



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 912**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03796966 .4**
86 Fecha de presentación : **11.12.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1572133**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Método para identificar moduladores del receptor de orexina-2 humano.**

30 Prioridad: **13.12.2002 US 433411 P**

73 Titular/es: **Janssen Pharmaceutica N.V.**
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2008

72 Inventor/es: **Sutton, Steven, W. y**
Lovenberg, Timothy, W.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2008

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 303 912 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para identificar moduladores del receptor de orexina-2 humano.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a sistemas de ensayo para identificar moduladores de receptores celulares. En concreto, la invención se refiere a ensayos para moduladores del receptor de orexina 2 que utilizan fuentes no recombinantes del receptor.

10 **Antecedentes de la invención**

La señalización de orexinas esta mediada por dos receptores y dos agonistas peptídicos. Los péptidos (orexina A y orexina B) son productos de escisión del mismo gen, pre-pro-orexina. En el sistema nervioso central, se encuentran neuronas que producen pre-pro-orexina en el núcleo peritrigonal, en el hipotálamo dorsal y en el hipotálamo lateral (Peyron *et al.*, 1998, J. Neurosci. 18: 9996-10015). Las células orexigénicas de estas regiones se proyectan hacia muchas áreas del cerebro, extendiéndose rostralmente hacia los bulbos olfatorios y caudalmente hacia la médula espinal (Van den Pol, 1999, J. Neurosci. 19: 3171-3182). Las orexinas se unen a dos receptores de alta afinidad, denominados como receptores de orexina 1 y de orexina 2. El receptor de orexina 1 es selectivo a favor de la orexina A, mientras que el receptor de orexina 2 se une a ambas orexinas con afinidades similares.

La amplia distribución en el SNC de células que producen orexina, así como de células que expresan los receptores de orexina, sugiere una implicación de la orexina en varias funciones fisiológicas incluyendo alimentación, bebida, despertar, estrés, metabolismo y reproducción. Un estudio reciente que describe una necrosis dirigida de células que producen pre-pro-orexina sugiere que los papeles fisiológicamente más importantes de las orexinas pueden ser efectos sobre el despertar, la alimentación y el metabolismo (Hara *et al.*, 2001, Neuron 30: 345-354).

Varias líneas de pruebas indican que el sistema de orexinas es un modulador importante del despertar. Los roedores a los que se les administra orexina por vía intracerebroventricular pasan más tiempos despiertos (Piper *et al.*, 2000, J. Neurosci. 12: 726-730). Los efectos mediados por orexina sobre el despertar se han vinculado con proyecciones neuronales de orexina hacia neuronas histaminérgicas en el núcleo tuberomamilar (TMN) (Yamanaka *et al.*, 2002, Biochem. Biophys. Res. Comm. 290: 1237-1245). Las neuronas del TMN expresan el receptor de orexina 2 principalmente y el receptor de orexina 1 en menor grado. Los roedores en los que se ha anulado el gen de pre-pro-orexina o cuyas neuronas orexigénicas se han destruido, presentan ciclos de sueño/vigilia alterados similares a la narcolepsia (Chemelli *et al.*, 1999, Cell 98: 437-451; Hara *et al.*, 2001, anteriormente). Se ha demostrado que los modelos de narcolepsia en perros tienen receptores de orexina 2 mutantes o no funcionales (Lin *et al.*, 1999, Cell 98: 365-376). La narcolepsia humana parece estar ligada a una señalización de orexinas deficiente, probablemente relacionada con una ablación inmune de neuronas orexinérgicas en el hipotálamo lateral (Mignot *et al.*, 2001, Am. J. Hum. Genet. 68: 686-699; Minot y Thorsby, 2001; New England J. Med. 344: 692) o, en casos raros, a mutaciones en el gen de orexina 2 (Peyron *et al.*, 2000, Nature Med. 6: 991-997).

Por lo tanto, los trastornos del ciclo de sueño-vigilia son probablemente dianas para la actividad moduladora del receptor de orexina 2. Los ejemplos de trastornos del sueño-vigilia que pueden tratarse mediante agonistas u otros moduladores que regulen positivamente los procesos mediados por el receptor de orexina 2 incluyen la narcolepsia, la desacomodación horaria (somnolencia) y trastornos del sueño secundarios a trastornos neurológicos, tales como depresión. Los ejemplos de trastornos que pueden tratarse mediante antagonistas u otros moduladores que regulen negativamente los procesos mediados por el receptor de orexina 2 incluyen insomnio, síndrome de piernas inquietas, desacomodación horaria (desvelo) y trastornos del sueño secundarios a trastornos neurológicos, tales como manías, esquizofrenia, síndromes de dolor y similares.

El sistema de orexinas también interacciona con los sistemas de dopamina del cerebro. Inyecciones por vía intracerebroventricular de orexina en ratones aumentan la actividad locomotora, el acicalamiento y las estereotipias; estos efectos conductuales se revierten mediante la administración de antagonistas del receptor de dopamina D2 (Nakamura *et al.*, 2000, Brain Res. 873: 191-187). Por lo tanto, pueden ser útiles moduladores de orexina 2 para tratar diversos trastornos neurológicos; por ejemplo, agonistas o reguladores positivos para tratar la catatonía, antagonistas o reguladores negativos para tratar la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Tourette, la ansiedad, delirios y demencias.

Se han descubiertos orexinas y sus receptores tanto en el plexo mientérico como submucoso del sistema nervioso entérico, en el que las orexinas han demostrado aumentar la motilidad *in vitro* (Kirchgessner y Liu, 1999, Neuron 24: 941-951) y estimular la secreción ácida gástrica *in vitro* (Takahashi *et al.*, 1999, Biochem. Biophys. Res. Comm. 254: 623-627). Los efectos de la orexina sobre el intestino pueden estar dirigidos por una proyección a través del nervio vago (van den Pol, 1999, anteriormente), puesto que una vagotomía o la atropina impiden el efecto de una inyección intracerebroventricular de orexina sobre la secreción ácida gástrica (Takahashi *et al.*, 1999, anteriormente). Por lo tanto, los antagonistas de receptores de orexina u otros reguladores negativos de los sistemas mediados por receptores de orexina son tratamientos potenciales para úlceras, síndrome del intestino irritable, diarrea y reflujos gastroesofágicos.

