequeña, son aquellos compuestos disponibles comercialmente que se han usado en terapia antipalúdica o antiviral para un fin distinto, como arteéter; artemotil; artemetero; artemisona; artesunato; artemisinina; artemisiteno; ácido artelínico; 9-epi-artemisinina; dihidroartemisinina; dímero de dihidroartemisinina; glucuronido de dihidroartemisinina; 3,6,9-trimetildecahidro-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*j*]isocromen-10-ol; (3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-decahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12H-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10(3H)-ona, octahidro-3,6,9-

trimetil-, (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-  
 ol; 3,12-Epoxi-12H-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10(3H)-ona, octahidro-3,6,8-trimetil-, (3R,5aS,6R,8R,12S,12aR)-;  
 3,12-Epoxi-12H-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10-ol, decahidro-3,6,9-trimetil-, (3S,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-;  
 (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-Decahidro-10-etoxi-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12H-pirano[4,3-*j*]-1,2-  
 5 benzodioxepina; 3,12-Epoxi-12H-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepina, 10-fluorodecahidro-3,6,9-trimetil-,  
 (3R,5aS,6R,8aS,9R,10R,12S,12aR)-; 3,12-Epoxi-12H-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10-ol, decahidro-10-d-3,6,9-  
 trimetil-, (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-(9CI); ácido 4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-  
 trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanoico; éster 1-  
 [(3R,5aS,6R,8aS,9R,10R,12R,12aR)-decahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12H-pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10-il]  
 10 de ácido butanodioico; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-  
*i*]isocromen-10-il 4-(isobutilamino)-4-oxobutanoato; succinato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il  
 ((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il);  
 oxalato de N,N-Dimetil-N-[2-[(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetilperhidro-3,12-epoxipirano[4,3-*j*]-1,2-  
 benzodioxepin-10-iloxi]etil]amina; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 15 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-oxo-4-((1-feniletil)amino)butanoato; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-  
 3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((4-metoxibencil)amino)-4-oxobutanoato;  
 ácido 6-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-  
*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)hexanoico; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 20 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((ciclohexilmetil)amino)-4-oxobutanoato;  
 (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-  
 ((furan-2-ilmetil)amino)-4-oxobutanoato; ácido 2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-  
 trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)propanoico;  
 (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((4-  
 fluorofenil)amino)-4-oxobutanoato; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 25 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((2,2-dimetoxietil)amino)-4-oxobutanoato;  
 (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((4-  
 hidroxifenil)amino)-4-oxobutanoato; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((4-metoxifenil)amino)-4-oxobutanoato;  
 (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-oxo-  
 30 4-((piridin-4-ilmetil)amino)butanoato; ácido 3-hidroxi-2-(4-(4-oxo-4-(((5aS,6R,12S)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)butanamido)butanoico;  
 (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((2-  
 (1H-indol-3-il)etil)amino)-4-oxobutanoato; ácido 4-((4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-  
 trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)metil)benzoico; ácido 4-(4-oxo-4-  
 35 (((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-  
 il)oxi)butanamido)-3-fenilbutanoico; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((2-(1H-imidazol-5-il)etil)amino)-4-oxobutanoato; (5aS,6R,12S)-3,6,9-  
 trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-((4-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-4-  
 oxobutil)amino)-4-oxobutanoato; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 40 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-oxo-4-((tetrahidrofuran-2-il)metil)amino)butanoato; ácido 3-(1H-indol-3-il)-  
 2-(4-(4-oxo-4-  
 (((5aS,6R,12S)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-  
 il)oxi)butanamido)butanamido)propanoico; ácido 4-(metiltilio)-2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-  
 trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)butanoico; ácido 5-amino-5-oxo-  
 45 2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-  
*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)pentanoico; ácido 2-((S)-4-metil-2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-  
 3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)pentanamido)acético; ácido  
 (S)-3-metil-2-(4-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 50 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)butanamido)butanoico; éster 4-[[2-(3,4-  
 dihidroxifenil)etil]amino]-4-oxo-, (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-decahidro-3,6,9-trimetil-3,12-epoxi-12H-  
 pirano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin-10-ílico de ácido butanoico; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-  
 trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-(((S)-3-(1H-indol-3-il)-1-metoxi-1-oxopropan-2-  
 il)amino)-4-oxobutanoato; ácido (S)-2-((S)-4-metil-2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-  
 trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido) pentanamido)propanoico; ácido  
 (S)-2-((S)-4-metil-2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 55 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido) pentanamido)pentanodioico; ácido (S)-3-metil-2-((S)-4-  
 metil-2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-  
*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)pentanamido)butanoico; ácido (S)-2-((S)-4-metil-2-(4-oxo-4-  
 (((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-  
 il)oxi)butanamido) pentanamido)-3-fenilpropanoico; ácido (S)-4-metil-2-((S)-4-metil-2-(4-oxo-4-  
 60 (((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-  
 il)oxi)butanamido) pentanamido)pentanoico; ácido 3-(2,2-dimetiltetrahidro-2H-piran-4-il)-3-(4-oxo-4-  
 (((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-  
 il)oxi)butanamido) propanoico; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-  
 epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il 4-(((S)-1-((4-hidroxifenil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)amino)-4-  
 65 oxobutanoato; ácido (R)-3-mercapto-2-((S)-4-metil-2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-  
 trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-*i*]isocromen-10-il)oxi)butanamido)pentanamido)propanoico; ácido

(2S,3R)-3-metil-2-((S)-4-metil-2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-i]isocromen-10-il)oxi)butanamido)pentanamido)pentanoico; ácido (S)-3-(1H-indol-3-il)-2-((S)-4-metil-2-(4-oxo-4-(((3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-i]isocromen-10-il)oxi)butanamido)pentanamido)propanoico; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-i]isocromen-10-il 4-(((S)-1-(((S)-1-etoxi-3-(4-hidroxifenil)-1-oxopropan-2-il)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)amino)-4-oxobutanoato; (3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-3,6,9-trimetildecahidro-3H-3,12-epoxi[1,2]dioxepino[4,3-i]isocromen-10-il 4-(((S)-1-(((S)-3-(1H-indol-3-il)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)amino)-4-oxobutanoato; o derivados funcionales de los mismos con actividad antidiabética probada.

Tal como se describe en la presente memoria descriptiva, se pueden sintetizar derivados funcionales adicionales de artemisinina o de cualquiera de los compuestos específicos de artemisinina descritos en la presente memoria descriptiva, o se pueden identificar mediante tecnología de cribado apropiada empleando un ensayo de unión a BTBD9, unión a gefirina o actividad agonista de gefirina o actividad inhibidora de BTBD9.

También son agentes activos preferidos, que imitan la estructura de un compuesto de artemisinina o de otro compañero que se une a la gefirina, o los que son ligandos específicos de gefirina, como anticuerpos o fragmentos de anticuerpo agonistas.

En una realización de la invención, el agente activo es el único agente terapéuticamente activo que se administra a un sujeto, por ejemplo, como monoterapia para modificar o prevenir una enfermedad.

En otra realización, el agente activo está combinado con agentes activos adicionales en un combinado de medicamentos, por ejemplo, combinado en una mezcla o kit de partes, de tal forma que el combinado de medicamentos contiene más de un agente terapéuticamente activo que se administra a un sujeto, por ejemplo, como terapia de combinación para modificar o prevenir una enfermedad.

Específicamente, el agente activo también se puede administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos distintos, que incluyen pero no se limitan al tratamiento estándar para tratar la misma indicación diana, por ejemplo, agentes activos para tratar la diabetes, que incluyen cualquiera de insulina, sulfonilureas, incretinas, otros secretagogos, glitazonas, metformina, agonistas de GLP-1 o inhibidores de DPP4, inhibidores de glucosidasa, análogos de amilina, inhibidores de SGLT2, cirugía de derivación gástrica o trasplante de islote pancreático.

En una terapia de combinación, el agente activo se puede administrar como una mezcla, o concomitantemente con una o más pautas posológicas terapéuticas, por ejemplo, o bien antes, o bien simultáneamente o bien después de la terapia concomitante.

Ejemplos de compuestos antidiabéticos activos farmacéuticamente incluyen insulina, sulfonilureas, otros secretagogos, glitazonas, metformina u otras biguanidas, agonistas de GLP-1 o inhibidores de DPP4, otras incretinas, inhibidores de glucosidasa, análogos de amilina, inhibidores de SGLT2, cirugía de derivación gástrica o trasplante de islote pancreático. La presente invención se refiere además a kits que comprenden el agente activo de la invención y fármacos, utilizados para terapia de combinación.

El agente activo de la invención y el otro compuesto activo farmacéuticamente se pueden administrar al sujeto en la misma composición farmacéutica o en distintas composiciones farmacéuticas, por ejemplo, al mismo tiempo o en momentos distintos.

El término "deficiencia de MoCo" se refiere a enfermedad por carencia de sulfito oxidasa, deshidrogenasa/oxidasa xantina, aldehído oxidasa o cualquier enzima adicional cuya actividad requieren la presencia y un nivel suficiente de cofactor molibdeno, independientemente de la génesis. El diagnóstico de deficiencia de MoCo incluye, pero no se limita a ellas, accidentes cerebrovasculares tempranos, niveles bajos de ácido úrico en sangre, y niveles altos de sulfito, xantina y ácido úrico en orina.

El término "epilepsia del lóbulo temporal" se usa para describir la epilepsia recurrente que se origina en el lóbulo temporal. El lóbulo temporal es una región de la corteza cerebral que está localizada detrás de la fisura lateral en ambos hemisferios cerebrales del cerebro de los mamíferos. La epilepsia es un trastorno del cerebro caracterizada por una predisposición duradera para generar accidentes cerebrovasculares epilépticos y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta condición. La definición de epilepsia requiere la ocurrencia de al menos un accidente cerebrovascular epiléptico.

