

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 972**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/66** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2005 E 05818064 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 1812080**

54 Título: **GPR41 y sus moduladores para el tratamiento de los trastornos relacionados con la insulina**

30 Prioridad:

**03.11.2004 US 624867 P**

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

**26.09.2014**

73 Titular/es:

**ARENA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
6154 Nancy Ridge Drive  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**LEONARD, JAMES N.;  
CHU, ZHI LIANG;  
BRUCE, MARC A. y  
BOATMAN, P. DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 498 972 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

GPR41 y sus moduladores para el tratamiento de los trastornos relacionados con la insulina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los procedimientos para identificar un compuesto estabilizante glucémico, por ejemplo, un compuesto que controla la secreción de insulina, determinando si un compuesto modula la funcionalidad de GPR41. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención son útiles en la profilaxis o el tratamiento de los trastornos relacionados con la insulina tales como la hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, envejecimiento, resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, o diabetes.

15 **Antecedente de la invención**

Las células utilizan glucosa como fuente principal de energía. Por lo tanto, el cuerpo degrada en primer lugar la glucosa antes de utilizarla. La glucosa se libera a continuación desde el intestino en la sangre dando como resultado un aumento en los niveles de glucosa en sangre. En respuesta a este aumento en el nivel de glucosa, las células de los islotes  $\beta$  pancreáticos aumentan la producción y la secreción de insulina. La insulina circula a través de la sangre y actúa como mensajero, enviando una señal a los órganos sensibles a la insulina tales como el tejido adiposo, músculo e hígado para aumentar su captación de glucosa. De esta manera, un aumento de glucosa en sangre está acompañado por un posterior aumento en la secreción de insulina a partir de las células  $\beta$ . Es este aumento en la insulina el que actúa para devolver los niveles de glucosa en sangre a los normales. En individuos sanos, los niveles de glucosa en sangre se mantienen bastante constantes. Este estado de equilibrio, denominado normoglucemia (niveles normales de glucosa) está estrechamente controlado por la insulina.

En enfermedades tales como la diabetes, esta regulación estrecha de los niveles de glucosa en sangre se ha perdido, llevando a los niveles aumentados de glucosa en sangre observados en diabéticos. Se puede producir un estado de hiperglucemia (nivel elevado de glucosa) debido a una insuficiente producción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas y/o a través de una inadecuada captación de glucosa por los órganos diana tales como el músculo, el hígado y la grasa. El resultado final es un aumento en el nivel de glucosa en sangre. Por tanto, se puede pensar que la diabetes es el resultado de dos tipos de desequilibrio, un deterioro en la secreción de insulina a partir de las células  $\beta$  y un deterioro de la sensibilidad a la insulina por los órganos principales sensibles a la insulina. Esta sensibilidad deteriorada a la insulina, conocida también como resistencia a la insulina (debido a que los órganos son resistentes a los efectos de la insulina), significa que se requiere más insulina a fin de que los órganos diana aumenten su captación de glucosa. La resistencia a la insulina conduce a una presión aumentada sobre las células  $\beta$  dado que las células  $\beta$  necesitan aumentar su secreción de insulina para compensar la resistencia a la insulina. Esto es un creciente problema que conduce en primer lugar a una tolerancia deteriorada a la glucosa y; eventualmente, la pérdida completa de la secreción de insulina debido a la incapacidad del páncreas de mantener la demanda creciente de insulina.

La diabetes es un término diagnóstico para un grupo de trastornos caracterizados por una homeostasia anómala de la glucosa que dan como resultado un elevado nivel de glucosa. Existen muchos tipos de diabetes, pero los más comunes son el Tipo I, denominado también como diabetes mellitus dependiente de insulina o IDDM, y el Tipo II, denominado también como diabetes mellitus no dependiente de insulina o NIDDM. La diabetes de Tipo I es principalmente una enfermedad con una edad temprana de inicio, y es debida a la destrucción de las células  $\beta$  secretoras de insulina en el páncreas por el sistema inmune. En este caso, el cuerpo no reconoce las células  $\beta$  pancreáticas como propias y destruye sus propias células. Con la destrucción de las células  $\beta$  se produce una pérdida completa de la secreción de insulina y los individuos afectados de esta manera tienen una absoluta dependencia de la insulina para la supervivencia. La diabetes de Tipo II es principalmente una enfermedad con una etapa posterior de inicio, usualmente después de los 40 años, pero en los últimos años es más frecuente encontrar personas más jóvenes a las que se les ha diagnosticado diabetes de Tipo II. Se caracteriza principalmente por la resistencia a la insulina y el agotamiento de las células beta y se asocia a menudo con la obesidad. La diabetes de Tipo II es más común que la diabetes de Tipo I y representa el 90-95 % de todos los casos de diabetes diagnosticados a lo largo del mundo.

La exposición crónica de los tejidos a la hiperglucemia puede dar como resultado diversas complicaciones que incluyen problemas microvasculares de neuropatía, retinopatía y las complicaciones macrovasculares de ictus, enfermedad de las arterias coronarias, y enfermedad vascular periférica. El control inadecuado del nivel de glucosa en sangre es también una característica de enfermedades diferentes de la diabetes tales como la obesidad y el Síndrome X. Por ejemplo, una de las características del síndrome X es la resistencia a la insulina o la intolerancia a la glucosa. Además, la obesidad se caracteriza por hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, una característica compartida con NIDDM, hipertensión y aterosclerosis. Además, la obesidad es un factor de riesgo principal para NIDDM. El riesgo de desarrollar NIDDM se triplica en sujetos con un 30 % o más de sobrepeso, y las tres cuartas partes de los pacientes con NIDDM tienen sobrepeso.

La obesidad, que es el resultado de un desequilibrio entre la captación calórica y el gasto de energía, está muy correlacionada con la resistencia a la insulina y la diabetes en animales experimentales y seres humanos. Sin embargo, los mecanismos moleculares que están implicados en los síndromes de diabetes por obesidad se

encuentran todavía en investigación. Durante el desarrollo temprano de la obesidad, la mayor secreción de insulina equilibra la resistencia a la insulina y protege a los pacientes de la hiperglucemia (Le Stunff, y col., Diabetes 43:696-702 (1989)). Sin embargo, con el tiempo, la función de las células pancreáticas se deteriora y se desarrolla la diabetes no dependiente a la insulina en aproximadamente un 20 % de los individuos obesos (Pederson, P., Diab. Metab. Rev. 5:505-509 (1989), y Brancati, F. L., y col., Arch. Intern. Med. 159:957-963 (1999)). Dada su elevada prevalencia en las sociedades modernas, la obesidad ha llegado de esta manera a ser un factor de riesgo para NIDDM (Hill, J. O., y col., Science 280:1371-1374 (1998)). Sin embargo, los factores que predisponen a algunos pacientes a la alteración de la secreción de insulina en respuesta a la acumulación de grasa siguen siendo desconocidos. Desafortunadamente, aún no están todavía disponibles tratamientos a largo plazo para tratar la obesidad.

Varios millones de personas a lo largo del mundo padecen diabetes. Solo en los Estados Unidos, existen más de 18 millones de diabéticos, con 600.000 nuevos casos diagnosticados cada año. Las personas con diabetes tienen un riesgo mucho mayor de enfermedad cardíaca, ceguera, insuficiencia renal, infección, amputaciones de las extremidades, y otras dolencias. Se estima que los gastos médicos directos y los gastos indirectos atribuibles a la diabetes en los Estados Unidos fueron de 132.000 millones de dólares estadounidenses en 2002. Tomadas en conjunto, las complicaciones de la diabetes son una de las principales causas nacionales de muerte.

Existen tratamientos para tratar la diabetes tales como los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, biguanidas, tiazolidinodionas, meglitinidas, sulfonilureas e insulina exógena. Sin embargo, estos tratamientos tienen eficacia limitada y se asocian con problemas de seguridad y tolerabilidad significativos tales como un riesgo de episodios hipoglucémicos, aumento de peso, perturbaciones gastrointestinales y anemia. Además, muchas de las opciones de tratamiento requieren inyección o múltiples dosificaciones diarias que presentan desafíos para el cumplimiento.

Además de los trastornos que se benefician de un aumento en la secreción de insulina tales como la diabetes, existen numerosos trastornos que pueden beneficiarse de la disminución de la secreción de insulina. Por ejemplo, una disminución en la secreción de insulina puede dar como resultado un aumento de la glucosa en sangre que es necesaria durante la hipoglucemia. Además, por ejemplo, la disminución de la secreción de insulina puede ser útil para un paciente con un insulinoma, que es un tumor que secreta insulina en exceso. La insulina puede servir también como factor de crecimiento para determinados tumores. Además, se sabe que la restricción calórica regula por defecto la secreción de insulina y esta puede ser un mediador de un impacto favorable de la restricción calórica sobre la longevidad. Por tanto, una reducción en la secreción de insulina puede ser beneficiosa para tratar el envejecimiento. En todos estos casos, una reducción en los niveles de insulina puede ser beneficiosa.

Por tanto, existe necesidad de identificar un agente que con seguridad y eficacia module la secreción de insulina y/o los niveles de glucosa en sangre para el tratamiento de trastornos relacionados con la insulina tales como la hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, envejecimiento, resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, o diabetes. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

## **Sumario de la invención**

Los solicitantes han encontrado de forma inesperada que GPR41 se expresa en las líneas de células de los islotes pancreáticos y que GPR41 está regulado en exceso en los ratones db/db diabéticos. Además, los solicitantes han identificado compuestos agonistas que modulan la función de GPR41 y han encontrado que estos compuestos disminuyen la secreción de insulina. Además, los solicitantes describen agonistas o antagonistas inversos de GPR41 que se pueden usar para aumentar la secreción de insulina para el tratamiento de trastornos relacionados con la insulina tales como la resistencia a la insulina, la tolerancia deteriorada a la glucosa y la diabetes.

En un *primer* aspecto, la invención caracteriza un procedimiento para identificar un compuesto estabilizador de la glucemia, que comprende: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, en el que una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuestos estabilizador de la glucemia, teniendo el mencionado GPR41 una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°:2. o una de sus variantes u ortólogos, donde dicha variante es una variante alélica, variante de corte y empalme o variante conservativa de sustitución de aminoácidos de GPR41.

En algunas realizaciones, dicho GPR41 es humano. En algunas realizaciones, dicha determinación comprende un ensayo de segundo mensajero. En algunas realizaciones, un compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-4-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (2-cloro-fenil)-amida

del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables

En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista de GPR41 por ejemplo, un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 4-Furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-haxahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-Metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso GPR41 por ejemplo, un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-Bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional, la invención caracteriza un procedimiento para preparar una composición que comprende un compuesto estabilizador de la glucemia y que incluye premezclar dicho compuesto con un vehículo, donde dicho compuesto es uno de los compuestos descritos anteriormente.

La invención caracteriza además una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un compuesto proporcionado anteriormente.

Se describe en el presente documento un procedimiento para tratar o evitar un trastorno relacionado con la insulina en un individuo que lo necesita, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un compuesto proporcionado anteriormente. En algunos casos, dicho trastorno relacionado con la insulina es hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, o diabetes. Este procedimiento puede comprender además administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un agente usado para el tratamiento de la diabetes, trastornos de lípidos en la sangre, u obesidad en combinación con una cantidad eficaz de un compuesto del cuarto aspecto. El individuo puede ser un mamífero y preferentemente el individuo es un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención caracteriza un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende un compuesto proporcionado anteriormente para su uso como un compuesto estabilizador de la glucemia y un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende dicho compuesto para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina.

Se describe también en el presente documento un procedimiento para identificar un compuesto estabilizador de la glucemia, que comprende: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está aumentada, en el que un aumento en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador numérico. Preferentemente dicho GPR41 es humano. Preferentemente, dicha determinación comprende un ensayo de segundo mensajero. Un compuesto estabilizador de la glucemia puede comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, ácido 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster ciclopropanocarboxílico, ácido ciclopropanocarboxílico; o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-Metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El compuesto estabilizador de la glucemia puede ser un agonista de GPR41, por ejemplo, un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, ácido 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster ciclopropanocarboxílico, ácido ciclopropanocarboxílico; o-tolilamida del ácido

4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido  
 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido  
 5 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente  
 aceptables.

Se describe también en el presente documento un procedimiento para identificar un compuesto estabilizador de la  
 10 glucemia, que comprende: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la  
 funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el  
 compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. Preferentemente, dicho GPR41 es humano.  
 Preferentemente, dicha determinación comprende un ensayo de segundo mensajero. El compuesto estabilizador de la  
 15 glucemia puede comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida  
 del ácido 4-(5-Bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida  
 del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del  
 ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 20 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxifenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del  
 ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales  
 farmacéuticamente aceptables

preferentemente, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso de GPR41. El  
 compuesto estabilizador de la glucemia puede comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste  
 25 en:  
 o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida  
 del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida  
 del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del  
 ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 30 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluoroinetoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del  
 ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales  
 farmacéuticamente aceptables.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para aumentar la función de GPR41 que comprende  
 35 poner en contacto GPR41 con una cantidad eficaz de un agonista de GPR41. Preferentemente dicho agonista  
 comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster del ácido  
 ciclopropanocarboxílico, ácido ciclopropanocarboxílico; o-tolilamida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido  
 40 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 4-Furan-2-il,2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido  
 45 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente  
 aceptables.

Se describe también en el presente documento una función para disminuir una función de GPR41 que comprende  
 poner en contacto GPR41 con una cantidad eficaz de un agonista o antagonista inverso de GPR41. Preferentemente  
 dicho agonista o antagonista inverso comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en,  
 50 o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida  
 del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida  
 del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del  
 ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 55 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del  
 ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales  
 farmacéuticamente aceptables.

### **Breve descripción de los dibujos**

60 La **Figura 1** muestra el análisis de inmunotransferencia de la expresión de GPR41 humano en tejidos adultos y  
 fetales de seres humanos.

65 La **Figura 2** muestra el análisis de la RT-PCR y de la PCR cuantitativa mediante taqMan de la expresión de GPR41  
 de ratón en tejidos seleccionados de ratones normales y mutantes.

La **Figura 3** muestra el análisis del ensayo de protección de la ARNasa de la expresión de GPR41 de ratón en tipos celulares y tejidos de ratón.

La **Figura 4** muestra el acoplamiento de GPR41 a G-alfa i de la proteína G.

La **Figura 5** muestra el acoplamiento de GPR41 con G-alfa 12713 de la proteína G.

La **Figura 6** muestra la eficacia de los agonistas de GPR41 en células 293 transfectadas simultáneamente con Gq/Gi.

La **Figura 7** muestra un agonista de GPR41 que inhibe la liberación de la insulina en células MIN6 de insulinoma.

La Figura 8 muestra que un agonista de GPR41, el Compuesto 4, invierte el efecto beneficioso del compuesto B11 que disminuye el ensayo oral de tolerancia a la glucosa (oGTT),

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los solicitantes han descrito en el presente documento que GPR41 humano se expresa predominantemente en el páncreas (véase la Figura 1) y GPR41 de ratón se expresa en el páncreas y las líneas de células de islotes pancreáticos (véanse las Figuras 2 y 3). El páncreas se divide en lóbulos mediante septos de tejido conectivo. Los lóbulos están compuestos en última instancia por agrupaciones tipo uvas de células exocrinas denominadas acinos, que segregan enzimas digestivas. Incluidos en el tejido exocrino pancreático están los islotes de Langerhans, el componente endocrino del páncreas. Los islotes constituyen solamente el 1 % del páncreas. Los islotes contienen algunos tipos de células y están muy vascularizados. Los tipos de células de los islotes incluyen: alfa, beta, delta, A, B, C, D, y E. Estas son las células de los islotes beta que segregan insulina.