El peso corporal también puede afectarse por la regulación mediada por orexinas del apetito y del metabolismo. Algunos efectos de la orexina sobre el metabolismo y el apetito pueden mediarse en el intestino, en el que, como se ha mencionado ya, las orexinas alteran la motilidad gástrica y la secreción ácida gástrica. Por lo tanto, los antagonistas de orexina son probablemente útiles en el tratamiento del sobrepeso o de la obesidad y de afecciones relacionadas con el sobrepeso o la obesidad, tales como diabetes resistente a insulina o de tipo II, hiperlipidemia, cálculos biliares, angina, hipertensión, dificultades para respirar, taquicardia, infertilidad, apnea del sueño, dolor de espalda y de las articulaciones, venas varicosas y osteoartritis. Por el contrario, los agonistas de orexina son probablemente útiles en el tratamiento de un peso insuficiente y de afecciones relacionadas como hipotensión, bradicardia, amenorrea e infertilidad relacionada y trastornos de la alimentación tales como anorexia y bulimia.

Las orexinas administradas por vía intracerebroventricular han demostrado aumentar la presión arterial media y la frecuencia cardíaca en animales que podían moverse libremente (despiertos) (Samson *et al.*, 1999, Brain Res. 831: 248-253; Shirasaka *et al.*, 1999, Am. J. Physiol. 277: R1780-R1785) y en animales anestesiados con uretano (Chen *et al.*, 2000, Am. J. Physiol. 278: R692-R697), con resultados similares. Por lo tanto, los agonistas de receptores de orexina pueden ser candidatos para el tratamiento de la hipotensión, la bradicardia y la insuficiencia cardíaca relacionada con las mismas, mientras que los antagonistas de receptores de orexina pueden ser útiles para el tratamiento de la hipertensión, la taquicardia y otras arritmias, angina de pecho e insuficiencia cardíaca aguda.

A partir de la discusión anterior, puede observarse que la identificación de moduladores de receptores de orexina, particularmente de moduladores del receptor de orexina 2, será muy ventajosa en el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de una gran diversidad de trastornos que están mediados por estos sistemas de receptores. Existe una necesidad en la técnica de métodos mejorados para identificar moduladores del receptor de orexina 2 humano, particularmente, de métodos que no requieren el uso de moléculas de ADN recombinante que codifiquen el receptor de orexina 2 humano. Dichos métodos mejorados pueden facilitar el procesamiento rápido de bibliotecas químicas para identificar moduladores del receptor de orexina 2 humano y, preferiblemente, también serán susceptibles de automatización, proporcionando de este modo ventajas comerciales importantes para el descubrimiento de nuevos fármacos y el desarrollo de aplicaciones. Se piensa que la presente invención satisface estas necesidades y proporciona otras ventajas relacionadas.

Garlton *et al.*, (2001), en un resumen de The Annual Meeting of The Society for Neuroscience, describen la identificación del receptor de orexina 2 en ratas. Sakurai *et al.*, (1998) Cell 92: 578-85 describen la identificación de los neuropéptidos orexina A y orexina B. Jaszberenyi *et al.*, (2000) describen los efectos de los neuropéptidos orexina A y orexina B sobre el sistema hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). El documento WO 01/85693 describe compuestos que presentan antagonismo de receptores de orexina.

La citación de una referencia en este documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia es técnica anterior a la presente invención.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para identificar moduladores del receptor de orexina 2 humano, que utilizan líneas celulares no recombinantes que expresan el receptor de orexina 2, en los que la línea celular que expresa el receptor de orexina 2 es la línea celular PFSK-1. En realizaciones típicas de la invención, se utilizan células completas así como fracciones o componentes de las mismas como fuente no recombinante de receptor de orexina 2 humano. Por lo tanto, las líneas celulares no recombinantes proporcionan suficientes cantidades de receptores de orexina 2 para realizar ensayos para evaluar compuestos para determinar su capacidad para modular el receptor, sin requerir el uso de moléculas de ácido nucleico producidas de forma recombinante, que codifican el receptor.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para identificar compuestos que modulen la actividad del receptor de orexina 2 humano. El método comprende combinar un supuesto modulador de la actividad del receptor de orexina 2 humano con receptores de orexina 2 humanos, contenidos en el interior de membranas de células DFSK-I que poseen de forma no recombinante el receptor de orexina 2 humano, y medir un efecto del modulador sobre la actividad del receptor de orexina 2 humano. En una realización, los receptores de orexina 2 humanos están contenidos en el interior de membranas de células intactas. En otra realización, los receptores de orexina 2 están contenidos en el interior de estructuras de membranas tales como fragmentos de membranas aislados, vesículas unilaminares y vesículas multilaminares. Pueden realizarse diversos tipos de ensayos dentro de este aspecto de la invención. En una realización, el efecto medido es la unión del supuesto modulador a los receptores de orexina 2. En otra realización, el efecto medido es la competición del supuesto modulador con un ligando conocido del receptor de orexina 2 humano para la unión a los receptores. En otra realización, el efecto medido es la modulación de un segundo mensajero intracelular del receptor de orexina 2 humano, tal como AMPc, Ca^{++} o un producto génico indicador. En una realización preferida, el segundo mensajero intracelular es Ca^{++} y se detecta con un indicador fluorescente de Ca^{++} .

También se describe en este documento un kit para usarlo en la identificación de compuestos que modulen la actividad del receptor de orexina 2 humano. El kit comprende típicamente receptores de orexina 2 humanos contenidos en el interior de membranas de células que poseen el receptor de orexina 2 humano e instrucciones para el uso de los receptores para identificar compuestos que modulen la actividad del receptor de orexina 2 humano. Los kits pueden comprender células intactas que posean receptores de orexina 2 humanos. También pueden comprender componentes

adicionales tales como ligandos conocidos del receptor de orexina 2, reactivos para detectar un efecto de un supuesto modulador sobre la actividad del receptor de orexina 2 y/o uno o más tampones o diluyentes para practicar un ensayo para identificar compuestos que modulen la actividad del receptor de orexina 2 humano.