La deficiencia de MoCo es una enfermedad hereditaria producida por la mutación en MCOS1, MCOS2 o gefirina, que lleva a la ausencia de actividad de xantina deshidrogenasa/oxidasa y aldehído oxidasa (Reiss y Johnson, 2003). Se ha informado de unos cuantos casos de deficiencia de MoCo y solamente se ha curado un paciente hasta ahora. Debido a que no hay terapias aprobadas disponibles para la deficiencia de MoCo, el artemetero, debido a su efecto agonista del artemetero sobre la gefirina, tiene el potencial de convertirse en el medicamento sin interés comercial para tratar la deficiencia de MoCo.

Estudios recientes revelan el papel único de la gefirina en la epilepsia de lóbulo temporal. Se detectó un nivel bajo de gefirina en pacientes con epilepsia del lóbulo temporal, así como también en un modelo experimental en ratón, y estos podrían deberse a la división inadecuada del ARNm de la gefirina (Forstera *et al.*, 2010). Con base en nuestro estudio, el tratamiento con artemetero puede aumentar la estabilidad de la gefirina tanto en las células de ratón como en las humanas. Estos resultados muestran la posibilidad de involucrar el artemetero en los tratamientos contra la epilepsia del lóbulo temporal.

En un aspecto adicional dado a conocer en la presente memoria descriptiva, se proporciona un método para identificar un agente activo adecuado para el tratamiento antidiabético. Los ensayos funcionales involucran el uso *ex vivo* de células pancreáticas, por ejemplo, células alfa o células beta pancreáticas que sobreexpresan ARX, para probar si el agente experimental

i) aumenta la expresión de insulina por dicha célula; y/o

ii) reprime ARX en dicha célula; y/o

iii) inhibe la unión de BTBD9 a CUL3; y/o

iv) aumenta el nivel o agrupamiento de gefirina; y/o

v) aumenta la señalización mediada por gefirina del GABAR.

Métodos para determinar la interacción de BTBD9 o la interacción de gefirina, por ejemplo, la actividad agonista de gefirina *in vitro*, incluyen purificación conjunta, ELISA, inmunoprecipitación conjunta, calorimetría de titulación isotérmica, fluorometría de barrido diferencial (Thermofluor), polarización de fluorescencia, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, ensayos de proximidad de destello y métodos de resonancia plasmónica de superficie, y específicamente un método capaz de operación de alto rendimiento, por ejemplo, un método basado en chip.

Los compuestos también se pueden modelar por ordenador para dar o en la estructura cristalina de BTBD9 o de gefirina. Una vez que se identifican los compuestos moduladores potenciales, los compuestos se pueden cribar mediante ensayos celulares *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los compuestos identificados de esta forma son útiles como análogos de los agentes activos preferidos de la invención.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Tales ejemplos son, sin embargo, meramente representativos de los métodos para poner en práctica una o más realizaciones de la presente invención y no se deben leer como limitantes del alcance de la invención.

#### Ejemplo

#### **Materiales y Métodos**

##### *Reactivos*

Los anticuerpos usados en este proyecto son la insulina (*Sigma* 18510), el glucagón (*Sigma* G2654), Pax4 (*R&D* AF2614, lote n.º UZYO110121), Pax4 (*Santa Cruz* 98942, lote n.º H1610), Arx (*R&D* AF7068, lote n.º CFOM0211121), Myc (*Cell Signaling Technology* CST2276, lote 19), Histona H2B (*Cell Signaling Technology* CST2934, lote 1), gefirina (*Abeam*, ab25784), gefirina (*Synaptic Systems*, 147 111), Cul3 (*Abeam*, ab75851), Btd9 (*Abnova*, H00114781 -D01), Btd9 (*Abeam*, ab174976). El artemetero y los cebadores se obtuvieron de *Sigma*. Las secuencias de cebadores se indican en la figura 7. Anticuerpo de burro- $\alpha$ -conejillo de indias marcado con Cy-3 de *Jackson ImmunoResearch*. Todos los otros anticuerpos marcados fluorescentemente se compraron en *Life Technologies Corporation*. Todos los anticuerpos marcados con HRP se compraron en *Jackson Lab*.

##### *Cultivo celular*

Se cultivaron líneas celulares pancreáticas de ratón  $\alpha$ TC1 (proporcionadas por *Novo Nordisk*) y  $\beta$ TC3 (proporcionadas por *Novo Nordisk*) en DMEM bajo en glucosa complementado con 10 % de FBS, 50U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomycin. Se cultivaron líneas celulares pancreáticas de ratón Min6 (proporcionadas por *Novo Nordisk*) con una construcción inducible por doxiciplina, en DMEM con alto en glucosa complementado con 15 % de FBS aprobado por *Tet System (Clontech* 631106), 71  $\mu$ M 2-mercaptoetanol, 50U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomycin. El cultivo celular de islotes humanos cumplió con los protocolos establecidos (Walpita *et al.*, 2012).

##### *Cribado de alta capacidad*

Se transfirieron compuestos (50 nl) a una placa con 384 pocillos adecuados para óptica negra (*Corning* 3712) de placas madre con DMSO mediante transferencia acústica (*Labcyte Inc.*). Se colocaron en placas células Min6 (3000

células por pocillo) en 50 µl de medio sobre los compuestos. Tres días después del tratamiento, se fijaron las células en formaldehído al 3,7 % durante diez minutos a temperatura ambiente. Después del lavado con PBS, se fijaron las células con metanol puro frío a -20 °C durante 10 minutos, permeabilizado mediante Triton X-100 al 1 % en PBS durante 30 minutos y bloqueado mediante BSA al 3 % en PBS durante 30 minutos. Se agregaron veinte microlitros de anticuerpo primario antinsulínico, diluido en 1 :2000 en BSA al 1,5 %, por pocillo, y se incubaron a 4 °C durante la noche. Después de lavado con PBS dos veces, se añadieron 20 µL de anticuerpo de burro- $\alpha$ -conejillo de indias marcado con Cy-3 diluido en 1 :1000 y 10 µg/ml de *Hoechst* 3342 en PBS en cada pocillo, y se incubó durante 1 h. Después de dos lavados con PBS, se almacenaron las placas a 4 °C en la oscuridad hasta su análisis.

Se tomaron imágenes con un microscopio automatizado (*Perkin Elmer Operetta*) usando un objetivo 20X. Las imágenes se expusieron durante 10 ms en el canal de *Hoechst* y 500 ms en el canal 548 de *Alexa Fluor*. Las imágenes se analizaron con el software *Harmony* (*Perkin Elmer*). Se identificaron núcleos (Método C *Harmony*) y se definió el citoplasma con base en los núcleos (Método C *Harmony*). En total se cribaron 1152 pocillos que contenían 280 compuestos de una colección de fármacos aprobados clínicamente con estructura única (CeMM, Viena, Austria) por triplicado con los pocillos de control. Se seleccionaron los aciertos con base en la intensidad de la insulina en el canal 548 de *Alexa Fluor* y los números de células en el canal de *Hoechst*.

#### Secuenciación de ARN

Después de la incubación con o sin doxiciclina durante 24, 72 y 144 horas, se lisaron las células y se aisló el ARN con el mini kit *RNeasy* (*Qiagen*) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se preparó la biblioteca para la secuenciación de ARN con el kit *Ribo-zero* y el kit *Scriptseq v2* (*Epicenter*) o mediante preparación de biblioteca automática robótica totalmente automática. La secuenciación profunda se hizo en la instalación de secuenciación biomédica en CeMM. Los datos en bruto se alinearon y se cuantificaron mediante *Tophat* y *Bowtie 2.0*.

#### RT-qPCR

Después se aisló el ARN con el mini kit *RNeasy* (*Qiagen*), se transcribió inversamente con cebadores aleatorios usando el kit para transcripción inversa cDNA de alta capacidad (*Applied Biosystems*). Se realizó una PGR cuantitativa con *Power SYBR Green PGR Master Mix* (*Applied Biosystems*) en la máquina para qPCR *Lightcycler 480* (*Roche*).

#### Inmunoelectrotransferencia

Se generaron extractos de células enteras mediante el lisado de células en tampón NP-40 que contenía 150 mM de cloruro de sodio, 1,0 % de NP-40 y 50 mM de Tris, pH 8,0, complementado con un combinado de medicamentos de inhibidor de proteasa (*Roche*). El lisado de células enteras (30 µg) se cargó en un gel de SDS-poliacrilamida para electroforesis con 30 mA por gel, y luego se transfirió mediante electroforesis a una membrana de nitrocelulosa (*GE Healthcare Life Science*). Todas las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en 1 :1000 en 5 % de leche a 4 °C durante la noche y con anticuerpos secundarios marcados con HRP (diluidos 1 :20000) durante 1 h. Las señales se detectaron usando el reactivo para detección con inmunoelectrotransferencia *ECL Prime* (*Amersham*).

#### Proteómica química

Se registraron espectros de NMR en un equipo *Bruker Avance III 400* (*Bruker, Billerica, MA, EE.UU.*). Los cambios químicos se dan en ppm, y las constantes de acoplamiento se dan en hercios. Los espectros de masas se registraron usando un sistema *XeVo-UPLC-TQ-MS* (*Waters, Milford, MA, EE.UU.*). Se realizó una purificación mediante cromatografía instantánea de columna (FCC) usando gel de sílice 60 (*Merck, Darmstadt, Alemania*), se realizó una MPLC en un sistema *Biotage Isolera* (*Biotage, Uppsala, Suecia*). Se determinó la pureza de los compuestos sintetizados y se confirmó mediante análisis con UPLC.

