



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 427**

51 Int. Cl.:

G01N 33/566 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01994292 .9**

86 Fecha de presentación : **18.12.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1354200**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2003**

54 Título: **Procedimiento de selección de ligandos de GPR40.**

30 Prioridad: **22.12.2000 GB 0031527**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB
SMITHKLINE BEECHAM plc.

72 Inventor/es: **Andrews, John, Leon;**
Briscoe, Celia, Patricia;
Ignar, Diane, Michelle;
Muir, Alison, Isobel;
Sauls, Howard, Ray Jr. y
Tadayyon, Mohammad

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimiento de selección de ligandos de GPR40.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a la identificación de un ligando para un receptor acoplado a proteína G (GPCR) y su uso en procedimientos de selección, y diseño racional de fármacos, para identificar antagonistas y agonistas del receptor.

10 **Antecedentes**

La superfamilia de genes de proteína de membrana de receptores acoplados a proteína G (GPCR) se ha caracterizado como que tiene siete posibles dominios transmembrana. Se cree que los dominios representan hélices a transmembrana conectadas mediante bucles extracelulares y citoplásmicos. Los receptores acoplados a proteína G incluyen un amplio intervalo de receptores biológicamente activos, tales como hormonales, virales, factor de crecimiento y neuroreceptores.

Se han caracterizado los receptores acoplados a proteína G como que incluyen estos siete tramos hidrófobos conservados de aproximadamente 20 a 30 aminoácidos, que conectan al menos ocho bucles hidrófilos divergentes. La familia de la proteína G de receptores acoplados incluye receptores de dopamina que se unen a fármacos neurolépticos usados para tratar trastornos psicóticos y neurológicos. Otros ejemplos de miembros de esta familia incluyen, pero no se limitan a, receptores de calcitonina, adrenérgicos, de endotelina, de AMPc, de adenosina, muscarínicos, de acetilcolina, de serotonina, de histamina, de trombina, de quinina, de hormona estimulante del folículo, de opsinas, receptor del gen 1 de diferenciación endotelial, de rodopsinas, odorantes, de citomegalovirus.

La mayoría de los receptores acoplados a proteína G tienen residuos únicos de cisteína conservados en cada uno de los dos primeros bucles extracelulares que forman enlaces disulfuro que se cree que estabilizan la estructura de la proteína funcional. Las 7 regiones transmembrana se denominan TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, y TM7. TM3 se ha implicado en la transducción de señales.

La fosforilación y lipidación (palmitilación o farnesilación) de residuos de cisteína puede influenciar la transducción de señales de algunos receptores acoplados a proteína G. La mayoría de los receptores acoplados a proteína G contienen sitios de fosforilación potenciales en el tercer bucle citoplásmico y/o el extremo carboxi terminal. Para varios receptores acoplados a proteína G, tales como el β -adrenoreceptor, la fosforilación mediante proteína quinasa A y/o quinasas de receptor específico median la desensibilización del receptor.

Para algunos receptores, se cree que los sitios de unión a ligando de receptores acoplados a proteína G comprenden un tubo hidrófilo formado por varios dominios transmembrana de receptor acoplado a proteína G, tubo que está rodeado por residuos hidrófobos de los receptores acoplados a proteína G. Se presupone que el lado hidrófilo de cada hélice transmembrana de receptor acoplado a proteína G está orientado hacia dentro y forma un sitio de unión a ligando polar. Se ha implicado TM3 en varios receptores acoplados a proteína G como que tiene un sitio de unión a ligando, tal como el residuo de aspartato de TM3. Las serinas de TM5, una asparagina de TM6 y fenilalaninas o tirosinas de TM6 o TM7 también están implicadas en la unión a ligandos.

Los receptores acoplados a proteína G pueden acoplarse intracelularmente por proteínas G heterotriméricas a diversas enzimas intracelulares, canales de iones y transportadores. Véase Johnson, *et al.*, Endoc. Rev., (1989) 10: 317-331). Diferentes subunidades a de proteína G estimulan preferencialmente efectores particulares para modular diversas funciones biológicas en una célula. Se ha identificado la fosforilación de residuos citoplásmicos de receptores acoplados a proteína G como un mecanismo importante para la regulación del acoplamiento de proteína G a algunos receptores acoplados a proteína G. Los receptores acoplados a proteína G se encuentran en numerosos sitios dentro de un huésped mamífero.

A lo largo de los últimos 15 años, se han introducido satisfactoriamente casi 150 agentes terapéuticos que se dirigen a 7 receptores transmembrana (7 TM) en el mercado, estableciendo así su valor como dianas terapéuticas.

55 **Sumario**

Un primer aspecto de la presente invención es un procedimiento de selección de un compuesto de prueba para determinar si el compuesto es un ligando del receptor GPR40. El procedimiento comprende detectar si el compuesto de prueba inhibe de manera competitiva la unión de un ácido graso ligando de GPR40 a un receptor GPR40, en el que el ácido graso ligando de GPR40 es un ácido graso C₆-C₂₃ insaturado o saturado.

Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento de selección de un compuesto para detectar actividad antagonista de GPR40. El procedimiento comprende proporcionar una célula de prueba que expresa sobre su superficie un receptor GPR40, y que contiene un constructo indicador que comprende un elemento transcripcional sensible a Gq y un gen indicador, en el que la expresión del gen indicador produce una señal detectable. La superficie de la célula de prueba se expone a un agonista de ácido graso de GPR40 en condiciones que permiten la unión de un agonista de ácido graso de GPR40, y luego se expone a un compuesto de prueba. Se mide cualquier señal detectable

producida por el gen indicador, y se compara con la señal detectable que se esperaría que se produjese si se expusiese la célula sólo al agonista de GPR40. Una disminución en la señal detectable indica que el compuesto de prueba es un antagonista de GPR40.

5 Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento de selección de un compuesto para detectar actividad de agonista de GPR40. El procedimiento comprende proporcionar una célula que expresa sobre su superficie un receptor GPR40, y que contiene un constructo indicador que comprende un elemento transcripcional sensible y un gen indicador, en el que la expresión del gen indicador produce una señal detectable. El elemento transcripcional sensible puede ser un elemento transcripcional sensible a Gi, un elemento transcripcional sensible a Gq, o un elemento transcripcional sensible a Gi/Gq. El compuesto de prueba se pone en contacto con la superficie celular en condiciones que permiten la unión de un ligando de GPR40 al receptor GPR40, y se detecta la expresión del gen indicador.

10 Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento de selección de un compuesto para detectar actividad antagonista de GPR40. El procedimiento comprende proporcionar una célula que expresa sobre su superficie el receptor GPR40, y que contiene un constructo indicador que comprende un elemento transcripcional sensible y un gen indicador, en el que la expresión del gen indicador produce una señal detectable. El elemento transcripcional sensible puede ser un elemento transcripcional sensible a Gi, un elemento transcripcional sensible a Gq, o un elemento transcripcional sensible a Gi/Gq. Se expone la superficie celular a un compuesto de prueba y a un agonista de GPR40 en condiciones que permiten la unión de un ligando de GPR40 al receptor GPR40, y se detecta la expresión del gen indicador. La disminución de la expresión de gen indicador en presencia tanto del compuesto de prueba como del agonista, comparado con la expresión del gen indicador en presencia del agonista de GPR40 sólo, indica que el compuesto de prueba es un antagonista de GPR40.

25 Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento de selección de un compuesto para detectar actividad antagonista de GPR40, en el que el procedimiento comprende detectar si un compuesto de prueba disminuye la liberación de insulina estimulada por glucosa a partir de, o la producción por, células beta pancreáticas de mamífero en presencia de un agonista de GPR40, comparado con la liberación de insulina estimulada por glucosa que se produciría debido a la presencia del agonista de GPR40.

30 Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento de selección de un compuesto para detectar actividad agonista de GPR40, que comprende detectar si el compuesto se une a GPR40 y aumenta la liberación de insulina estimulada por glucosa a partir de, o la producción por, células beta pancreáticas de mamífero.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 muestra la respuesta de calcio (medida por el cambio en la fluorescencia) de GPR40 frente al ácido graso ácido eláídico en células HEK-293 que expresan transitoriamente o bien GPR40, o bien el receptor de 7TM GPRW, o bien el receptor de 7TM HLTEX11.

40 La figura 2 muestra los resultados de ensayos usando melanóforos transfectados transitoriamente para determinar el acoplamiento a proteína G de GPR40. Cantidades crecientes de ADN de GPR40 transfectado produjeron un aumento en la actividad de $G\alpha_i/G\alpha_o$, indicando que la actividad constitutiva de GPR40 es mediante $G\alpha_i$.

45 La figura 3a representa gráficamente la respuesta en veces de células CHO que expresan GPR40 humano de CRE-luciferasa; no hubo ningún aumento en la actividad indicadora detectada en el sistema de CRE con ninguna dosis de vector de expresión de GPR40.

50 La figura 3b representa gráficamente la respuesta en veces de células CHO que expresan receptor acoplado a Gs humano de CRE-luciferasa; hubo un aumento significativo en la actividad de luciferasa detectada con dosis crecientes de vector de expresión.

55 La figura 3c representa gráficamente el efecto de calcitonina y ácido eicosatrienoico sobre la actividad de luciferasa a partir de células CHO que expresan GPR40 humano de CRE-luciferasa o células CHO que expresan CRE-luciferasa sin receptor. Se aumentó la producción de luciferasa mediante calcitonina tanto en células que sólo contenían indicador como en células que contenían GPR40, mientras que no se detectó ningún efecto significativo de ácido 5,8,11-eicosatrienoico en ninguna concentración sometida a prueba.

60 La figura 4A muestra cambios en la actividad indicadora estimulada por ácido L-alfa-lisofosfatídico (LPA), con y sin tratamiento con toxina pertussis (PTX). Las células huésped consistieron en células CHO que contenían constructos indicadores de GAL4/E1k1-luciferasa; 3G8 y 5F6 son líneas de células CHO clonales transfectadas con GPR40 humano y que contienen constructo indicador GAL4/E1k1-luciferasa. Se suprimió la producción de luciferasa en células huésped debida a la estimulación por LPA mediante tratamiento con toxina pertussis.

65 La figura 4B muestra cambios en la actividad indicadora estimulada por ácido en 5,8,11-eicosatrienoico, con y sin tratamiento con toxina pertussis (PTX). Las células son tal como se describen para la figura 4A. Se aumentó la producción de luciferasa debida a la estimulación por ácido 5,8,11-eicosatrienoico en células transfectadas con GPR40, y no se inhibió mediante tratamiento con toxina pertussis.

La figura 4C muestra cambios en la actividad indicadora estimulada por trombina, con y sin tratamiento con toxina pertussis (PTX). Las células son tal como se describen para la figura 4A. La producción de luciferasa debida a la estimulación por trombina sólo se atenuó parcialmente tras el tratamiento con toxina pertussis.

La figura 4D muestra el porcentaje de inhibición de la actividad de luciferasa tras el tratamiento con toxina pertussis en células CHO que expresan sólo GAL4/ELK1-luciferasa (célula huésped), y cinco clones de célula CHO diferentes que expresan GAL4/ELK1-luciferasa y GPR40 humano.

La figura 4E muestra los recuentos de luciferasa basales a partir de células CHO que expresan sólo GAL4/Elk1-luciferasa (célula huésped), y diferentes clones de célula CHO que expresan GAL4/ELK1-luciferasa y GPR40 humano, o bien con o bien sin tratamiento con toxina pertussis. Los clones transfectados con constructo de expresión de GPR40 e indicador ELK-Gal4 mostraron un aumento de la actividad indicadora basal comparado con la de la línea de célula huésped, pero disminuyó en hasta un 70% tras el tratamiento con toxina pertussis.

15 Descripción detallada

GPR40 es un receptor acoplado a proteína G huérfano recientemente descrito, aislado durante la búsqueda de receptores novedosos (Sawzdargo, M. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 (2), 543-547). La secuencia de polinucleótido de GPR40 humano (número de acceso de GenBank NM005303) se facilita en SEQ ID NO: 1 en el presente documento, y la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la misma se facilita en SEQ ID NO: 2 en el presente documento.

Más recientemente, se ha clonado y secuenciado un ortólogo de GPR40 de ratón (solicitud de patente de los EE.UU. número 60/234.253, SmithKline Beecham). La secuencia de polinucleótido de GPR40 de ratón se facilita en SEQ ID NO: 3 en el presente documento y el polipéptido codificado por la misma tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en el presente documento.

La presente invención se basa en el hallazgo inusual e inesperado de que el receptor GPR40 humano se activa específicamente por ácidos grasos tanto saturados como insaturados. Además, se ha mostrado que GPR40 se expresa en el páncreas humano, más específicamente las células β de los islotes pancreáticos.

Los presentes inventores determinaron que el receptor GPR40 puede actuar constitutivamente mediante una proteína G sensible a la toxina pertussis. Se sabe que tanto las proteínas Gi como Go (y subtipos de las mismas) son sensibles a la toxina pertussis. Sin embargo, los presentes inventores llevaron a cabo una investigación adicional para determinar que los ácidos grasos eran ligandos de GPR40 que actuaban mediante proteína Gq (proteína G no sensible a toxina pertussis).

Muchos estudios han mostrado que el tratamiento agudo de los islotes con ácidos grasos (1-3 h) estimula la secreción de insulina estimulada por glucosa, mientras que periodos más largos de tratamiento (6-24 h) son inhibidores para la secreción de insulina estimulada por glucosa (Wamotte C. *et al* (1994). *Diabetes* 43(5):703-711; Zhou YP. *et al* (1996) *Metabolism: Clinical & Experimental*. 45(8):981-986). Hay pruebas que se acumulan que muestran que un aumento en los niveles de ácidos grasos en plasma pueden ser perjudiciales para la función de célula β (lipotoxicidad). Estudios en ratas ZDF, usadas frecuentemente como modelo de diabetes, han mostrado que el aumento de niveles de ácidos grasos circulantes conduce a la producción de ceramida, la activación de óxido nítrico sintasa, y la apoptosis de células β (Shimabukuro M., *et al* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 2498-2502). Se ha encontrado que la expresión de GPR40 está enriquecida en los islotes pancreáticos humanos de 2-100 veces (cuatro muestras individuales analizadas) para una entrada de ARN equivalente comparado con ARN pancreático total humano. Esta localización de tejido sugiere que el receptor puede tener un papel en la función de células β . El hallazgo de que los ácidos grasos son ligandos para GPR40 puede ayudar en el esclarecimiento de la función de GPR40 en la célula β . Una consecuencia de la activación aguda de receptor puede ser por tanto la potenciación de la secreción de insulina estimulada por glucosa mientras que puede esperarse que periodos más largos conduzcan a disminuciones de la secreción de insulina estimulada por glucosa y genes asociados con la sensibilidad a la glucosa de células β , por ejemplo, glucoquinasa. Basándose en esto, es posible que o bien los agonistas o bien los antagonistas de GPR40 puedan tener valor terapéutico para la diabetes, y particularmente para la diabetes tipo 2. Por tanto, puede esperarse que el tratamiento con un agonista de GPR40 aumente la secreción de insulina estimulada por glucosa a partir de células β a corto plazo. Los antagonistas de GPR40 pueden tener valor terapéutico con respecto a posibles reducciones de la lipotoxicidad y por tanto funcionar para mejorar la función de células β .