5 También se describen en este documento compuestos identificados usando los métodos descritos anteriormente, en los que no se sabía anteriormente que dichos compuestos eran moduladores de un receptor de orexina 2 humano. Dichos compuestos pueden ser agonistas, antagonistas o agonistas inversos de un receptor de orexina 2 humano o pueden modular un canal de Ca^{++} activado por el receptor de orexina 2 humano.

10 Aspectos adicionales describen en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y compuestos identificados por los métodos anteriores. También se proporcionan métodos de uso de estas composiciones farmacéuticas para tratar pacientes de afecciones mediadas por el receptor de orexina 2. En una realización, una afección mediada por una elevada cantidad o actividad de un receptor de orexina 2 humano se trata mediante la administración de una composición farmacéutica de un tipo que disminuye la cantidad o la actividad
15 del receptor de orexina 2. Dichas afecciones incluyen trastornos de la transición sueño/vigilia, insomnio, hipermetabolismo, hipertensión, taquicardia, obesidad, enfermedad de Parkinson, síndrome de Tourette, ansiedad, delirio y demencia. En otra realización, una afección mediada por una baja cantidad o actividad de un receptor de orexina 2 humano se trata mediante la administración de una composición farmacéutica de un tipo que aumente la cantidad o la actividad del receptor de orexina 2. Dichas afecciones incluyen narcolepsia, desacomodación horaria, hipometabolismo, hipotensión, bradicardia y falta de apetito.
20

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Muestra la inhibición dependiente de la dosis de 100 nM del ligando del receptor de orexina 2, orexina B, mediante el inhibidor A del receptor de orexina 2, medida por el Ca^{++} intracelular en células PFSK-1. Cuadrados oscuros = Orexina B sola; triángulos blancos = Orexina B en presencia de inhibidor A.
25

Figura 2: Muestra la inhibición dependiente de la dosis de 100 nM del ligando del receptor de orexina 2, orexina B, mediante el inhibidor B del receptor de orexina 2, medida por el Ca^{++} intracelular en células PFSK-1. Cuadrados oscuros = Orexina B sola; triángulos blancos = Orexina B en presencia de inhibidor B.
30

Figura 3: Muestra la inhibición dependiente de la dosis de 100 nM del ligando del receptor de orexina 2, orexina B, mediante los inhibidores C y D del receptor de orexina 2, medida por el Ca^{++} intracelular en células PFSK-1. Cuadrados oscuros = Orexina B sola; triángulos blancos = Orexina B en presencia de inhibidor C; cuadrados blancos = Orexina B en presencia de inhibidor D.
35

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para la identificación de compuestos que tienen la capacidad de modular la actividad del receptor de orexina 2 humano. Típicamente, se piensa que métodos como los que se describen en este documento requieren células que expresen un receptor recombinante. Sin embargo, los inventores han determinado que estos métodos pueden llevarse a cabo sin el uso de moléculas de ácido nucleico producidas de forma recombinante que codifiquen el receptor de orexina 2 humano. En su lugar, puede utilizarse la línea celular no recombinante PFSK-1, que produce el receptor de orexina 2 (disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, N° de acceso ATCC CRL-2060). Pueden identificarse otras líneas celulares de este tipo usando métodos definidos, como se describen a continuación. Los moduladores del receptor de orexina 2 que pueden identificarse mediante los métodos que se describen en este documento incluyen agonistas, antagonistas y agonistas inversos. Como se usa en este documento, el término “modulador” se refiere a un agente que aumenta o disminuye la cantidad o la actividad de un receptor. Pueden ser moduladores cualquier tipo de molécula, incluyendo, pero sin limitación, ADN, ARN, péptidos, proteínas o moléculas orgánicas o inorgánicas no proteicas. El término “agonista” se refiere a un compuesto que se une a un receptor, dando como resultado un efecto biológico asociado con la actividad del receptor. El término “antagonista” se refiere a un compuesto que bloquea al menos un efecto biológico asociado con la actividad de un receptor (habitualmente por unión al receptor). El término agonista inverso se refiere a un compuesto que se une a un receptor constitutivamente activo y reduce un efecto biológico asociado con la actividad constitutiva del receptor.
50
55

Los moduladores identificados en los ensayos que se describen en este documento son útiles, por ejemplo, como agentes terapéuticos, agentes profilácticos y agentes de diagnóstico. Las indicaciones para los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, efectos sobre el despertar, alimentación, metabolismo, narcolepsia, secreciones hormonales, estrés y efectos sobre el sistema reproductor. En concreto, pueden usarse moduladores que aumenten la cantidad o la actividad de receptores de orexina 2, identificados usando los métodos de la presente invención, para tratar afecciones tales como narcolepsia, bradicardia, hipotensión, hipometabolismo y trastornos de la alimentación o del apetito que conducen a afecciones de peso insuficiente. Se espera que los moduladores que disminuyen la cantidad o la actividad del receptor de orexina 2 sean útiles en el tratamiento de afecciones tales como insomnio, síndrome de piernas inquietas, dolor, taquicardia, hipertensión, angina de pecho, infarto de miocardio, asma, obesidad, fertilidad (control de la natalidad), infertilidad, amenorrea (dietética, emocional, patológica, o debida a estrés), desequilibrio de líquidos, úlceras, diarrea, estreñimiento, síndrome del intestino irritable o diversas formas de disquinesia.
60
65

Un modo de entender cómo están implicados los receptores de orexina 2 humanos en todos estos procesos fisiológicos es desarrollar moduladores químicos (agonistas, antagonistas y agonistas inversos) del receptor como herramientas de investigación y entidades terapéuticas. Se usan células hospedadoras no recombinantes que expresan el receptor de orexina 2 humano, tales como la línea celular PFSK-1, para proporcionar materiales para un método de exploración para identificar dichos agonistas y antagonistas. De este modo, esta invención muestra directamente un modo para identificar nuevos agonistas y antagonistas del receptor de orexina 2 humano que pueden demostrar ser útiles como herramientas de investigación o que pueden usarse como terapéuticos para tratar trastornos que implican directa o indirectamente a receptores de orexina 2.