Todas las sustancias químicas para la síntesis se adquirieron en *Sigma-Aldrich* y se usaron sin purificación adicional.

Se prepararon matrices de afinidad del fármaco esencialmente como se describió previamente (Huber *et al.*, 2014). En resumen, se agregó etilendiamina (2,7 µl, 40 µmol), etanolamina (9,7 µl, 160 µmol), y trietilamina (15 µl, 108 µmol) a 500 µl de perlas *Sepharose 4 Fast Flow* activadas con NHS (*GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia*) y la reacción se colocó en un agitador giratorio durante 24 h. Se lavaron y se resuspendieron las perlas en DMSO y se añadió artesunato activado por NHS (100 µl, 1,00 µmol) a la suspensión, y la mezcla se puso en un agitador giratorio durante 24 h. Se bloquearon las perlas que no reaccionaron mediante la adición de NHS-acetato (10 µmol) y trietilamina (25 µl, 180 µmol), seguido por agitación en un agitador giratorio durante 24 h. Después de lavado con DMSO y tampón para lisis, se incubaron perlas con lisados de células.

Se realizaron cromatografía por afinidad y elución por duplicado como se informó previamente (Huber *et al.*, 2014), usando 10 mg de lisado de células total como entrada de proteína por réplica.

65

Después de la elución, se redujeron las proteínas enriquecidas con ditriitol, se alquilaron residuos de cisteína mediante incubación con yodoacetamida y las muestras se digirieron con tripsina porcina modificada (*Promega, Madison, WI*). Se purificó el tres por ciento (y múltiplos del mismo) de los eluidos digeridos, y se concentró mediante material con C18 en fase inversa para el análisis subsiguiente duplicado mediante cromatografía de líquidos unidimensional sin gel-espectrometría de masas (1D-LCMS). Detalles de la metodología de LCMS se describieron previamente.

La extracción pico y la conversión de archivos RAW al formato MGF para la identificación de proteína subsiguiente se hizo con *msconvert (ProteoWizard Library v2.1.2708)*. Se realizó una búsqueda inicial en la base de datos con una tolerancia de masas más amplia para recalibrar las listas de masa para la identificación final óptima de proteína. Para la búsqueda inicial en la base de datos de proteína, se usó *Mascot*, versión 2.3.02 (*Matrix Science Ltd., Londres, Reino Unido*). Las tolerancias de error en los iones del precursor y fragmento fueron  $\pm 10$  ppm y  $\pm 0,6$  Da, respectivamente, y la búsqueda en la base de datos se limitó a péptidos totalmente tripticos con un máximo de 1 división omitida, oxidación de carbamidometil cisteína y metionina se estableció como modificación fija y variable, respectivamente. El umbral de resultados de ion péptido de *Mascot* se estableció en 30, y se requerían al menos 3 identificaciones de péptido por proteína. Se realizaron búsquedas contra la liberación en la base de datos *humanos UniProtKB/SwissProt* de 2012-05, que incluye todas las isoformas de proteína.

Las identificaciones iniciales del péptido se usaron para deducir transformaciones lineales independientes para las masas de fragmento y precursor que podrían minimizar la desviación cuadrática media de las masas medidas con respecto al valor teórico. Se buscó en los archivos la lista de masas recalibradas contra la misma base de datos de proteína humana mediante una combinación de los motores de búsqueda *Mascot* y *Phenyx (GeneBio, SA, versión 2.5.14)* usando tolerancias de masas más estrechas ( $\pm 4$  ppm y  $\pm 0,3$  Da). Se permitió un sitio de corte triptico omitido. Se estableció la carbamidometil cisteína como una modificación fija y la metionina oxidada se estableció como una modificación variable. Para validar las proteínas, se procesaron los archivos producidos por *Mascot* y *Phenyx* mediante analizadores desarrollados internamente. Las proteínas con  $\geq 2$  péptidos únicos sobre una puntuación T1, o con un solo péptido sobre una puntuación T2 se seleccionaron como identificaciones no ambiguas. También se aceptaron péptidos adicionales para estas proteínas validadas con puntuación  $>T3$ . Se usaron los siguientes umbrales en las búsquedas con *Mascot*: T1 =14, T2=40 y T3=10; los umbrales en *Phenyx* se establecieron en 4,2, 4,75 y 3,5, respectivamente (valor de  $p < 10^{-3}$ ). Las proteínas validadas recuperadas mediante los dos algoritmos se combinaron, se descartó cualquier conflicto espectral y se agruparon de acuerdo con los péptidos compartidos. Se determinó una tasa de descubrimientos falsos (FDR) de  $< 1$  % para las identificaciones de proteína y  $< 0,1$  % para los péptidos (que incluyen las exportadas con menores puntuaciones) mediante la aplicación del mismo procedimiento contra una base de datos de secuencias de proteína revertidas.

Se filtraron los enlazantes no específicos de la coimmunoprecipitación de fármacos usando el software *SAINT* (versión 2.3.4) usando conteos espectrales de proteína como una medida de abundancia de proteína y comparando los datos de un experimento de coimmunoprecipitación real contra los del control negativo, *SAINT* calcula la probabilidad de que una proteína víctima sea un elemento interactuante cebo real. También comparamos las probabilidades con *SAINT* con el factor de reducción del conteo espectral con la competencia del compuesto libre que representa una magnitud del efecto. El factor de reducción se calculó como la proporción de la mediana de los conteos espectrales observada en las coimmunoprecipitaciones con/sin competencia. En cada condición, estuvieron disponibles 4 conteos espectrales para la mediana (2 réplicas biológicas y 2 técnicas para cada uno).

#### Ensayos de desplazamiento térmico celular

Se realizaron ensayos de desplazamiento térmico celular como se describe en la bibliografía (Martinez Molina *et al. Science* 2013). De forma resumida, se calentaron lisados de células alfa hasta las temperaturas indicadas en el intervalo de 40 a 64 grados Celsius y se retiraron las proteínas precipitadas mediante centrifugación. Se usaron los sobrenadantes en un análisis de inmunoelectrotransferencia que se analizaron para los niveles de Btbd9 (*Abeam*), Cul3 y gefirina (*Synaptic System*) con anticuerpos específicos.

#### Coimmunoprecipitación

Se usaron lisados de células alfa tratados previamente con artemetero o con DMSO de control, y se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo específico dirigido contra Btbd9 (*Abnova*). Se inmovilizaron los complejos de anticuerpos en perlas de proteína A *Dynabeads*, se lavaron y se eluyeron con tampón para carga que contenía SDS. Se estimaron las cantidades de proteína unidas mediante comparación con las muestras de entrada con 5 %. Se usó inmunoelectrotransferencia con un anticuerpo específico dirigido contra CUL3 para determinar la interacción entre BTBD9 y CUL3.

#### Métodos estadísticos

Todos los valores de  $p$  se calcularon mediante la prueba  $t$  de Student, a menos que se especifiquen otros métodos. El enriquecimiento en los términos de la ontología génica se realizó con *Gorilla*.

## Resultados

Para discriminar los efectos de la sobreexpresión de Pax4 y Arx autónomos de las células de los fenotipos que requieren señalización paracrina y endocrina en un microambiente de islote, diseñamos la línea de células beta de ratón Min6 para permitir la sobreexpresión inducible de PAX4, ARX o GFP de control (figura 1a y figura 1b). En estas líneas de células se midieron los cambios en la expresión génica inducidos por la sobreexpresión del factor de transcripción para uno (figura 1c), tres, y seis días. Más de 800 genes fueron regulados de forma opuesta por PAX4 y ARX en el punto de tiempo inicial de 24 h, lo que indica la regulación directa por los dos factores (figura 1d). De modo interesante, el factor progenitor endocrino Ngn3 estuvo entre los genes más regulados diferencialmente por los dos factores de transcripción. Aunque la sobreexpresión de PAX4 reprimió Ngn3, la sobreexpresión de ARX activó temporalmente este factor (figura 1e y 1f). Una explicación posible de la activación de Ngn3 es que las células beta adquieren mayor plasticidad tras la sobreexpresión de ARX. Además, la inducción de ARX reprimió Pax4 después de 24 h y activó la transcripción de varios genes de células alfa, incluyendo el glucagón en el último punto de tiempo de 6 días (figura 1g). Estos cambios son indicativos de que nuestro sistema modela fielmente el cambio de destino de beta a alfa con la sobreexpresión de ARX que previamente solo se observó en modelos en animales. De este modo, hemos generado un sistema celular que permite un cribado de alta capacidad y alto contenido para los represores funcionales de ARX. Para identificar tales compuestos, indujimos la expresión de ARX al mismo tiempo que añadimos compuestos y luego medimos los niveles de insulina después de 72 horas. En las muestras de control tratadas con DMSO observamos una disminución del 50 % en los niveles de insulina en comparación con las células no inducidas (figura 2a). Luego cribamos una biblioteca de 280 moléculas pequeñas aprobadas clínicamente, seleccionadas por su diversidad estructural y objetivo. Los compuestos resultantes se seleccionaron por su capacidad para mantener niveles de insulina altos, incluso en la presencia de ARX mientras que no afectan la viabilidad celular (figura 2b). De modo interesante, dos artemisininas, el artemetero y la dihidroartemisinina, están entre los mejores resultados, que inhiben totalmente el fenotipo de sobreexpresión de ARX. Estos son los únicos compuestos resultantes que también inducen la expresión de insulina y Pax4 en las células alfa pancreáticas, según lo que predicen los inhibidores funcionales de ARX (figura 2c, d). En base a estos resultados, investigamos los efectos de otros análogos de artemisinina en las células alfa y beta. Aunque el artesunato presenta efectos similares (figura 3a), los análogos que carecen de la porción de endoperoxido como el desoxiartemetero no mostraron ningún efecto en la expresión de insulina en las células alfa (figura 3b). Un ensayo de dosis-respuesta indicó concentraciones efectivas máximas medias inferiores a 1  $\mu\text{M}$  en células Min6 que sobreexpresaron ARX (figura 3c) e inferiores a 10  $\mu\text{M}$  en células alfa (figura 3d).