Por tanto, esta identificación de ácidos grasos como ligandos para GPR40 facilita el desarrollo de procedimientos de selección para identificar agonistas y antagonistas del receptor.

En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar compuestos que se unen y activan (agonista) o inhiben la activación (antagonista) del receptor GPR40, procedimiento que comprende usar GPR40, en combinación con ácidos grasos ligandos de GPR40 C₆-C₂₃ insaturados o saturados, que contienen opcionalmente hasta 6 enlaces alqueno o 3 acetileno, opcionalmente cíclicos o ramificados, y opcionalmente sustituido con 1-3 grupos hidroxilo.

ES 2 280 427 T3

Tal como se usa en el presente documento, "GPR40" se refiere a un polipéptido receptor que tiene al menos un 95% de identidad con la secuencia de polipéptido facilitada en SEQ ID NO: 2, y que tiene función de GPR40; los polipéptidos de receptor GPR40 usados en los procedimientos de la presente invención son preferiblemente de mamífero, y más preferiblemente humanos. GPR40 también se refiere a derivados del receptor útiles en los procedimientos de selección o de diseño racional de fármacos descritos en el presente documento. Tales derivados incluyen partes del polipéptido de SEQ ID NO: 2 que conserva función de unión a ligando.

Preferiblemente, el ácido graso ligando se selecciona del grupo constituido por:

1) ácido trans-retinoico (ácido de vitamina A; Tretinoína) $C_{20}H_{28}O_2$ (Insat)

2) ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico $C_{22}H_{32}O_2$ (Insat)

3) ácido palmítico $C_{16}H_{32}O_2$ (Sat)

4) ácido pentadecanoico $C_{15}H_{30}O_2$ (Sat)

5) ácido eláidico $C_{18}H_{34}O_2$ (Insat)

6) ácido petroselinico $C_{18}H_{34}O_2$ (Insat)

7) ácido heptadecanoico $C_{17}H_{34}O_2$ (Sat)

8) ácido tridecanoico $C_{13}H_{26}O_2$ (Sat)

9) ácido láurico (ácido dodecanoico) $C_{12}H_{24}O_2$ (Sat)

10) ácido araquidónico $C_{20}H_{32}O_2$ (Insat)

11) ácido linolénico $C_{18}H_{30}O_2$ (Insat)

12) ácido palmitoleico $C_{16}H_{30}O_2$ (Insat)

13) ácido cáprico $C_{10}H_{20}O_2$ (Sat)

14) ácido mirístico $C_{14}H_{28}O_2$ (Sat)

15) ácido esteárico $C_{18}H_{36}O_2$ (Sat)

16) ácido undecanoico $C_{11}H_{22}O_2$ (Sat)

16) ácido eicosatrienoico

En esta lista "sat" se refiere a ácidos grasos saturados e "insat" se refiere a ácidos grasos insaturados.

Tal como se usa a continuación en el presente documento el término "ácido graso ligando" se define como un ácido graso ligando de la invención, ligando que es un ácido graso C_6 - C_{23} saturado o insaturado, que contiene opcionalmente hasta 6 enlaces alqueno o 3 acetileno, opcionalmente cíclico o ramificado, y opcionalmente sustituido con 1-3 grupos hidroxilo.

Los compuestos identificados usando los procedimientos de la invención pueden ser útiles para el tratamiento de diabetes tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente, DMNID) y obesidad, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo enfermedad de Alzheimer) y otras indicaciones tales como accidente cerebrovascular.

En una primera realización, puede identificarse un agonista o antagonista de GPR40 poniendo en contacto una célula que expresa sobre la superficie de la misma el receptor GPR40, estando dicho receptor asociado con un segundo componente que puede proporcionar una señal detectable en respuesta a la unión de un compuesto a dicho receptor, con un compuesto que va a seleccionarse en condiciones que permiten la unión al receptor; y determinar si el compuesto se une a, y activa, o inhibe, el receptor, detectando la presencia o ausencia de una señal generada a partir de la interacción del compuesto con el receptor, opcionalmente en presencia de un ligando marcado o sin marcar, por ejemplo un ácido graso ligando.

En una realización adicional, puede identificarse un agonista o antagonista de GPR40 determinando la inhibición de la unión de un ligando (por ejemplo, un ácido graso ligando) a células que tienen el receptor GPR40 sobre la superficie de la misma, o a membranas celulares que contienen el receptor, en presencia de un compuesto candidato y en condiciones que permiten la unión al receptor. Determinando la cantidad de ligando unido al receptor, se identifica un compuesto que puede provocar la reducción de la unión de un ligando como un agonista o antagonista de GPR40.

En general, tales procedimientos de selección implican proporcionar células apropiadas que expresan GPR40 sobre las superficies de las mismas. Tales células incluyen células de mamíferos (por ejemplo, de ovario de hámster chino (CHO), HEK (riñón embrionario humano), células beta de islotes pancreáticos), células melanóforas, y células de *Drosophila* o *E. coli*. En particular, se emplea un polinucleótido que codifica para GPR40 para transfectar células para expresar de esta manera dicho receptor. Puede lograrse la construcción de vectores de expresión comprenden un polinucleótido que codifica para GPR40 y la transfección de células con dichos vectores de expresión de GPR40 usando procedimientos convencionales, tal como se describe en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). La expresión del receptor puede ser transitoria o estable. Preferiblemente, la expresión es estable. Más preferiblemente se transfecta una línea celular de mamífero con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para el receptor GPR40, por ejemplo el polinucleótido de SEQ ID NO: 1, o la región codificante del mismo, y entonces se cultiva la línea celular en un medio de cultivo de manera que el receptor se expresa de manera estable sobre la superficie celular. Luego se pone en contacto el receptor expresado con un compuesto de prueba para observar la unión, la estimulación o la inhibición de una respuesta funcional, en presencia o ausencia de un ligando (tal como un ácido graso ligando tal como se describió anteriormente en el presente documento).

Los ensayos, tal como se describen en el presente documento, pueden utilizar células intactas que expresan GPR40 funcional, o membranas celulares que contienen el receptor, tal como se conoce en la técnica.

Alternativamente una parte soluble del receptor GPR40 (es decir, no unida a la membrana) que comprende el dominio de unión a ligando puede expresarse en la fracción soluble, o bien en el compartimiento intracelular o bien secretarse fuera de la célula al medio. Las técnicas para el aislamiento y purificación de los receptores solubles expresados se conocen bien en la técnica.

Un ejemplo de un procedimiento de selección incluye expresar GPR40 en el que el receptor está unido a fosfolipasa C o D. Ejemplos representativos de tales células incluyen, pero no se limitan a, células endoteliales, células de músculo liso, y células de riñón embrionario. La selección puede lograrse tal como se describió anteriormente en el presente documento detectando la activación del receptor o la inhibición de la activación del receptor a partir de la segunda señal de fosfolipasa.

Otro procedimiento implica la selección de compuestos que son ligandos de GPR40 determinando la inhibición de la unión de un ligando marcado (tal como un ácido graso ligando) a células que tienen el receptor sobre la superficie de las mismas, o a membranas celulares que contienen el receptor. Tal procedimiento implica transfectar una célula eucariota con ADN que codifica para GPR40 de tal manera que la célula expresa el receptor sobre su superficie. Entonces se pone en contacto la célula con un compuesto de prueba en presencia de una forma marcada de un ligando, tal como un ácido graso ligando marcado. Puede marcarse el ligando usando cualquier procedimiento adecuado tal como se conoce en la técnica, incluyendo radiactividad (por ejemplo, con ¹²⁵yodo), compuestos fluorescentes, β -glucuronidasa, luciferasa, etc. Se mide la cantidad de ligando marcado unido a los receptores, por ejemplo, midiendo la radiactividad asociada con células transfectadas o membranas de estas células. Si el compuesto de prueba se une al receptor, la unión del ligando marcado al receptor está inhibida tal como se determina mediante una reducción de ligando marcado que se une a los receptores. Este procedimiento se denomina generalmente ensayo de unión.

Un procedimiento de selección adicional implica el uso de células de mamíferos que se transfectan para expresar GPR40 funcional. Se cargan las células con un colorante indicador que produce una señal fluorescente cuando se une a calcio, y se ponen en contacto las células con una sustancia de prueba y/o un agonista de receptor, tal como un ácido graso ligando. Se mide cualquier cambio en la señal fluorescente en un periodo de tiempo definido usando, por ejemplo, un espectrofotómetro de fluorescencia o un lector de placa de formación de imágenes de fluorescencia. Un cambio en el patrón de señal de fluorescencia generado por el ligando indica que un compuesto es un posible agonista para el receptor. Una disminución en el patrón de señal de fluorescencia generado por el agonista en presencia del compuesto de prueba indica que un compuesto es un posible antagonista para el receptor.

Otro procedimiento implica la selección de ligandos de GPR40 mediante determinación de los efectos sobre la acumulación de AMPc y/o adenilil ciclase mediada por receptor. Tal procedimiento implica transfectar transitoriamente o de manera estable una célula eucariota con GPR40 para expresar el receptor sobre la superficie celular. Luego se expone la célula a compuestos de prueba en presencia o ausencia de un agonista de GPR40, tal como un ácido graso. Se mide entonces el cambio en el nivel de AMPc a lo largo de un periodo de tiempo definido, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo o ensayos de unión a proteína (por ejemplo usando FlashPlates (PerkinElmer LifeSciences) o un ensayo de proximidad de centelleo). También pueden determinarse cambios en los niveles de AMPc midiendo directamente la actividad de la enzima, adenilato ciclase, en preparaciones de células rotas. Si el compuesto de prueba se une al receptor y afecta la activación de GPR40, los niveles de AMPc mediados por GPR40, o la actividad de adenilato ciclase, se reducirán o aumentarán.

En la técnica se conocen diversos procedimientos para detectar la activación de GPCR, dependiendo en parte de la proteína G a la que está acoplado el receptor. Por ejemplo, la activación de la ruta de Gi disminuye la actividad de adenilil ciclase, y puede detectarse la señalización de Gi midiendo la inhibición de la acumulación de AMPc estimulada por forskolina (Wong *et al.*, Methods Enzymology, 238:81 (1994)).

El uso de ensayos basados en indicador se conoce en la técnica para identificar ligandos de GPCR. En general, tales ensayos usan células recombinantes que expresan una proteína de receptor diana funcional cuya actividad de transducción de señal está modulada por interacción con un ligando extracelular, pudiendo la actividad de transducción generar una señal detectable. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Pharmacol. Toxicol. 42:199 (1999); Stables *et al.*, J. Recept. Signal Transduct. Res. 19:395 (1999).

Para ilustrar, la señal intracelular transducida se inicia mediante la interacción específica de un ligando extracelular con el receptor sobre la superficie celular. Esta interacción inicia una serie de acontecimientos intracelulares que dan como resultado un cambio rápido y detectable en la transcripción o traducción de un gen. Seleccionando secuencias reguladoras transcripcionales que son sensibles a las señales intracelulares transducidas y uniendo operativamente los promotores seleccionados a genes indicadores cuya transcripción, traducción o actividad final puede detectarse y medirse fácilmente, el ensayo basado en transcripción indica si un receptor específico interactúa con un compuesto de prueba para influenciar la transducción intracelular. Véase, por ejemplo, Himmler *et al.*, J. Receptor Res. 13:79 (1993); Weyer *et al.*, Receptors and Channels 1:193 (1993); Bevan *et al.*, Neuroreport 9:2703 (1998).

Usando tales ensayos pueden identificarse compuestos de prueba que inducen la señalización de receptor (agonistas). Alternativamente, el ensayo puede someter a prueba compuestos para determinar la capacidad para potenciar la respuesta de inducción generada mediante tratamiento de la célula con un agonista conocido. Si el compuesto de prueba no parece inducir directamente la actividad de la proteína receptora, puede repetirse el ensayo poniendo en contacto en primer lugar la célula recombinante con un activador conocido del receptor diana para inducir la ruta de transducción de señal (y generar la señal detectable). Entonces pueden someterse a ensayo los compuestos de prueba para determinar la capacidad para antagonizar (inhibir o bloquear) la activación del receptor mediante un activador agonista conocido.

Tal como se usa en el presente documento, un “agonista” se refiere a agentes que o bien inducen la activación de rutas de señalización de receptores, por ejemplo, tal como imitando un ligando para el receptor, o bien agentes que potencian la sensibilidad del receptor hacia un ligando, por ejemplo, reducen las concentraciones de ligando requeridas para inducir un nivel particular de señalización dependiente de receptor.

Las células utilizadas en tales ensayos pueden expresar el receptor de interés endógenamente, o pueden modificarse mediante ingeniería para expresar una proteína receptora diana heteróloga. Se conocen en la técnica procedimientos para introducir ADN heterólogo dentro de células eucariotas y puede usarse cualquier procedimiento adecuado. Tal como se conoce en la técnica, puede ser deseable inactivar uno o más genes endógenos de las células huéspedes (por ejemplo, el gen para el receptor homólogo). Adicionalmente, pueden inactivarse otras proteínas implicadas en la transducción de la señal a partir del receptor diana, o complementarse con un ortólogo o parólogo de otro organismo, por ejemplo, subunidades de proteína G de levadura pueden complementarse con subunidades de proteína G de mamífero en células de levadura también modificadas mediante ingeniería para expresar un receptor acoplado a proteína G de mamífero.

La célula huésped puede contener un constructo indicador que comprende un gen indicador en unión operativa con uno o más elementos reguladores transcripcionales sensibles a la actividad de transducción de la señal de la proteína receptora. Genes indicadores a modo de ejemplo incluyen enzimas (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa, fosfatasa alcalina secretada, β -galactosidasa, proteína fluorescente verde, beta lactamasa, cloramfenicol acetil transferasa) que puede producir una marca espectrométricamente activa (por ejemplo, cambios de color, fluorescencia o luminiscencia), o un producto génico que altera un fenotipo celular (por ejemplo, crecimiento celular, resistencia a fármaco o auxotrofia).