La línea celular PFSK-1 se ejemplifica en este documento para los ensayos de la presente invención. La línea celular PFSK-1 es una línea celular de tumor neuroectodérmico primitivo humano del hemisferio cerebral (Fults *et al.* (1992) J. Neuropath. Exp. Neurol. 51: 272-280). Se identificó que la línea celular expresaba el receptor de orexina 2 a través de una exploración de microseries de ADN del ARNm producido por un gran número de líneas celulares. Se confirmó que la línea celular PFSK-1 producía cantidades de receptor de orexina 2 suficientes para ser adecuada para el uso en los ensayos que se describen en este documento. Puesto que la línea celular PFSK-1 fue la única identificada como adecuada en la exploración inicial de microseries de ADN de los inventores, está claro que pueden usarse rondas adicionales de dicha exploración para identificar otras líneas celulares adecuadas de acuerdo con metodologías convencionales. Ahora que se ha identificado una línea celular, otras líneas celulares que se identifiquen posteriormente podrán compararse con las células PFSK-1 para determinar si producen suficiente receptor de orexina 2 para ser adecuadas para el uso en la presente invención.

Los ensayos para detectar interacción o modulación de compuestos del receptor de orexina 2 humano incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión a ligando directos, ensayos de unión a ligando competitivos (o de desplazamiento) o ensayos funcionales que miden la respuesta del receptor al ligando, por ejemplo, por medición de los cambios en segundos mensajeros intracelulares. Cada uno de estos ensayos puede realizarse usando células intactas. Algunos de los ensayos, por ejemplo, ensayos de unión o de competición, pueden realizarse sobre membranas que contienen receptores de orexina 2 aisladas de las células. Como se sabe en la técnica, pueden utilizarse fragmentos de membranas o vesículas que comprendan el receptor para este tipo de ensayo.

Un sistema de ensayo preferido de la invención utiliza células PFSK-1 vivas y la medición de un segundo mensajero intracelular como indicador de la capacidad de compuestos candidatos para modular el receptor de orexina 2. En una realización, se mide un cambio en el Ca^{++} intracelular a través de la acción de proteínas Gq; por ejemplo, mediante fluorescencia, como se describe en detalle a continuación. En otra realización, se obtiene un segundo mensajero en células PFSK-1 mediante la transfección de las células con construcciones génicas que confieren expresión de proteínas G α quiméricas (Conklin *et al.*, 1993, Nature 363: 274-276; Milligan y Reese, 1999, Trends Pharmacol. Sci. 20: 118-124).

Un sistema de ensayo ejemplar de la invención utiliza células PFSK-1 vivas y la medición de cambios en el Ca^{++} intracelular, según se vea afectado por compuestos moduladores candidatos. La unión de receptores de orexina 2 por agonistas aumenta la concentración intracelular de ión calcio libre a través de la activación de una proteína Gq y de la apertura de canales de calcio del plasmalema activados por voltaje (van den Pol *et al.*, 1988, anteriormente). Este efecto se controla usando un indicador fluorescente de Ca^{++} , tal como Fluo-3Am (TefLabs, Austin, Texas) y un instrumento como el FLIPR (Fluorescent Imaging Plate Reader) de Molecular Devices (Sunnyvale, California).

En resumen, se cultivan células PFSK-1 y se mantienen como se describe en el Ejemplo 1 a continuación. Las células retiran de placas de cultivo de tejidos confluentes con tripsina-EDTA y se siembran en placas multipocillo (por ejemplo, Packard Viewplates, Meriden, Connecticut). Se cultivan células adherentes hasta la confluencia y después se cargan con el colorante fluorescente. Se elimina el medio de cultivo completo de la placa y se añade la solución del indicador de fluorescencia a cada pocillo. La placa se mantiene durante un tiempo predeterminado en condiciones apropiadas de cultivo de células. Se realizan mediciones de cambios en las concentraciones de calcio intracelular usando el instrumento FLIPR. El momento de la adición del compuesto está determinado por el tipo de ensayo (exploración de agonistas, determinación de la eficacia agonista o de la CE_{50} , exploración de antagonistas o ensayo de pK_B del antagonista) y por las cinéticas de velocidad del compuesto o compuestos de ensayo, como entenderá un especialista en la técnica.

Para un ensayo de pK_B del antagonista convencional usando el FLIPR, el dispositivo se ajusta para que registre exposiciones a intervalos de un segundo y, después, 20 exposiciones a intervalos de 6 segundos. Se añade un volumen y una concentración apropiados de compuesto, control o agonista después de las diez primeras exposiciones. Se recopilan datos estadísticos apropiados (tales como la suma, la señal máxima, o la señal máxima - mínima para cada pocillo) que describen en la magnitud de la respuestas mediante el programa informático del FLIPR o por medios similares que usan archivos de datos sin procesar generados por el programa informático del FLIPR.

Con los fines de la exploración, pueden ensayarse compuestos a una dosis individual para determinar el porcentaje de estimulación o el porcentaje de inhibición de la señalización de Ca^{++} intracelular, en comparación con un estímulo agonista de orexina conocido. En una exploración de agonistas, se añaden los controles positivos y negativos a una columna de la placa separada de los compuestos de ensayo. En una exploración de antagonistas, típicamente, los compuestos se administran a los pocillos de ensayo, se incuban para permitir la unión y después se añade un estímulo agonista de orexina a los pocillos de ensayo. El control para la exploración de antagonistas incluye controles positivos y negativos para indicar la respuesta fluorescente a un agonista completo, así como las medidas basales.

Se analiza el agonismo para determinar tanto la eficacia (en comparación con un agonista de orexina de control) como la CE_{50} . Para este tipo de ensayo, una placa individual multipocillo puede contener tanto una respuesta a la dosis del compuesto de ensayo como una respuesta a la dosis de un agonista de orexina de control.

El antagonismo se analiza calculando los valores de K_B y pK_B para compuestos que se haya descubierto que inhiben los aumentos en las concentraciones de Ca^{++} intracelular en las células. Esto se lleva a cabo mediante la determinación de la CE_{50} de un agonista de orexina y la comparación de los valores de CI_{50} determinados a partir de las diluciones de un compuesto o compuestos antagonistas en una placa individual multipocillo de células PFSK-1 cargadas con Fluo-3 AM o un colorante similar. En este caso, en todos los pocillos excepto en los usados para determinar la CE_{50} del agonista, se administra la misma concentración del agonista de orexina.