Los solicitantes describen también en el presente documento que GPR41 de ratón está regulado en exceso en las células de los islotes pancreáticos procedentes de ratones db/db diabéticos en comparación con los islotes procedentes de ratones C57 silvestres (véase la Figura 2). Además, los solicitantes han descrito en el presente documento el acoplamiento de la proteína G de GPRC en GPR41 con G-alfa i y G-alfa 12/13 (véanse las Figuras 4 y 5). Además, los solicitantes describen en el presente documento que los agonistas de GPR41 inducen la señalización de IP3 en células transfectadas simultáneamente con Gq/Gi (véase la Figura 6). Usando células MIN6 de insulinoma, los solicitantes describen además en el presente documento que los agonistas de GPR41 inhiben la secreción de insulina (Figura 7) e invierten el efecto beneficioso del compuesto que disminuye la tolerancia a la glucosa en el test oral (oGTT) (Figura 8).

Aunque existen numerosas clases de receptores en seres humanos, el más abundante y terapéuticamente relevante en la actualidad está representado por la clase del receptor acoplado a la proteína G (GPCR). Se estima que existen aproximadamente 30.000-40.000 genes en el genoma humano, y de estos, se estima que aproximadamente un 2 % codifican los GPCR. Los GPCR representan un importante área para el desarrollo de productos farmacéuticos: a partir de aproximadamente 20 de los 100 GPCR conocidos, se han desarrollado aproximadamente un 60 % de todos los productos farmacéuticos recetados.

Los GPCR comparten un motivo estructural común, que tiene siete secuencias de entre 22 a 24 aminoácidos hidrófobos que forman siete hélices alfa, cada una de las cuales abarca la membrana (cada tramo se identifica por un número, es decir, transmembrana-1 (TM-1), transmembrana-2 (TM-2), etc.). Las hélices transmembrana se unen mediante hebras de aminoácidos entre la transmembrana-2 y la transmembrana-3, la transmembrana-4 y la transmembrana-5, y la transmembrana-6 y la transmembrana-7 en el exterior, o el lado "extracelular" de la membrana celular (estos se denominan regiones 1 "extracelulares", 2 y 3 (EC-1, EC-2 y EC-3), respectivamente). Las hélices transmembrana se unen también por hebras de aminoácidos entre transmembrana-1 y transmembrana-2, transmembrana-3 y transmembrana-4, y las transmembranas y la transmembrana-6 en el interior, o el lado "intracelular", de la membrana celular (denominados estos como regiones 1 "intracelulares", 2 y 3 (IC-1, IC-2 e IC-3), respectivamente). El término "carboxi" ("C") del receptor se encuentra en el espacio intracelular en el interior de la célula, y el término "amino" ("N") del receptor se encuentra en el espacio extracelular en el exterior de la célula.

Generalmente, cuando se une un ligando con el receptor (denominado a menudo como "activación" del receptor); se produce un cambio en la conformación del receptor que facilita el acoplamiento entre la región intracelular y la "proteína G" intracelular. Se ha notificado que los GPCR son "promiscuos" con respecto a las proteínas G, es decir, que un GPCR puede interactuar con más de una proteína G. Véase, Kenakin, T., 43 Life Sciences 1095 (1988). Aunque existen otras proteínas G, actualmente, Gq, Gs, Gi, Gz y Go son proteínas G que se han identificado. El acoplamiento de GPCR activado por ligando con la proteína G inicia un proceso de la cascada de señalización (denominado "transducción de la señal"). En condiciones normales, la transducción de la señal da como resultado en última instancia la activación celular o la inhibición celular. Aunque sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se piensa que el bucle IC-3 así como el extremo carboxi del receptor interactúan con la proteína G.

Existen también proteínas G promiscuas, que parecen acoplarse a algunas clases de GPCR de la ruta C de la

fosfolipasa, tales como Gα15 o Gα16 (Offermanns & Simon, J Biol Chem 270:15175-80 (1995)), o proteínas G quiméricas diseñadas para acoplarse a un gran número de GPCR diferentes en la misma ruta, por ejemplo, la fosfolipasa C (Milligan & Rees, Trends in Pharmaceutical Sciences 20:118-24 (1999)).

5 Los GPCR acoplados a Gi disminuyen los niveles intracelulares de AMPc. La tecnología de los melanóforos (véase más abajo) es útil para identificar los GPCR acoplados a Gi y también para identificar moduladores de dichos GPCR acoplados a Gi.

10 En condiciones fisiológicas, los GPCR se encuentran en la membrana celular en equilibrio entre dos conformaciones diferentes: un estado "inactivo" y un estado "activo". Un receptor en un estado inactivo es incapaz de unirse a la ruta de transducción de la señalización intracelular para iniciar la transducción de la señal que conduce a una respuesta biológica. Cambiar la conformación del receptor al estado activo permite la unión con la ruta de transducción (mediante la proteína G) y produce una respuesta biológica.

15 Se puede estabilizar un receptor en un estado mediante un ligando o un compuesto tal como un fármaco. Descubrimientos recientes, que incluyen, pero no se limitan exclusivamente a modificaciones en la secuencia de aminoácidos del receptor, proporcionan medios diferentes a los ligandos o fármacos para promover y estabilizar el receptor en la conformación del estado activo. Esto significa estabilizar eficazmente el receptor en un estado activo simulando el efecto de una unión del ligando con el receptor. La estabilización por dicho medio independiente de  
20 ligando se denomina "activación constitutiva del receptor".

La secuencia de GPR41 se publicó en primer lugar en la bibliografía por Sawzdargo y col. (Sawzdargo y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 239:543-547 (1997)). Sawzdargo y col. amplificaron el ADN genómico humano utilizando la PCR con cebadores degenerados basados en secuencias conservadas en el receptor 1 de la alanina de ser humano y  
25 rata (GALR1) y GALR2 de rata. Un producto contenía un segmento que mostraba una homología del 100 % con una porción de la región 3-prima del gen CD22 humano. Sawzdargo investigó los marcos de lectura abiertos en esta región e identificó los genes GPR40 y GPR41. El gen GPR41 no tiene intrones. GPR41 un GPCR de 346 aminoácidos previstos que contiene 7 dominios transmembrana, 1 sitio de glicosilación, 1 sitio de fosforilación PKC, 2 sitios de fosforilación PKA/PKC, y un sitio de palmitoilación, que se localiza en el dominio del extremo C. La proteína GPR41  
30 comparte una identidad del 98 % de aminoácidos con GPR42, pero poca similitud con los GALR. Sawzdargo y col. notificó adicionalmente que el gen GPR41 se localizaba en la dirección 3' de CD22, que se había cartografiado anteriormente para 19q13.1.

GPR41 se clasificó como un receptor huérfano, lo que significa que se ha identificado ligando para el receptor. Recientemente, Brown y col. han notificado que GPR41 se activa mediante propionato y otros aniones de ácidos  
35 carboxílicos de cadena corta (Brown y col., J. Biol. Chem. 278:11312-11319 (2003)). Además, Brown y col. indican que GPR41 activa las proteínas de la familia Gi/o y que GPR41 se expresa principalmente en tejido adiposo.

En contraste con la divulgación del presente documento de que GPR41 se expresa en las células beta de páncreas, el documento WO 01/61359 (fecha de presentación 19 de febrero, 2001) indica que GPR41 está restringido al tejido  
40 adiposo. Además, el documento WO 01/61359 indica que GPR41 se puede usar como diana de selección para los compuestos que inhiben la lipólisis. Como GPR4 está acoplado a Gi, dichos compuestos podrían ser agonistas de GPR41. Se teoriza también en el documento WO 01/61359 que los agonistas de GPR41 son útiles, por ejemplo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la dislipidemia y las dolencias asociadas con la dislipidemia,  
45 enfermedad de las arterias coronarias, aterosclerosis, trombosis u obesidad, angina, insuficiencia renal crónica, enfermedad vascular periférica, ictus, diabetes tipo II o síndrome metabólico. Esto está en contraste con la divulgación del presente documento de que un agonista o antagonista inverso de GPR41 podrían ser útiles, por ejemplo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina tal como la diabetes.

## 50 DEFINICIONES

La bibliografía científica que se ha desarrollado alrededor de los receptores ha adoptado numerosos términos para referirse a ligandos que tienen diversos efectos sobre los receptores. Por claridad y consistencia, se usarán las  
55 siguientes definiciones a lo largo de este documento de patente.

**AGONISTA** significará un material, por ejemplo, un ligando o compuesto candidato, que activa una respuesta intracelular cuando se une al receptor. Una respuesta intracelular puede ser, por ejemplo, la potenciación de la unión de GTP a las membranas o la modulación del nivel de un segundo mensajero tal como AMPc o IP3. En algunas realizaciones, un **AGONISTA** es material no previamente conocido que activa la respuesta intracelular cuando se une al receptor (por ejemplo, para potenciar la unión de GTPγS a las membranas o para disminuir el nivel del AMPc intracelular). En algunas realizaciones, un **AGONISTA** es un material no conocido anteriormente que disminuye el nivel de glucosa en sangre cuando se une al receptor. El término **AGONISTA** incluye también **AGONISTAS PARCIALES** que son materiales, por ejemplo, ligandos o compuestos candidatos, que activan la respuesta intracelular cuando se unen al receptor en un grado o extensión menor que los agonistas completos.  
60

**ANTAGONISTA** significará un material, por ejemplo, ligandos o compuestos candidatos que se unen  
65

competitivamente al receptor en el mismo sitio que un agonista pero que no activan una respuesta intracelular, y pueden inhibir por tanto una respuesta intracelular estimulada por el agonista. Un **ANTAGONISTA** no disminuye el valor inicial de la respuesta intracelular en la ausencia de un agonista. En algunas realizaciones, un **ANTAGONISTA** es un material no conocido anteriormente que compite con un agonista para inhibir una respuesta celular cuando se une al receptor (por ejemplo, en el que la respuesta celular es la unión de GTPyS a las membranas o para la disminución del nivel de AMP intracelular).

Se pretende en el presente documento que **ANTICUERPO** abarque anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Se pretende que el término **ANTICUERPO** abarque IgG, IgA, IgD, IgE, e IgM. Los anticuerpos incluyen anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos completos de cadena única, y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que incluyen Fab, Fab', F(ab)2 y F(ab')2. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen, natural o sintético, por ejemplo, procedentes de ser humano, murino, conejo, cabra, cobaya, hámster, camello, burro, oveja, caballo o pollo. Los anticuerpos pueden tener afinidades de unión con una constante de disociación o valor Kd, por ejemplo, menos de 5x10-6M, 10-6M, 5x10-7M, 10-7M, 5x10-8M, 10-8M, 5x10-9M, 10-9M, 5x10-10M 10-10M, 5x10-11M, 10-11M, 5x10-12M, 10-12M, 5x10-13M, 10-13M, 5x10-14M 10-14M, 5x10-15M y 10-15M. Se pueden preparar anticuerpos de la presente invención mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica.

**COMPUESTO CANDIDATO** significará una molécula (por ejemplo, un compuesto químico) adecuado para una técnica de selección. El término compuesto candidato excluye específicamente cualquier compuesto ya conocido que modula GPR41, por ejemplo, un agonista conocido de GPR41.

**COMPOSICIÓN** significará un material que comprende al menos dos compuestos o dos componentes; por ejemplo, una "composición farmacéutica" es una composición.

**EFICACIA DEL COMPUESTO** significará una medida de la capacidad de un compuesto para inhibir o estimular la funcionalidad del receptor, en oposición a la afinidad de unión al receptor. **RECEPTOR ACTIVADO CONSTITUTIVAMENTE** significará un receptor sujeto a la activación constitutiva del receptor

**ACTIVACIÓN CONSTITUTIVA DEL RECEPTOR** significará la estabilización de un receptor en el estado activo por medios diferentes que la unión del receptor con su ligando endógeno o uno de sus equivalentes químicos.

**CONTACTO O PONER EN CONTACTO** significará poner al menos dos restos juntos, tanto en un sistema *in vitro* como en un sistema *in vivo*.

Se pretende que **DIABETES** tal como se usa en el presente documento abarque el diagnóstico usual de diabetes realizado a partir de cualquier procedimiento que incluye, por ejemplo, la siguiente lista: síntomas de la diabetes (por ejemplo, poliuria, polidipsia, polifagia) más niveles de glucosa en sangre casuales superiores o iguales a 200 mg/dl, donde la glucosa casual en sangre se define en cualquier momento del día sin tener en cuenta la temporalización del alimento o el consumo de bebida; o niveles de glucosa en sangre a las 8 horas de ayuno superiores o iguales a 126 mg/dl; o niveles de glucosa en sangre superiores o iguales a 200 mg/dl dos horas después de la administración oral de 75 g de glucosa anhidra disueltos en agua. Además, el término diabetes, tal como se usa en el presente documento incluye también el estado "prediabético" que se define por la Asociación Americana de Diabetes como un nivel de glucosa en sangre en ayunas de 100-125 mg/dl o niveles de glucosa en sangre de 140-199 mg/dl dos horas después de la administración oral de glucosa. La diabetes puede precipitarse por algunas dolencias que incluyen, por ejemplo, destrucción autoinmune de las células de los islotes beta, apoptosis de las células beta, o embarazo (diabetes gestacional)

**ENDÓGENO** significará un material que produce un mamífero de modo natural. **ENDÓGENO** en referencia a, por ejemplo y sin limitación, el término "receptor" significará que se produce naturalmente por un mamífero (por ejemplo, y sin limitación, un ser humano) o un virus. Por el contrario, el término **NO ENDÓGENO** en este contexto significará que no se produce naturalmente por un mamífero (por ejemplo, y sin limitación, un ser humano) o un virus. Por ejemplo, y sin limitación, un receptor que no es activo constitutivamente en su forma endógena, pero cuando se manipula se vuelve activo constitutivamente, se denomina lo más preferentemente en el presente documento como "receptor no endógeno activado constitutivamente". Ambos términos se pueden utilizar para describir sistemas "in vivo" e "in vitro". Por ejemplo, y no como una limitación, en un enfoque de cribado, el receptor endógeno o no endógeno puede ser en referencia a un sistema de cribado *in vitro*.

**CANTIDAD EFICAZ** significa una cantidad de compuesto activo o composición farmacéutica que estimula la respuesta biológica o medicinal deseada en un tejido, sistema, o individuo que está siendo investigado por el investigador o el doctor en medicina u otro especialista clínico. Por ejemplo, una dosis eficaz puede ser una cantidad que puede tratar un trastorno relacionado con la insulina. Asimismo, por ejemplo, una dosis eficaz puede ser una cantidad que puede evitar un trastorno relacionado con la insulina.

Se pretende que **COMPUESTO estabilizador de la glucemia** signifique un compuesto que estabiliza los niveles de glucosa en sangre. La estabilización de la glucosa en sangre puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, un compuesto estabilizador de la glucemia puede estabilizar los niveles de glucosa en sangre en un individuo con diabetes

5 aumentando la secreción de insulina. Además, por ejemplo, un compuesto estabilizador de la glucemia puede estabilizar los niveles de glucosa en sangre en un individuo con hipoglucemia disminuyendo la secreción de insulina. Además, por ejemplo, un compuesto estabilizador de la glucemia puede estabilizar los niveles de glucosa en sangre aumentando la sensibilidad de a la glucosa en un órgano o tejido.