Pese a que se usan ampliamente en el tratamiento de la malaria, el mecanismo molecular de acción de las artemisininas no está claro. Se han propuesto distintas dianas moleculares, entre ellas la oxidación de hierro en eritrocitos humanos y la inhibición de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de reticulina endoplasmática de *Plasmodium SERCA* (O'Neill *et al.*, 2010). Además, se observan efectos potentes de estos compuestos en las células de mamífero, y se han descrito las artemisininas como agentes antiinflamatorios y anticancerosos. El efecto de las artemisininas aisladas en el páncreas no se ha evaluado aún, pero existe evidencia limitada de los efectos positivos de los extractos de *Artemisia* en pacientes humanos y en modelos animales de diabetes de tipo 1 (Ahmad *et al.*, 2014). Para identificar el mecanismo molecular de acción de las artemisininas en las células alfa pancreáticas, usamos un enfoque de proteómica química. Acoplamos artesunato, un ingrediente activo de la artemisinina en las células alfa y en las células beta que sobreexpresan Arx, para un soporte sólido, y se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación en presencia y en ausencia del artemetero que compite libremente (figura 4a). Se identificó la gefirina mediante espectrometría de masas como el principal interactuador específico, y presentó un fuerte enriquecimiento de las ligasas de ubiquina E3, incluyendo CUL3 y su supuesto adaptador de sustrato Btd9 (figura 5b). Luego usamos el ensayo de desplazamiento térmico celular (Martinez Molina *et al. Science* 2013) para confirmar estos factores como interactores de artemisininas. Típicamente, la interacción con una molécula pequeña estabiliza las proteínas para despliegue térmico, y observamos tal estabilización para BTBD9 después del tratamiento con artemetero (figura 4c). En contraste, la gefirina se desestabiliza (figura 4d). La gefirina ejerce diferentes funciones, incluyendo la actividad enzimática en la síntesis del cofactor molibdeno MoCo, la regulación de la señalización de mTOR a través de la interacción con RAFT1 y papales estructurales en el transporte de los receptores de GABA y glicina hacia la membrana. En una línea de células alfa observamos un aumento dependiente de la dosis de los niveles de proteína gefirina después del tratamiento con artemisinina mediante inmunoelectrotransferencia e inmunofluorescencia (figura 5a y figura 5e). Esta observación sugiere un aumento de la estabilidad de la gefirina mediado por la artemisinina. En concordancia, observamos una mayor capacidad de síntesis de MoCo en los lisados tratados con el compuesto (figura 5f). En concordancia con el aumento en los niveles de gefirina y en la agrupación, también observamos mayores concentraciones de ion cloruro (figura 5g) y en la ocupación de la membrana del receptor de GABA (figura 5b). Para ver si las alteraciones en el sistema de ubiquitinación Cul3-Btd9 podrían ser responsables de una mayor estabilidad de la gefirina, realizamos experimentos de coimmunoprecipitación. Observamos una fuerte interacción de BTBD9 con CUL3 que fue bloqueada totalmente mediante la adición de artemetero (figura 5c).

Los experimentos de secuenciación de ARN de las células alfa subrayaron aún más los efectos del artemetero en la señalización del receptor GABA. El análisis de enriquecimiento del conjunto génico identifica el proceso de transmisión sináptica entre las rutas modificadas significativamente, y observamos una regulación hacia arriba de los genes Nrnx3, Sv2b y Shc3 en la ruta (figura 5d). De modo interesante, se ha propuesto GABA como un factor que puede revertir la diabetes mediante la inducción de proliferación de células beta (Soltani *et al.*, 2011). Para probar que la señalización del receptor de GABA juega un papel en el mecanismo de acción de las artemisininas en las células alfa pancreáticas,

combinamos el artemetero con bicuculina (figura 5h) o con gabazina (figura 5i), dos antagonistas del receptor de GABA. La presencia de antagonistas del receptor de GABA inhibió los efectos del artemetero en las células TC1. De manera importante, el tratamiento de tiagabina, un agonista de GABAR, también aumentó la expresión de insulina en las células alfa (figura 5j). Para caracterizar la importancia de nuestro hallazgo para la biología humana, examinamos los efectos del artemetero en los islotes pancreáticos primarios humanos. En concordancia con los hallazgos en las líneas de células de ratón, observamos aumento en los niveles de proteína gefirina y un aumento en la tinción de la membrana para el receptor de GABA (figura 6b). El tratamiento de 3 días con artemetero aumentó la secreción de insulina (figura 6b) y el número de células doble positivas que expresaron tanto insulina como glucagón (figura 6 a,d). En el nivel de expresión génica, los cultivos de islotes tratados con artemetero en general redujeron drásticamente la expresión de los factores de células alfa ARX y PPY, mientras que hay una expresión ligeramente aumentada de factores de células beta, incluidos PAX6 y PAX4.

El tratamiento de combinación con artemisinina es el tratamiento de elección para el paludismo, y se dispensan anualmente más de 300 millones de tratamientos. A pesar de esta gran cohorte de pacientes, no se han publicado datos clínicos sobre los efectos de las artemisininas en la función endocrina pancreática humana, y por varias razones, estos pueden haber pasado desapercibidos hasta ahora. La condición potencialmente mortal aguda de los pacientes infectados con *Plasmodium* junto con la propensión conocida de la infección por *Plasmodium* a hacer que la hipoglucemia haga que los niveles de glucosa sean sumamente variables en el corto plazo. Además, en los individuos sanos, no se espera que incluso un aumento drástico en el número de células beta produzca un fenotipo, puesto que ellos solamente segregan insulina de forma regulada por la glucosa. Desafortunadamente, actualmente no hay ningún método de toma de imágenes disponible para evaluar directamente la masa de células beta humanas. El sujeto ideal para estudiar los efectos de la artemisinina en la función pancreática podría ser un paciente con diabetes de tipo 1 con una completa ausencia de péptido C de insulina detectable, una condición que afecta aproximadamente al 60 % de los pacientes con D T1 o a uno de cada 1500 niños. Actualmente estamos tratando de obtener muestras de sangre de dichos pacientes, quienes adicionalmente están infectados por la malaria y reciben tratamiento con terapias de combinación con artemisinina. Si las artemisininas también inducen la transdiferenciación, esperamos tener la capacidad de detectar el péptido C en muestras de sangre después del tratamiento, pero no en muestras tomadas en el diagnóstico.

El ciclo de tratamiento corto, los efectos negativos del *Plasmodium* o de otros fármacos en tratamiento de combinación o los niveles de artemisinina en el páncreas todavía podrían limitar la utilidad clínica en este escenario. Sin embargo, incluso en ese caso, nuestros hallazgos abren avenidas completamente nuevas para el descubrimiento de fármacos hacia un tratamiento para la diabetes de tipo 1 mediante la transdiferenciación de células alfa en beta. Estos podrían incluir estabilizadores de gefirina estructuralmente distintos, pero también compuestos que apunten a otros actores en la ruta de señalización del receptor de GABA.

#### Referencias

Ahmad, W., Khan, I., Khan, M.A., Ahmad, M., Subhan, F., y Karim, N. (2014). *Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic activity of Artemisia indica linn (aerial parts) in Streptozotocin induced diabetic rats. J Ethnopharmacol.* 151: 618-623.

Al-Hasani, K., Pfeifer, A., Courtney, ., Ben-Othman, N., Gjernes, E., Vieira, A., Druelle, N., Avolio, F., Ravassard, P., Leuckx, G., et al. (2013). *Adult Duct-Lining Cells Can Reprogram into beta-like Cells Able to Counter Repeated Cycles of Toxin-Induced Diabetes. Dev Cell* 26, 86-100.

Arancibia-Cárcamo, I.L., Yuen, E.Y., Muir, J., Lumb, M.J., Michels, G., Saliba, R.S., Smart, T.G., Yan, Z., Kittler, J.T., Moss, S.J..(2009). *Ubiquitin-dependent lysosomal targeting of GABA(A) receptors regulates neuronal inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:17552-17557. Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., Madsen, O.D., Serup, P., Heimberg, H., y Mansouri, A. (2009). *The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. Cell* 138, 449-462.

Courtney, M., Gjernes, E., Druelle, N., Ravaud, C, Vieira, A., Ben-Othman, N., Pfeifer, A., Avolio, F., Leuckx, G., Lacas-Gervais, S., et al. (2013). *The Inactivation of Arx in Pancreatic alpha-Cells Triggers Their Neogenesis and Conversion into Functional beta-Like Cells. PLoS Genet* 9, e1003934.

Forstera, B., Belaidi, A.A., Juttner, R., Bernert, C, Tsokos, M., Lehmann, T.N., Horn, P., Dehnicke, C, Schwarz, G., y Meier, J.C. (2010). *Irregular RNA splicing curtails postsynaptic gephyrin in the cornu ammonis of patients with epilepsy. Brain* 133, 3778-3794.

Genau, H.M., Huber, J., Baschieri, F., Akutsu, M., Dötsch, V., Farhan, H., Rogov, V., Behrends, C. (2015). *CUL3-KBTBD6/KBTBD7 Ubiquitin Ligase Cooperates with GABARAP Proteins to Spatially Restrict TIAM1 -RAC1 Signaling. Mol Cell* 57:995-1010.