Después se determina la K_B según Cheng y Prusoff (1973), *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108, usando la fórmula siguiente:

$$K_B = CI_{50} / (1 + ([agonista] / CE_{50}))$$

Puesto que la unión del receptor de orexina 2 por un agonista conduce a la apertura de canales de ión calcio en la membrana, podrían usarse otros medios conocidos por los especialistas en la técnica para ensayar la actividad del receptor de orexina en células PFSK-1. Los ejemplos de dichos métodos incluyen el uso de colorantes fluorescentes sensibles a voltaje (tales como los usados en el FLIPR Membrane Potencial Assay Kit de Molecular Devices), técnicas de pinzamiento zonal y similares. De forma similar, podrían usarse estos métodos para seleccionar moduladores del canal de Ca^{++} pertinente.

La presente invención también se refiere a métodos para explorar compuestos de ensayo que se sospeche que son moduladores del receptor de orexina 2 para compuestos que modulen la expresión del ADN o ARN que codifica el receptor de orexina 2 humano, así como la función de la proteína receptora *in vivo*. Pueden ser compuestos que modulen estas actividades ADN, ARN, péptidos, proteínas o moléculas orgánicas o inorgánicas no proteicas. Los compuestos pueden modular por aumento o disminución de la expresión del ADN o ARN que codifica el receptor de orexina 2 o de la función de la proteína receptora. Pueden detectarse compuestos que modulen la expresión del ADN o ARN que codifica el receptor de orexina 2 o la función de la proteína receptora de orexina 2 mediante una diversidad de ensayos que utilizan células PFSK-1 y/o fracciones o componentes de las mismas. La presencia o la cantidad de ARNm que codifica el receptor de orexina 2 de células que lo contienen puede medirse de acuerdo con métodos convencionales, incluyendo, pero sin limitación, análisis de transferencia de "Northern" y PCR cuantitativa. La presencia o la cantidad de proteína receptora de orexina 2 también pueden medirse por métodos convencionales, tales como transferencia de "Western", inmunoprecipitación o métodos similares. Se han descrito anteriormente ensayos para medir la función en los que la función se indica por la capacidad del receptor para transducir una señal, es decir, para producir un segundo mensajero intracelular. El ensayo puede ser un simple ensayo de "sí/no" para determinar si existe un cambio en la expresión o función. El ensayo puede hacer cuantitativo por comparación de la expresión o función de una muestra de ensayo con los niveles de expresión o función en una muestra patrón. Los moduladores identificados en este proceso son útiles como agentes terapéuticos, herramientas de investigación y agentes de diagnóstico.

Como se describe en este documento, pueden prepararse kits que contengan proteína receptora de orexina 2 humana producida por o procedente de células PFSK-1. Dichos kits se usan para caracterizar o identificar compuestos que tienen la capacidad o la actividad de modular la actividad del receptor de orexina 2 humano. Dicha caracterización es útil para una diversidad de objetivos, incluyendo, pero sin limitación, el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de fármacos para identificar nuevos fármacos que modulen la actividad del receptor de orexina 2 humano.

Pueden prepararse kits que contengan la proteína receptora de orexina 2 a partir de células PFSK-1, puesto que generalmente estas preparaciones serán útiles para analizar y/o caracterizar la actividad en una gran diversidad de compuestos heterólogos. Dichos kits serán particularmente beneficiosos, por ejemplo, para investigadores en el descubrimiento de genes para la expresión de nuevos compuestos como moduladores de la proteína receptora de orexina 2. Dicho kit comprendería un vehículo compartimentalizado adecuado para mantener bien confinado al menos un envase. El vehículo comprendería además reactivos tales como proteína receptora (en el interior de membranas o en el interior de células completas o vivas) o compuestos de control adecuados para detectar la modulación de las proteínas receptoras de orexina 2. El vehículo también puede contener un medio para la detección tal como ligandos marcados, antígenos marcados o sustratos enzimáticos o similares. Dichos kits también se usan para detectar la presencia de la proteína receptora o de fragmentos peptídicos en una muestra. Dicha caracterización es útil para una diversidad de objetivos, incluyendo, pero sin limitación, análisis forenses, aplicaciones diagnósticas y estudios epidemiológicos.

Como se describe en este documento, pueden formularse composiciones farmacéuticamente útiles, que comprenden moduladores de la actividad del receptor de orexina 2 humano, de acuerdo con métodos conocidos tales como mediante la mezcla de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Pueden encontrarse ejemplos de dichos vehículos y métodos de formulación en Remington's Pharmaceutical Sciences. Para preparar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para una administración eficaz, dichas composiciones contendrán una cantidad eficaz de la proteína ADN, ARN o modulador como el ingrediente activo.

Como se describe en este documento, se administran composiciones terapéuticas o de diagnóstico identificadas usando los métodos de la presente invención a un individuo en cantidades suficientes para tratar o diagnosticar tras-

tornos en los que esté indicada la modulación de la actividad relacionada con el receptor de orexina 2 humano. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con una diversidad de factores, tales como la afección del individuo, el peso, el sexo y la edad. Otros factores incluyen el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse al individuo por una diversidad de vías tales como intravenosa, intraperitoneal, intranasal, subcutánea, tópica, oral e intramuscular.

La expresión “derivado químico” describe una molécula que contiene restos químicos adicionales que normalmente no son parte de la molécula básica (es decir, un modulador del receptor de orexina 2 identificado por los métodos de la invención). Dichos restos pueden mejorar la solubilidad, la vida media, la absorción, etc. de la molécula básica. Como alternativa, los restos pueden atenuar los efectos secundarios indeseables de la molécula básica o disminuir la toxicidad de la molécula básica. Se describen ejemplos de dichos restos en una diversidad de textos, tales como en Remington's Pharmaceutical Sciences.