10 **TOLERANCIA DETERIORADA A LA GLUCOSA** (IGT) tal como se usa en el presente documento se pretende que indique que la dolencia asociada con la resistencia a la insulina sea intermedia entre la diabetes tipo 2 declarada y la tolerancia normal a la glucosa (NGT) IGT se diagnostica mediante un procedimiento donde la respuesta de la glucosa postprandial de una persona afectada se determina que es anómala tal como se evalúa mediante los niveles de glucosa postprandial en plasma a las 2 horas. En este ensayo, se administra una cantidad medida de glucosa al paciente y se miden los niveles de glucosa en sangre a intervalos regulares, usualmente cada media hora durante las dos primeras horas y cada hora posteriormente. En un individuo "normal" o sin IGT, los niveles de glucosa aumentan durante las dos primeras horas hasta un nivel menor de 140 mg/dl y a continuación disminuyen rápidamente. En un individuo con IGT, los niveles de glucosa en sangre son mayores y el nivel de disminución es a una velocidad más lenta.

20 **EN NECESIDAD DE PREVENCIÓN O TRATAMIENTO** tal como se usa en el presente documento se refiere a un juicio emitido por un cuidador (por ejemplo, un médico, enfermera, enfermera especialista, etc., en el caso de seres humanos; un veterinario en el caso de animales, que incluyen mamíferos no humanos) que un individuo o animal requiere o se beneficiará del tratamiento. Este juicio se emite basándose en varios factores que son propios del campo de un cuidador experto, pero que incluyen el conocimiento de que el individuo o el animal están enfermo, o estará enfermo, como resultado de una dolencia que es tratable por los compuestos de la invención.

25 **INDIVIDUO** tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferentemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado ovejitas, caballos, o primates, y lo más preferente seres humanos.

30 **INHIBIR O QUE INHIBE**, en relación con el término "respuesta" significará que se disminuya o evita una respuesta en la presencia de un compuesto por oposición a en ausencia del compuesto.

35 **TRASTORNO RELACIONADO CON LA INSULINA** significa un trastorno relacionado con el nivel de insulina en la sangre o en un órgano o tejido Como se usa en el presente documento, un trastorno relacionado con la insulina puede ser el resultado de, por ejemplo, muy poca secreción de insulina, mucha secreción de insulina, o incluso una secreción normal de insulina acoplada con la resistencia de un órgano a la insulina. Se pretende que un trastorno relacionado con la insulina incluya, por ejemplo, un trastorno que podría beneficiarse de una disminución en la secreción de insulina, por ejemplo, hipoglucemia, un insulinoma, un tumor en el que la insulina es un factor de crecimiento, o el envejecimiento. Además, se pretende que un trastorno relacionado con la insulina incluya, por ejemplo, un trastorno que da como resultado un nivel elevado de glucosa en sangre y podría beneficiarse de un aumento en la secreción de insulina. Dichos trastornos incluyen, por ejemplo, resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa o diabetes tal como diabetes de Tipo I o diabetes de Tipo II. Además, En algunas realizaciones, el término trastorno relacionado con la insulina puede incluir enfermedades que están relacionadas con un nivel elevado de glucosa en sangre, por ejemplo, aterosclerosis, enfermedad cardíaca, ictus, hipertensión, Síndrome X, obesidad, y enfermedad vascular periférica.

45 **RESISTENCIA A LA INSULINA**, tal como se usa en el presente documento se pretende que abarque el diagnóstico usual de resistencia a la insulina realizado mediante cualquiera de numerosos procedimientos, que incluyen, pero que no se restringen a: prueba intravenosa de tolerancia a la glucosa, o medida del nivel de insulina en ayunas. Es bien sabido que existe una buena correlación entre el nivel máximo de insulina en ayunas y el grado de resistencia a la insulina. Por lo tanto, se podrían usar niveles elevados de insulina en ayunas como un marcador derivado de resistencia a la insulina con el fin de identificar qué individuos con tolerancia normal a la glucosa tienen resistencia a la insulina. Se puede realizar también un diagnóstico de resistencia a la insulina usando la prueba de pinzamiento euglicémico de la glucosa.

55 **AGONISTA INVERSO** significa un material, por ejemplo, un ligando o compuesto candidato que se une tanto a la forma endógena como a la forma activada constitutivamente del receptor de tal manera que reduce el valor inicial de la respuesta intracelular del receptor observado en ausencia de un agonista. Una respuesta intracelular puede ser, por ejemplo, modulación de la unión de GTP a membranas o modulación del nivel de un segundo mensajero tal como AMPc o IP3. En algunas realizaciones, un **AGONISTA INVERSO** es un material no anteriormente conocido que reduce el valor inicial de la respuesta intracelular del receptor observado en la ausencia de un agonista.

60 **LIGANDO** significará una molécula endógena que se produce naturalmente específica de un receptor endógeno, que se produce naturalmente

65 Como se usa en el presente documento, los términos **MODULAR** o **QUE MODULA** significará referirse a un aumento o disminución en la cantidad, calidad, respuesta o efecto de una actividad, función o molécula. Un **MODULADOR** GPR41 es un agente que modula el receptor de GPR41.

**COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA** significará una composición que comprende al menos un compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender al menos un principio activo, por lo cual la composición es susceptible a la investigación para un resultado eficaz especificado, en un animal (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano). Las personas normalmente expertas en la técnica comprenderán y apreciarán las técnicas adecuadas para determinar si un principio activo tiene un resultado eficaz deseado basándose en las necesidades del experto.

**FUNCIONALIDAD DEL RECEPTOR** se referirá al funcionamiento normal de un receptor para recibir un estímulo y moderar un efecto en la célula, incluyendo, pero sin limitarse a la regulación de la transcripción génica, regulación de la entrada o salida de iones, realización de una reacción catalítica, y/o modulación de la actividad a través de las proteínas G. Una funcionalidad de GPR41 puede ser, por ejemplo, unir una proteína G tal como Gi o G12/13, señalar a través de un segundo mensajero tal como AMPc o IP3 (cuando se usa una proteína G quimérica), unirse específicamente a un anticuerpo específico de GPR41, unirse específicamente a un compuesto tal como un agonista o agonista inverso de GPR41, modular la secreción de insulina o modular los niveles de glucosa en sangre in vivo.

**SEGUNDO MENSAJERO** significará una respuesta intracelular producida como resultado de la activación del receptor. Un segundo mensajero puede incluir, por ejemplo, trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG), AMP cíclico (AMPc), GMP cíclico (GMPc), y Ca<sup>2+</sup>. Se puede medir la respuesta al segundo mensajero para una determinación de la activación del receptor. Además, se puede medir la respuesta al segundo mensajero para la identificación directa de los compuestos candidatos, incluyendo por ejemplo, agonistas inversos, agonistas parciales, agonistas, y antagonistas.

La invención se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto estabilizador de la glucemia, que comprende: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, si una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. Se puede usar el procedimiento de selección para identificar un compuesto que puede ser, por ejemplo, un agonista, agonista inverso, agonista parcial, o antagonista de GPR41.

Como se usa en el presente documento, "GPR41" se refiere a un polipéptido con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N°: 2, o una variante u ortólogo de esta secuencia que retiene sustancialmente la función de un polipéptido con la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia en la SEC ID N°:2, donde dicha variante es una variante alélica, variante de corte y empalme o variante conservativa de sustitución de aminoácidos de GPR41.

Se entiende que se pueden realizar variaciones o modificaciones limitadas de GPR41 sin destruir su función. Por ejemplo, se pretende que GPR41 incluya otros polipéptidos de GPR41, por ejemplo, especies de mamíferos ortólogas del polipéptido GPR41 humano. Las secuencias de las especies ortólogas de GPR41 humano están presentes en la base de datos, por ejemplo, se puede encontrar un ortólogo de ratón de GPR41 en el GenBank en el N° de Acceso XM\_145470 y se puede encontrar un ortólogo de rata de GPR41 en el GenBank en el N° de Acceso XM\_344880. Además, GPR41 incluye variantes tales como variantes alélicas, variantes de corte y empalme y variantes de sustitución de aminoácidos conservativos de GPR41. Por ejemplo, GPR41 incluye variantes que retienen sustancialmente la función del polipéptido GPR41 natural tal como, por ejemplo, la capacidad de señalar a través de G-alfa i o G-alfa 12/13, la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo específico de GPR41, la capacidad de unirse específicamente a un compuesto tal como un ligando o agonista conocido, la capacidad de unirse específicamente a compuestos agonistas o agonistas inversos descritos en el presente documento, o la capacidad de regular la secreción de insulina o los niveles de glucosa en sangre. Una variante de GPR41 no necesita funcionar con el mismo nivel que el GPR41 natural, y no necesita contener todas y cada una de las funciones del GPR41 natural.

Se pueden comparar los cambios de aminoácidos conservativos y no conservativos, huecos, e inserciones en una secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia usando algoritmos y programas disponibles tales como la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica ("BLAST") usando los ajustes por defecto [Véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-8; Altschul y col., J Mol Biol (1990) 215:403-410; Altschul y col., Nature Genetics (1993) 3:266-72; y Altschul y col., Nucleic Acids Res (1997) 25:3389-3402].

Se entiende que un fragmento de GPR41 que retiene sustancialmente una función del polipéptido global está incluido en la definición. Por ejemplo, se puede usar un dominio generador de señal de GPR41 o un dominio de unión a compuesto de GPR41 en lugar del polipéptido completo. Además, GPR41 puede contener secuencias heterólogas tales como una etiqueta de un epítipo u otro polipéptido fusionado. Además, GPR41 puede contener una marca, por ejemplo, una radiomarca, una marca fluorescente o una marca enzimática,

Se pueden aplicar los procedimientos descritos en el presente documento usando un polipéptido que comprende un 99 %, 98 %, 95 %, 92 %, 90 %, 85 %, 80 %, o 75 % de identidad de la secuencia con la SEC ID N°:2, en el que el polipéptido no es GPR42.

En algunas realizaciones, dicha variante de GPR41 es un mutante no endógeno, activado constitutivamente de GPR41. En una realización, dicha GPR41 se deriva de un mamífero. En otra realización, dicho GPR41 es humano.

En determinadas realizaciones, dicho GPR41 es recombinante. En determinadas realizaciones, dicha puesta en contacto comprende ponerse en contacto con una célula hospedadora o con una membrana de una célula hospedadora que expresa el GPCR, en el que la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el receptor. En algunas realizaciones, dicha puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de un agonista conocido del GPCR o un antagonista tal como se ha descrito en el presente documento.

En determinadas realizaciones, dicho procedimiento comprende además la etapa de comparar la modulación del receptor producida por el compuesto candidato con una segunda modulación del receptor producida por la puesta en contacto del receptor con un modulador conocido del receptor. En determinadas realizaciones, dicho modulador conocido es un agonista.

En algunas realizaciones, dicha determinación comprende un ensayo de segundo mensajero, por ejemplo, la determinación es a través de la medida de la unión de GTPγS a membranas que comprenden dicho GPCR. En determinadas realizaciones, dicho GTPγS está marcado con [<sup>35</sup>S]. En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida del nivel de un segundo mensajero seleccionado entre el grupo que consiste en AMPcíclico (AMPc), GMP cíclico (GMPc), trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG), actividad de la quinasa MAP, yCa<sup>2+</sup>. En determinadas realizaciones, el segundo mensajero es AMPc. En determinadas realizaciones, dicha medida del AMPc se lleva a cabo usando el ensayo de la adenil ciclasa de célula completa. En determinadas realizaciones, dicha medida del AMPc se lleva a cabo con membranas que comprenden GPCR. En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida del IP3 intracelular. En determinadas realizaciones, dicha determinación incluye además el uso de una proteína G quimérica. En determinadas realizaciones, dicho segundo mensajero es la actividad de la quinasa MAP. En algunas realizaciones, dicha determinación es a través del ensayo del indicador CRE. En determinadas realizaciones, dicho indicador es la luciferasa. En algunas realizaciones, dicho indicador es la p-galactosidasa. En determinadas realizaciones, dicha determinación o dicha comparación es a través de la medida del Ca<sup>2+</sup> intracelular.

En algunas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida de la captación de glucosa por los adipocitos obtenida de un mamífero. En algunas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida de la captación de glucosa por las células del músculo esquelético obtenida de un mamífero.

En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través del uso del ensayo del melanóforo.

En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, ácido 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster ciclopropanocarboxílico, (2,5-diclorofenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto candidato como un modulador de la secreción de insulina, que comprende a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, donde una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un modulador de la secreción de insulina. Por ejemplo, un compuesto que disminuye la funcionalidad de GPR41, tal como un antagonista o un agonista inverso de GPR41, puede dar como resultado un aumento de la secreción de insulina. Se puede desear un aumento en la secreción de insulina, por ejemplo, en individuos con resistencia a la insulina tales como diabéticos. Un compuesto que aumenta la funcionalidad de GPR41, tal como un agonista de GPR41, puede dar como resultado una disminución en la secreción de insulina. Se puede desear una disminución en la secreción de insulina, por ejemplo, en individuos con hipoglucemia.

La invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto candidato como un modulador de la concentración de glucosa en sangre que comprende a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, donde una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un modulador de la concentración de glucosa en sangre. La invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto candidato como un modulador de la secreción de

insulina, que comprende a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, donde una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un modulador de la secreción de insulina. Por ejemplo, un compuesto que disminuye la funcionalidad de GPR41, tal como un agonista o antagonista inverso de GPR41, puede dar como resultado un aumento en la secreción de insulina y una disminución de la concentración de glucosa en sangre. Se puede desear una disminución de la glucosa en sangre. Por ejemplo, en individuos tales como diabéticos. Un compuesto que aumenta la funcionalidad de GPR41, tal como un agonista de GPR41, puede dar como resultado una disminución en la secreción de insulina y un aumento de la concentración de glucosa en sangre. Se puede desear un aumento de la glucosa en sangre, por ejemplo, en individuos con hipoglucemia.

En determinadas realizaciones, dicho GPR41 es recombinante. En determinadas realizaciones, dicha puesta en contacto comprende ponerse en contacto con una célula hospedadora o con una membrana de una célula hospedadora que expresa el GPCR, en el que la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el receptor. En algunas realizaciones, dicha puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de un agonista del GPCR.

En los procedimientos de la invención, se pueden llevar a cabo reacciones de control para mostrar la especificidad de la respuesta. Por ejemplo, se pueden comparar células transfectadas en simulación con células transfectadas con GPR41 para mostrar la especificidad de una respuesta al receptor de GPR41.

En los procedimientos de la invención, en determinadas realizaciones dicho compuesto candidato no es un anticuerpo o un derivado de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, dicho compuesto candidato no es un péptido. En determinadas realizaciones, dicho compuesto candidato no es un polipéptido.

Tal como se ha indicado anteriormente, la funcionalidad del receptor se refiere a un funcionamiento normal de un receptor para recibir un estímulo y moderar un efecto en la célula, incluyendo, pero sin limitarse a la regulación de la transcripción génica, regulación de la entrada o salida de iones, realización de una reacción catalítica, y/o modulación de la actividad a través de las proteínas G. Una funcionalidad de GPR41 puede ser, por ejemplo, unir una proteína G tal como Gi o G12/13, señalar a través de un segundo mensajero tal como AMPc o IP3 (cuando se usa una proteína G quimérica), unirse específicamente a un anticuerpo específico de GPR41, unirse específicamente a un compuesto tal como un agonista o agonista inverso de GPR41, modular la secreción de insulina o modular los niveles de glucosa en sangre in vivo.