Tal como se usa en el presente documento, un “constructo de gen indicador” es una molécula de ácido nucleico que incluye un gen indicador unido operativamente a elemento(s) o secuencia(s) reguladora(s) transcripcional(es) que controlan la transcripción del gen indicador. La actividad de al menos una o más de estas secuencias control está directa o indirectamente regulada por la proteína receptora diana. Las secuencias reguladoras transcripcionales incluyen el promotor y otras regiones reguladoras, tales como secuencias potenciadoras, que modulan la actividad del promotor o secuencias reguladoras que modulan la actividad o eficacia de la ARN polimerasa que reconoce el promotor, o las secuencias reguladoras se reconocen por moléculas efectoras, incluyendo aquellas que se inducen específicamente mediante interacción de una señal extracelular con el receptor diana. Por ejemplo, puede realizarse la modulación de la actividad del promotor alterando la unión de la ARN polimerasa a la región promotora, o alternativamente, interfiriendo con la iniciación de la transcripción o elongación del ARNm. Tales secuencias se denominan colectivamente en el presente documento como elementos o secuencias reguladoras transcripcionales. Además, el constructo puede incluir secuencias de nucleótidos que alteran la traducción del ARNm resultante, alterando de esta manera la cantidad de producto de gen indicador.

El nivel de expresión del gen indicador proporciona la señal de detección dependiente de receptor. Puede medirse la cantidad de transcripción de gen indicador usando cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos de la técnica. Por ejemplo, puede detectarse la expresión de ARNm específico usando inmunotransferencia de tipo Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real tal como el disponible como TAQMAN®; o puede identificarse un producto proteínico específico mediante tinción característica o una actividad intrínseca. El gen indicador puede codificar para un producto génico que, mediante actividad enzimática, da lugar a una señal de detección basándose en color, fluorescencia o luminiscencia. Se compara entonces la respuesta del gen indicador con la respuesta o bien en la misma célula en ausencia del compuesto de prueba, o bien puede compararse con la respuesta

en una célula sustancialmente idéntica que carece de receptores específicos. Cualquier diferencia estadísticamente, o de otra manera, significativa en la respuesta indica que el compuesto de prueba ha alterado la actividad del receptor específico.

Los agonistas y antagonistas son moléculas “efectoras de receptor” que modulan la transducción de señal por medio del receptor. Las moléculas efectoras de receptor pueden unirse al receptor, aunque no necesariamente, en el sitio de unión del ligando natural. Los efectores de receptor pueden modular la transducción de señal cuando se usan solos (ligandos de sustitución), o pueden alterar la transducción de señal en presencia del ligando natural, o bien para aumentar o bien para inhibir la señalización mediante el ligando natural. Por ejemplo, los “antagonistas” son moléculas que bloquean o disminuyen la actividad de transducción de señal del receptor, por ejemplo, pueden inhibir competitiva, no competitiva y/o alostéricamente la transducción de señal a partir del receptor, mientras que los “agonistas” potencian, inducen o aumentan de otra manera la actividad de transducción de señal de un receptor. Los términos “activador de receptor” y “ligando de sustitución” se refieren a un agonista que induce la transducción de señal a partir de un receptor. La “transducción de señal” es el tratamiento de señales químicas a partir del entorno celular a través de la membrana celular, y puede producirse mediante uno o más de diversos mecanismos, tal como fosforilación, activación de canales de iones, activación de enzima efectora por medio de intermedios de proteína de unión a nucleótido de guanina, formación de inositol fosfato, activación de adenilil ciclasa, y/o activación directa (o inhibición) de un factor transcripcional. El término “modulación de una actividad de transducción de señal de una proteína receptora” en sus diversas formas gramaticales, tal como se usa en el presente documento, designa la inducción y/o potenciación, así como la inhibición de una o más rutas de transducción de señal aguas abajo de un receptor.

Se conocen en la técnica procedimientos que utilizan células de pigmento para identificar ligandos de GPCR. En general, el procedimiento utiliza células de pigmento que pueden dispersar o agregar pigmento en respuesta a un estímulo mediado por receptor, y que expresan un receptor acoplado a proteína G exógeno. El estado del pigmento (agregación o dispersión) en respuesta a un compuesto de prueba indica si el compuesto de prueba interactúa con el GPCR expresado. Véase, por ejemplo, patente de los EE.UU. número 5.462.856; patente de los EE.UU. número 6.051.386.

Los melanóforos de *Xenopus laevis* pueden expresar funcionalmente receptores recombinantes que se acoplan mediante proteínas G a adenilato ciclasa o fosfolipasa C (PLC). La estimulación mediada por receptor de cualquiera de estas enzimas provoca la dispersión de melanosomas, mientras que la estimulación de receptor que inhibe la adenilato ciclasa induce la agregación de melanosomas. Se han concebido diversos ensayos utilizando melanóforos de *Xenopus* transfectados con un GPCR de interés, para detectar los efectos agonistas (o antagonistas) de los compuestos de prueba sobre los receptores. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Pharmacol. Toxicol. 42:199 (1999); McClintock *et al.*, Anal. Biochem. 209:298 (1993); Potenza *et al.*, Anal Biochem 206:315 (1992); Potenza *et al.*, Pigment Cell Res 5:372 (1992).

El lector de placa de formación de imágenes fluorométricas (Fluorometric Imaging Plate Reader) (FLIPR™, Molecular Devices, RU) mide la fluorescencia intracelular en microplacas de múltiples pocillos. Cuando un GPCR se acopla a una ruta de señalización de calcio, el sistema FLIPR puede usarse con células que expresan al receptor acoplado a proteína G y que contienen colorantes fluorescentes sensibles al calcio, para controlar el flujo de calcio intracelular que se produce tras la activación del receptor acoplado a proteína G. Véase, por ejemplo, Kirk *et al.*, J. Biomolecular Screening, 1:75 (1996).

Algunos GPCR no se acoplan con rutas de señalización de calcio, mientras que otros pueden no señalizar mediante rutas de calcio dependiendo del tipo de célula en la que se expresa el receptor. En tales situaciones, se han utilizado las proteínas G quiméricas para unir el receptor con señalización de calcio en células transfectadas, permitiendo así el uso de ensayos FLIPR de alto rendimiento. (Wada *et al.*, Developing a High Throughput Functional Screening Assay for Gi/o-coupled Cloned Receptors using the FLIPR™ System, publicado por Molecular Devices, 2001; Coward *et al.*, Chimeric G-proteins allow a high-throughput signaling assay of Gi-coupled receptors, Analytical Biochemistry 270:242 (1999)). Coward *et al* informan de que el uso de proteínas G quiméricas permite que receptores acoplados a Gi señalicen mediante Gq y generen una respuesta de calcio detectable en células CHO, medida usando tecnología FLIPR™.

En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos de selección de compuestos de prueba para determinar si el compuesto es un ligando de receptor GPR40, detectando si el compuesto de prueba inhibe competitivamente la unión de un ácido graso ligando de GPR40 a un receptor GPR40. El ácido graso ligando puede marcarse con una etiqueta detectable tal como se conoce bien en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, etiquetas detectables incluyen restos que pueden detectarse mediante inspección visual (por ejemplo, que incluyen o producen elementos coloreados), o detectarse con la ayuda de sistemas de detección artificial, incluyendo, por ejemplo, sistemas ópticos, sistemas espectroscópicos, sistemas radiográficos y similares. La etiqueta detectable puede seleccionarse de radioisótopos, tintes fluorescentes y enzimas.

La presente invención también proporciona procedimientos de selección de compuestos de prueba para detectar actividad antagonista de GPR40. Uno de tales procedimientos utiliza una célula de prueba que expresa sobre su superficie un receptor GPR40, y que contiene un constructo indicador que comprende un elemento transcripcional sensible a Gq y un gen indicador, en el que la expresión del gen indicador produce una señal detectable. Se expone la superficie

de la célula de prueba a un agonista de ácido graso de GPR40 en condiciones que permiten la unión del agonista de ácido graso de GPR40 al receptor GPR40, y luego se expone la superficie celular al compuesto de prueba en condiciones similares. Entonces se mide la señal detectable producida por el gen indicador, y se compara con la señal detectable que se esperaría que se produjese en presencia de un agonista de ácido graso de GPR40 solo (es decir, en ausencia del compuesto de prueba). Esta comparación puede ser una comparación directa de la señal detectable en una célula control (es decir, una célula similar en todos los aspectos a la célula de prueba, pero expuesta al agonista de ácido graso de GPR40 en ausencia del compuesto de prueba). Alternativamente, la comparación puede ser con respecto a un patrón que se determina antes de o después de tratar la célula de prueba, es decir, un experimento control que se realizó antes o después de la señal detectable para establecer un patrón cuantitativo o cualitativo que se usa en la comparación.

La presente invención proporciona además procedimientos de selección de un compuesto para determinar la actividad agonista de GPR40. Uno de tales procedimientos utiliza una célula que expresa receptores GPR40 sobre su superficie, y que contiene un constructo indicador que comprende un elemento transcripcional sensible y un gen indicador, en el que la expresión del gen indicador produce una señal detectable. El elemento transcripcional puede ser un elemento transcripcional sensible a Gi, un elemento transcripcional sensible a Gq, o un elemento transcripcional sensible a Gi/Gq. Se pone en contacto la superficie celular con (es decir, se expone a) un compuesto de prueba, en condiciones que permiten la unión de un ligando de GPR40 al receptor GPR40, y se detecta la expresión de cualquier gen indicador (indicando que el compuesto de prueba tiene actividad agonista de GPR40).

La presente invención proporciona además procedimientos de selección de un compuesto para determinar la actividad antagonista de GPR40. Uno de tales procedimientos utiliza una célula que expresa sobre su superficie un receptor GPR40, y que contiene un constructo indicador que comprende un elemento transcripcional sensible y un gen indicador, en el que la expresión del gen indicador produce una señal detectable. El elemento transcripcional sensible puede ser un elemento transcripcional sensible a Gq o un elemento transcripcional sensible a Gi/Gq. Se expone la superficie celular a (es decir, se pone en contacto con) un compuesto de prueba y un agonista de GPR40, en condiciones que permiten la unión del agonista de GPR40 con el receptor GPR40. Se detecta la expresión posterior del gen indicador, y la expresión del gen indicador disminuida en presencia tanto del compuesto de prueba como del agonista (comparado con la expresión de gen indicador esperada en presencia de dicho agonista de GPR40 solo), indica que el compuesto de prueba es un antagonista de GPR40. Tal como se describió previamente en el presente documento, la comparación de la expresión del gen indicador en la célula de prueba puede realizarse con una célula control o con una respuesta cuantitativa o cualitativa patrón conocida.

Tal como se usa en el presente documento, un elemento transcripcional sensible a Gq es uno que responde (se activa) ante la activación de un receptor unido a Gαq (o subtipo Gαq). Tal como se conoce en la técnica, las proteínas Gq son proteínas G insensibles a toxina pertussis. Tal como se usa en el presente documento, un elemento transcripcional sensible a Gi es uno que responde (se activa) ante la activación de un receptor unido a Gαi (o subtipo Gαi). Tal como se conoce en la técnica, las proteínas Gi son proteínas G sensibles a toxina pertussis (como lo son Go). Tal como se usa en el presente documento, un elemento transcripcional sensible a Gq/Gi es uno que responde (se activa) ante la activación de un receptor unido a Gαq (o subtipos Gαq), o un receptor unido a Gαi (o subtipos Gαi). Uno de tales elementos transcripcionales sensibles a Gq/Gi es GAL4/Elk-1 (véase, por ejemplo, Bevan *et al.*, *Neuroreport* 9:2703 (1998)).

La presente invención proporciona además procedimientos de selección de un compuesto para detectar la actividad antagonista de GPR40, detectando si el compuesto disminuye la liberación de insulina estimulada por glucosa a partir de células beta pancreáticas de mamífero (o producción de insulina dentro de células beta pancreáticas de mamífero) en presencia de un agonista de GPR40, comparado con la liberación de insulina estimulada por glucosa que se produciría debida a la presencia del agonista de GPR40. La liberación de insulina “esperada” debida a la presencia del agonista de GPR40 puede establecerse llevando a cabo experimentos de control simultáneos o posteriores, o puede tener un patrón determinado previamente. Se conocen en la técnica diversos procedimientos para medir la liberación de insulina a partir de, o la producción dentro de, células. Puede utilizarse cualquier procedimiento adecuado en los presentes procedimientos.

La presente invención proporciona además un procedimiento de selección de un compuesto para determinar la actividad agonista de GPR40, detectando si el compuesto se une a GPR40 y aumenta la liberación de insulina estimulada por glucosa a partir de (o producción de insulina dentro de) células beta pancreáticas de mamífero.

Por el contrario, pueden identificarse receptores adicionales para los cuales los ácidos grasos ligandos de la invención actúan como ligandos seleccionando candidatos potenciales frente a un ácido graso ligando en un ensayo adecuado, por ejemplo, determinando la posible inhibición de niveles de AMPc elevados por forskolina.

Kits adecuados para llevar a cabo los presentes procedimientos pueden contener:

- (a) GPR40 y uno o más ácidos grasos ligandos marcados o sin marcar;
- (b) una célula recombinante que expresa GPR40 y uno o más ácidos grasos ligandos marcados o sin marcar; o
- (c) una membrana celular que expresa GPR40 y uno o más ácidos grasos ligandos marcados o sin marcar.

Se apreciará que en cualquiera de tales kit, (a), (b), o (c) puede comprender un componente sustancial.

Pueden identificarse agonistas y/o antagonistas a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, a partir de células, preparaciones libres de células, bibliotecas químicas y mezclas de productos naturales. Tales agonistas y/o antagonistas pueden ser enzimas, receptores, ligandos, sustratos modificados o naturales, etc., como puede ser el caso de cualquiera de los ácidos grasos ligandos de la invención; o pueden ser miméticos funcionales o estructurales del polipéptido de la presente invención (véase Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology 1(2): Capítulo 5 (1991)).

Ejemplos de antagonistas potenciales incluyen:

(a) anticuerpos o, en algunos casos, oligonucleótidos, que se unen al receptor pero no provocan una segunda respuesta mensajera de manera que se evita la actividad del receptor;

(b) ácidos grasos que están íntimamente relacionados con un ligando de GPR40 pero que no provocan respuesta a partir del receptor GPR40;

(c) moléculas pequeñas que se unen a GPR40, haciéndolo inaccesible a ligandos de manera que se evita la actividad biológica normal, por ejemplo, moléculas de tipo péptido o péptidos pequeños;

(d) formas solubles de GPR40, por ejemplo, fragmentos del receptor, que se unen al ligando y evitan que el ligando interactúe con el GPR40 unido a membrana.