Pueden usarse en solitario compuestos identificados de acuerdo con los métodos que se describen en este documento a dosificaciones apropiadas, definidas mediante ensayos de rutina para obtener una estimulación o una inhibición óptima del receptor de orexina 2 o de su actividad, al tiempo que se minimice cualquier toxicidad potencial. Además, puede ser deseable la coadministración o la administración secuencial de otros agentes. Se describen en este documento formulaciones farmacéuticas tópicas, orales, sistémicas y parenterales adecuadas para usar en los nuevos métodos de tratamiento usando compuestos identificados a través de la presente invención. Las composiciones que contienen compuestos o moduladores, identificados de acuerdo con esta invención, como el ingrediente activo para usar en la modulación de receptores de orexina 2 pueden administrarse en una gran diversidad de formas de dosificación terapéuticas en vehículos convencionales para la administración. Por ejemplo, los compuestos o moduladores pueden administrarse en dichas formas de dosificación orales como comprimidos, cápsulas (incluyendo cada una formulaciones de liberación temporalizada y de liberación sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, soluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones o mediante inyección. Asimismo, también pueden administrarse en forma intravenosa (tanto embolada como en infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión o intramuscular, usando todas formas bien conocidas por los especialistas en la técnica farmacéutica. Puede emplearse una cantidad eficaz pero no tóxica del compuesto deseado como un agente modulador del receptor de orexina 2.

La dosificación diaria de composiciones identificadas de acuerdo con los métodos que se describen en este documento puede variarse en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por paciente, por día. Para la administración por vía oral, las composiciones se proporcionan preferiblemente en forma de comprimidos marcados o no marcados que contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0 y 50,0 miligramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Habitualmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de desde aproximadamente 0,0001 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. El intervalo es, más particularmente, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día. Las dosificaciones de los moduladores del receptor de orexina 2 se ajustan cuando se combinan para conseguir los efectos deseados. Por otro lado, las dosificaciones de estos diversos agentes pueden optimizarse de forma independiente y combinarse para conseguir un resultado sinérgico en el que se reduzca la patología más que si cualquiera de los agentes se usara en solitario.

Ventajosamente, pueden administrarse compuestos o moduladores identificados de acuerdo con los métodos de la presente invención en una dosis diaria individual, o la dosis diaria total puede administrarse en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces diarias. Además, estos compuestos pueden administrarse en forma intranasal a través del uso tópico de vehículos intranasales adecuados o a través de vías transdérmicas, usando las formas de parches dérmicos transdérmicos bien conocidas por los especialistas en la técnica. Para que se administre en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosificación será, por supuesto, continua en lugar de intermitente durante todo el régimen de dosificación.

Para el tratamiento de combinación con más de un agente activo, en el que los agentes activos están en formulaciones de dosificación separadas, los agentes activos pueden administrarse de forma concurrente o cada uno puede administrarse por separado en momentos escalonados.

El régimen de dosificación que utilizan los compuestos o moduladores identificados de acuerdo con la presente invención se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores que incluyen tipo, especie, edad, peso, sexo y afección médica del paciente; la gravedad de la afección que se trata; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto en particular de los mismos que se emplea. Un médico o veterinario especialista puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz del fármaco que se requiere para prevenir o contrarrestar el avance de la afección. Una precisión óptima en conseguir concentraciones de fármaco dentro del intervalo que produce eficacia sin toxicidad requiere un régimen basado en la cinética de la disponibilidad del fármaco en los sitios diana. Esto implica tener en cuenta la distribución, el equilibrio y la eliminación de un fármaco.

Pueden formar el ingrediente activo composiciones o moduladores identificados de acuerdo con los métodos que se describen en este documento, y se administran típicamente junto con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados (en conjunto denominados en este documento como materiales de “vehículo”) seleccionados convenientemente con respecto a la forma deseada de administración, es decir, comprimidos, cápsulas, elixires, jarabes orales y similares, y coherente con las prácticas farmacéuticas convencionales.

Por ejemplo, para la administración por vía oral en forma de un comprimido o cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte oral no tóxico y farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Además, cuando se desee o sea necesario, también pueden incorporarse en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen, pero sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, de tragacanto o alginato sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes que se usan en estas formas de dosificación incluyen, sin limitación, oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma de xantano y similares.

Para formas líquidas, el componente de fármaco activo puede combinarse en agentes de suspensión o de dispersión convenientemente aromatizados, tales como las gomas sintéticas y naturales, por ejemplo, de tragacanto, goma arábiga, metilcelulosa y similares. Otros agentes de dispersión que pueden emplearse incluyen glicerina y similares. Para la administración por vía parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Se emplean preparaciones isotónicas que generalmente contienen conservantes adecuados cuando se desea una administración por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea.

Pueden mezclarse preparaciones tópicas que contienen el componente de fármaco activo con una diversidad de materiales de vehículo bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, alcoholes, gel de aloe vera, alantoína, glicerina, aceites de vitamina A y E, aceite mineral, propionato de miristilo PPG2 y similares para formar, por ejemplo, soluciones alcohólicas, limpiadores tópicos, cremas limpiadoras, geles dérmicos, lociones dérmicas y champús en formulaciones de crema o de gel.

Los compuestos o moduladores identificados de acuerdo con la presente invención también pueden administrarse en forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Pueden formarse liposomas a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

También pueden administrarse compuestos identificados de acuerdo con la presente invención mediante el uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los que se unen o acoplan las moléculas de compuesto. Los compuestos o moduladores identificados mediante la presente invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como vehículos farmacológicos dirigibles. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacril-amidofenol, polihidroxi-etilaspirtamidofenol, o polietil-eneoxidopolilisina sustituida con restos palmitoilo. Además, los compuestos o moduladores identificados de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir una liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, caprolactona, poliépsilon, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidro-piranos, policianoacrilatos y copolímeros reticulados o en bloque anfipáticos de hidrogeles.