En los procedimientos de la invención, la determinación puede comprender un ensayo de segundo mensajero. Se puede determinar el inicio de una señal intracelular, por ejemplo, a través de la medida del nivel de un segundo mensajero tal como AMP cíclico (AMPc), GMP cíclico (GMPc), trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG), quinasa MAP, o calcio. Son bien conocidos algunos ensayos en la técnica para medir estos segundos mensajeros, por ejemplo, ensayos de AMPc, ensayos de IP3, el ensayo FLIPR, el ensayo del melanóforo, o el ensayo del indicador CRE. Además, se describen en el presente documento en los Ejemplos 12-17 ejemplos de ensayos de segundos mensajeros. En determinadas realizaciones, el segundo mensajero es AMPc. En otras realizaciones, dicho segundo mensajero es IP3. En realizaciones adicionales dicho segundo mensajero es calcio.

En una realización, dicha determinación es a través de la medida de la unión de GTPγS a la membrana que comprende dicho GPCR. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica y se ejemplifican en el presente documento en los Ejemplos 12 y 14. En determinadas realizaciones, dicho GTPγS está marcado con [<sup>35</sup>S].

Se describen también en el presente documento compuestos estabilizadores glucémicos que se pueden identificar de acuerdo con el procedimiento de a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, si una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia.

Por ejemplo, se puede identificar un compuesto estabilizador de la glucemia de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, si una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia.

En una realización, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista de GPR41. Por ejemplo, dicho compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,3-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster del ácido ciclopropanocarboxílico (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y la o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista de GPR41. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista de GPR41 con una CE50 de menos de 10  $\mu\text{M}$  de menos de 1  $\mu\text{M}$ , de menos de 100 nM, o de menos de 10 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 1  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una EC50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 100 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 nM.

En determinadas realizaciones, dicha CE50 se determina usando un ensayo seleccionado entre el grupo que consiste en: ensayo de IP3 realizado utilizando células HEK293 transfectadas que expresaban el polipéptido GPR41 recombinante; y se llevó a cabo el ensayo del melanóforo utilizando melanóforos transfectados que expresaban el polipéptido GPR41 recombinante. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de menos de 10  $\mu\text{M}$ , de menos de 1  $\mu\text{M}$ , de menos de 100 nM, o de menos de 10 nM en dicho ensayo. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de menos de 10  $\mu\text{M}$ , de menos de 9  $\mu\text{M}$ , de menos de 8  $\mu\text{M}$ , de menos de 7  $\mu\text{M}$ , de menos de 6  $\mu\text{M}$ , de menos de 5  $\mu\text{M}$ , de menos de 4  $\mu\text{M}$ , de menos de 3  $\mu\text{M}$ , de menos de 2  $\mu\text{M}$ , de menos de 1  $\mu\text{M}$ , de menos de 900 nM, de menos de 800 nM, de menos de 700 nM, de menos de 600 nM, de menos de 500 nM, de menos de 400 nM, de menos de 300 nM, de menos de 200 nM, de menos de 100 nM, de menos de 90 nM, de menos de 80 nM, de menos de 70 nM, de menos de 60 nM, de menos de 50 nM, de menos de 40 nM, de menos de 30 nM, de menos de 20 nM, de menos de 10 nM en dicho ensayo. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 1  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 100 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es selectivo para el GPCR.

En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso de GPR41. Por ejemplo, dicho compuesto glucémico puede comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso de GPR41 con una CI50 de menos de 10  $\mu\text{M}$ , de menos de 1  $\mu\text{M}$ , de menos de 100 nM, o de menos de 10 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 1  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 100 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 nM.

En determinadas realizaciones, dicha CI50 se determinó utilizando un ensayo seleccionado entre el grupo que consiste en: se llevó a cabo el ensayo de IP3 utilizando células HEK293 transfectadas que expresaban el polipéptido GPR41 recombinante; y se llevó a cabo el ensayo del melanóforo utilizando melanóforos transfectados que expresaban el polipéptido GPR41 recombinante. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de menos de 10  $\mu\text{M}$ , de menos de 1  $\mu\text{M}$ , de menos de 100 nM, o de menos de 10 nM en dicho ensayo. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de menos de 10  $\mu\text{M}$ , de menos de 9  $\mu\text{M}$ , de menos de 8  $\mu\text{M}$ , de menos de 7  $\mu\text{M}$ , de menos de 6  $\mu\text{M}$ , de menos de 5  $\mu\text{M}$ , de menos de 4  $\mu\text{M}$ , de menos de 3  $\mu\text{M}$ , de menos de 2  $\mu\text{M}$ , de menos de 1  $\mu\text{M}$ , de menos de 900 nM, de menos de 800 nM, de menos de 700 nM, de menos de 600 nM, de menos de 500 nM, de menos de 400 nM, de menos de 300 nM, de menos de 200 nM, de menos de 100 nM, de menos de 90 nM, de menos de 80 nM, de menos de 70 nM, de menos de 60 nM, de menos de 50 nM, de menos de 40 nM, de menos de 30 nM, de menos de 20 nM, de menos de 10 nM en dicho ensayo. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10  $\mu\text{M}$ . En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la

glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 1 µM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 100 µM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es selectivo para el GPCR.

En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia está oralmente biodisponible. En algunas realizaciones, dicha biodisponibilidad oral es al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, o al menos 45 % con respecto a la administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, dicha biodisponibilidad oral es al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, o al menos 45 % con respecto a la administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia oralmente biodisponible es capaz además de cruzar la barrera hematoencefálica.

Además, se describe en el presente documento un procedimiento para preparar una composición que comprende identificar un compuesto estabilizador de la glucemia y a continuación premezclar dicho compuesto con un vehículo, donde dicho compuesto se puede identificar mediante el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, si una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. Por ejemplo, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende un compuesto estabilizador de la glucemia que se ha relacionado anteriormente, incluyendo dicho procedimiento premezclar dicho compuesto con un vehículo. Además, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende un compuesto estabilizador de la glucemia seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-diclorofenil)-amida del ácido 4-Furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-clorofenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se describe también una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, si una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia.

Algunas realizaciones de la presente invención incluyen un procedimiento para producir una composición farmacéutica que comprende premezclar al menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de compuestos descritas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se puede formular un compuesto en composiciones farmacéuticas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables, además de aquellos mencionados en el presente documento, están disponibles para los expertos en la técnica; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, 1980, Mack Publishing Co., (Oslo y col., eds.).

Aunque es posible que, para su uso en la profilaxis o el tratamiento, un compuesto descrito en el presente documento o identificado mediante los procedimientos de la invención pueden administrarse en un uso alternativo como una materia prima o compuesto químico puro, puede ser útil para presentar el compuesto o el principio activo como una formulación o composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además de esta manera formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto descrito en el presente documento o una sal o derivado del mismo farmacéuticamente aceptable junto con uno o más vehículos de los mismos farmacéuticamente aceptables y/o ingredientes profilácticos. El(los) vehículo(es) son "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el resto de ingredientes de la formulación y no demasiado perjudicial con el receptor de los mismos.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para la administración oral rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para la administración mediante la inhalación o la insuflación.

Los compuestos de la invención, junto con un adyuvante, vehículo, o diluyente convencionales, se pueden colocar de esta manera en la forma de formulaciones farmacéuticas y dosificaciones unitarias de los mismos, y en dicha forma se pueden emplear como sólidos, tales como comprimidos o cápsulas cargadas, o líquidos tales como soluciones,

suspensiones, emulsiones, elixires, geles o cápsulas cargadas con lo mismo, todo para su uso oral, en la forma de supositorios para la administración rectal; o en la forma de soluciones inyectables estériles para su uso parenteral (incluyendo el subcutáneo). Dichas composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas unitarias de las mismas pueden comprender ingredientes convencionales en proporciones convencionales, con o sin compuestos o principios activos adicionales, y dichas formas farmacéuticas unitarias pueden contener cualquier cantidad eficaz adecuada del principio activo.

Para la administración oral, la composición farmacéutica puede estar en la forma de, por ejemplo, un comprimido, cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se puede preparar en la forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad concreta del principio activo. Los ejemplos de dichas unidades de dosificación son cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos o una suspensión, con aditivos convencionales tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, acacia, almidón de maíz o gelatinas; con desintegrantes tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetil-celulosa; y con lubricantes tales como talco o estearato de magnesio. Se puede administrar también el principio activo mediante inyección como una composición donde, por ejemplo, se puede usar solución salina, dextrosa o agua como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe en el presente documento un procedimiento para activar selectivamente un receptor de GPR41 en un hospedador humano, que comprende administrar un compuesto que activa selectivamente el producto del gen GPR41 en un hospedador humano que necesita dicho tratamiento. Por ejemplo, el compuesto puede ser un agonista de GPR41 tal como o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, ácido 4-[1,3,3]tiadiazol-4-il-fenil éster ciclopropanocarboxílico, ácido ciclopropanocarboxílico; o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-Metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se describe también un procedimiento para inhibir selectivamente un receptor de GPR41 en un hospedador humano, que comprende administrar un compuesto que inhibe selectivamente el producto del gen GPR41 en un hospedador humano que necesita dicho tratamiento. Por ejemplo, el compuesto puede ser un agonista inverso de GPR41 tal como o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se describe en el presente documento adicionalmente un procedimiento para tratar o evitar un trastorno relacionado con la insulina en un individuo que lo necesita, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del compuesto identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, si una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. Preferentemente, dicho trastorno relacionado con la insulina es hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, envejecimiento, resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, o diabetes. En algunos casos, dicho trastorno relacionado con la insulina incluye una dolencia relacionada con una concentración elevada de glucosa en sangre, tal como aterosclerosis, enfermedad cardíaca, ictus, hipertensión, obesidad, síndrome X o enfermedad vascular periférica. En algunas realizaciones, dicho trastorno relacionado con la insulina es diabetes de Tipo II. Preferentemente, el compuesto administrado comprende un agonista de GPR41. Como alternativa, el compuesto administrado comprende un agonista o antagonista inverso de GPR41.

El procedimiento comprende además administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un agente utilizado para el tratamiento de la diabetes, trastornos de lípidos en la sangre, u obesidad en combinación con una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, si una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. Por ejemplo, el procedimiento comprende además administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un agente utilizado para el tratamiento de la diabetes, trastornos de lípidos en la sangre, u obesidad en combinación con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene un agonista inverso de GPR41. El individuo puede ser un mamífero y preferentemente el individuo es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" en referencia a un trastorno significa una reducción en la gravedad de uno o más síntomas asociados con un trastorno concreto. Por lo tanto, tratar un trastorno no significa necesariamente una reducción en la gravedad de todos los síntomas asociados con un trastorno y no significa necesariamente una reducción completa en la gravedad de uno o más síntomas asociados con un trastorno. De igual forma, el término "prevenir" significa la prevención de la incidencia o el inicio de uno o más síntomas asociados con un trastorno concreto y no significa necesariamente la prevención completa de un trastorno. Se pueden usar los procedimientos para tratar un trastorno relacionado con la insulina que incluye, por ejemplo, hipoglucemia o diabetes.

La dosis cuando se utilizan los compuestos descritos en el presente documento o se identifican mediante los procedimientos puede variar en unos límites amplios, y como es habitual y sabido por el médico, se personaliza para las condiciones individuales en cada caso individual. Esto depende por ejemplo, de la naturaleza y gravedad de la enfermedad que se va a tratar, o de la dolencia del paciente, del compuesto empleado o de si se trata de una patología aguda o crónica o si se lleva a cabo la profilaxis o de si se administran compuestos activos adicionales junto con los compuestos descritos en el presente documento o identificados mediante los procedimientos de la invención. Las dosis representativas de la presente invención incluyen, aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1000 mg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 750 mg, aproximadamente 0,01 a aproximadamente 500 mg, 0,01 a aproximadamente 250 mg, 0,01 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 0,01 mg a 150 mg, aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, y aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 75 mg. Se pueden administrar múltiples dosis durante el día, especialmente cuando se consideran necesarias cantidades relativamente grandes, por ejemplo 2, 3 o 4, dosis. Si es adecuado, dependiendo del comportamiento individual y según sea adecuado para el médico o el cuidador de los pacientes, puede ser necesario desviarse por encima o por debajo de la dosis diaria.

La cantidad de principio activo, o una sal o derivado activo del mismo, requerida para su uso en el tratamiento variará no solo con la sal concreta seleccionada si no también con la ruta de administración, la naturaleza de la dolencia que se trata y la edad y la dolencia del paciente serán en última instancia al criterio del médico o especialista clínico a cargo del tratamiento. En general, un experto en la técnica entiende como extrapolar los datos *in vivo* obtenidos en un sistema modelo, normalmente un modelo animal, u otro, tal como el de un ser humano. Normalmente, los modelos animales incluyen, pero sin limitación, los modelos de diabetes de roedores que se describen en el Ejemplo 19, más abajo (se han notificado otros modelos animales por Reed y Scribner en Diabetes, Obesity and Metabolism, 1:75-86 (1999)). En algunas circunstancias, estas extrapolaciones pueden estar basadas meramente en el peso del modelo animal en comparación con otro, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano, sin embargo, más a menudo, estas extrapolaciones no están sencillamente basadas en pesos, sino que incorporan más bien varios factores. Los factores representativos incluyen el tipo, la edad, peso, el sexo, la dieta y la dolencia médica del paciente, la gravedad de la enfermedad, la ruta de administración, consideraciones farmacológicas como la actividad, eficacia, los perfiles farmacocinéticos y toxicológicos del compuesto concreto empleado, si se utiliza un sistema de administración de fármacos, o de si se está tratando de una patología aguda o crónica o si se lleva a cabo la profilaxis o de si se administran compuestos activos adicionales junto con los compuestos descritos en el presente documento o identificados mediante los procedimientos de la invención y como parte de una combinación de fármacos. El régimen de dosificación para tratar una dolencia con enfermedad con los compuestos y/o composiciones de la presente invención se selecciona de acuerdo con varios factores como se ha citado anteriormente. Por tanto, el régimen de dosificación real puede variar ampliamente y por tanto puede desviarse de un régimen de dosificación preferido y un experto en la técnica reconocerá que se puede ensayar la dosificación y el régimen de dosificación fuera de estos intervalos típicos y, cuando sea adecuado, se puede usar.

La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una dosis única o como dosis divididas administradas a intervalos adecuados. Por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día. La propia subdosis se puede dividir adicionalmente, por ejemplo, en numerosas administraciones separadas ligeramente discretas. La dosis diaria se puede dividir, especialmente cuando se administran cantidades relativamente grandes según se considere adecuado, en varias, por ejemplo 2, 3 o 4, administraciones divididas. Si es adecuado, dependiendo del comportamiento individual, puede ser necesario desviarse hacia arriba o hacia abajo de la dosis diaria indicada.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar en una amplia variedad de formas farmacéuticas orales y parenterales. Será evidente para los expertos en la técnica que las siguientes formas farmacéuticas pueden comprender, como el componente activo, tanto un compuesto descrito en el presente documento o identificado mediante los procedimientos de la invención o una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto descrito en el presente documento.

Para preparar las composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos descritos en el presente documento, la selección de un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser tanto un sólido, líquido o una mezcla de ambos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que pueden actuar también como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes suspensores, aglutinantes, conservantes, agentes desintegrantes de comprimidos, o un material encapsulante.

En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente

dividido. En los comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene la capacidad aglutinante necesaria en las proporciones adecuadas y compactado con la forma y el tamaño deseados.