Los procedimientos según la invención pueden ser útiles en un procedimiento de diseño racional de fármaco que comprende las etapas de:

a) detectar la estructura de un sitio de unión a ácido graso ligando sobre el receptor GPR40 con dicho ácido graso ligando o un derivado del mismo;

b) identificar átomos de contacto en el sitio de unión del receptor GPR40 que interactúan con un ácido graso ligando durante la unión; y

c) diseñar compuestos agonistas o antagonistas que interactúan con los átomos en el sitio de unión identificados en (b) para activar (agonista) o inhibir (antagonista) la activación del receptor.

Por el contrario, también puede determinarse la estructura de cualquiera de los ácidos grasos ligandos cuando están unidos al sitio de unión a ligando sobre el receptor GPR40, permitiendo el diseño de compuestos antagonista adicionales. Tales antagonistas se unen al ácido graso ligando, evitando así la unión del ácido graso ligando al receptor. Procedimientos para usar ligandos o sus derivados para detectar la estructura de sitios de unión a ligandos en receptores, y diseño racional de fármacos basándose en esta información estructural, se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo Boyle, S *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry 1994, 2, 101-113; Beck-Sickinger, A.G *et al.* European Journal Of Biochemistry 1994, 225, 947-958; McWherter, C.A *et al.* J. Biol. Chem. 1997, 272, 11874-11880; Horwell, D.C *et al.* International Journal of Peptide & Protein Research 1996, 48, 522-531; Bednarek, M.A. *et al.* Peptides 1999, 20, 401-409).

Los compuestos identificados usando los procedimientos de selección o diseño racional anteriores serán de uso en terapia. Por ejemplo, un compuesto identificado como un agonista o un antagonista de GPR40 puede ser útil en terapia, en particular para tratamiento de diabetes tipo II (diabetes mellitus no insulino dependiente, DMNID) y obesidad, intolerancia a glucosa, resistencia a insulina, enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo enfermedad de Alzheimer) y otras indicaciones tal como accidente cerebrovascular, entre otras.

Por ejemplo, un procedimiento para tratar un estado anómalo relacionado con un exceso de actividad de GPR40 y/o un exceso de un ligando de GPR40 (por ejemplo un ácido graso ligando). El procedimiento comprende administrar a un paciente que lo necesita un antagonista de GPR40 tal como se describió anteriormente en el presente documento en una cantidad eficaz para bloquear o disminuir la unión de ligandos al receptor, o para inhibir o disminuir una segunda señal, aliviando así el estado anómalo.

Todavía en otro enfoque, puede inhibirse la expresión del gen que codifica para el polipéptido de GPR40 endógeno, usando las técnicas de bloqueo de la expresión. Técnicas de ese tipo conocidas implican el uso de secuencias antisentido, o bien generadas internamente o bien administradas externamente (véase, por ejemplo, O'Connor, J Neurochem (1991) 56:560 en Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Alternativamente, pueden suministrarse oligonucleótidos que forman hélices triples ("triplex") con el gen (véase, por ejemplo, Lee *et al.*, Nucleic Acids Res (1979) 6:3073; Cooney *et al.*, Science (1988) 241:456; Dervan *et al.*, Science (1991) 251:1360). Estos oligómeros pueden administrarse en sí mismos o pueden expresarse los oligómeros relevantes *in vivo*. Los oligonucleótidos triplex o antisentido sintéticos pueden comprender bases modificadas o estructuras principales modificadas. Ejemplos de éstos últimos incluyen estructuras principales de ácidos nucleicos peptídicos, metilfosfonato o fosforotioato. Tales estructuras principales se incorporan en el oligonucleótido triplex o antisentido para proporcionar protección frente a la degradación por nucleasas y se conocen bien en la técnica. Molé-

culas antisentido y triplex sintetizadas con estas u otras estructuras principales modificadas también forman parte de la presente invención.

Además, puede evitarse la expresión del polipéptido de GPR40 humano usando ribozimas específicas para la secuencia de ARNm de GPR40 humano. Las ribozimas son ARN catalíticamente activos que pueden ser naturales o sintéticos (véase por ejemplo Usman, N, *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol (1996) 6(4), 527-33.) Pueden diseñarse ribozimas sintéticas para escindir específicamente ARNm de GPR40 en posiciones seleccionadas, evitando así la traducción de los ARNm de GPR40 humano para dar polipéptido funcional. Las ribozimas pueden sintetizarse con una estructura principal de ribosa fosfato natural y bases naturales, tal como se encuentra normalmente en moléculas de ARN. Alternativamente las ribozimas pueden sintetizarse con estructuras principales no naturales para proporcionar protección frente a la degradación por ribonucleasa, por ejemplo, 2'-O-metil-ARN, y pueden contener bases modificadas.

La identificación de un ligando para GPR40, tal como un ácido graso ligando de la invención, permite la identificación eficaz de anticuerpos policlonales o monoclonales preparados contra GPR40 que son anticuerpos neutralizantes. Tales anticuerpos neutralizantes son de uso en terapia, en comparación con anticuerpos no neutralizantes que son ineficaces. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención hace referencia al uso de anticuerpos neutralizantes preparados contra GPR40 en terapia.

Los compuestos que son activos cuando se administran por vía oral pueden formularse como líquidos, por ejemplo, jarabes, suspensiones o emulsiones, comprimidos, cápsulas y pastillas. Una formulación líquida estará constituida generalmente por una suspensión o disolución del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable en un (unos) vehículo(s) líquido(s) adecuado(s) por ejemplo, etanol, glicerina, disolvente no acuoso (por ejemplo polietilenglicol), aceites o agua con un agente de suspensión, conservante, aromatizante o colorante. Una composición en la forma de un comprimido puede prepararse usando cualquier vehículo farmacéutico adecuado usado rutinariamente para preparar formulaciones sólidas. Ejemplos de tales vehículos incluyen estearato de magnesio, almidón, lactosa, sacarosa y celulosa. Una composición en la forma de cápsula puede prepararse usando procedimientos de encapsulación rutinarios. Por ejemplo, grageas que contienen el principio activo pueden prepararse usando vehículos convencionales y luego introducirse en una cápsula de gelatina dura; alternatively, puede prepararse una dispersión o suspensión usando cualquier vehículo farmacéutico adecuado (por ejemplo gomas acuosas, celulosas, silicatos o aceites) y luego introducir la dispersión o suspensión en una cápsula de gelatina blanda. Las composiciones parenterales típicas están constituidas por una disolución o suspensión del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable en un vehículo acuoso estéril o aceite parenteralmente aceptable, por ejemplo polietilenglicol, polivinilpirrolidona, lecitina, aceite de cacahuete o aceite de sésamo. Alternativamente, puede liofilizarse la disolución y luego reconstituirse con un disolvente adecuado justo antes de la administración. Una formulación de supositorio típica comprende un principio activo o sal farmacéuticamente aceptable del mismo que es activo cuando se administra de esta manera, con un agente aglutinante y/o lubricante tal como glicoles poliméricos, gelatinas o manteca de cacao u otras ceras o grasas vegetales o sintéticas de bajo punto de fusión. La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos los cuales se pretende que ilustren la invención sin limitar su alcance. Para facilitar el entendimiento de los siguientes ejemplos se describirán ciertos procedimientos y/o términos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis TAQMAN® de la expresión de GPR40 en tejidos humanos

Generación de muestras para análisis TAQMAN® de ARNm: se realizó una PCR de TAQMAN® siguiendo el procedimiento publicado por Sarau H.M. *et al.* ("Identification, Molecular Cloning, Expression and Characterisation of a Cysteinyl Leukotriene Receptor", Molecular Pharmacology, 1999, 56, 657-663). Se realizó una PCR de TAQMAN® cuantitativa para medir ARNm de GPR40 usando placas de 96 pocillos repetidas. Se añadió un volumen de 20 µl de una mezcla maestra de PCR (que contiene 2,5 µl de tampón TAQMAN®, 6 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de dATP 10 mM, 0,5 µl de dUTP 20 mM, 0,5 µl de dCTP 10 mM, 0,5 ml de dGTP 10 mM, 0,25 µl de uracil-N-glucosilasa, 1 µl de cebador directo 10 µM, 1 µl de cebador inverso 10 µM, 0,5 µl de sonda TAQMAN® 5 µM, 0,125 µl de TaqGold [PE Biosystems], 6,625 µl de agua) a cada pocillo usando robótica de Biomek (Beckman Coulter, High Wycombe, RU), y se tapó la placa usando tapas ópticas (PE Biosystems). Se llevó a cabo la reacción de PCR en un detector de secuencia ABI7700 (PE Biosystems) usando los parámetros de PCR: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos y 45 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, y se calculó el nivel de ADNc derivado de ARNm en cada muestra a partir de la señal TAQMAN® usando los patrones de calibración de ADN plásmido/genómico incluidos en cada serie. Se demostró que el nivel de ADN genómico que contamina las muestras de ARN originales era despreciable (<10 copias de ADN genómico/ng de ARN) mediante medición de TAQMAN® de la secuencia genómica para diez genes en muestras repetidas tomadas mediante el procedimiento de transcripción inversa descrito con la omisión de transcriptasa inversa. Los reactivos específicos de gen para GPR40:

cebador directo:	5' GTGGTGCTTAATCCGCTGGT	(SEQ ID NO: 5)
cebador inverso:	5' TGGCGTTACTTCTGGGACTTG	(SEQ ID NO: 6)
sonda:	5' CTTGCGTTCTTGCCGCACACACTGT	(SEQ ID NO: 7)

ES 2 280 427 T3

Los resultados muestran que los mayores niveles de GPR40 se expresan en el páncreas; los resultados se muestran en la tabla 1

TABLA 1

Unidades de nivel de ARNm de tejido corporal de GPR40: copias de ARNm de GPR40 detectadas/ng de combinación de ARNm		
	. copias de ARNm medias	+/- EEM
Cerebro	111	12
Pituitaria	46	18
Corazón	91	47
Pulmón	30	15
Hígado	28	11
Hígado fetal	59	28
Riñón	24	13
Músculo	44	10
Estómago	22	7
Intestino	34	21
Bazo	61	4
Linfocitos	62	24
Macrófago	7	7
Adiposo	30	6
Páncreas	225	44
Próstata	78	32
Placenta	31	11
Cartílago	5	6
Hueso	30	11
Médula ósea	20	12

Ejemplo 2

Expresión de GPR40 en células de islote pancreático humanas

Se llevó a cabo un análisis TAQMAN® de ARN de islote pancreático humano frente al ARN pancreático total tal como se describe en el ejemplo 1. Para una muestra de ARN equivalente de células de islote y páncreas total, había una expresión de GPR40 de 2 a 100 veces superior en 3 muestras de islote independientes que en páncreas total. (Resultados no mostrados).

ES 2 280 427 T3

Ejemplo 3

Expresión de GPR40 en células de insulinoma MIN6 y BRIN

5 *Condiciones TAQMAN® para expresión de GPR40 de ratón y rata*

Se realizó un TAQMAN® usando 50 ng de ADNc por reacción con cebador directo 0,3 μ M, cebador inverso 0,3 μ M, sonda 0,1 μ M y 1x mezcla maestra TAQMAN® (PE Applied Biosystems, RU). Las condiciones de ciclo fueron tal como sigue: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segs, 60°C durante 1 min.

Conjuntos cebador/sonda para GPR40 de ratón/rata

15 Cebador directo: 5' AGTTCCCTGGGCATCAACATA3' (SEQ ID NO: 8)
 Cebador inverso: 5' CAAGGGCAGAAAGAAGAGCAGA3' (SEQ ID NO: 9)
 Sonda: 5' AATGGCTCCCCGGTCTGCCTGG3' (SEQ ID NO: 10).

20 Los resultados se muestran en la tabla 2. Los resultados muestran que GPR40 se expresó en ambas líneas celulares de insulinoma, lo que confirma la ubicación de células β . Los resultados mostraron además que la expresión de GPR40 en células MIN6 es mucho mayor que en células BRIN.

TABLA 2

25

30 Línea celular de insulinoma	Valor Ct prom ¹	Valor relativo (curva patrón de ratón) normalizado (HPRT ²)	Valor relativo (curva patrón de rata) normalizado (HPRT ²)
35 MIN6 (insulinoma de ratón)	22,7	0,95	119946,9
40 BRIN (insulinoma de rata)	37,1	3,23 x 10 ⁻⁵	0,09
45 1) valor Ct se refiere al número de ciclo de TAQMAN® necesario para detectar la expresión génica para ese transcrito. 2) HPRT= Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa			

50 Ejemplo 4

La expresión de GPR40 aumenta en el páncreas de ratón ob/ob

55 Se llevó a cabo un análisis TAQMAN® para determinar los niveles de GPR40 en ratones flacos C57B1/6 comparado con ratones inactivados homocigóticos *ob/ob* C57B1/6. Estos niveles se compararon adicionalmente con niveles de ARNm de insulina. Los resultados se muestran en la tabla 3.

60

65

TABLA 3

	Cantidad relativa de GPR40 ¹ (ARNm $\pm$ e.e.m.)	Cantidad relativa de insulina (ARNm $\pm$ e.e.m.)
Ratones flacos C57B1/6 (n=10)	12 $\pm$ 28	78 $\pm$ 7
Ratones <i>ob/ob</i> C57B1/6 (n=10)	113 $\pm$ 23	960 $\pm$ 145
1) medida relativa a partir de una curva patrón creada usando cantidades conocidas de ADNc preparado a partir de ARN total con cebadores aleatorios		

Ejemplo 5

GPR40 y ácidos grasos: apareamiento de receptor y ligando

Las células que expresan el receptor GPR40 muestran un aumento relacionado con la dosis en los niveles de calcio intracelular en respuesta a los ácidos grasos ligandos, tal como se mide mediante tecnología FLIPR. La figura 1 muestra la respuesta de FLIPR detectada tras la adición de ácido eláídico (ácido trans-oleico, ácido 9-octadecanoico) a células HEK-293 que expresan transitoriamente el receptor GPR40. No se detectó ninguna respuesta en células que expresan transitoriamente otros dos receptores 7TM (PGRW y HLTEX11). Los ensayos utilizaron un cóctel de proteína G (+GPC) que contenía proteínas G quiméricas y promiscuas, tal como se conoce en la técnica de selección de receptores acoplados de proteína G huérfano.