Huber, K et al. (2014) *Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as anticancer strategy. Nature*, 508, 222-227.

Martinez Molina, D., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E.A., Dan, C, Sreekumar, L., Cao, Y, Nordlund, P. (2013) *Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay*. *Science*. 341, 84-7.

5 O'Neill, P.M., Barton, V.E., y Ward, S.A. (2010). *The molecular mechanism of action of artemisinin-the debate continues*. *Molecules* 15, 1705-1721.

Pagliuca, F.W., y Melton, D.A. (2013). *How to make a functional beta -cell*. *Development* 140, 2472-2483.

10 Reiss, J., y Johnson, J.L. (2003). *Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic genes MOCS1, MOCS2, and GEPH*. *Hum Mutat* 21, 569-576.

15 Soltani, N., Qiu, H., Aleksic, M., Glinka, Y., Zhao, F., Liu, R., Li, Y., Zhang, N., Chakrabarti, R., Ng, T., et al. (2011). *GABA exerts protective and regenerative effects on islet beta cells and reverses diabetes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 1 1692-1 1697.

Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J., Nandra, S.K., Prive, G.G. (2005). *Sequence and structural analysis of BTB domain proteins*. *Genome Biol*. 6: R82.

20 Tyagarajan, S.K., y Fritschy, J.M. (2010). *GABA(A) receptors, gephyrin and homeostatic synaptic plasticity*. *J Physiol*. 588, 101 -106.

25 Walpita, D., Hasaka, T., Spoonamore, J., Vetere, A., Takane, K.K., Fomina-Yadlin, D., Fiaschi-Taesch, N., Shamji, A., Clemons, P.A., Stewart, A.F., et al. (2012). *A human islet cell culture system for high-throughput screening*. *J Biomol Screen* 17, 509-518.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., y Melton, D.A. (2008). *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells*. *Nature* 455, 627-632.

30 **Lista de secuencias**

<110> CeMM - Forschungszentrum fuer Molekulare Medizin GmbH

35 <120> USO MÉDICO DE COMPUESTOS DE ARTEMISININA Y AGONISTAS DE GEFIRINA

<130> CM004P

<160> 50

40 <170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

50 <400> 1

gtcaagcagc accttggg ttcc

24

<210> 2

<211> 20

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

60 <400> 2

acaatgccac gcttctgctg

20

<210> 3

65 <211> 22

<212> ADN

ES 2 749 074 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 3	
	tccaccacca ccttccagct ca	22
	<210> 4	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 4	
	aattccttct ccagctccag	20
20	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 5	
30	gccgctggac ccggagaatg	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 6	
40	gccgggtgac cttgcgtacc	20
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 7	
50	taaccgcaga ggtcacactc ag	22
	<210> 8	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 8	
	ctcgaactg tggcatcccg a	21
	<210> 9	
65	<211> 22	
	<212> ADN	

ES 2 749 074 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 9	
	tgctggtgtt gatggagtgg ag	22
	<210> 10	
10	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 10	
	ggtaaagtg gaaggtgtcc tc	22
20	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 11	
30	ggtgggaatg ggtcagaagg ac	22
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 12	
40	ggccacacgc agtcattgt	20
	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 13	
	aggtatctaa tggctgtgtg agc	23
	<210> 14	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 14	
	gacacactgg gagcctgtgc	20
	<210> 15	
65	<211> 20	
	<212> ADN	

ES 2 749 074 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 15	
	tggaactgacc ctcgctctat	20
	<210> 16	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 16	
	tgtctcaggg ctggatctct	20
20	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 17	
30	ctctctgtgg cactgaacca	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 18	
40	ggactggacc aaggtgttg	20
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 19	
	agaaggctgg ggctcattg	20
	<210> 20	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 20	
	aggggcatc cacagtcttc	20
	<210> 21	
65	<211> 20	
	<212> ADN	

# ES 2 749 074 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 21 ctcaggggcc ttggacatc	20
	<210> 22	
10	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 22 caggcagtcg cagttttcac	20
20	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador	
	<400> 23 ctgtctggcg gcaccacat	20
30	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 24 gcaactaagt catagtccgc	20
40	<210> 25 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 25 ggcaatgcgg ctgcaa	16
	<210> 26 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 26 gggtaccac gggaatcac	19
	<210> 27 <211> 20 <212> ADN	
65		

ES 2 749 074 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 27 tgggaacaag agggcatctg	20
	<210> 28	
10	<211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 28 ccaccactgc atcaaattca tg	22
20	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 29 aatgccaaag cagagaagga	20
30	<210> 30 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 30 ctgcagtgtg cggtttctaa	20
40	<210> 31 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 31 cagatcactg tccttctgcc atgg	24
	<210> 32	
55	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador	
	<400> 32 gtccacaat gccacgcttc	20
65	<210> 33 <211> 24 <212> ADN	

ES 2 749 074 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 33	
	tccagatcat tctcagcttc ccag	24
	<210> 34	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 34	
	ccttctctgg cctttacca	20
20	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 35	
	gctgtcctgc cgctccagt	20
30	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 36	
40	cgttctcggg gtgcatagc	20
	<210> 37	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 37	
	tgtccacctg cgtggctctg tt	22
	<210> 38	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 38	
	tataagtcca gcgggctgag	20
	<210> 39	
65	<211> 20	
	<212> ADN	

ES 2 749 074 T3

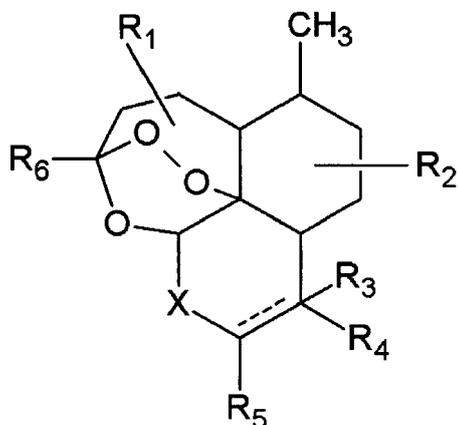
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 39 cctttcccat ggatgaagtc	20
	<210> 40	
10	<211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 40 ttcaacatga cagccagctc	20
20	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador	
	<400> 41 agttggcact tctcgctctc	20
30	<210> 42 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 42 ttcagcaagg aggaggtcat	20
40	<210> 43 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 43 atgaggctgg acttgaccga gg	22
	<210> 44 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 44 aactgcccgc tccgaggaaa	20
	<210> 45 <211> 21 <212> ADN	
65		

ES 2 749 074 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 45	
	tccatcagac ccaggcaat c	21
	<210> 46	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 46	
	taggtgccc tggcaccgaa	20
20	<210> 47	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 47	
30	ctgggtggtg agccaattaa aagc	24
	<210> 48	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 48	
40	tggtaggcca acccaatcat	20
	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 49	
	gtgagggtct ggtttccaa	20
	<210> 50	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 50	
	aggtgggtg tcactcagac	20

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de artemisinina para su uso en el tratamiento de un paciente con diabetes para aumentar el nivel de insulina, en el que el compuesto de artemisinina es un compuesto de fórmula general I



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

10 donde:

— es un enlace simple o doble;

15  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ , y  $R_6$  representan independientemente entre sí H, halógeno,  $-\text{CF}_3$ ,  $=\text{CH}_2$ ,  $-\text{OR}^a$ ,  $-\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{COOR}^a$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{CONR}^a\text{R}^a$ , alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alqueno  $\text{C}_{2-6}$ , alquino  $\text{C}_{2-6}$ , cicloalquilo  $\text{C}_{3-7}$ , heteroarilo, arilo o heterocicloalquilo  $\text{C}_{3-7}$ ; y

20  $R_5$  representa H, halógeno,  $=\text{O}$ ,  $-\text{OR}^a$ ,  $-\text{NR}^a\text{R}^b$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{CF}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{CHF}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{COOR}^a$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n\text{COOR}^a$ ,  $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^a$ , alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alqueno  $\text{C}_{2-6}$ , alquino  $\text{C}_{2-6}$ , cicloalquilo  $\text{C}_{3-7}$ , heteroarilo, arilo o heterocicloalquilo  $\text{C}_{3-7}$ ; y

X representa O o  $-\text{NR}^a$ ,

25  $R^a$  representa H o alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alqueno  $\text{C}_{2-6}$ , o alquino  $\text{C}_{2-6}$  opcionalmente sustituido; y

30  $R^b$  representa H o un alquilo  $\text{C}_{1-6}$ , alqueno  $\text{C}_{2-6}$ , alquino  $\text{C}_{2-6}$ , cicloalquilo, arilo, heteroarilo o aralquilo opcionalmente sustituido; o

$R^a$  y  $R^b$  junto con el átomo de nitrógeno interyacente representan un grupo heterocíclico, donde el átomo heterocíclico es N, O o S; y donde el átomo heterocíclico está opcionalmente sustituido (artemisona); y

n es 0, 1, 2 o 3.

- 35 2. El compuesto de artemisinina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paciente está sufriendo de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, una diabetes positiva a péptido C o negativa a péptido C o trastornos asociados con la diabetes.
- 40 3. El compuesto de artemisinina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el compuesto se administra al paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar la hipoinsulinemia, preferiblemente mediante administración sistémica o local.
- 45 4. El compuesto de artemisinina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto se selecciona del grupo compuesto por ácido artelínico, artemetero, artemotil, artenimol, artemisona y artesunato, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
- 50 5. El compuesto de artemisinina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto está acoplado a una porción de portador o ligando.
6. El compuesto de artemisinina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto se administra en una preparación farmacéutica para su uso oral, parenteral, sistémico, mucoso, tópico, rectal, sublingual, bucal o como implante, cuya preparación comprende un portador

farmacéuticamente aceptable, preferiblemente donde la preparación es una tableta, formulación dérmica o transdérmica, ungüento, gel, crema, loción, parche, solución, inyectable, solución oftálmica, sistema disperso, emulsión, sistema de fármaco microencapsulado, bomba osmótica, implante subdérmico, gránulo, microesfera, sistema de liberación modificada, sistema de liberación dirigida, gránulos o píldoras.