5 Los polvos y comprimidos pueden contener cantidades en porcentajes variables del compuesto activo. Una cantidad representativa en un polvo o comprimido puede contener entre 0,5 a aproximadamente 90 por ciento del compuesto activo; sin embargo, un experto conocerá qué cantidades serían necesarias fuera de este intervalo. Los vehículos adecuados para los polvos y comprimidos son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares. Se pretende que el término "preparación" incluya la formulación del  
10 compuesto activo con un material encapsulante como vehículo proporcionando una cápsula en la que el componente activo, con o sin vehículos, está rodeado por un vehículo, que está de esta manera en asociación con este. De igual forma, están incluidos sellos y pastillas para chupar. Se pueden usar comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, sellos, y pastillas para chupar como forma sólidas adecuadas para la administración oral.

15 Para preparar supositorios, una cera de bajo punto de fusión, tal como una premezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, se funde en primer lugar y el componente activo se dispersa homogéneamente en la anterior, como por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte a continuación en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar, y por tanto solidificar.

20 Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones que contienen además del principio activo dichos vehículos que son conocidos en la técnica como adecuados.

25 Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua-propilenglicol. Por ejemplo, se pueden formular preparaciones líquidas para la inyección parenteral como soluciones en una solución acuosa de polietilenglicol. Se pueden formular preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes suspensores adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente no tóxico, por ejemplo, como  
30 una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer, y una solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como medio disolvente o de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

35 Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden formularse de esta manera para la administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua) y se pueden presentar en una forma farmacéutica unitaria en ampollas, jeringuillas precargadas, recipientes de infusión de volumen pequeño o en multidosis con un conservante añadido. Las composiciones farmacéuticas pueden tomar dichas formas como  
40 suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formulatorios tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenido mediante aislamiento aséptico de un sólido estéril o mediante liofilización de una solución, para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, exenta de pirógenos, antes del uso.

45 Se pueden preparar soluciones acuosas para uso oral disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, aromas, agentes estabilizantes y espesantes adecuados, según se desee.

Se pueden preparar suspensiones acuosas adecuadas para su uso oral dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa,  
50 carboximetilcelulosa de sodio, u otros agentes suspensores bien conocidos.

Se incluyen también preparaciones en forma sólida que se pretende que se conviertan, poco antes del uso, en preparaciones en forma líquida para la administración oral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromas,  
55 estabilizantes, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares.

Para la administración tópica en la epidermis, los compuestos de acuerdo con la invención pueden formularse como pomadas, cremas o lociones, o como un parche transdérmico.  
60

Las pomadas y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de un espesante adecuado y/o agentes gelificantes. Se pueden formular las lociones con una base acuosa u oleosa y contendrán también generalmente uno o más agentes emulsificantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes suspensores, agentes espesantes, o agentes colorantes.  
65

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden

un agente activo en una base aromatizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

5 Las soluciones o suspensiones se aplican directamente en la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo con un gotero, pipeta o pulverizador. Las formulaciones se pueden proporcionar en forma única o multidosis. En el último caso de un gotero o pipeta, se puede conseguir esto administrando al paciente un volumen adecuado predeterminado, de la solución o suspensión. En el caso de un pulverizador, se puede conseguir esto, por ejemplo, por medio de una bomba de pulverización con atomización medida.

10 Se puede conseguir también la administración al tracto respiratorio por medio de una formulación en aerosol en la que se proporciona el principio activo en un envase presurizado con un propelente adecuado. Si los compuestos descritos en el presente documento o identificados mediante procedimientos de la invención o las composiciones que los comprenden se administran como aerosoles, por ejemplo como aerosoles o mediante inhalación, esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, utilizando un pulverizador, un nebulizador, un nebulizador de bomba, un aparato de inhalación, un inhalador de medida o un inhalador de polvo seco. Las formas farmacéuticas para la administración de los compuestos descritos en el presente documento o identificados mediante los procedimientos de la invención en forma de aerosol se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos de las personas expertas en la técnica. Para su preparación, por ejemplo, se pueden emplear disoluciones o dispersiones de los compuestos descritos en el presente documento o identificados mediante los procedimientos de la invención en agua, mezclas de agua/alcohol o soluciones salinas adecuadas utilizando aditivos habituales, por ejemplo, alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, potenciadores de la absorción para aumentar la biodisponibilidad, solubilizantes, dispersantes y otros, y, si es adecuado, propelentes habituales, que incluyen por ejemplo dióxido de carbono, CFC, tales como, 20 diclorodifluorometano, triclorofluorometano, o diclorotetrafluoroetano; y similares. El aerosol puede contener también convenientemente un tensioactivo tal como lecitina. Se puede controlar la dosis de fármaco mediante la provisión de una válvula de medida,

25 En las formulaciones previstas para la administración en el tracto respiratorio, incluyendo las formulaciones intranasales, el compuesto tendrá generalmente un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, del orden de 10 micrómetros o menos. Se puede obtener dicho tamaño de partícula por medios conocidos en la técnica, por ejemplo mediante micronización. Cuando se desea, se pueden emplear formulaciones adaptadas para proporcionar una administración sostenida del principio activo.

30 Alternativamente, se pueden proporcionar los principios activos en la forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto en una base de polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona (PVP). Convenientemente, el vehículo en polvo formará un gel en la cavidad nasal. Se puede presentar la composición en polvo en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina, o envases de tipo blíster a partir de los cuales se puede administrar el polvo por medio de un inhalador.

35 Las formulaciones farmacéuticas pueden ser formas farmacéuticas unitarias. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma farmacéutica unitaria puede ser una preparación envasada, el envase contiene cantidades discretas de preparación, tales como comprimidos envasados, cápsulas, y polvos en viales o ampollas. Asimismo, la forma farmacéutica unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello, o la propia pastilla para chupar, o este puede ser el número adecuado de cualquiera de estos en una forma envasada.

40 Los comprimidos o cápsulas para la administración oral y los líquidos para la administración intravenosa son composiciones particularmente útiles.

45 Los trastornos relacionados con la insulina incluyen, por ejemplo, hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, envejecimiento, resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, o diabetes.

50 La hipoglucemia se define como una glucosa en sangre anómalamente baja. La hipoglucemia puede ser el resultado, por ejemplo, de una insulina excesiva o de una mala dieta. Por ejemplo, se puede producir hipoglucemia cuando una persona con diabetes se ha inyectado demasiada insulina, ha ingerido muy poco alimento, o ha hecho ejercicio sin alimento extra. Los síntomas de hipoglucemia incluyen, por ejemplo, una sensación de nerviosismo o debilidad, dolor de cabeza, visión borrosa, hambre, y sudoración excesiva.

55 Los tumores que secretan insulina incluyen, por ejemplo, insulinomas. Un insulinoma es un tumor de las células beta en zonas del páncreas denominadas islotes de Langerhans. Aunque normalmente no son cancerosos, dichos tumores pueden ocasionar que el cuerpo fabrique insulina extra y pueden conducir a un nivel de glucosa en sangre que es muy bajo. Además de los tumores que secretan insulina, algunos tumores que no secretan insulina pueden usar insulina como factor de crecimiento. Aunque la insulina puede o no ser el único factor de crecimiento usado por el tumor, la reducción en la cantidad de insulina en el cuerpo puede reducir el crecimiento del tumor.

60

65

El envejecimiento es el proceso fisiológico que se produce en el organismo a medida que este envejece. La restricción calórica regula por defecto la secreción de insulina y existen motivos para sospechar que estos efectos son mediadores clave del impacto favorable de la restricción calórica sobre la longevidad. Por tanto, las estrategias para regular por defecto la insulina pueden ser útiles para retrasar el proceso del envejecimiento y el aumento de la longevidad.

La diabetes y las dolencias relacionadas tales como la resistencia a la insulina y la tolerancia deteriorada a la glucosa se han descrito anteriormente en el presente documento

Además, la resistencia a la insulina es una característica común del síndrome de ovarios poliquísticos (PCOS) y se han utilizado fármacos como rosiglitazona y metformina en el tratamiento de PCOS (Sepilian y Nagamani J. Clin Endocrinol Metab. Oct. 14, 2003; Baillargeon y col., Fertil. Steril. 82:893-902 (2004)). PCOS se caracteriza, por ejemplo, por ovarios poliquísticos alargados bilateralmente, amenorrea, e infertilidad. Se hereda como una dolencia dominante autosómica. Otros síntomas de la enfermedad pueden incluir, por ejemplo, hirsutismo y obesidad. Desde el punto de vista hormonal PCOS se caracteriza, por ejemplo, por una secreción aumentada de hormona luteinizante, insulina y andrógenos.

Otra indicación para los compuestos de la invención es el tratamiento de la lipodistrofia, por ejemplo, la producida por un tratamiento antirretrovírico para la infección por VIH. Por ejemplo, como el producido por un tratamiento antirretrovírico para la infección por VIH. Algunos pacientes con el tratamiento del sida a largo plazo denominado tratamiento antirretrovírico muy activo (HAART) están desarrollando de manera creciente un síndrome denominado lipodistrofia. Los síntomas incluyen sensibilidad a la insulina. La redistribución de la grasa desde la cara, los brazos y las piernas al abdomen y a la parte superior de la espalda, y los cambios del colesterol. Aproximadamente un 14 por ciento de personas en HAART desarrollan eventualmente diabetes de tipo 2. El fármaco rosiglitazona ha demostrado mejorar la sensibilidad a la insulina en pacientes VIH positivo que recibieron el tratamiento durante tres meses. Los pacientes tenían aproximadamente un 20 por ciento de mejora en el test normalizado para medir la sensibilidad a la insulina y aumentaron también su grasa corporal total, particularmente la cantidad de grasa en su cara, brazos y piernas, que aumentó hasta en un 24 por ciento. Por comparación, los pacientes que tomaron el placebo tenían un 2 por ciento de disminución en la grasa de la cara brazos y piernas.

En algunas realizaciones, dicho trastorno relacionado con la insulina incluye una dolencia relacionada con una concentración elevada de glucosa en sangre, tal como aterosclerosis, enfermedad cardíaca, ictus, hipertensión, obesidad, síndrome X y enfermedad vascular periférica.

La aterosclerosis es un proceso en el que se acumulan depósitos de sustancias grasas, colesterol y otras sustancias en el revestimiento interno de una arteria. Esta acumulación se denomina placa. Las placas que se rompen originan la formación de coágulos de sangre que pueden bloquear el flujo de sangre al corazón (ataque de corazón) o el cerebro (ictus). El ataque al corazón es la causa número uno de muerte para el hombre y la mujer en los Estados Unidos y el ictus es la tercera causa de muerte [véase, por ejemplo, Nature Medicine, Special Focus on Atherosclerosis, (2002) 8:1209-1262]. Los niveles anómalamente elevados de lípidos en circulación son el factor de predisposición principal en el desarrollo de la aterosclerosis. Niveles elevados de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), niveles elevados de triglicéridos, o niveles elevados de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) son, de forma independiente, factores de riesgo para la aterosclerosis y las patologías asociadas.

La enfermedad cardíaca incluye, pero no se limita a, insuficiencia cardíaca, insuficiencia coronaria, enfermedad de las arterias coronarias, y tensión arterial elevada (hipertensión). La enfermedad vascular periférica se refiere a enfermedades de los vasos sanguíneos alejados del corazón y el cerebro. Las enfermedades vasculares periféricas orgánicas están producidas por cambios estructurales en los vasos sanguíneos, tales como inflamación y daño en el tejido. La enfermedad de las arterias periféricas es un ejemplo. La enfermedad de las arterias periféricas (PAD) es una dolencia similar a la enfermedad de las arterias coronarias y la enfermedad de la arteria carótida. En PAD, se desarrollan depósitos grasos a lo largo de las paredes de las arterias y afectan a la circulación de la sangre, principalmente en las arterias que conducen a las piernas y a los pies. En estas etapas iniciales un síntoma común es el calambre o el cansancio en las piernas y nalgas durante la actividad. Dichos calambres disminuyen cuando la persona se detiene. Esto se denomina "claudicación intermitente". Las personas con PAD tienen un mayor riesgo de muerte debida a ictus y a ataque de corazón, debido al riesgo de coágulos de sangre.

El síndrome X, denominado también síndrome metabólico, se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos en una persona. Incluyen: obesidad central (tejido graso excesivo en y alrededor del abdomen), dislipidemia aterogénica (trastorno de grasa en sangre -principalmente triglicéridos elevados y niveles bajos de colesterol HDL), tensión arterial aumentada (130/85 mm de Hg o superior), resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, estado protrombótico (por ejemplo, fibrinógeno alto o inhibidor del activador del plasminógeno [-1] en la sangre), y estado proinflamatorio (por ejemplo, elevada proteína reactiva a C de alta sensibilidad en la sangre).

Aunque los compuestos descritos en el presente documento se pueden administrar como un único agente farmacéutico tal como se ha descrito en el presente documento anteriormente, se pueden usar en combinación con uno o más agentes que incluyen, por ejemplo, agentes que se usan para el tratamiento de la diabetes, trastornos de