La estimulación de GPR40 mediante otros ácidos grasos ligandos, usando tecnología FLIPR tal como se describe en el presente documento, se muestra en la tabla 4 a continuación (pCE50 = -log CE50 donde CE50 es la “concentración eficaz”; CE50 es la mitad de la concentración de compuesto necesaria para una respuesta máxima)

TABLA 4

					pEC50 medio de 3 experimentos	(+/-) eem
	pEC50 medio	pEC50 medio	pEC50 medio			
Ácidos grasos insaturados						
Ácido palmitoleico C ₁₆ H ₃₀ O ₂ (9Z)	4,82	4,81	4,96		4,86	0,05
Ácido linolénico	4,93	4,66	5,12		4,90	0,13

5	$C_{18}H_{30}O_2$ (9Z, 12Z, 15Z)					
	Ácido linoleico $C_{18}H_{32}O_2$ (9Z, 12Z)	4,78	4,68		4,73	n=2
10	Ácido 12-elaídico $C_{18}H_{34}O_2$ (9E)	5,03	5,27	5,18	5,16	0,07
15	Ácido oleico $C_{18}H_{34}O_2$ (9Z)	4,55	4,23		4,39	n=2
20	Ácido petroselinico $C_{18}H_{34}O_2$ (6Z)	4,88*	4,97	5,03	5,00	0,02
25	Todo trans-retinal (aldehído de vitamina A) $C_{20}H_{28}O$	4,08	4,23		4,16	n=2
30	Ácido todo trans-retinoico (ácido de vitamina A; Tretinoína) $C_{20}H_{28}O_2$	5,56	5,52	5,65	5,58	0,04
35	Ácido 9-cis-retinoico (9-cis-tretinoína) $C_{20}H_{28}O_2$	4,27	4,52		4,40	n=2
40	Todo trans-retinol (vitamina A) $C_{20}H_{30}O$	Sin ajuste	Sin ajuste			
45	Ácido araquidónico $C_{20}H_{32}O_2$ (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)	4,74	4,89	5,14	4,92	0,12
50	Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico $C_{22}H_{32}O_2$	5,18	5,53	5,4	5,37	0,10
55	Ácido erúcico $C_{22}H_{42}O_2$ (13Z)	4,33*	Sin ajuste		4,33	n=1
60	Ácido nervónico $C_{24}H_{46}O_2$ (15Z)	Sin ajuste	Sin ajuste			

65

Ácidos grasos saturados						
Ácido n-caproico $C_6H_{12}O_2$	4,33*	Sin ajuste		6	4,33	n=1
Ácido heptanoico $C_7H_{14}O_2$	4,33	4,22*		7	4,28	n=2
Ácido caprílico $C_8H_{16}O_2$	4,25	4,58		8	4,42	n=2
Ácido nonanoico $C_9H_{18}O_2$	4,16	4,63		9	4,40	n=2
Ácido cáprico $C_{10}H_{20}O_2$	4,74	4,96	4,84	10	4,85	0,06
Ácido undecanoico $C_{11}H_{22}O_2$	4,6	4,66	4,83	11	4,70	0,07
Ácido laúrico (ácido dodecanoico) $C_{12}H_{24}O_2$	4,75	4,93	5,07	12	4,92	0,09
Ácido tridecanoico $C_{13}H_{26}O_2$	4,8	4,95	5,05	13	4,93	0,07
Ácido mirístico $C_{14}H_{28}O_2$	4,95	4,52	5,05	14	4,84	0,16
Ácido pentadecanoico $C_{15}H_{30}O_2$	4,97	5,36	5,21	15	5,18	0,11
Ácido palmítico $C_{16}H_{32}O_2$	5,08	5,51	5,3	16	5,30	0,12
Ácido heptadecanoico $C_{17}H_{34}O_2$	4,86	4,99	5,11	17	4,99	0,07
Ácido esteárico $C_{18}H_{36}O_2$	4,7	4,78	4,85	18	4,78	0,04
Ácido nonadecanoico $C_{19}H_{38}O_2$	4,58	4,46*		19	4,52	n=2
Ácido araquídico $C_{20}H_{40}O_2$	Sin ajuste	4,21*		20	4,21	n=1

5	Ácido heneicosanoico $C_{21}H_{42}O_2$	4,45	4,53*		21	4,49	n=2
10	Ácido behénico (ácido docosanoico) $C_{22}H_{44}O_2$	4,29	4,31		22	4,30	n=2
15	Ácido tricosanoico $C_{23}H_{46}O_2$	4,31*	Sin ajuste		23	4,31	n=1
20	Ácido lignocérico $C_{24}H_{48}O_2$	Sin ajuste	Sin ajuste		24	0	
25	Compuestos de ácidos grasos adicionales		CE50 (M)	CE50 M	pCE50		
30	Ácido medio (10:3, n-9)		2,51E-06	2,5	5,60		
35	Ácido linoleico (18:2, n-6)		9,54E-06	9,5	5,02		
40	Ácido linolénico (18:3, n-3)		5,50E-06	5,5	5,26		
45	Ácido gamma-linolénico (18:3, n-6)		8,91E-06	8,9	5,05		
50	Ácido eláidico (18:1, n-9, E)		1,35E-05	13,5	4,87		
55	Ácido 17-octadecinoico (17-ODYA) (18:1 x acetileno terminal)		7,58E-06	7,6	5,12		
60	Ácido eicosa-11Z, 14Z-dienoico (20:2, n-6)		1,07E-05	10,7	4,97		
65	Ácido eicosa-5Z,8Z-dienoico (20:2, n-12)		7,76E-06	7,8	5,11		
	Ácido eicosa-11Z,14Z,17Z-		1,12E-05	11,2	4,95		

	trienoico (20:3, n-3)					
5	Ácido dihomogamma-linolénico (20:3, n-6)	7,24E-06	7,2	5,14		
10	Ácido 5,8,11-eicosatrienoico (20:3 x acetilenos)	1,70E-06	1,7	5,77		
15	Ácido eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaenoico (20:5, n-3)	6,76E-06	6,8	5,17		
20	Ácido araquidónico (20:4, n-6)	9,12E-06	9,1	5,04		
25	14(R), 15(S)-DiHETE (20:4 +2 hidroxilos)	2,34E-05	23,4	4,63		
30	Ácido docosa-13Z,16Z,19Z-trienoico (22:3, n-3)	6,76E-06	6,8	5,17		
35	Ácido adrenico (22:4, n-6)	1,35E-05	13,5	4,87		
40	Ácido docosa-7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-pentaenoico (22:5, n-3)	4,68E-06	4,7	5,33		
45	Ácido docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico(22:6, n-3)	1,62E-06	1,6	5,79		
50						

Ejemplo 5A

*Ensayos funcionales**Acoplamiento de proteína G*

La mayoría de los GPCR muestran actividad constitutiva como una expresión de los aumentos de GPCR. Se realizaron experimentos para determinar si GPR40 se acopla mediante $G\alpha_s$, $G\alpha_q$ o $G\alpha_i$, usando indicadores constitutivamente activos y siguiendo la activación de agonista.

Se examinó la actividad de GPR40 constitutiva en melanóforos. Se transfectaron transitoriamente los melanóforos con 10, 20, 40 y 80 μ g de ADN de plásmido de GPR40/pJG3,6 mediante electroporación y se colocaron en placas de 96 pocillos. Cuarenta y ocho horas tras la electroporación, se aspiraron los medios y se sustituyeron con tampón de ensayo L-15, tampón de ensayo + melatonina 25 nM o tampón de ensayo + alfa-MSH 100 nM. Se dejaron incubar

estos reactivos durante 2 horas y se midió la transmitancia (T). Se calculó la actividad constitutiva porcentual usando el siguiente cálculo:

$$\frac{(T(L15) - T(MSH))}{(T(\text{Melatonina}) - T(MSH))} * 100$$

Los resultados muestran que cantidades crecientes de ADN de GPR40 transfectado producían un aumento en la actividad de $G\alpha_i/G\alpha_o$, lo que indica que la actividad constitutiva de GPR40 es mediante cualquiera de las familias de $G\alpha_i/G\alpha_o$ de proteínas-G (figura 2).

Se determinó el acoplamiento específico en células de mamíferos usando la expresión transitoria de indicador CRE-luciferasa para $G\alpha_s$ y líneas celulares estables que contenían indicador Gal4/ELK-1-luciferasa para $G\alpha_q/G\alpha_i$. Se cotransfectaron células CHO de tipo natural con 3X vector indicador CRE-luciferasa y diversas cantidades de un vector de expresión para GPR40. Se transfectaron las células de control sólo con vector indicador. Se produjeron los plásmidos del gen indicador internamente pero pueden comprarse vectores similares de Stratagene (PATHDETECT®). Las células se colocaron en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos a 1×10^4 células/pocillo en DMEM/F12 complementado con SBF al 5%. Tras 72 horas a 37°C, CO₂ al 5%, se transfectaron las células usando el reactivo de transfección liposomal vendido con la marca comercial LIPOFECTAMINE® y con las siguientes combinaciones de plásmidos:

A- 3x-CRE-Luc

B- 3x-CRE-Luc + CMV-GPR40

C- 3x-CRE-Luc + CMV-receptor acoplado a Gs

La concentración de plásmido indicador para todos los pocillos fue de 0,15 µg/pocillo. Las concentraciones de plásmidos receptores fueron de 0,5, 1,0, 5,0, 10,0 ng/pocillo. Tras 24 h las células que contenían 1 ng/pocillo de plásmido receptor o sin control de ADN e indicador CRE-Luc se trataron con ácido graso o la calcitonina que se sabe que actúa mediante un receptor acoplado a Gs (Chakraborty, Science 251: 1078 (1991)) a las concentraciones indicadas. Se sometió la producción de luciferasa a ensayo tras 4 horas de tratamiento usando un kit de ensayo de gen indicador luciferasa con la marca comercial LUCLITE®, usado según las instrucciones del fabricante (Packard Bioscience).

Tal como se muestra en la figura 3a, no hubo aumento en la actividad del indicador en el sistema de CRE a ninguna dosis del vector de expresión de GPR40. Por el contrario, tal como se muestra en la figura 3b, la expresión de un receptor acoplado a Gs provocó un aumento significativo en la actividad de luciferasa.

Tal como se muestra en la figura 3c, aunque la calcitonina provocó un aumento en la producción de luciferasa tanto en las células que contenían sólo indicador como en aquellas que contenían GPR40, no hubo ningún efecto del ácido 5,8,11-eicosatrienoico a cualquier concentración sometida a prueba, lo que indicó que ni la actividad constitutiva de GPR40 ni la activada por agonista está acoplada por medio de Gas.

Se usó un indicador Gal4/Elk-1 para someter adicionalmente a prueba el acoplamiento de GPR40 a $G\alpha_i/G\alpha_q$. Se creó una línea indicadora clónica, estable, transfectando células CHO con un plásmido que contenía un constructo de expresión para GAL4/Elk-1 y un constructo indicador GAL4-luciferasa. Ahora puede comprarse un sistema indicador similar de Stratagene (con la marca comercial PATHDETECT®). Se transfectó un constructo de expresión para GPR40 humano, que contenía un constructo de resistencia frente a G418 en la línea celular CHO huésped con indicador GAL4/Elk-1 (10 µg de ADN de plásmido pCR3-GPR40) por medio de electroporación. Se seleccionaron las líneas celulares con G418 500 µg/ml hasta que todas las células en el control estuvieron muertas y entonces se seleccionaron los clones. Puede activarse el indicador Gal4/Elk-1 mediante Gq o Gi. Para confirmar el acoplamiento por medio de Gi, se trataron las células con tratamiento de toxina pertussis que ADP ribosila la $G\alpha_i$ evitando su interacción con receptores (Bokoch *et al.*, J. Biol. Chem 258:2072 (1983)). La toxina pertussis no tiene efectos conocidos sobre $G\alpha_q$.

Se colocaron las células huésped y aquellas transfectadas con el constructo de GPR40 en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos con 2000 células/pocillo en DMEM/F12 complementado con SBF al 5%. Tras 48 horas a 37°C a CO₂ al 5%, se colocaron las células en DMEM/F12 libre de suero en presencia o ausencia de 1 µg/ml de toxina pertussis. Tras 16 horas a 37°C, CO₂ al 5%, se trataron las células huésped con: ácido lisofosfatídico (oleoil) (LPA) que se acopla mediante $G\alpha_i$ para activar la MAP quinasa (Hordijk *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 645 (1994)); trombina que se acopla mediante $G\alpha_i$ y $G\alpha_q$ (Hung *et al.*, J. Biol. Chem. 267:20831 (1992)); o ácido 5,8,11-eicosatrienoico (un ligando de GPR40), a las concentraciones indicadas. Se estimularon las células huésped que contenían el constructo de GPR40 con ácido 5,8,11-eicosatrienoico a las concentraciones indicadas. Los controles para el ácido lisofosfatídico contenían DMSO al 0,5%; los controles para el ácido 5,8,11-eicosatrienoico contenían etanol al 0,05%. Se sometió la actividad de luciferasa a ensayo 4 horas después del tratamiento usando un kit de ensayo de gen indicador de luciferasa disponible con la marca comercial LUCLITE®, según las instrucciones del fabricante (Packard Bioscience).

Tal como se muestra en la figura 4A, en las células huésped, se suprimió completamente la actividad indicadora estimulada por LPA mediante el tratamiento con toxina pertussis confirmando el acoplamiento mediante $G\alpha_i$.

Tal como se muestra en la figura 4C, la producción de luciferasa debida a la estimulación con trombina sólo se atenuó parcialmente tras el tratamiento con toxina confirmando el acoplamiento mediante Gai/Gaq .

Tal como se muestra en las figuras 4D y 4E, los clones transfectados con el constructo de expresión de GPR40 e indicador ELK-Gal4 mostraron un aumento de la actividad de indicador basal frente a la línea de la célula huésped que sólo contenía indicador, que disminuyó en hasta el 70% tras el tratamiento con toxina pertussis sugiriendo actividad de indicador acoplado a Gai constitutiva.

Tal como se muestra en la figura 4B, el ácido 5,8,11-eicosatrienoico no tuvo ningún efecto sobre la producción de luciferasa en las células huésped, pero aumentó la actividad de luciferasa comparado con la basal en células que contenían GPR40 en una manera que no se inhibía por el tratamiento con toxina pertussis.

Estos ensayos demuestran que la actividad del receptor GPR40 constitutiva está acoplada a las proteínas-G sensibles a toxina pertussis $G\alpha_i$, o $G\alpha_o$ (y miembros de la familia relacionados). Además, la activación del receptor GPR40 estimulada por agonista de ácido graso está acoplada mediante una proteína G insensible a toxina pertussis, lo que sugiere que la activación del receptor GPR40 estimulada por agonista está acoplada mediante $G\alpha_q$.