- 5
7. El compuesto de artemisinina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto se administra en una dosis de al menos una vez al día, preferiblemente en una dosis de 0,01 – 2000 mg/día, preferiblemente 0,1 – 500 mg/día, en una sola dosis o en múltiples dosis, o en el que la dosis se proporciona en una formulación o dispositivo de liberación lenta.
- 10
8. El compuesto de artemisinina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tratamiento se combina con otra terapia antidiabética, preferiblemente tratamiento con un agente antidiabético, preferiblemente cualquiera de insulina, sulfonilureas, incretinas, otros secretagogos, glitazonas, metformina, agonistas de GLP-1 o inhibidores de DPP4, inhibidores de glucosidasa, análogos de amilina, inhibidores de SGLT2, cirugía de derivación gástrica o trasplante de islotes pancreáticos.
- 15
9. El compuesto con compuesto de artemisinina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el compuesto se administra en combinación con otro agonista de gefirina o inhibidor de BTBD9.
- 20

Fig. 1

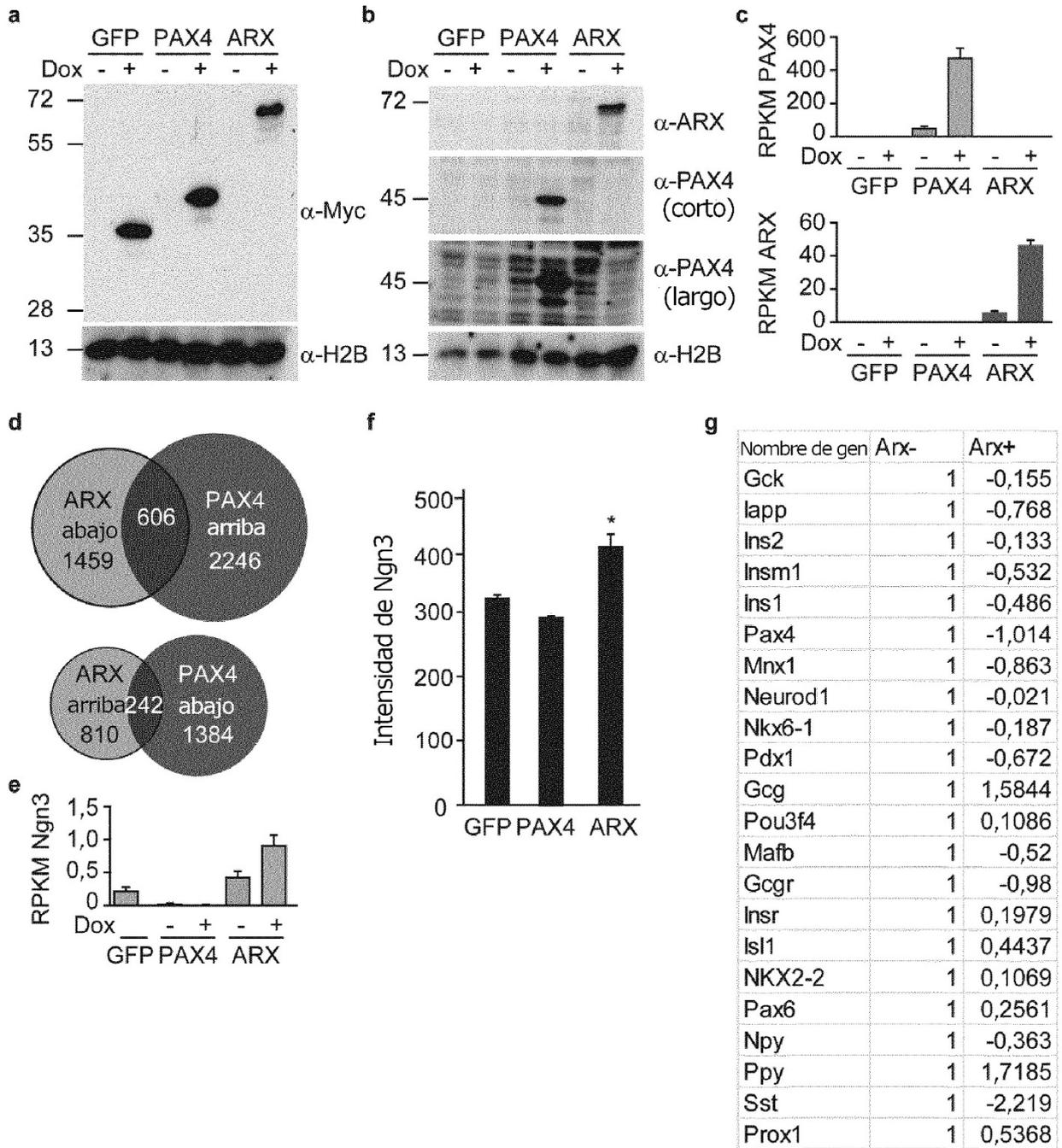


Fig. 2

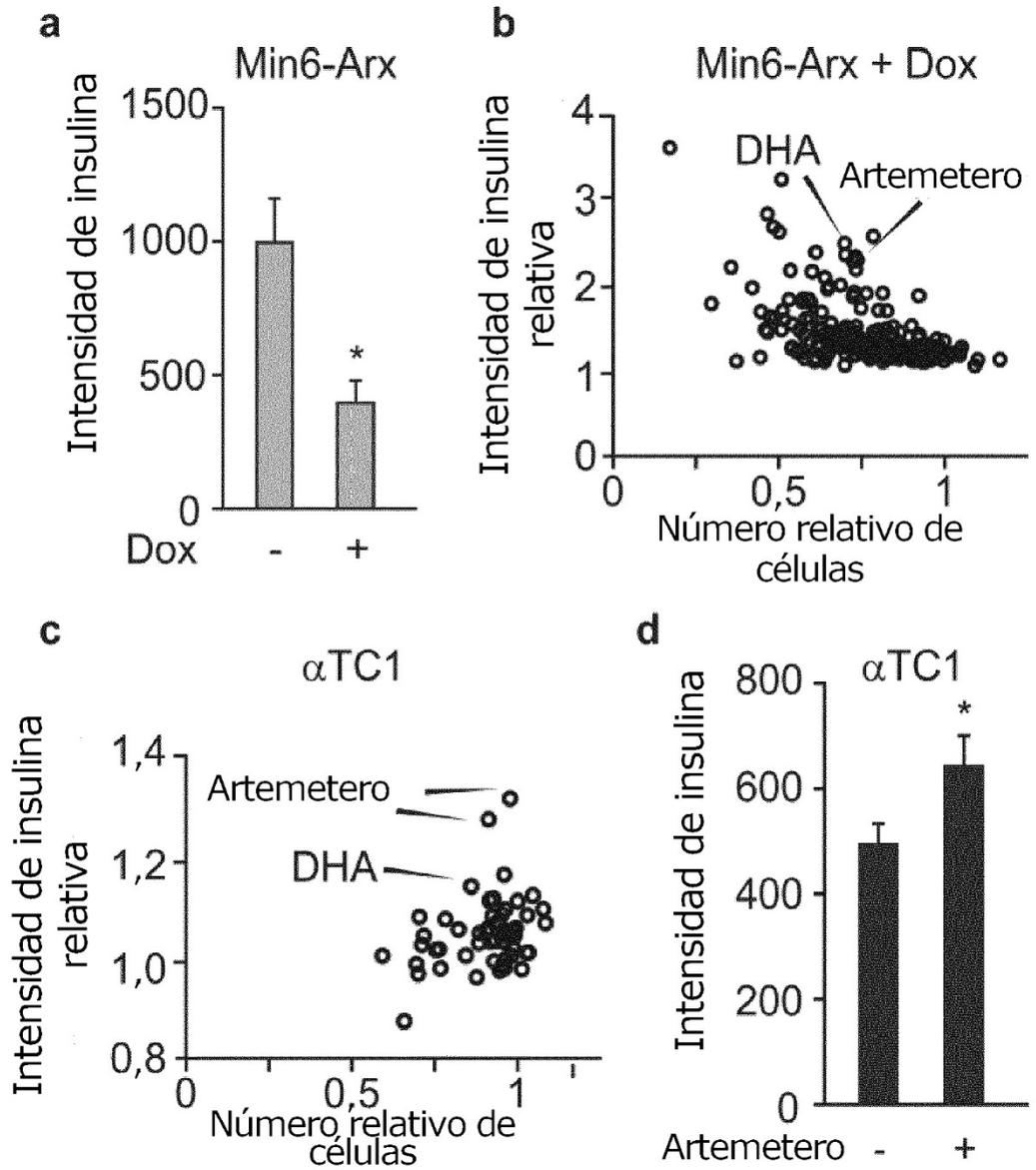