- 5 lípidos en la sangre, u obesidad. Por ejemplo, se puede usar un compuesto tal como un agonista o antagonista inverso de GPR41 en combinación con uno o más agentes que pertenecen a la clase de fármacos conocidos como inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, inhibidores de la aldosa reductasa, biguanidas, tiazolidinodionas, meglitinidas, sulfonilureas, insulina, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la síntesis del escualeno, compuestos fibratos, potenciadores del catabolismo de LDL, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), inhibidores de la lipasa, liberadores de la serotonina y/o noradrenalina o inhibidores de la recaptación.
- 10 Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa pertenecen a la clase de fármacos que inhiben competitivamente las enzimas digestivas tales como la  $\alpha$ -amilasa, maltasa,  $\alpha$ -dextrinasa, sacarasa, etc, en el páncreas y/o el intestino delgado. La inhibición reversible por inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa retrasa, disminuye o reduce de otra forma los niveles de glucosa en sangre retrasando la digestión del almidón y los azúcares. Algunos ejemplos representativos de inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa incluyen la acarbosa, N-(1,3-dihidroxi-2-propil)valiol-amina (nombre genérico: voglibosa), miglitol, y los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa conocidos en la técnica.
- 15 La clase de inhibidores de la aldosa reductasa son fármacos que inhiben la enzima limitadora de la velocidad de la primera etapa en la ruta del poliol y evitan o detienen por tanto las complicaciones diabéticas. En el estado hiperglucémico de la diabetes, la utilización de la glucosa en la ruta del poliol está aumentada y el exceso de sorbitol acumulado intracelularmente actúa como consecuencia como una toxina celular y evoca por tanto el inicio de complicaciones tales como la neuropatía diabética, retinopatía, y nefropatía. Los ejemplos de inhibidores de la aldosa reductasa incluyen tolurestat; epalrestat; ácido 3,4-dihidro-2,8-diisopropil-3-tioxo-2H-1,4-benzoxazina-4-acético; 2,7-difluoro-espiro(9H-fluoreno-9,4'-imidazolidina)-2',5'-diona (nombre genérico: imirestat); ácido 3-[(4-bromo-2-fluorofenil)metil]-7-cloro-3,4-dihidro-2,4-dioxo-1(2H)-quinazolina (nombre genérico: zenarestat); 6-fluoro-2,3-dihidro-2',5'-dioxo-espiro[4H-1-benzopirán-4,4'-imidazolidina]-2-carboxamida (SNK-860); zopolrestat; sorbinil; y 1-[(3-bromo-2-benzofuranil)sulfonil]-2,4-imidazolidinadiona (M-16209), y los inhibidores de la aldosa reductasa conocidos en la técnica.
- 20 Las biguanidas son una clase de fármacos que estimulan la glucólisis anaerobia, aumentan la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, inhiben la absorción de la glucosa en el intestino, suprimen la gluconeogénesis hepática, e inhiben la oxidación de los ácidos grasos. Los ejemplos de biguanidas incluyen la fenformina, metformina, buformina, y las biguanidas conocidas en la técnica.
- 25 Los potenciadores de la secreción de insulina pertenecen a la clase de fármacos que tienen la propiedad de promover la secreción de insulina a partir de las células  $\beta$  pancreáticas. Los ejemplos de potenciadores de la secreción de insulina incluyen las sulfonilureas (SU). Las sulfonilureas (SU) son fármacos que promueven la secreción de insulina a partir de las células  $\beta$  pancreáticas transmitiendo señales de la secreción de insulina mediante receptores SU en las membranas celulares. Los ejemplos de sulfonilureas incluyen tolbutamida; clorpropamida; tolazamida; acetohexamida; 4-cloro-N-[(1-pirrolidinilamino) carbonil]-bencenosulfonamida (nombre genérico: glicopiramida) o su sal de amonio; glibenclamida (gliburide); gliclazida; 1-butil-3-metanilurea; carbutamida; glibonurida; glipizida; gliquidona; glisoxepid; glibutiazol; glibuzol; glihexamida; glimidina; glipinamida; fenbutamida; tolciclamida, glimepirida, y otros potenciadores de la secreción de insulina conocidos en la técnica. Otros potenciadores de la secreción de insulina incluyen N-[[4-(1-metil-etil)ciclohexil]carbonil]-D-fenilalanina (Nateglinida); (2S)-2-bencil-3-(cis-hexahidro-2-isoindolinilcarbonil)propionato de calcio dihidratado (Mitiglinida, KAD-1229); y otros potenciadores de la secreción de insulina conocidos en la técnica.
- 35 Las tiazolidinodionas pertenecen a la clase de fármacos más comúnmente conocidos como TZD. Las tiazolidinodionas son una clase de fármacos para la diabetes de tipo 2 que disminuyen el azúcar en sangre aumentando la sensibilidad de las células a la insulina. La insulina puede a continuación movilizar la glucosa en las células para la energía. Estos fármacos pueden aumentar también el HDL.
- 40 Los ejemplos de tiazolidinodionas incluyen la rosiglitazona, pioglitazona, y las tiazolidinodionas conocidas en la técnica. Rezulin (troglitazona) fue el primer fármaco de esta clase en los Estados Unidos, pero se ha retirado del mercado debido a su toxicidad hepática. Los compuestos relacionados disponibles ahora con un mejor perfil de seguridad incluyen Actos (pioglitazona) y Avandia (rosiglitazona). Las principales contraindicaciones para su uso de estas medicaciones incluyen la enfermedad hepática y la insuficiencia cardiaca. Estos fármacos pueden producir también un significativo aumento en la retención de fluidos y aumentar por tanto el riesgo de insuficiencia cardiaca.
- 45 Las meglitinidas se usan para detener el rápido aumento del azúcar en sangre que se puede producir inmediatamente después de que una persona con diabetes de tipo 2 ingiera una comida. Estos compuestos, que incluyen, por ejemplo, repaglinida (Prandin) y nateglinida (Starlix), trabajan aumentando la cantidad de insulina producida por el páncreas de forma similar a la manera en que trabajan las medicaciones de sulfonilureas. Las meglitinidas se toman antes de ingerir una comida. Los efectos secundarios asociados con esta clase de fármacos incluyen un bajo nivel de azúcar, infecciones respiratorias superiores que incluyen dolencias de los senos, dolor de cabeza, dolor en las articulaciones y en la espalda, náuseas, diarrea y estreñimiento.
- 50 Los diferentes tipos de insulina se clasifican de acuerdo con lo rápido que empiezan a actuar (inicio) y a cuánto tiempo continúan actuando (duración). Los tipos no disponibles incluyen insulina rápida, corta, intermedia, y de actuación
- 55
- 60
- 65

prolongada. Existen insulinas rápidas premezcladas y que actúan de forma intermedia disponibles, que incluyen: 70 % de insulina de acción intermedia (NPH) y 30 % de insulina regular de acción corta, denominada insulina 70/30; 50 % de insulina de acción intermedia (NPH) y 50 % de insulina regular de acción corta, denominada insulina 50/50; 75 % de insulina de acción intermedia (NPH) y 25 % de Humalog de acción rápida (lispro), denominada insulina 75/25; 70 % de NovoLog de acción intermedia (NPH); y 30 % de NovoLog de acción rápida (insulina aspart), denominada NovoLog Mix 70/30. Se administra insulina usualmente como una inyección en los tejidos bajo la piel (subcutánea). Se puede administrar también a través de una bomba de insulina o un inyector de chorro, un dispositivo que pulveriza la medicación en la piel.

La insulina permite que el azúcar (glucosa) penetre en las células, donde se usa para la energía. Sin insulina, el nivel de azúcar en sangre aumenta por encima de lo que es seguro para el cuerpo. Usualmente, una insulina de acción rápida o corta o una insulina de acción intermedia o larga se toma para proporcionar los niveles constantes y variables de insulina que el cuerpo necesita. La insulina de acción corta reduce rápidamente los niveles de azúcar en sangre y a continuación desaparece. Algunas insulinas de acción larga comienzan a tener efecto cuando las insulinas de acción rápida o corta comienzan a desaparecer. La nueva insulina de larga acción, Lantus, comienza a trabajar unos pocos minutos después que se administra y continúa trabajando a la misma velocidad durante aproximadamente 24 horas.

La combinación de una insulina de acción rápida o corta y una insulina de acción intermedia o larga ayuda a mantener los niveles de azúcar en sangre en un intervalo que es seguro para el cuerpo a lo largo del día. De esta manera se puede usar la insulina para tratar a las personas con diabetes de tipo 1, las personas con diabetes de tipo 2 cuyo páncreas produce poca o ninguna insulina o cuyas medicaciones orales no controlan su azúcar en sangre. Estas personas pueden tomar insulina tanto sola o junto con la medicación oral, las personas con diabetes de tipo 2 cuyos niveles de azúcar en sangre son altos debido a enfermedad grave o cirugía mayor, las mujeres con diabetes de tipo 2 que están embarazadas o que están dando de lactar que no pueden mantener sus niveles de azúcar en sangre en un intervalo seguro con dieta y ejercicio. Se ha estudiado solo una medicación oral para la diabetes (gliburide) para su uso durante el embarazo.

El efecto secundario principal de la insulina puede ser bajar peligrosamente el nivel de azúcar en sangre (hipoglucemia grave). Se puede desarrollar un nivel de azúcar en sangre muy bajo en 10 a 15 minutos. La insulina puede contribuir a la ganancia de peso, especialmente en personas con el tipo 2 que tienen ya sobrepeso. Otros posibles efectos secundarios de la insulina a largo plazo incluyen la pérdida de tejido graso (lipodistrofia) donde se inyecta la insulina y, raramente, reacciones alérgicas que incluyen hinchazón (edema).

Los compuestos de estatina pertenecen a la clase de fármacos que disminuyen los niveles de colesterol en sangre inhibiendo la hidroximetil-glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa. La HMG-CoA reductasa es la enzima que limita la velocidad en la biosíntesis del colesterol. Una estatina que inhibe esta reductasa disminuye las concentraciones séricas de LDL regulando en exceso la actividad de los receptores de LDL y es responsable de aclarar el LDL de la sangre. Los ejemplos de compuestos de estatinas incluyen rosuvastatina, pravastatina y su sal de sodio, simvastatina, lovastatina, atorvastatina, fluvastatina, cerivastatina, y los inhibidores de la HMG-CoA reductasa conocidos en la técnica.

Los inhibidores de la síntesis del escualeno pertenecen a una clase de fármacos que disminuyen los niveles de colesterol en sangre inhibiendo la síntesis del escualeno. Los ejemplos de inhibidores de la síntesis del escualeno incluyen el ácido (S)- $\alpha$ -[Bis[2,2-dimetil-1-oxopropoxi]metoxi] fosfinil]-3-fenoxibencenobutanossulfónico sal monopotásica (BMS-188494) y los inhibidores de la síntesis del escualeno conocidos en la técnica.

Los compuestos fibratos pertenecen a una clase de fármacos que disminuyen los niveles de colesterol en sangre inhibiendo la síntesis y la secreción de triglicéridos en el hígado y activando la lipoproteína lipasa. Se sabe que los fibratos activan los receptores activados por los proliferadores de los peroxisomas e inducen la expresión de la lipoproteína lipasa. Los compuestos de compuestos fibratos incluyen bezafibrato, beclobrato, binifibrato, ciplofibrato, clinofibrato, clofibrato, ácido clofibrato, etofibrato, fenofibrato, gemfibrozil, nicofibrato, pirifibrato, ronifibrato, simfibrato, teofibrato, y los fibratos conocidos en la técnica.

Los potenciadores del catabolismo de **LDL** (lipoproteína de baja densidad) pertenecen a una clase de fármacos que disminuyen los niveles de colesterol en sangre aumentando el número de receptores de LDL (lipoproteína de baja densidad); los ejemplos incluyen los potenciadores del catabolismo de LDL conocidos en la técnica.

Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) pertenecen a la clase de fármacos que disminuyen parcialmente los niveles de glucosa en sangre así como que disminuyen la tensión arterial inhibiendo las enzimas convertidoras de la angiotensina. Los ejemplos de inhibidores de las enzimas convertidoras de la angiotensina incluyen captopril, enalapril, alacepril, delapril; ramipril, lisinopril, imidapril, benazepril, ceronapril, cilzapril, enalaprilat, fosinopril, moxeltopril, perindopril, quinapril, spirapril, temocapril, trandolapril, y los inhibidores de las enzimas convertidoras de la angiotensina conocidos en la técnica.

Los inhibidores de la lipasa incluyen, por ejemplo, compuestos antiobesidad tales como Orlistat (XENICAL™). Orlistat

inhibe la absorción de grasa directamente pero tiende también a producir una elevada incidencia de efectos secundarios gástricos desagradables tales como diarrea y flatulencia.

5 Otras clases de fármacos antiobesidad incluyen los liberadores o los inhibidores de la recaptación de la serotonina y/o la noradrenalina. Por ejemplo, sibutramida (Meridia<sup>TM</sup>) es un inhibidor mixto de la recaptación de 5-HT/noradrenalina. El principal efecto secundario de sibutramina puede ser un aumento en la tensión arterial y el ritmo cardiaco en algunos pacientes. Se ha notificado que los inhibidores de la liberación/recaptación de serotonina fenfluramina (Pondimin<sup>TM</sup>) y dextfenfluramina (Redux<sup>TM</sup>) disminuyen la captación de alimento y el peso corporal durante un periodo prolongado de tiempo (más de 6 meses). Sin embargo, ambos productos se han retirado del uso tras informes de evidencias preliminares de anomalías en la válvula cardiaca asociadas con su uso.

10 Algunas realizaciones de la invención incluyen, una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en el presente documento o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en combinación con al menos un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un inhibidor de la  $\alpha$ -glucosidasa, un inhibidor de la aldosa reductasa, una biguanida, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, un inhibidor de la síntesis de escualeno, un compuesto fibrato, un potenciador del catabolismo de LDL y un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina. En otra realización, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa se selecciona entre el grupo que consiste en prevastatina, simvastatina, lovastatina, atorvastatina, fluvastatin y lipitor.

15 de acuerdo con la presente invención, la combinación se puede usar mezclando los respectivos componentes activos tanto juntos como de forma independiente con un vehículo, excipiente, aglutinante, diluyente, etc., farmacéuticamente aceptable, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y administrando la mezcla o mezclas tanto de forma oral como no oral como una composición farmacéutica. Cuando un compuesto o una mezcla de compuestos se administran como un tratamiento combinado o como profilaxis con otro compuesto activo, los agentes terapéuticos se pueden formular como composiciones farmacéuticas separadas administradas en el mismo momento o en momentos diferentes, o se pueden administrar los agentes terapéuticos como una única composición.

20 se describe en el presente documento un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, donde una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa del compuesto candidato que se está usando como compuesto estabilizador de la glucemia, para uso como compuesto estabilizador de la glucemia.

25 Se describe también un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada, donde una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa del compuesto candidato que se está usando como compuesto estabilizador de la glucemia, para uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina.

30 La invención se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto estabilizador de la glucemia, que comprende: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está aumentada, en el que un aumento en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador numérico.

35 En una realización, dicha GPR41 se deriva de un mamífero. En otra realización, dicho GPR41 es humano.

40 En determinadas realizaciones, dicho GPR41 es recombinante. En determinadas realizaciones, dicha puesta en contacto comprende ponerse en contacto con una célula hospedadora o con una membrana de una célula hospedadora que expresa el GPCR, en el que la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el receptor. En algunas realizaciones, dicha puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de un agonista conocido del GPCR o un antagonista tal como se ha descrito en el presente documento.

45 En determinadas realizaciones, dicho procedimiento comprende además la etapa de comparar el aumento en la funcionalidad del receptor producido por el compuesto candidato para un segundo aumento en la funcionalidad del receptor producido al poner en contacto el receptor con un ligando o agonista conocido del receptor.