Para la administración por vía oral, los compuestos o moduladores pueden administrarse en forma de cápsulas, comprimidos o embolados o, como alternativa, pueden mezclarse en el pienso del animal. Las cápsulas, comprimidos y bolos están compuestos por el ingrediente activo junto con un excipiente vehículo apropiado tal como almidón, talco, estearato de magnesio o fosfato dicálcico. Estas formas de dosificación unitarias se preparan mezclando íntimamente el ingrediente activo con ingredientes inertes adecuados en polvo fino, incluyendo diluyentes, cargas, agentes disgregantes y/o aglutinantes, de tal modo que se obtenga una mezcla uniforme. Un ingrediente inerte es uno que no reaccionará con los compuestos o moduladores y que no será tóxico para el animal que se está tratando. Los ingredientes inertes adecuados incluyen almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio, gomas y aceites vegetales y similares. Estas formulaciones pueden contener una cantidad ampliamente variable de los ingredientes activos e inactivos, dependiendo de numerosos factores tales como el tamaño y el tipo de la especie animal a tratar y el tipo y la gravedad de infección. El ingrediente activo también puede administrarse como un aditivo en el pienso mezclando simplemente el compuesto con la materia prima o aplicando el compuesto en la superficie del pienso. Como alternativa, el ingrediente activo puede mezclarse con un vehículo inerte y, después, la composición resultante puede mezclarse con el pienso y suministrarse directamente al animal. Los vehículos inertes adecuados incluyen harina de maíz, harina de cítricos, residuos de fermentación, arenas de soja, granos secos y similares. Los ingredientes activos se mezclan íntimamente con estos vehículos inertes por molienda, agitación, trituración o volteo, de tal modo que la composición final contenga del 0,001 al 5% en peso del ingrediente activo.

Como alternativa, los compuestos o moduladores pueden administrarse por vía parenteral mediante inyección de una formulación que consiste en el ingrediente activo disuelto en un vehículo líquido inerte. La inyección puede ser intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intraruminal, intratraqueal o subcutánea. La formulación inyectable consiste en el ingrediente activo mezclado con un vehículo líquido inerte apropiado. Los vehículos líquidos aceptables incluyen los aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo y similares, así como disolventes orgánicos tales como solketal, glicerol formal y similares. Como una alternativa, también pueden usarse formulaciones parenterales acuosas. Los aceites vegetales son los vehículos líquidos preferidos. Las formulaciones se preparan por disolución o suspensión del ingrediente activo en el vehículo líquido de tal modo que la formulación final contenga del 0,005 al 10% en peso del ingrediente activo.

Es posible la aplicación tópica de los compuestos o moduladores a través del uso de un brebaje líquido o de un champú que contiene los presentes compuestos o moduladores como una solución o suspensión acuosa. Estas formulaciones contienen generalmente un agente de suspensión tal como bentonita y, normalmente, también contendrán un agente antiespumante. Son aceptables formulaciones que contienen del 0,005 al 10% en peso del ingrediente activo. Son formulaciones preferidas las que contienen del 0,01 al 5% en peso de los presentes compuestos o moduladores.

Ejemplo 1

Cultivo y mantenimiento de células PFSK-1

Se obtuvieron células PFSK-1 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (CRL-2060; Manassas, VA) y se cultivaron como se describe en Fults *et al.*, (1992, anteriormente). Se cultivaron células sobre placas de cultivo de tejidos de 10 ó 15 cm (Coming, Inc., Coming, Nueva York) en medio RPMI 1640 que contenía Hepes 25 mM y L-glutamina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, California) suplementado con suero bovino fetal al 10% (HyClone, Logan, Utah), penicilina G 50 u/ml y sulfato de estreptomicina 50 u/ml. Las células cultivadas en placas de 10 cm se cultivaron en 10 ml de medio completo y las células cultivadas en placas de 15 cm se cultivaron en 30 ml de medio completo. Las células se pasaron cada tres a cinco días a una dilución 1:5 retirando el medio por aspiración, añadiendo 2 ml/placa de una solución de tripsina-EDTA de Gibco/Invitrogen, retirando por aspiración la solución, incubando a temperatura ambiente durante cinco minutos y dispersando las células en placas recién preparadas usando medio completo recién preparado. Después, las células se mantuvieron en incubadores ajustados para mantener 37°C y CO₂ al 5%.

Ejemplo 2

Ensayo de fluorescencia de ión calcio intracelular en células PFSK-1

Células PFSK cultivadas y mantenidas como se ha descrito en el Ejemplo 1 se retiraron de un placa de cultivo de tejidos confluyente con tripsina-EDTA, como se ha descrito anteriormente, y se sembraron en una placa de 96 pocillos Packard Viewplate (Meriden, Connecticut) a 50.000 células/pocillo en 100 µl/pocillo de medio completo. Al día siguiente las células, que se habían adherido a la Viewplate y habían crecido hasta la confluencia, se cargaron con el colorante fluorescente Fluo-3. Para preparar la solución de Fluo-3, se mezclaron 20 µl de Fluo-3 AM 2,3 µM con 20 µl de detergente F-127 al 20% (Molecular Probes, Eugene, Oregon) y esa mezcla se mezcló en 10 ml de D-MEM: F12 de Gibco/Invitrogen. Después, se retiró el medio de cultivo completo de la Viewplate y se añadieron 100 µl de la solución de Fluo-3M a cada pocillo. Se añadieron los inhibidores A, B, C o D del receptor de orexina 2 apropiadamente diluidos (compuestos de ensayo, diluidos en solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato) inmediatamente después del Fluo-3, como estaba establecido, y después la placa se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se añadieron los compuestos de ensayo a los pocillos en un vehículo isotónico de pH neutro, tal como solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato.

Ejemplo 3

Análisis de los efectos de compuestos de ensayo sobre ión calcio intracelular en células PFSK-1

Después de la etapa de incubación descrita en el Ejemplo 2, se midieron los cambios en las concentraciones de calcio intracelular usando el instrumento FLIPR (Molecular Probes, Eugene, OR). El dispositivo FLIPR se ajustó para registrar 60 exposiciones a intervalos de un segundo y después 20 exposiciones a intervalos de 6 segundos. El pipeteador del FLIPR se ajustó para que administrase 30 µl de orexina B concentrada o de control de tampón después de las primeras diez exposiciones. Se analizaron los datos usando el la señal máxima menos la señal mínima para cada pocillo, en unidades arbitrarias de fluorescencia. Los valores de fluorescencia se analizaron adicionalmente usando el programa Prism de GraphPad (San Diego, California) para determinar la CE₅₀ de la orexina B y la CI₅₀ del inhibidor de orexina A a un estímulo de orexina B 100 nM.