Ejemplo 6

Ensayos funcionales

Ensayo de calcio

Los receptores expresados de manera estable en células HEK 293 pueden demostrar una respuesta de calcio robusta frente a agonistas con la potencia y el orden de rango apropiado. Los niveles de calcio basales en las células HEK 293 en células control vector o transfectadas con GPR40 están en el intervalo normal de 100 nM a 200 nM. Se cargan células HEK 293 que expresan receptores GPR40 recombinantes con el indicador fluorescente FLUO-4 y en un único día se evalúan > 150 ligandos seleccionados para detectar la movilización de calcio inducida por agonista. Los agonistas que presentan una movilización de calcio transitoria se someten a prueba en células control vector para determinar si la respuesta de calcio es única para las células de receptor transfectadas. Cuando se identifica una respuesta inducida por agonista única, se reproduce la respuesta en un grupo separado de células y luego se caracteriza farmacológicamente con curvas de respuesta a concentración para los ligandos eficaces y relacionados.

Ejemplo 7

Preparación de membrana y selección para GPR40

Los ensayos de competición de unión a ácido graso ligando son útiles para el descubrimiento de antagonistas y agonistas del receptor GPR40. Las células CHO o HEK 293 transfectadas de manera estable con el receptor GPR40 son útiles como fuente de receptor GPR40; también pueden emplearse otras células transfectadas con el receptor GPR40 o células que muestran naturalmente un alto nivel de expresión del receptor GPR40. Normalmente, se aumenta en escala el cultivo de células que expresan el receptor GPR40 hasta 30 l y se recuperan las células mediante centrifugación a 600 x g durante 10 min. Entonces se congela el sedimento celular en nitrógeno líquido. Los sedimentos contienen normalmente alrededor de 10^9 células. Para el aislamiento de membrana, se congelan/descongelan los sedimentos 3 veces. Luego se resuspenden en Tris 10 mM enfriado en hielo (pH 7,5), EDTA (sal de sodio) 1 mM (40 ml/1e8 células) y se homogeneizan usando un homogeneizador (20-25 tiempos) Dounce (cristal/cristal), seguido por una suspensión con Polytron con pulsos de 3-10 seg con un ajuste 3/4 (homogeneizador de tejido Brinkman). Se centrifuga esta suspensión a 300 x g durante 10 min. Se descarta el sedimento y se centrifuga la fracción sobrenadante a 40.000 x g (Sorvall SS-34: 18.000 rpm) durante 30 min a 4°C, se resuspende en tampón de homogeneización usando el Polytron y se lava una vez. Se resuspende el sedimento en tampón de ensayo (Tris 50 mM pH 7,5) a una concentración de 1-4 mg de proteína/ml.

Las membranas obtenidas de esta manera son adecuadas para la preparación de un ensayo de competición de unión a ácido graso ligando de alto rendimiento para buscar compuestos que interfieren en la interacción ligando-receptor. La unión total de un ácido graso marcado a estas membranas se somete a prueba en primer lugar para determinar si es lineal con la cantidad de membranas usadas. También se establece el periodo de tiempo para alcanzar la unión de equilibrio a una temperatura adecuada y según nuestra experiencia es de aproximadamente 1 h a una temperatura de 20°C. Las condiciones para un ensayo de selección de este tipo se ejemplifican por aquellas usadas en la unión a receptor MCH. Normalmente se usan 25 μ g de proteína de membrana por pocillo en un volumen total de 100 μ l de tampón que contiene HEPES 50 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM y albúmina de suero bovino al 0,5% (calidad de inmunotransferencia de tipo western), pH 7,4. La concentración de ^{125}I -mMCH es normalmente de 1-2 nM y 75.000 cpm/pocillo. La unión específica de ^{125}I -mMCH debe desplazarse completamente por MCH sin marcar a concentraciones de 100 nM o más.

ES 2 280 427 T3

Normalmente se disuelven los compuestos que van a someterse a prueba y se añaden a DMSO y las concentraciones finales de DMSO en el ensayo son del 1% o inferiores. Tras la incubación se recogen los contenidos de los pocillos en un filtro GF/C tratado con polietilenimina usando un colector de células de placa de 96 pocillos y se lavan los filtros cuatro veces normalmente con 1 ml de tampón de lavado enfriado con hielo que contiene HEPES 20 mM, NaCl 0,5 M pH 7,4. Se cuentan los filtros para identificar los antagonistas de la unión a ácido graso ligando marcado.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para seleccionar un compuesto de prueba para determinar si el compuesto es un ligando de receptor GPR40, que comprende detectar si dicho compuesto de prueba inhibe competitivamente la unión de un ácido graso ligando de GPR40 a un receptor GPR40, en el que el ácido graso ligando de GPR40 es un ácido graso C₆-C₂₃ saturado o insaturado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ácido graso ligando de GPR40 contiene hasta 6 enlaces alquilenos o 3 acetileno.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ácido graso ligando de GPR40 es cíclico o ramificado.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido graso ligando de GPR40 está sustituido con 1-3 grupos hidroxilo.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ácido graso ligando de GPR40 está marcado con una etiqueta detectable.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho receptor GPR40 está proporcionado por membranas celulares que contienen receptores GPR40 funcionales.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho ácido graso ligando de GPR40 se selecciona a partir de agonistas de ácido graso de GPR40:
 - ácido palmitoleico C₁₆H₃₀O₂ (9Z);
 - ácido linolénico C₁₈H₃₀O₂ (9Z, 12Z, 15Z);
 - ácido linoleico C₁₈H₃₂O₂ (9Z, 12Z);
 - ácido elaídico C₁₈H₃₄O₂ (9E);
 - ácido oleico C₁₈H₃₄O₂ (9Z);
 - ácido petroselínico C₁₈H₃₄O₂ (6Z);
 - todo trans-retinal (vitamina A; aldehído) C₂₀H₂₈O;
 - ácido todo trans-retinoico (ácido de vitamina A; Tretinoína) C₂₀H₂₈O₂;
 - ácido 9-cis-retinoico (9-cis-tretinoína) C₂₀H₂₈O₂;
 - todo trans-retinol (vitamina A) C₂₀H₃₀O;
 - ácido araquidónico C₂₀H₃₂O₂ (5Z, 8Z, 11Z, 14Z);
 - ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenoico C₂₂H₃₂O₂;
 - ácido erúico C₂₂H₄₂O₂ (13Z);
 - ácido nervónico C₂₄H₄₆O₂ (15Z);
 - ácido n-caproico C₆H₁₂O₂;
 - ácido heptanoico C₇H₁₄O₂;
 - ácido caprílico C₈H₁₆O₂;
 - ácido nonanoico C₉H₁₈O₂;
 - ácido cáprico C₁₀H₂₀O₂;
 - ácido undecanoico C₁₁H₂₂O₂;
 - ácido laúrico (ácido dodecanoico) C₁₂H₂₄O₂;
 - ácido tridecanoico C₁₃H₂₆O₂;

ES 2 280 427 T3

ácido mirístico $C_{14}H_{28}O_2$;

ácido pentadecanoico $C_{15}H_{30}O_2$;

5 ácido palmítico $C_{16}H_{32}O_2$;

ácido heptadecanoico $C_{17}H_{34}O_2$;

10 ácido esteárico $C_{18}H_{36}O_2$;

ácido nonadecanoico $C_{19}H_{38}O_2$;

ácido araquídico $C_{20}H_{40}O_2$;

15 ácido heneicosanoico $C_{21}H_{42}O_2$;

ácido behénico (ácido docosanoico) $C_{22}H_{44}O_2$;

20 ácido tricosanoico $C_{23}H_{46}O_2$;

ácido lignocérico $C_{24}H_{48}O_2$;

ácido medio (10:3, n-9);

25 ácido linoleico (18:2, n-6);

ácido linolénico (18:3, n-3);

ácido gamma-linolénico (18:3, n-6);

30 ácido elaídico (18:1, n-9, E);

ácido 17-octadecinoico (17-ODYA) (18:1 x acetileno terminal);

35 ácido eicosa-11Z,14Z-dienoico (20:2, n-6);

ácido eicosa-5Z,8Z-dienoico (20:2, n-12);

ácido eicosa-11Z,14Z,17Z-trienoico (20:3, n-3);

40 ácido dihomogamma-linolénico (20:3, n-6);

ácido 5,8,11-eicosatrienoico (20:3 x acetilenos);

45 ácido eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-pentenoico (20:5, n-3);

ácido araquidónico (20:4, n-6);

14(R), 15(S)-DiHETE (20:4 + 2 hidroxilos);

50 ácido docosa-13Z,16Z,19Z-trienoico (22:3, n-3);

ácido adrénico (22:4, n-6);

55 ácido docosa-7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-pentenoico (22:5, n-3);

ácido docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexenoico (22:6, n-3);

60 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho ácido graso ligando de GPR40 se selecciona de ácido trans-retinoico; ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexenoico; ácido palmítico; ácido pentadecanoico; ácido elaídico; ácido petroselinico; ácido heptadecanoico; ácido tridecanoico; ácido láurico; ácido araquidónico; ácido linolénico; ácido palmitoleico; ácido cáprico; ácido mirístico; ácido esteárico; ácido undecanoico; y ácido eicosatrienoico

9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8 que comprende:

65 (a) proporcionar una célula que expresa sobre su superficie un receptor GPR40, y que contiene un constructo indicador que comprende:

(i) un elemento transcripcional sensible seleccionado de un elemento transcripcional sensible a Gi, un elemento transcripcional sensible a Gq, y un elemento transcripcional sensible a Gi/Gq; y

(ii) un gen indicador, en el que la expresión del gen indicador produce una señal detectable;

(b) exponer dicha superficie celular a un compuesto de prueba y un agonista de GPR40 en condiciones que permitan la unión de un ligando de GPR40 al receptor GPR40; y

(c) detectar la expresión del gen indicador;

en el que la expresión disminuida del gen indicador en presencia tanto del compuesto de prueba como del agonista, comparado con la expresión del gen indicador en presencia de dicho agonista de GPR40 sólo, indica que dicho compuesto de prueba es un antagonista de GPR40.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha etapa de comparación comprende comparar la señal detectable medida con un patrón determinado previamente.

11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha etapa de comparación comprende proporcionar una célula control, exponer dicha célula control a dicho agonista de ácido graso de GPR40, medir la señal detectable producida por el gen indicador, y comparar dichas mediciones de célula control con dichas mediciones de célula de prueba.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicho gen indicador codifica para una enzima seleccionada de luciferasa, fosfatasa, fosfatasa alcalina secretada, β -galactosidasa, proteína fluorescente verde, beta lactamasa, y cloramfenicol acetil transferasa.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que dicha célula es una célula de mamífero.

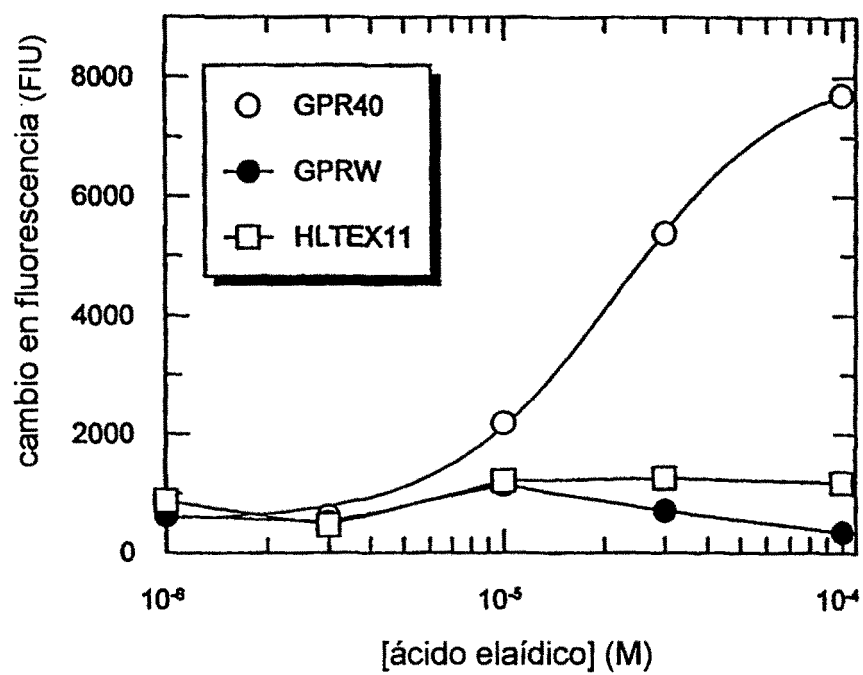
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que dicho elemento transcripcional sensible es un elemento transcripcional sensible a Gi.

15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que dicho elemento transcripcional sensible es un elemento transcripcional sensible a Gq.

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que dicho elemento transcripcional sensible es un elemento transcripcional sensible a Gi/Gq.

17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el elemento transcripcional sensible a Gi/Gq es Gal4/ELK-1.