50 En algunas realizaciones, dicha determinación comprende un ensayo de segundo mensajero, por ejemplo, la determinación es a través de la medida de la unión de GTP $\gamma$ S a la membrana que comprende dicho GPCR. En determinadas realizaciones, dicho GTP $\gamma$ S está marcado con [<sup>35</sup>S]. En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida del nivel de un segundo mensajero seleccionado entre el grupo que consiste en AMPcíclico (AMPc), GMP cíclico (GMPc), trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG), actividad de la quinasa MAP, y Ca<sup>2+</sup>. En determinadas realizaciones, el segundo mensajero es AMPc. En determinadas realizaciones, dicha

- medida del AMPc se lleva a cabo usando el ensayo de la adenil ciclasa de célula completa. En determinadas realizaciones, dicha medida del AMPc se lleva a cabo con membranas que comprenden GPCR. En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida del IP3 intracelular. En determinadas realizaciones, dicha determinación incluye además el uso de una proteína G quimérica. En determinadas realizaciones, dicho segundo mensajero es la actividad de la quinasa MAP. En algunas realizaciones, dicha determinación es a través del ensayo del indicador CRE. En determinadas realizaciones, dicho indicador es la luciferasa. En algunas realizaciones, dicho indicador es  $\beta$ -galactosidasa. En determinadas realizaciones, dicha determinación o dicha comparación es a través de la medida del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.
- En algunas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida de la captación de glucosa por adipocitos obtenidos de un mamífero. En algunas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida de la captación de glucosa por las células del músculo esquelético obtenida de un mamífero.
- En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través del uso del ensayo del melanóforo.
- En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-diclorofenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- La invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto candidato como un inhibidor de la secreción de insulina, que comprende a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está aumentada, donde un aumento en la funcionalidad de GPR41 es indicativo del compuesto candidato que es un inhibidor de la secreción de insulina. Por ejemplo, un compuesto que aumenta la funcionalidad de GPR41, tal como un agonista de GPR41, puede dar como resultado una disminución en la secreción de insulina. Se puede desear una disminución en la secreción de insulina, por ejemplo, en individuos con hipoglucemia.
- La invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto candidato que da como resultado un aumento de la concentración de glucosa en sangre, que comprende a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está aumentada, donde un aumento en la funcionalidad de GPR41 es indicativo del compuesto candidato que da como resultado un aumento de la concentración de glucosa en sangre. Por ejemplo, un compuesto que aumenta la funcionalidad de GPR41, tal como un agonista de GPR41, puede dar como resultado una disminución en la secreción de insulina y un aumento de la concentración de glucosa en sangre. Se puede desear un aumento de la glucosa en sangre, por ejemplo, en individuos con hipoglucemia.
- En determinadas realizaciones, dicho GPR41 es recombinante. En determinadas realizaciones, dicha puesta en contacto comprende ponerse en contacto con una célula hospedadora o con una membrana de una célula hospedadora que expresa el GPCR, en el que la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el receptor. En algunas realizaciones, dicha puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de un agonista del GPCR.
- En los procedimientos de la invención, se pueden llevar a cabo reacciones de control para mostrar la especificidad de la respuesta. Por ejemplo, se pueden comparar las células transfectadas con simulación con las células transfectadas con GPR41 para mostrar la especificidad de una respuesta al receptor de GPR41.
- En los procedimientos de la invención, en determinadas realizaciones dicho compuesto candidato no es un anticuerpo o un derivado de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, dicho compuesto candidato no es un péptido. En determinadas realizaciones, dicho compuesto candidato no es un polipéptido.
- En los procedimientos de la invención, la determinación puede comprender un ensayo de segundo mensajero. Se puede determinar el inicio de una señal intracelular, por ejemplo, a través de la medida del nivel de un segundo mensajero tal como AMP cíclico (AMPc), GMP cíclico (GMPc), trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG), quinasa MAP, o calcio. Son bien conocidos algunos ensayos en la técnica para medir estos segundos mensajeros, por ejemplo, ensayos de AMPc, ensayos de IP3, el ensayo FLIPR, el ensayo del melanóforo, o el ensayo del indicador CRE. Además, se describen en el presente documento en los Ejemplos 12-17 ejemplos de ensayos de segundos mensajeros. En determinadas realizaciones, el segundo mensajero es AMPc. En otras realizaciones, dicho segundo mensajero es IP3. En realizaciones adicionales dicho segundo mensajero es calcio.
- En una realización, dicha determinación es a través de la medida de la unión de GTP $\gamma$ S a la membrana que

comprende dicho GPCR. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica y se ejemplifican en el presente documento en los Ejemplos 12 y 14. En determinadas realizaciones, dicho GTPγS está marcado con [<sup>35</sup>S].

5 En una realización, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista de GPR41. Por ejemplo, dicho compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido  
 10 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y la o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente  
 aceptables.

15 En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista de GPR41. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista de GPR41 con una CE50 de menos de 10 μM de menos de 1 μM, de menos de 100 nM, o de menos de 10 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 μM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de un valor seleccionado de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 1 mM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 100 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 nM.

25 En determinadas realizaciones, dicha CE50 se determina usando un ensayo seleccionado entre el grupo que consiste en: se llevó a cabo el ensayo de IP3 utilizando células HEK293 transfectadas que expresaban el polipéptido GPR41 recombinante; y el ensayo del melanóforo llevado a cabo usando melanóforos transfectados que expresan el polipéptido GPR41 recombinante. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de menos de 10 μM, de menos de 1 μM, de menos de 100 nM, o de menos de 10 nM en dicho ensayo. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 de menos de 10 μM, de menos de 9 μM, de menos de 8 μM, de menos de 7 μM, de menos de 6 μM, de menos de 5 μM, de menos de 4 μM, de menos de 3 μM, de menos de 2 μM, de menos de 1 μM, de menos de 900 nM, de menos de 800 nM, de menos de 700 nM, de menos de 600 nM, de menos de 500 nM, de menos de 400 nM, de menos de 300 nM, de menos de 200 nM, de menos de 100 nM, de menos de 90 nM, de menos de 80 nM, de menos de 70 nM, de menos de 60 nM, de menos de 50 nM, de menos de 40 nM, de menos de 30 nM, de menos de 20 nM, de menos de 10 nM en dicho ensayo. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 μM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 1 μM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 100 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista con una CE50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es selectivo para el GPCR.

45 En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia está oralmente biodisponible. En algunas realizaciones, dicha biodisponibilidad oral es al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, o al menos 45 % con respecto a la administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, dicha biodisponibilidad oral es al menos del 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, o al menos 45 % con respecto a la administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia oralmente biodisponible es capaz además de cruzar la barrera hematoencefálica.

55 En una realización, dicho compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolil amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido  
 60 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y la o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente  
 aceptables.

Además, la invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición que comprende un compuesto estabilizador de la glucemia que se ha relacionado anteriormente y que comprende premezclar dicho compuesto con un vehículo. Además, la invención proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende un

compuesto estabilizador de la glucemia y que comprende premezclar dicho compuesto con un vehículo, donde dicho compuesto comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se describe también una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está aumentada, en el que un aumento en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador numérico.

Algunas realizaciones de la presente invención incluyen un procedimiento para producir una composición farmacéutica que comprende premezclar al menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de compuestos descritas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se puede formular un compuesto en las composiciones farmacéuticas utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica y que se describen en el presente documento.

Aunque es posible que, para su uso en la profilaxis o el tratamiento, un compuesto descrito en el presente documento o identificado mediante los procedimientos de la invención pueden administrarse en un uso alternativo como una materia prima o compuesto químico puro, puede ser útil para presentar el compuesto o el principio activo como una formulación o composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona además de esta manera formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto descrito en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de la misma junto con uno o más vehículos de la misma farmacéuticamente aceptables y/o ingredientes profilácticos. El(los) vehículo(s) son "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el resto de ingredientes de la formulación y no demasiado perjudicial con el receptor de los mismos.

Se han descrito anteriormente formulaciones farmacéuticas, rutas de administración, y dosificaciones.

Se describe en el presente documento un procedimiento para tratar o evitar un trastorno relacionado con la insulina en un individuo que lo necesita, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del compuesto identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está aumentada, donde un aumento en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. En algunos casos, dicho trastorno relacionado con la insulina es hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, o el envejecimiento. El compuesto administrado puede comprender un agonista de GPR41. Preferentemente el individuo es un mamífero y más preferentemente el individuo es un ser humano.

Aunque los compuestos descritos o identificados en el presente documento mediante los procedimientos de la invención pueden administrarse como el único agente farmacéutico activo que se ha descrito anteriormente en el presente documento, se pueden usar en combinación con uno o más agentes.

Se describe también en el presente documento un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está aumentada, donde un aumento en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia, para uso como compuesto estabilizador de la glucemia.

Se describe además un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está aumentada, donde un aumento en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia, para uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina.

La invención se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto estabilizador de la glucemia, que comprende: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está

disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. En una realización, dicho compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4, 5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización, dicha GPR41 se deriva de un mamífero. En otra realización, dicho GPR41 es humano.

En determinadas realizaciones, dicho GPR41 es recombinante. En determinadas realizaciones, dicha puesta en contacto comprende ponerse en contacto con una célula hospedadora o con una membrana de una célula hospedadora que expresa el GPCR, en el que la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el receptor. En algunas realizaciones, dicha puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de un agonista conocido del GPCR o un antagonista tal como se ha descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, dicha determinación comprende un ensayo de segundo mensajero, por ejemplo, la determinación es a través de la medida de la unión de GTPyS a membranas que comprenden dicho GPCR. En determinadas realizaciones, dicho GTPyS está marcado con [<sup>35</sup>S]. En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida del nivel de un segundo mensajero seleccionado entre el grupo que consiste en AMPcíclico (AMPc), GMP cíclico (GMPc), trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG), actividad de la quinasa MAP, yCa<sup>2+</sup>. En determinadas realizaciones, el segundo mensajero es AMPc. En determinadas realizaciones, dicha medida del AMPc se lleva a cabo usando el ensayo de la adenil ciclasa de célula completa. En determinadas realizaciones, dicha medida del AMPc se lleva a cabo con membranas que comprenden GPCR. En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida del IP3 intracelular. En determinadas realizaciones, dicha determinación incluye además el uso de una proteína G quimérica. En determinadas realizaciones, dicho segundo mensajero es la actividad de la quinasa MAP. En algunas realizaciones, dicha determinación es a través del ensayo del indicador CRE. En determinadas realizaciones, dicho indicador es la luciferasa. En algunas realizaciones, dicho indicador es la p-galactosidasa. En determinadas realizaciones, dicha determinación o dicha comparación es a través de la medida del Ca<sup>2+</sup> intracelular.

En algunas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida de la captación de glucosa por adipocitos obtenidos de un mamífero. En algunas realizaciones, dicha determinación es a través de la medida de la captación de glucosa por las células del músculo esquelético obtenida de un mamífero.

En determinadas realizaciones, dicha determinación es a través del uso del ensayo del melanóforo.

La invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto candidato como un potenciador de la secreción de insulina, que comprende a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un potenciador de la secreción de insulina. Por ejemplo, un compuesto que disminuye la funcionalidad de GPR41, tal como un antagonista o un agonista inverso de GPR41, puede dar como resultado un aumento de la secreción de insulina. Se puede desear un aumento en la secreción de insulina, por ejemplo, en individuos con resistencia a la insulina tales como diabéticos.

La invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto candidato que da como resultado una disminución en la concentración de glucosa en sangre, que comprende a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato da como resultado una disminución de la concentración de glucosa en sangre. Por ejemplo, un compuesto que disminuye la funcionalidad de GPR41, tal como un agonista o antagonista inverso de GPR41, puede dar como resultado un aumento en la secreción de insulina y una disminución de la concentración de glucosa en sangre. Se puede desear una disminución de la glucosa en sangre. Por ejemplo, en individuos tales como diabéticos.

En determinadas realizaciones, dicho GPR41 es recombinante. En determinadas realizaciones, dicha puesta en contacto comprende ponerse en contacto con una célula hospedadora o con una membrana de una célula hospedadora que expresa el GPCR, en el que la célula hospedadora comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el receptor. En algunas realizaciones, dicha puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de un agonista del GPCR.

En los procedimientos de la invención, se pueden llevar a cabo reacciones de control para mostrar la especificidad de la respuesta. Por ejemplo, Se pueden comparar las células transfectadas con simulación con las células transfectadas

con GPR41 para mostrar la especificidad de una respuesta al receptor de GPR41.

En los procedimientos de la invención, en determinadas realizaciones dicho compuesto candidato no es un anticuerpo o un derivado de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, dicho compuesto candidato no es un péptido. En determinadas realizaciones, dicho compuesto candidato no es un polipéptido.

En los procedimientos de la invención, la determinación puede comprender un ensayo de segundo mensajero. Se puede determinar el inicio de una señal intracelular, por ejemplo, a través de la medida del nivel de un segundo mensajero tal como AMP cíclico (AMPc), GMP cíclico (GMPc), trifosfato de inositol (IP3), diacilglicerol (DAG), quinasa MAP, o calcio. Son bien conocidos algunos ensayos en la técnica para medir estos segundos mensajeros, por ejemplo, ensayos de AMPc, ensayos de IP3, el ensayo FLIPR, el ensayo del melanóforo, o el ensayo del indicador CRE. Además, se describen en el presente documento en los Ejemplos 12-17 ejemplos de ensayos de segundos mensajeros. En determinadas realizaciones, el segundo mensajero es AMPc. En otras realizaciones, dicho segundo mensajero es IP3. En realizaciones adicionales dicho segundo mensajero es calcio.

En una realización, dicha determinación es a través de la medida de la unión de GTPγS a la membrana que comprende dicho GPCR. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica y se ejemplifican en el presente documento en los Ejemplos 12 y 14. En determinadas realizaciones, dicho GTPγS está marcado con [<sup>35</sup>S].

En una realización, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista inverso de GPR41. En una realización, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un antagonista de GPR41. En una realización, dicho compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso de GPR41 con una CI50 de menos de 10 μM, de menos de 1 μM, de menos de 100 nM, o de menos de 10 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 μM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 1 μM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 100 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 nM.

En determinadas realizaciones, dicha CI50 se determinó utilizando un ensayo seleccionado entre el grupo que consiste en: se llevó a cabo el ensayo de IP3 utilizando células HEK293 transfectadas que expresaban el polipéptido GPR41 recombinante; y se llevó a cabo el ensayo del melanóforo utilizando melanóforos transfectados que expresaban el polipéptido GPR41 recombinante. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de menos de 10 μM, de menos de 1 μM, de menos de 100 nM, o de menos de 10 nM en dicho ensayo. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 de menos de 10 μM, de menos de 9 μM, de menos de 8 μM, de menos de 7 μM, de menos de 6 μM, de menos de 5 μM, de menos de 4 μM, de menos de 3 μM, de menos de 2 μM, de menos de 1 μM, de menos de 900 nM, de menos de 800 nM, de menos de 700 nM, de menos de 600 nM, de menos de 500 nM, de menos de 400 nM, de menos de 300 nM, de menos de 200 nM, de menos de 100 nM, de menos de 90 nM, de menos de 80 nM, de menos de 70 nM, de menos de 60 nM, de menos de 50 nM, de menos de 40 nM, de menos de 30 nM, de menos de 20 nM, de menos de 10 nM en dicho ensayo. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 μM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 1 μM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 100 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso con una CI50 en dicho ensayo de un valor seleccionado entre el intervalo de 1 nM a 10 nM. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia es selectivo para el GPCR.

En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia está oralmente biodisponible. En algunas realizaciones, dicha biodisponibilidad oral es al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, o al menos 45 % con respecto a la administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, dicha biodisponibilidad oral es al menos del 20 %, al menos 25 %, al menos

30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, o al menos 45 % con respecto a la administración intraperitoneal. En algunas realizaciones, dicho compuesto estabilizador de la glucemia oralmente biodisponible es capaz además de cruzar la barrera hematoencefálica.

5 Se describe además un procedimiento para preparar una composición que comprende identificar un compuesto estabilizador de la glucemia y a continuación premezclar dicho compuesto con un vehículo, donde dicho compuesto se puede identificar mediante el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. Por ejemplo, la invención  
10 proporciona un procedimiento para preparar una composición que comprende identificar un compuesto estabilizador de la glucemia y a continuación premezclar dicho compuesto con un vehículo, donde dicho compuesto se identifica mediante el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia.

15 Se describe también una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador  
20 de la glucemia.

Algunas realizaciones de la presente invención incluyen un procedimiento para producir una composición farmacéutica que comprende premezclar al menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de compuestos descritas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Se han descrito anteriormente formulaciones farmacéuticas, rutas de administración, y dosificaciones.

Se describe en el presente documento un procedimiento para tratar o evitar un trastorno relacionado con la insulina en un individuo que lo necesita, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del compuesto  
30 identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia. En algunos casos, dicho trastorno relacionado con la insulina es resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, o diabetes. En algunos casos, dicho trastorno relacionado con la insulina incluye una dolencia relacionada con una concentración  
35 elevada de glucosa en sangre, tal como aterosclerosis, enfermedad cardíaca, ictus, hipertensión, obesidad, síndrome X o enfermedad vascular periférica. En algunas realizaciones, dicho trastorno relacionado con la insulina es diabetes de Tipo II. El compuesto administrado puede comprender un agonista o antagonista inverso de GPR41.