Fig. 3

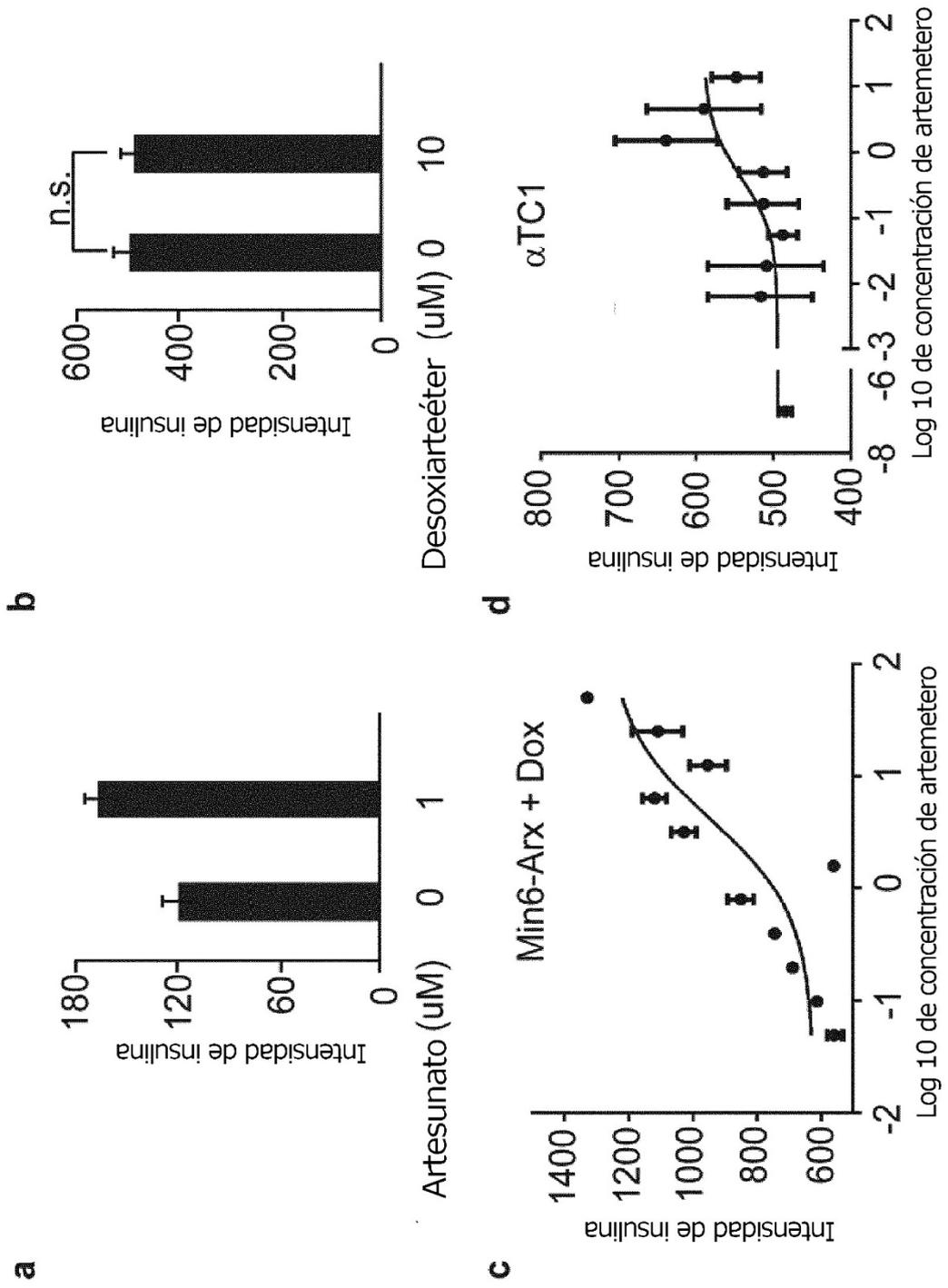


Fig. 4

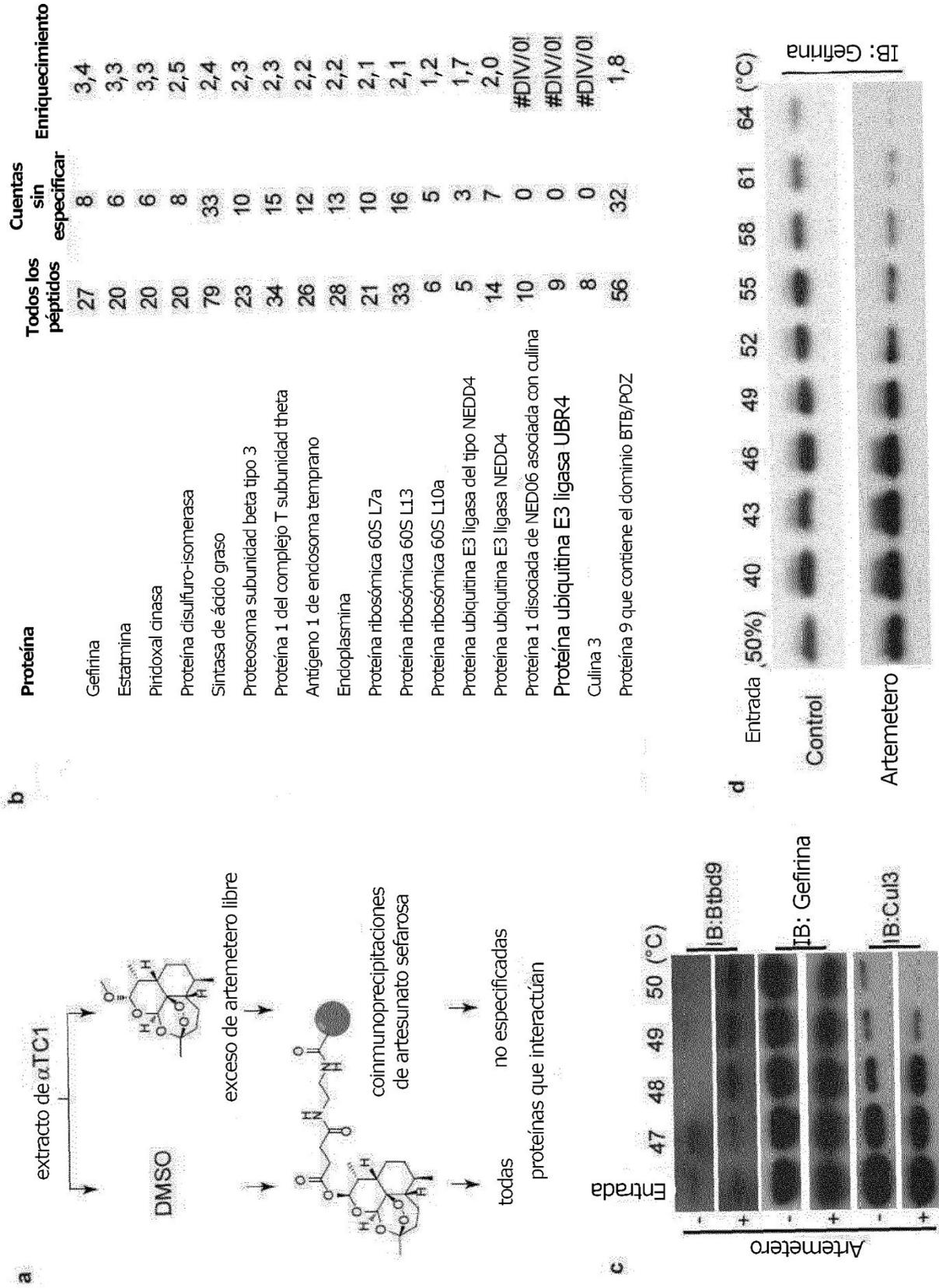


Fig. 5

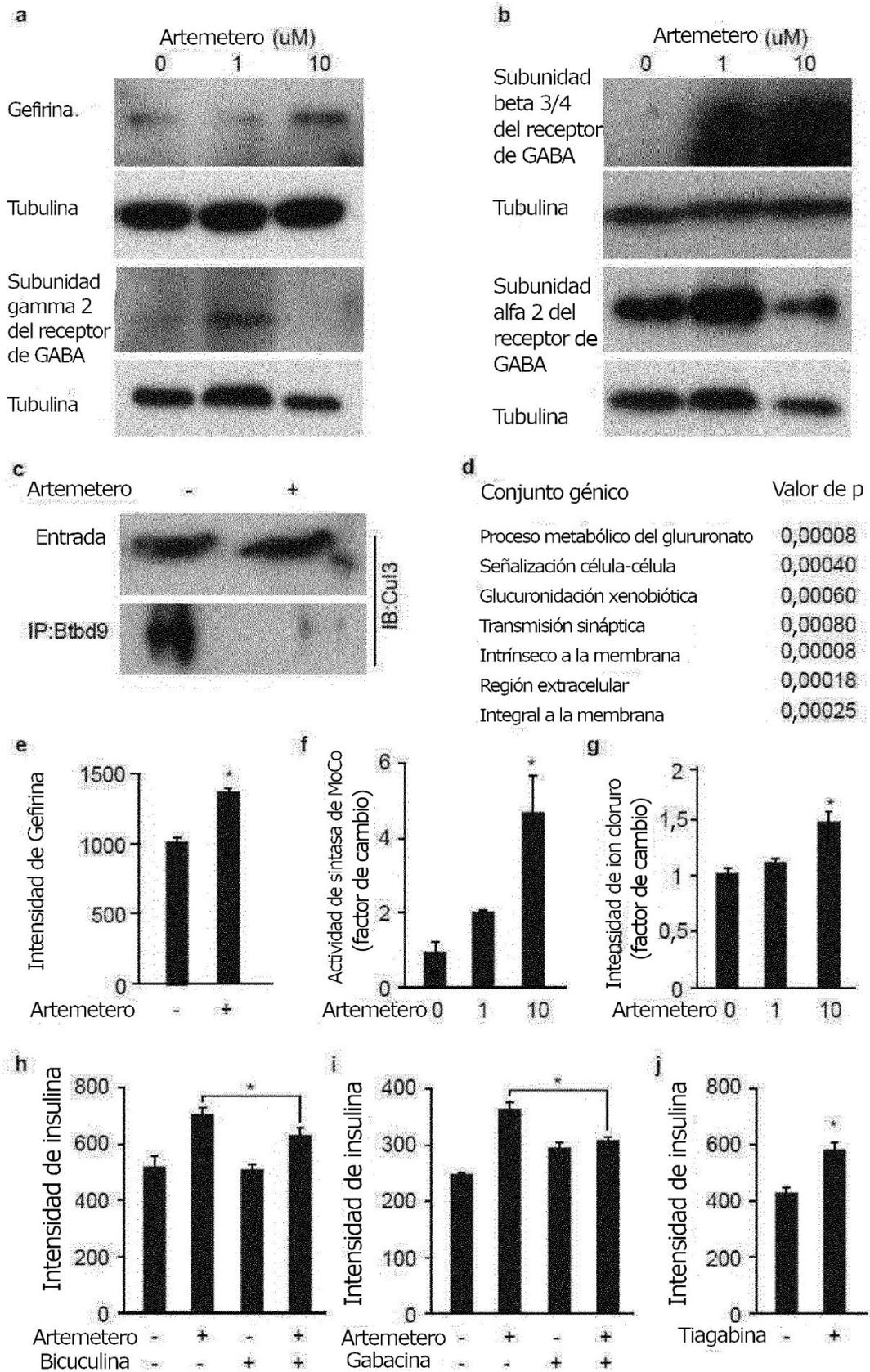


Fig. 6

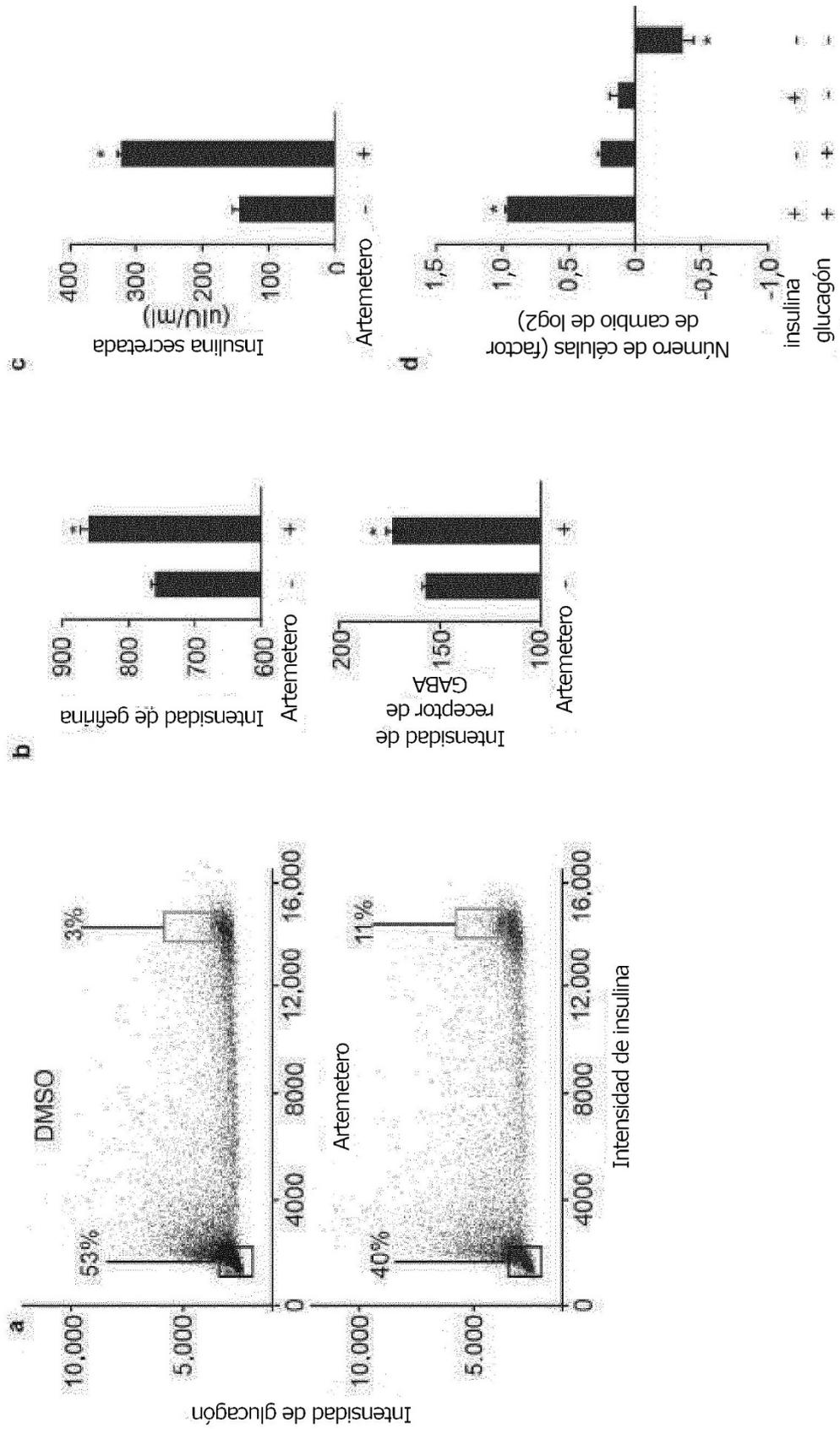


Fig. 7. Secuencias de cebador

Especies	Gen	Orientación	Secuencia	SEQ ID nº
mm	Ins2	directo	GTC AAGCAGCACCTTTGTGGTTCC	1
mm	Ins2	inverso	ACAATGCCACGCTTCTGCTG	2
mm	Pdx1	directo	TCCACCACCACCTTCCAGCTCA	3
mm	Pdx1	inverso	AATTCCTTCTCCAGCTCCAG	4
mm	Rsk1	directo	GCCGCTGGACCCGGAGAATG	5
mm	Rsk1	inverso	GCCGGGTGACCTTGCGTACC	6
mm	Rsk2	directo	TAACCGCAGAGGTCACACTCAG	7
mm	Rsk2	inverso	CTCGAAACTGTGGCATCCCGA	8
mm	Rsk3	directo	TGCTGGTGTGATGGAGTGGAG	9
mm	Rsk3	inverso	GGTCAAAGTGAAGGTGTCCTC	10
mm	Actb	directo	GGTGGGAATGGGTCAGAAGGAC	11
mm	Actb	inverso	GGCCACACGCAGCTCATTGT	12
mm	Pax4	directo	AGGTATCTAATGGCTGTGTGAGC	13
mm	Pax4	inverso	GACACACTGGGAGCCTTGTC	14
mm	Npy	directo	TGGACTGACCCTCGCTCTAT	15
mm	Npy	inverso	TGTCTCAGGGCTGGATCTCT	16
mm	lapp	directo	CTCTCTGTGGCACTGAACCA	17
mm	lapp	inverso	GGACTGGACCAAGGTTGTTG	18
hs	GAPDH	directo	AGAAGGCTGGGGCTCATTG	19
hs	GAPDH	inverso	AGGGGCCATCCACAGTCTTC	20
hs	TUBB3	directo	CTCAGGGGCCCTTTGGACATC	21
hs	TUBB3	inverso	CAGGCAGTCGCAGTTTTTCAC	22