Se analizó el antagonismo calculando los valores de K_B y pK_B para los compuestos que se descubrió que inhibían los aumentos en las concentraciones de Ca⁺⁺ intracelular en las células. Esto se llevó a cabo determinando la CE₅₀ de un agonista de orexina y comparando los valores de CI₅₀ determinados a partir de diluciones del compuesto o compuestos antagonistas en una placa individual multipocillo de células PFSK-1 cargadas con Fluo-3 AM.

Después, se determinó la K_B usando la fórmula de Cheng y Prusoff. Los resultados de tres experimentos separados, que ensayaban los inhibidores A, B, C y D del receptor de orexina 2, se muestran en la Figura 1 (inhibidor A), Figura 2 (inhibidor B) y Figura 3 (inhibidores C y D). Se midió la inhibición dependiente de la dosis de 100 nM de orexina B por cada compuesto; los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Inhibidor	CI ₅₀ (nM)	CE ₅₀ de orexina B (nM)	Dosis de orexina B (nM)	K _B (nM)	pK _B
A	477	6,2	100	28	7,6
B	32	7,4	100	2,2	8,7
C	1000	13	100	120	6,9
D	>10.000	13	100	>1200	<5,9

Se han descrito y ejemplificado en este documento ciertas realizaciones de la invención. La invención no se limita a las realizaciones descritas y ejemplificadas, sino que es susceptible de variaciones y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para identificar compuestos que modulen la actividad del receptor de orexina 2 humano, que comprende:

(a) combinar un supuesto modulador de la actividad del receptor de orexina 2 humano con receptores de orexina 2 humanos contenidos en el interior de membranas de células que poseen de forma no recombinante el receptor de orexina 2 humano, en el que las células que poseen el receptor de orexina 2 humano son células PFSK-1; y

(b) medir un efecto del modulador sobre la actividad del receptor de orexina 2 humano.

2. El método de la reivindicación 1, en el que los receptores de orexina 2 humanos están contenidos en el interior de membranas de células intactas.

3. El método de la reivindicación 1, en el que los receptores de orexina 2 humanos están contenidos en el interior de estructuras de membrana seleccionadas del grupo constituido por fragmentos de membranas aislados, vesículas unilaminares y vesículas multilaminares.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el efecto medido en la etapa (b) es la unión del supuesto modulador a los receptores de orexina 2.

5. El método de la reivindicación 1, en el que el efecto medido en la etapa (b) es la competición del supuesto modulador con un ligando conocido del receptor de orexina 2 humano para la unión a los receptores.

6. El método de la reivindicación 2, en el que el efecto medido en la etapa (b) es la modulación de un segundo mensajero intracelular del receptor de orexina 2 humano.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el segundo mensajero intracelular se selecciona del grupo constituido por AMPc, Ca^{++} y un producto génico indicador.

8. El método de la reivindicación 7, en el que las células se transfectan con una construcción de ADN de proteína aGa.

9. El método de la reivindicación 7, en el que el segundo mensajero intracelular es Ca^{++} , detectado con un indicador fluorescente de Ca^{++} .

10. El método de la reivindicación 1, adaptado para reconocer al supuesto modulador como un agonista, antagonista o agonista inverso del receptor de orexina 2.

Figura 1

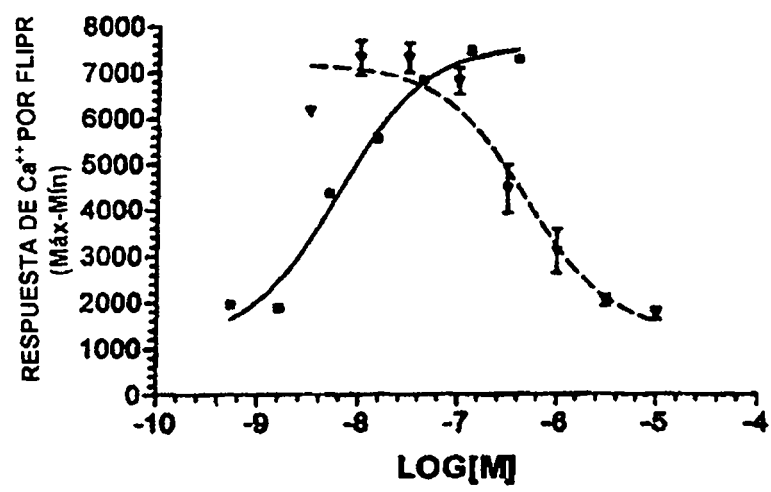


Figura 2

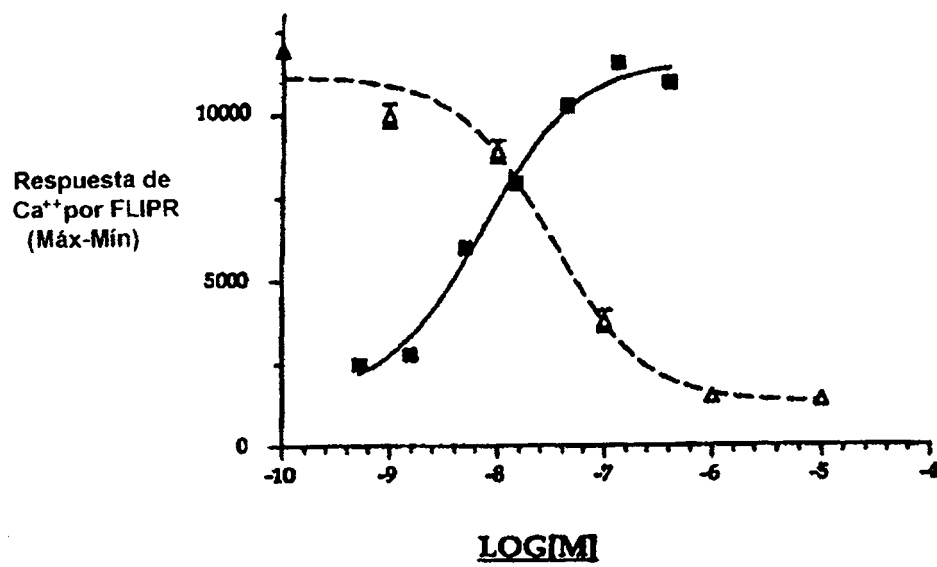


Figura 3