Figura 1



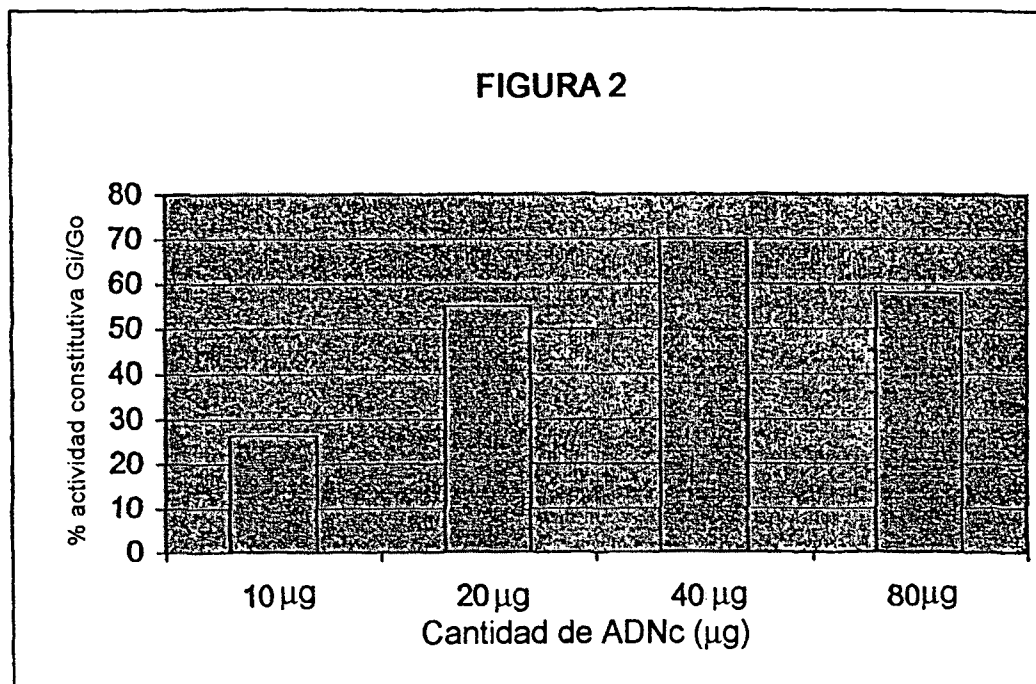


Fig. 3A

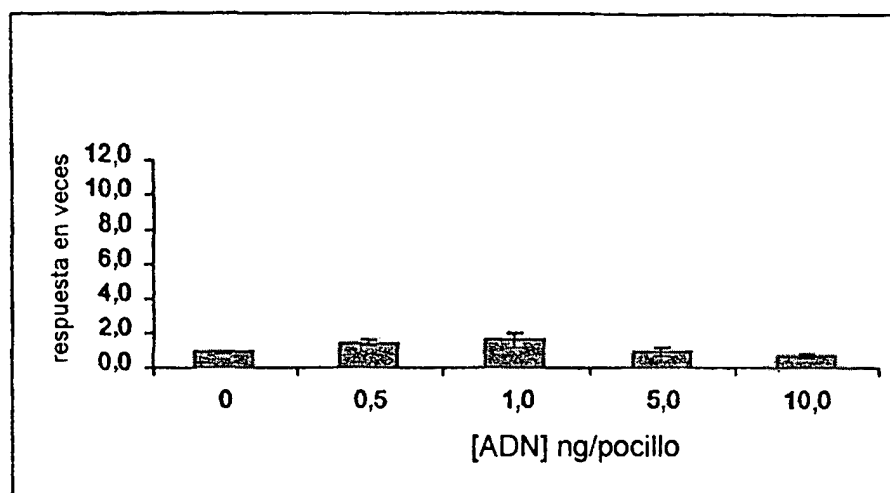


Fig 3B

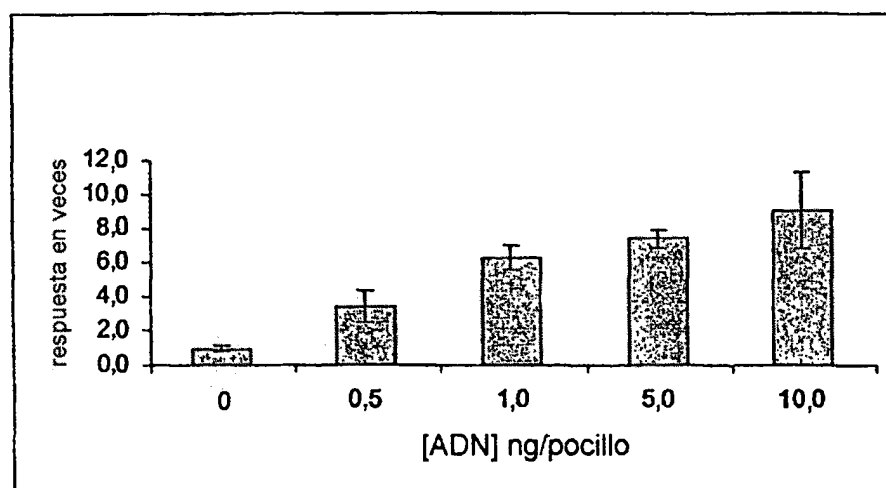


Fig 3c

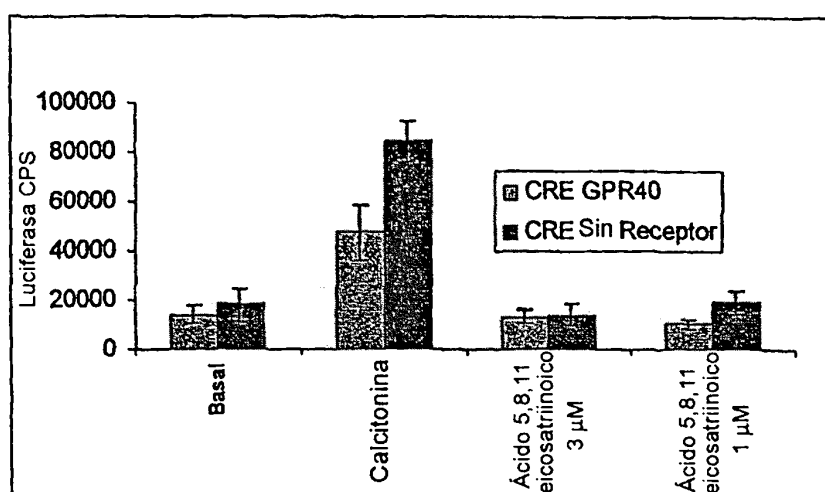


Fig. 4A

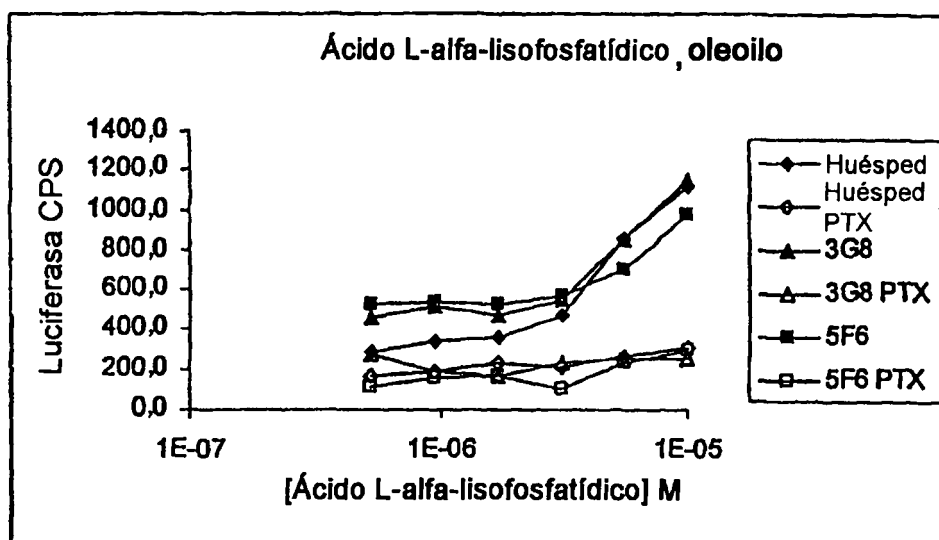


Fig. 4B

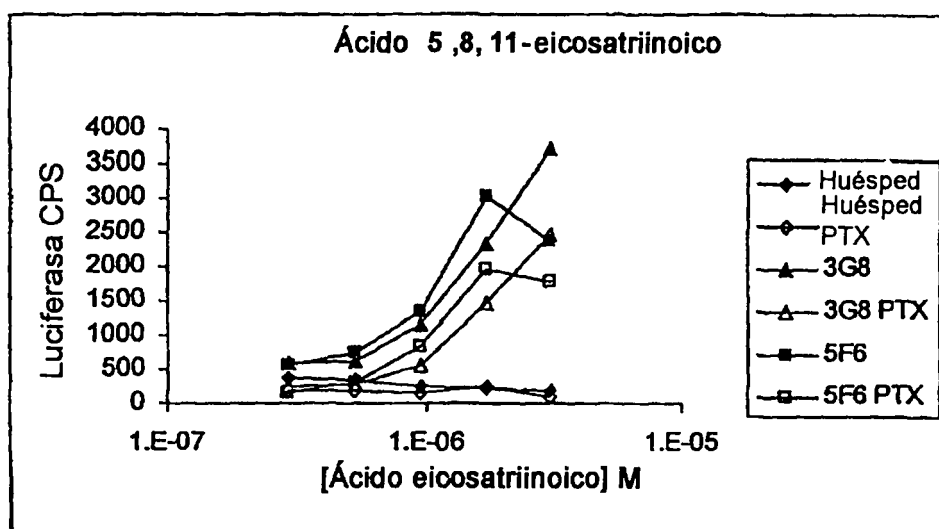


Fig. 4C

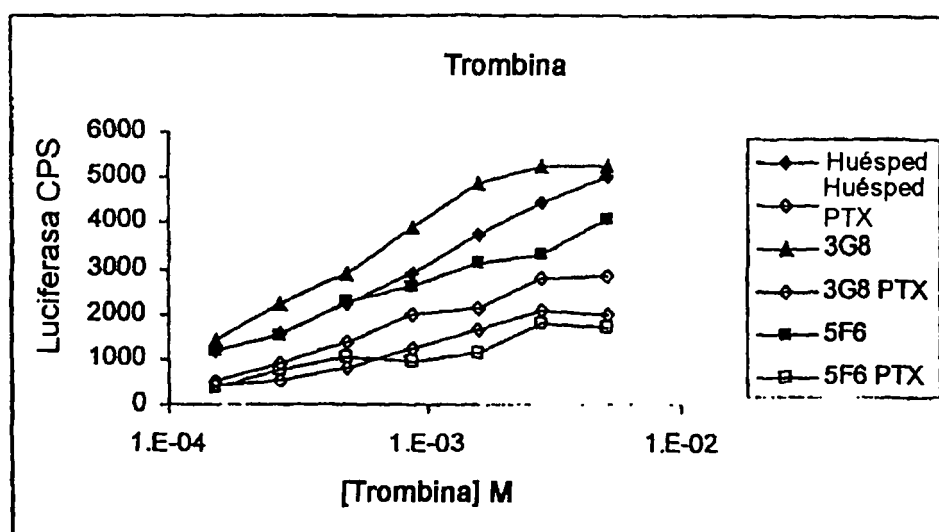


Fig. 4D

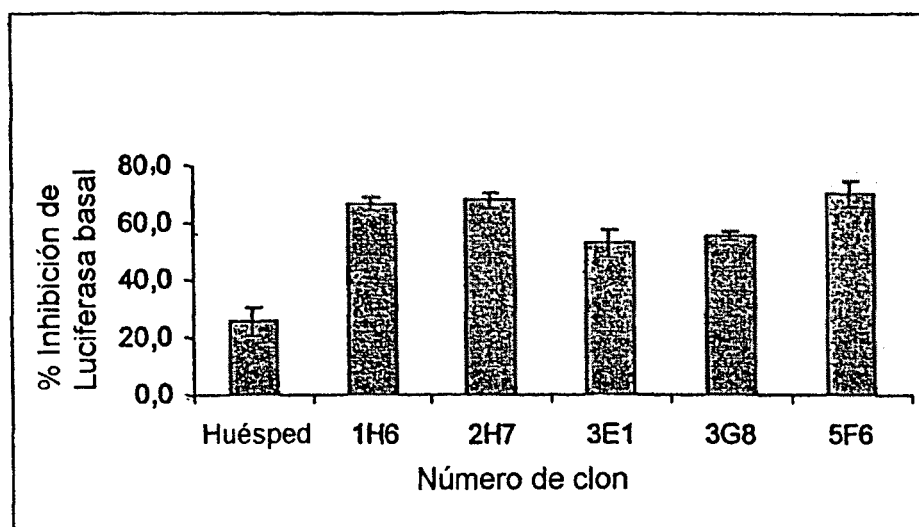
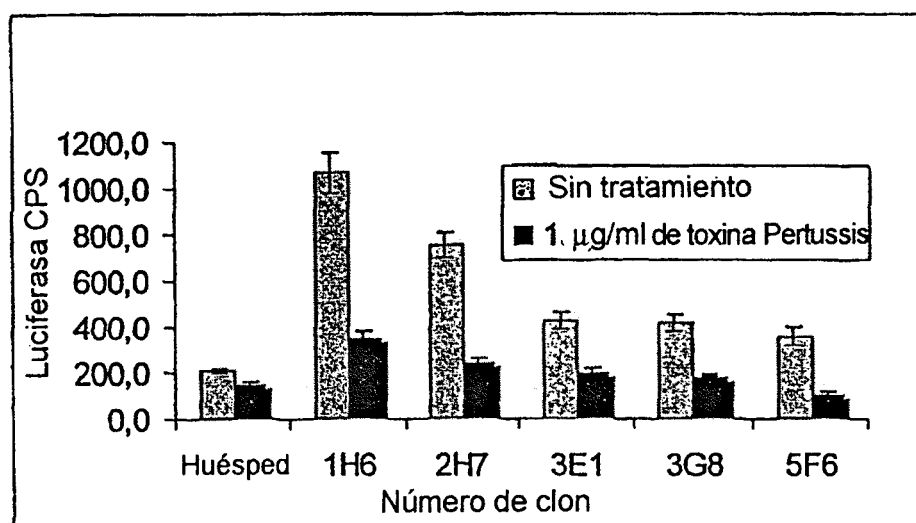


Figura 4E



ES 2 280 427 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> SmithKline Beecham p.l.c.
 Celia, Briscoe P
 5 Diane, Ignar M
 Alison, Muir I
 Tadayyon, Mohammed
 <120> Procedimiento de selección de ligandos de GPR40
 10 <130> tbd
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 15 <211> 903
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(900)
 <223>
 25 <400> 1

 30 atg gac ctg ccc ccg cag ctc tcc ttc ggc ctc tat gtg gcc gcc ttt 48
 Met Asp Leu Pro Pro Gln Leu Ser Phe Gly Leu Tyr Val Ala Ala Phe
 1 5 10 15

 gcg ctg ggc ttc ccg ctc aac gtc ctg gcc atc cga ggc gcg acg gcc 96
 Ala Leu Gly Phe Pro Leu Asn Val Leu Ala Ile Arg Gly Ala Thr Ala
 35 20 25 30

 cac gcc cgg ctc cgt ctc acc cct agc ctg gtc tac gcc ctg aac ctg 144
 His Ala Arg Leu Arg Leu Thr Pro Ser Leu Val Tyr Ala Leu Asn Leu
 35 40 45
 40 ggc tgc tcc gac ctg ctg ctg aca gtc tct ctg ccc ctg aag gcg gtg 192