hs	ACTB	directo	CTGTCTGGCGGCACCACCAT	23
hs	ACTB	inverso	GCAACTAAGTCATAGTCCGC	24
hs	HMBS	directo	GGCAATGCGGCTGCAA	25
hs	HMBS	inverso	GGGTACCCACGGGAATCAC	26
hs	SDHA	directo	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	27
hs	SDHA	inverso	CCACCACTGCATCAAATTCATG	28
hs	AOF2	directo	AATGCCAAAGCAGAGAAGGA	29
hs	AOF2	inverso	CTGCAGTGTGCGGTTTCTAA	30
hs	INS	directo	CAGATCACTGTCTTCTGCCATGG	31
hs	INS	inverso	GTTCCACAATGCCACGCTTC	32
hs	GCG	directo	TCCAGATCATTCTCAGCTTCCCAG	33
hs	GCG	inverso	CCTTCTCGGCCTTTCACCA	34
hs	SST	directo	GCTGTCTGCGCCTCCAGT	35
hs	SST	inverso	CGTTCTCGGGGTGCCATAGC	36
hs	PPY	directo	TGTCCACCTGCGTGGCTCTGTT	37
hs	PPY	inverso	TATAAGTCCAGCGGGCTGAG	38
hs	PDX1	directo	CCTTTCATGGATGAAGTC	39
hs	PDX1	inverso	TTCAACATGACAGCCAGCTC	40
hs	MAFA	directo	AGTTGGCACTTCTCGCTCTC	41
hs	MAFA	inverso	TTCAGCAAGGAGGAGGTCAT	42
hs	ARX	directo	ATGAGGCTGGACTTGACCGAGG	43
hs	ARX	inverso	ACACTGCCGCTCCGAGGAAA	44
hs	PAX6	directo	TCCATCAGACCCAGGGCAATC	45
hs	PAX6	inverso	TAGGTTGCCCTGGCACCGAA	46
hs	AMY2A	directo	CTGGGTGGTGAAGCAATTAAGC	47
hs	AMY2A	inverso	TGGTGGCCCAACCAATCAT	48
hs	PAX4	directo	GTGAGGGTCTGGTTTTCCAA	49
hs	PAX4	inverso	AGGTGGGGTGTCACTCAGAC	50