 45

 50

 55

 60

 65

ES 2 280 427 T3

	Gly	Cys	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Thr	Val	Ser	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	
	50						55					60					
5	gag	gcg	cta	gcc	tcc	ggg	gcc	tgg	cct	ctg	ccg	gcc	tcg	ctg	tgc	ccc	240
	Glu	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Trp	Pro	Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	Cys	Pro	
	65					70				75					80		
10	gtc	ttc	gcg	gtg	gcc	cac	ttc	ttc	cca	ctc	tat	gcc	ggc	ggg	ggc	ttc	288
	Val	Phe	Ala	Val	Ala	His	Phe	Phe	Pro	Leu	Tyr	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	
					85					90					95		
15	ctg	gcc	gcc	ctg	agt	gca	ggc	cgc	tac	ctg	gga	gca	gcc	ttc	ccc	ttg	336
	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Gly	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ala	Ala	Phe	Pro	Leu	
				100					105					110			
20	ggc	tac	caa	gcc	ttc	cgg	agg	ccg	tgc	tat	tcc	tgg	ggg	gtg	tgc	gcg	384
	Gly	Tyr	Gln	Ala	Phe	Arg	Arg	Pro	Cys	Tyr	Ser	Trp	Gly	Val	Cys	Ala	
			115					120					125				
25	gcc	atc	tgg	gcc	ctc	gtc	ctg	tgt	cac	ctg	ggt	ctg	gtc	ttt	ggg	ttg	432
	Ala	Ile	Trp	Ala	Leu	Val	Leu	Cys	His	Leu	Gly	Leu	Val	Phe	Gly	Leu	
		130					135					140					
30	gag	gct	cca	gga	ggc	tgg	ctg	gac	cac	agc	aac	acc	tcc	ctg	ggc	atc	480
	Glu	Ala	Pro	Gly	Gly	Trp	Leu	Asp	His	Ser	Asn	Thr	Ser	Leu	Gly	Ile	
						150					155					160	
35	aac	aca	ccg	gtc	aac	ggc	tct	ccg	gtc	tgc	ctg	gag	gcc	tgg	gac	ccg	528
	Asn	Thr	Pro	Val	Asn	Gly	Ser	Pro	Val	Cys	Leu	Glu	Ala	Trp	Asp	Pro	
					165					170					175		
40	gcc	tct	gcc	ggc	ccg	gcc	cgc	ttc	agc	ctc	tct	ctc	ctg	ctc	ttt	ttt	576
	Ala	Ser	Ala	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Phe	Phe	
				180					185					190			
45	ctg	ccc	ttg	gcc	atc	aca	gcc	ttc	tgc	tac	gtg	ggc	tgc	ctc	cgg	gca	624
	Leu	Pro	Leu	Ala	Ile	Thr	Ala	Phe	Cys	Tyr	Val	Gly	Cys	Leu	Arg	Ala	
			195					200					205				
50	ctg	gcc	cgc	tcc	ggc	ctg	acg	cac	agg	cgg	aag	ctg	cgg	gcc	gcc	tgg	672
	Leu	Ala	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	His	Arg	Arg	Lys	Leu	Arg	Ala	Ala	Trp	
		210					215					220					
55	gtg	gcc	ggc	ggg	gcc	ctc	ctc	acg	ctg	ctg	ctc	tgc	gta	gga	ccc	tac	720
	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Cys	Val	Gly	Pro	Tyr	
		225				230					235					240	
60	aac	gcc	tcc	aac	gtg	gcc	agc	ttc	ctg	tac	ccc	aac	cta	gga	ggc	tcc	768
	Asn	Ala	Ser	Asn	Val	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Pro	Asn	Leu	Gly	Gly	Ser	
					245					250					255		
65	tgg	cgg	aag	ctg	ggg	ctc	atc	acg	ggt	gcc	tgg	agt	gtg	gtg	ctt	aat	816
	Trp	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Gly	Ala	Trp	Ser	Val	Val	Leu	Asn	
				260					265					270			
70	ccg	ctg	gtg	acc	ggt	tac	ttg	gga	agg	ggt	cct	ggc	ctg	aag	aca	gtg	864
	Pro	Leu	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Gly	Leu	Lys	Thr	Val	
			275					280					285				
75	tgt	gcg	gca	aga	acg	caa	ggg	ggc	aag	tcc	cag	aag	taa				903
	Cys	Ala	Ala	Arg	Thr	Gln	Gly	Gly	Lys	Ser	Gln	Lys					
		290					295					300					

ES 2 280 427 T3

<211> 300

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

10	Met	Asp	Leu	Pro	Pro	Gln	Leu	Ser	Phe	Gly	Leu	Tyr	Val	Ala	Ala	Phe	
	1				5					10					15		
	Ala	Leu	Gly	Phe	Pro	Leu	Asn	Val	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	
				20					25					30			
15	His	Ala	Arg	Leu	Arg	Leu	Thr	Pro	Ser	Leu	Val	Tyr	Ala	Leu	Asn	Leu	
			35					40					45				
	Gly	Cys	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Thr	Val	Ser	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	
20		50					55					60					
	Glu	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Trp	Pro	Leu	Pro	Ala	Ser	Leu	Cys	Pro	
	65					70				75						80	
25	Val	Phe	Ala	Val	Ala	His	Phe	Phe	Pro	Leu	Tyr	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	
					85					90					95		
	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Gly	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ala	Ala	Phe	Pro	Leu	
30				100					105					110			
	Gly	Tyr	Gln	Ala	Phe	Arg	Arg	Pro	Cys	Tyr	Ser	Trp	Gly	Val	Cys	Ala	
			115					120					125				
35	Ala	Ile	Trp	Ala	Leu	Val	Leu	Cys	His	Leu	Gly	Leu	Val	Phe	Gly	Leu	
			130				135					140					
	Glu	Ala	Pro	Gly	Gly	Trp	Leu	Asp	His	Ser	Asn	Thr	Ser	Leu	Gly	Ile	
40		145				150					155					160	
	Asn	Thr	Pro	Val	Asn	Gly	Ser	Pro	Val	Cys	Leu	Glu	Ala	Trp	Asp	Pro	
				165						170					175		
45	Ala	Ser	Ala	Gly	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Phe	Phe	
				180					185						190		
	Leu	Pro	Leu	Ala	Ile	Thr	Ala	Phe	Cys	Tyr	Val	Gly	Cys	Leu	Arg	Ala	
50			195					200					205				
	Leu	Ala	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	His	Arg	Arg	Lys	Leu	Arg	Ala	Ala	Trp	
		210					215					220					
55	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Cys	Val	Gly	Pro	Tyr	
		225				230					235					240	

60

65

ES 2 280 427 T3

	Asn	Ala	Ser	Asn	Val	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Pro	Asn	Leu	Gly	Gly	Ser	
					245					250					255		
5	Trp	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Gly	Ala	Trp	Ser	Val	Val	Leu	Asn	
				260					265					270			
	Pro	Leu	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Pro	Gly	Leu	Lys	Thr	Val	
			275					280					285				
10	Cys	Ala	Ala	Arg	Thr	Gln	Gly	Gly	Lys	Ser	Gln	Lys					
		290					295					300					
15																	
	<210> 3																
	<211> 903																
	<212> ADN																
20	<213> <i>Mus musculus</i>																
	<220>																
	<221> CDS																
25	<222> (1) .. (900)																
	<223>																
	<400> 3																
30																	
	atg	gac	ctg	ccc	cca	cag	ctc	tcc	ttc	gct	ctc	tat	gta	tct	gcc	ttt	48
	Met	Asp	Leu	Pro	Pro	Gln	Leu	Ser	Phe	Ala	Leu	Tyr	Val	Ser	Ala	Phe	
	1				5					10					15		
35	gcg	ctg	ggc	ttt	cca	ttg	aac	ttg	tta	gcc	atc	cga	ggc	gca	gtg	tcc	96
	Ala	Leu	Gly	Phe	Pro	Leu	Asn	Leu	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Ala	Val	Ser	
				20					25					30			
40	cac	gct	aaa	ctg	cga	ctc	act	ccc	agc	ttg	gtc	tac	act	ctc	cat	ctg	144
	His	Ala	Lys	Leu	Arg	Leu	Thr	Pro	Ser	Leu	Val	Tyr	Thr	Leu	His	Leu	
			35					40					45				
45	ggc	tgc	tct	gat	ctc	cta	ctg	gcc	atc	act	ctg	ccc	ctg	aag	gct	gtg	192
	Gly	Cys	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Thr	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	
		50					55				60						
50	gag	gcc	ctg	gct	tct	gga	gcc	tgg	ccc	ctg	cgc	ctc	ccc	ttc	tgc	cca	240
	Glu	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Trp	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Phe	Cys	Pro	
	65					70				75					80		
55	gtc	ttt	gcc	ttg	gcc	cac	ttt	gct	ccc	ctc	tac	gca	ggc	gga	ggc	ttc	288
	Val	Phe	Ala	Leu	Ala	His	Phe	Ala	Pro	Leu	Tyr	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	
					85				90					95			
60	cta	gct	gct	ctc	agc	gct	ggc	cgc	tac	ctg	ggg	gct	gcc	ttc	ccc	ttc	336
	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Gly	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ala	Ala	Phe	Pro	Phe	
				100					105					110			

ES 2 280 427 T3

5	ggg tac caa gcc atc cgg agg ccc cgc tat tcc tgg ggt gtg tgt gtg Gly Tyr Gln Ala Ile Arg Arg Pro Arg Tyr Ser Trp Gly Val Cys Val 115 120 125	384
10	gct ata tgg gcc ott gtc ctc tgc cac ctg ggg ctg gcc ctt ggc ttg Ala Ile Trp Ala Leu Val Leu Cys His Leu Gly Leu Ala Leu Gly Leu 130 135 140	432
15	gag act tcc gga agc tgg ctg gac aac agt acc agt tcc ctg ggc atc Glu Thr Ser Gly Ser Trp Leu Asp Asn Ser Thr Ser Ser Leu Gly Ile 145 150 155 160	480
20	aac ata ccc gtg aat ggc tcc ccg gtc tgc ctg gaa gcc tgg gat ccc Asn Ile Pro Val Asn Gly Ser Pro Val Cys Leu Glu Ala Trp Asp Pro 165 170 175	528
25	gac tct gcc cgc cct gcc cgt ctc agt ttc tcc att ctg ctc ttc ttt Asp Ser Ala Arg Pro Ala Arg Leu Ser Phe Ser Ile Leu Leu Phe Phe 180 185 190	576
30	ctg ccc ttg gtc atc act gcc ttc tgc tat gtg ggc tgc ctc cgg gcc Leu Pro Leu Val Ile Thr Ala Phe Cys Tyr Val Gly Cys Leu Arg Ala 195 200 205	624
35	ctg gtg cgc tca ggc ctg agc cac aaa cgg aag ctc agg gca gct tgg Leu Val Arg Ser Gly Leu Ser His Lys Arg Lys Leu Arg Ala Ala Trp 210 215 220	672
40	gtg gcc gga ggc gct ctc ctc aca ctc ctg ctc tgc ctg ggg ccc tat Val Ala Gly Gly Ala Leu Leu Thr Leu Leu Leu Cys Leu Gly Pro Tyr 225 230 235 240	720
45	aat gcc tcc aat gtg gct agt ttc ata aac ccg gac cta gga ggc tcc Asn Ala Ser Asn Val Ala Ser Phe Ile Asn Pro Asp Leu Gly Gly Ser 245 250 255	768
50	tgg agg aag ttg gga ctc atc aca ggg gcc tgg agt gtg gta ctc aac Trp Arg Lys Leu Gly Leu Ile Thr Gly Ala Trp Ser Val Val Leu Asn 260 265 270	816
55	cca ctg gtc act ggc tac ttg gga aca ggt cct gga cgg gga aca ata Pro Leu Val Thr Gly Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Gly Arg Gly Thr Ile 275 280 285	864
60	tgt gtg acg agg act caa aga gga aca att cag aag tag Cys Val Thr Arg Thr Gln Arg Gly Thr Ile Gln Lys 290 295 300	903

<210> 4

<211> 300

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 280 427 T3

<400> 4

5	Met	Asp	Leu	Pro	Pro	Gln	Leu	Ser	Phe	Ala	Leu	Tyr	Val	Ser	Ala	Phe	1	5	10	15
10	Ala	Leu	Gly	Phe	Pro	Leu	Asn	Leu	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Ala	Val	Ser	20	25	30	
15	His	Ala	Lys	Leu	Arg	Leu	Thr	Pro	Ser	Leu	Val	Tyr	Thr	Leu	His	Leu	35	40	45	
20	Gly	Cys	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Thr	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	50	55	60	
25	Glu	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Trp	Pro	Leu	Pro	Leu	Pro	Phe	Cys	Pro	65	70	75	
30	Val	Phe	Ala	Leu	Ala	His	Phe	Ala	Pro	Leu	Tyr	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	85	90	95	
35	Leu	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Gly	Arg	Tyr	Leu	Gly	Ala	Ala	Phe	Pro	Phe	100	105	110	
40	Gly	Tyr	Gln	Ala	Ile	Arg	Arg	Pro	Arg	Tyr	Ser	Trp	Gly	Val	Cys	Val	115	120	125	
45	Ala	Ile	Trp	Ala	Leu	Val	Leu	Cys	His	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	130	135	140	
50	Glu	Thr	Ser	Gly	Ser	Trp	Leu	Asp	Asn	Ser	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Ile	145	150	155	
55	Asn	Ile	Pro	Val	Asn	Gly	Ser	Pro	Val	Cys	Leu	Glu	Ala	Trp	Asp	Pro	165	170	175	
60	Asp	Ser	Ala	Arg	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Phe	Ser	Ile	Leu	Leu	Phe	Phe	180	185	190	
65	Leu	Pro	Leu	Val	Ile	Thr	Ala	Phe	Cys	Tyr	Val	Gly	Cys	Leu	Arg	Ala	195	200	205	
70	Leu	Val	Arg	Ser	Gly	Leu	Ser	His	Lys	Arg	Lys	Leu	Arg	Ala	Ala	Trp	210	215	220	
75	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Gly	Pro	Tyr	225	230	235	
80	Asn	Ala	Ser	Asn	Val	Ala	Ser	Phe	Ile	Asn	Pro	Asp	Leu	Gly	Gly	Ser	245	250	255	
85	Trp	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Gly	Ala	Trp	Ser	Val	Val	Leu	Asn	260	265	270	
90	Pro	Leu	Val	Thr	Gly	Tyr	Leu	Gly	Thr	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Thr	Ile	275	280	285	
95	Cys	Val	Thr	Arg	Thr	Gln	Arg	Gly	Thr	Ile	Gln	Lys	290	295	300					

ES 2 280 427 T3

	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> cebador directo para GPR40 humano	
	<400> 5	
10	gtggtgctta atccgctggt	20
	<210> 6	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> cebador inverso para GPR40 humano	
	<400> 6	
20	tggcggttact tctgggactt g	21
	<210> 7	
25	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> sonda para GPR40 humano	
30	<400> 7	
	cttgcgttct tgccgcacac actgt	25
35	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
40	<213> cebador directo para GPR40 de ratón/rata	
	<400> 8	
45	agttccctgg gcatcaacat a	21
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
50	<213> cebador inverso para GPR40 de ratón/rata	
	<400> 9	
55	caagggcaga aagaagagca ga	22
	<210> 10	
60	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> sonda para GPR40 de ratón/rata	
65	<400> 10	
	aatggctccc cggtctgcct gg	22