El procedimiento puede comprender además administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un agente usado  
40 para el tratamiento de la diabetes, trastornos de lípidos en la sangre, u obesidad en combinación con una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia.  
45 Por ejemplo, el procedimiento comprende además administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un agente utilizado para el tratamiento de la diabetes, trastornos de lípidos en la sangre, u obesidad en combinación con una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene un agonista inverso de GPR41.

50 Preferentemente, el individuo es un mamífero y más preferentemente el individuo es un ser humano.

Aunque los compuestos descritos o identificados en el presente documento mediante los procedimientos de la invención pueden administrarse como el único agente farmacéutico activo que se ha descrito anteriormente en el presente documento, se pueden usar en combinación con uno o más agentes que incluyen, por ejemplo, agentes que se usan para el tratamiento de la diabetes, trastornos de lípidos en la sangre, u obesidad. Por ejemplo, se puede usar  
55 un compuesto tal como un agonista o antagonista inverso de GPR41 en combinación con uno o más agentes que pertenecen a la clase de fármacos conocidos como inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa inhibidores de la aldosa reductasa, biguanidas, tiazolidinodionas, meglitinidas, sulfonilureas, insulina, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, inhibidores de la síntesis del escualeno, compuestos fibratos, potenciadores del catabolismo de LDL, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), inhibidores de la lipasa, inhibidores de la liberación o recaptación de serotonina  
60 y/o noradrenalina.

Algunas realizaciones de la invención incluyen, una composición farmacéutica comprende un compuesto descrito en el presente documento o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en combinación con al menos un miembro  
65 seleccionado entre el grupo que consiste en un inhibidor de la  $\alpha$ -glucosidasa un inhibidor de la aldosa reductasa, una biguanida, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, un inhibidor de la síntesis de escualeno, un compuesto fibrato, un potenciador del catabolismo de LDL y un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina. En otra realización, el

inhibidor de la HMG-CoA reductasa se selecciona entre el grupo que consiste en prevastatina, simvastatina, lovastatina, atorvastatina, fluvastatin y lipitor.

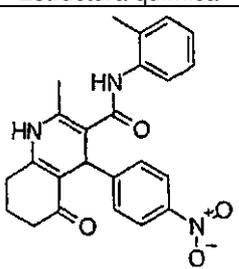
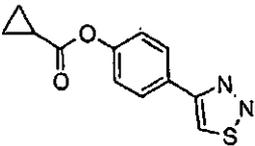
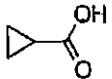
5 de acuerdo con la presente invención, la combinación se puede usar mezclando los respectivos componentes activos tanto juntos como de forma independiente con un vehículo, excipiente, aglutinante, diluyente, etc., farmacéuticamente aceptable, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y administrando la mezcla o mezclas tanto de forma oral como no oral como una composición farmacéutica. Cuando un compuesto o una mezcla de compuestos se administran como un tratamiento combinado o como profilaxis con otro compuesto activo, los agentes terapéuticos se pueden formular como composiciones farmacéuticas separadas administradas en el mismo momento o en momentos diferentes, o se pueden administrar los agentes terapéuticos como una única composición.

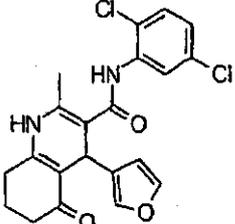
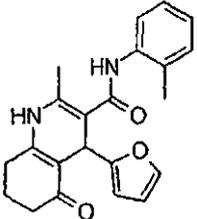
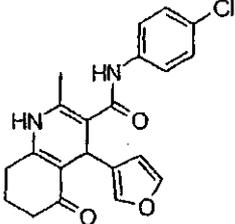
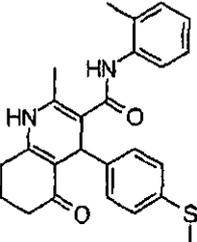
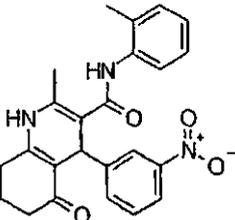
15 Se describe también en el presente documento un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia, para uso como compuesto estabilizador de la glucemia.

20 Se describe además un procedimiento para la fabricación de un medicamento que comprende una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en el compuesto estabilizador de la glucemia identificado de acuerdo con el procedimiento de: a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y b) determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia, para su uso en el tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina tal como resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa o diabetes.

25 Se describe también un procedimiento para aumentar la función de GPR41, que comprende poner en contacto GPR41 con una cantidad eficaz de un agonista de GPR41, por ejemplo, un compuesto seleccionado entre el grupo seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido  
 30 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, ácido 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster ciclopropanocarboxílico, ácido ciclopropanocarboxílico; o-tolilamida del ácido  
 4-furan-3-il-2-methyl-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 35 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-clorofenil)-amida del ácido  
 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y la o-tolilamida del ácido  
 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En la Tabla 1 a continuación se muestran las estructuras de estos compuestos. Se contempla también un procedimiento para aumentar la función de GPR41 en una célula, que comprende poner en contacto una célula que expresa GPR41 con una cantidad eficaz de un agonista de GPR41. La célula puede ser, por ejemplo, en un individuo o la célula puede ser una célula aislada.

Tabla 1:

Comp. Nº	Estructura química	Nombre químico
1		o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico
2		4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster del ácido ciclopropanocarboxílico
3		Ácido ciclopropanocarboxílico

4		<p style="text-align: center;">o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico</p>
5		<p style="text-align: center;">(2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico</p>
6		<p style="text-align: center;">o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico</p>
7		<p style="text-align: center;">(4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico</p>
8		<p style="text-align: center;">o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico</p>
9		<p style="text-align: center;">o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico</p>

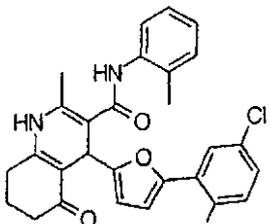
Se describe además un procedimiento para disminuir la función de GPR41, que comprende poner en contacto GPR41 con una cantidad eficaz de un agonista o antagonista inverso de GPR41, por ejemplo, un compuesto seleccionado entre el grupo seleccionado entre el grupo que consiste en o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y la o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En la Tabla 2 a continuación se muestran las estructuras de estos compuestos. Se contempla también un procedimiento para disminuir la función de GPR41 en una célula, que comprende poner en

contacto una célula que expresa GPR41 con una cantidad eficaz de un agonista o antagonista inverso de GPR41. La célula puede ser, por ejemplo, en un individuo o la célula puede ser una célula aislada.

5

Tabla 2

Comp. N°	Estructura química	Nombre químico
10		o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometilfenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico
11		o-tolilamida del ácido 4-(5-Bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico
12		(2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico
13		o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico
14		o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxifenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico

15		<p style="text-align: center;">o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico</p>
----	-----------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Se describe en el presente documento un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno relacionado con la insulina, que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad eficaz de un modulador de GPR41 en un caso, dicho trastorno relacionado con la insulina es hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, o el envejecimiento. Preferentemente, dicho modulador es un agonista. Más preferentemente dicho agonista comprende un compuesto seleccionado entre el grupo seleccionado grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster del ácido ciclopropanocarboxílico, ácido ciclopropanocarboxílico; o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El trastorno relacionado con la insulina puede ser resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, o diabetes, y dicho modulador es un agonista o antagonista inverso. En una realización, dicho trastorno relacionado con la insulina es diabetes de Tipo II. En algunos casos, dicho trastorno relacionado con la insulina incluye una dolencia relacionada con una concentración elevada de glucosa en sangre, tal como aterosclerosis, enfermedad cardiaca, ictus, hipertensión, obesidad, síndrome X o enfermedad vascular periférica. Preferentemente, dicho agonista o antagonista inverso comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y 4-[5-(2,5-Dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El procedimiento puede comprender además administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un agente usado para el tratamiento de la diabetes, trastornos de lípidos en la sangre, u obesidad en combinación con una cantidad eficaz de un agonista o antagonista inverso de GPR41. Preferentemente, el individuo es un mamífero y más preferentemente el individuo es un ser humano.

Se describe además un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno tratable o evitable aumentando la función de GPR41, que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado entre el grupo seleccionado entre el grupo que consiste en o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, ácido 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster ciclopropanocarboxílico, ácido ciclopropanocarboxílico; o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-clorofenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y la o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En una realización, dicho trastorno es un trastorno relacionado con la insulina. En algunas realizaciones, dicho trastorno relacionado con la insulina es hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, o el envejecimiento.

La invención proporciona también un compuesto para tratar o prevenir un trastorno tratable o evitable disminuyendo la función de GPR41, que comprende administrar a un individuo que lo necesita una cantidad eficaz de o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido

2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En una realización, dicho trastorno es un trastorno relacionado con la insulina. En algunas realizaciones, dicho trastorno relacionado con la insulina es resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa, o diabetes. En una realización, dicho trastorno relacionado con la insulina es diabetes de tipo II. En algunas realizaciones, dicho trastorno relacionado con la insulina incluye una dolencia relacionada con una concentración elevada de glucosa en sangre, tal como aterosclerosis, enfermedad cardíaca, ictus, hipertensión, obesidad, síndrome X o enfermedad vascular periférica. En una realización, dicho procedimiento comprende además administrar a dicho individuo una cantidad eficaz de un agente usado para el tratamiento de la diabetes, trastornos de lípidos en la sangre, u obesidad en combinación con una cantidad eficaz de un agonista o antagonista inverso de GPR41. En una realización, el individuo es un mamífero y en otra realización de la invención el individuo es un ser humano.

La invención proporciona también un compuesto para aumentar los niveles de glucosa en sangre en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un agonista de GPR41, donde dicho agonista comprende un compuesto seleccionado entre el grupo seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitrofenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, ácido 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster ciclopropanocarboxílico, ácido ciclopropanocarboxílico; o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-clorofenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona también un compuesto para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un agonista o antagonista inverso de GPR41, donde dicho agonista o antagonista inverso comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y la o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Además, la invención proporciona un compuesto para disminuir la secreción de insulina en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un agonista de GPR41, donde dicho agonista comprende un compuesto seleccionado entre el grupo seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (4-clorofenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona además un compuesto para aumentar la secreción de insulina en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un agonista o antagonista inverso de GPR41, en el que el agonista o antagonista inverso de GPR41 puede comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-Bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona además un compuesto para aumentar la secreción de insulina de una manera dependiente de glucosa en un individuo que lo necesita, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un agonista o antagonista inverso de GPR41, en el que el agonista o antagonista inverso de GPR41 puede comprender un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en: o-tolilamida del ácido

2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 4-(5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El término "de una manera dependiente de glucosa" significa que la secreción de insulina está aumentada en respuesta a una elevada concentración de glucosa, pero no en respuesta a una baja concentración de glucosa. Algunos fármacos que se han usado para el tratamiento de la diabetes aumentan la secreción de insulina con respecto al nivel de glucosa en sangre. Esto no es deseable debido a que estos fármacos aumentan la secreción de insulina incluso en condiciones de hipoglucemia. La insulina aumentada exacerba a continuación adicionalmente la hipoglucemia, algunas veces hasta niveles críticos. Una elevada concentración de glucosa significa que la concentración de glucosa en la sangre o alrededor de las células es mayor que un intervalo normal de concentración de glucosa, por ejemplo, 16,8 mmol/l es una concentración de glucosa. Una baja concentración de glucosa significa que la concentración de glucosa en la sangre o alrededor de las células es menor que un intervalo normal de concentración de glucosa, por ejemplo, 3,3 mmol/l o menos.

El mecanismo celular de acción de la secreción de insulina es el aumento en el AMPc intracelular. Tal como se describe en el presente documento, GPR41 se expresa en las células de los islotes beta pancreáticos. GPR41 se acopla a Gi de tal manera que un agonista o antagonista inverso de GPR41 dará como resultado un aumento en el AMPc en las células de los islotes beta pancreáticos y un aumento en la secreción de insulina.

Un objetivo de la invención se refiere a un procedimiento de (a) llevar a cabo un procedimiento de la invención para identificar un compuesto estabilizador de la glucemia y (b) opcionalmente, determinar la estructura del compuesto, y (c) proporcionar el compuesto o el nombre de la estructura del compuesto.

Otro objeto de la presente invención se refiere a compuestos radiomarcados de la Tabla 1 o la Tabla 2 que serían útiles no solo en la formación de imagen radiológica sino también en ensayos, *in vitro* e *in vivo*, para localizar y cuantificar GPR41 en muestras de tejido, incluyendo tejido humano, y para identificar ligandos de GPR41 mediante la inhibición de la unión de un compuesto radiomarcado. Es un objetivo adicional de la presente invención desarrollar ensayos novedosos de GPR41 de los que comprenden dichos compuestos radiomarcados.

Los radionucleidos adecuados que se pueden incorporar a compuestos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a  $^3\text{H}$  (escrito también como T),  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{31}\text{S}$  y  $^{77}\text{Br}$ . El radionucleido que se incorpora a los presentes compuestos radiomarcados dependerá de la aplicación específica de este compuesto radiomarcado. Por tanto, para el marcado de GPR41 *in vitro* y los ensayos de competición, los compuestos que incorporan  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{82}\text{Br}$  serán generalmente los más útiles. Para las aplicaciones de formación de imágenes radiológicas  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$  o  $^{77}\text{Br}$  serán generalmente los más útiles.

Se entiende que un compuesto "radiomarcado" o "marcado" es un compuesto de la Tabla 1 o Tabla 2 que ha incorporado al menos un radionucleido; en algunas realizaciones el radionucleido se selecciona entre el grupo que consiste  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{82}\text{Br}$ ; en algunas realizaciones el radionucleido  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$ . Más aún, debe entenderse que todos los átomos representados en los compuestos de la invención pueden ser tanto los isótopos que se producen más comúnmente de dichos átomos o los isótopos no radioactivos o radioisótopos más escasos.

Los procedimientos sintéticos para incorporar radioisótopos a compuestos orgánicos que incluyen aquellos aplicables a aquellos compuestos de la invención son bien conocidos en la técnica e incluyen incorporar niveles de actividad de tritio en las moléculas diana: **A.** Reducción catalítica con gas tritio -este procedimiento da como resultado normalmente productos de elevada actividad específica y requiere precursores halogenados o insaturados. **B.** Reducción con borohidruro de sodio [ $^3\text{H}$ ] -este procedimiento es bastante barato y requiere precursores que contengan grupos funcionales reducibles tales como aldehídos, cetonas, lactonas, ésteres, y similares. **C.** Reducción con hidruro de aluminio litio [ $^3\text{H}$ ] -Este procedimiento ofrece productos en casi todas las actividades específicas teóricas. Esto requiere también precursores que contienen grupos funcionales reducibles tales como aldehídos, cetonas, lactonas, ésteres, y similares. **D.** Marcado mediante exposición a gas tritio -este procedimiento implica exponer precursores que contienen protones intercambiables a gas tritio en presencia de un catalizador adecuado. **E.** N-metilación utilizando yoduro de metilo [ $^3\text{H}$ ] -este procedimiento se emplea usualmente para preparar productos de O-metilo o N-metilo ( $^3\text{H}$ ) tratando los precursores adecuados con una actividad muy específica de yoduro de metilo ( $^3\text{H}$ ). Este procedimiento permite en general una elevada actividad específica, tal como aproximadamente 80-87 Ci/mmol.

Los procedimientos sintéticos para incorporar niveles de actividad de  $^{125}\text{I}$  a moléculas diana incluyen: **A.** Reacciones de Sandmeyer y similares -Este procedimiento transforma una aril o heteroaril amina en una sal de diazonio, tal como una sal de tetrafluoroborato, y posteriormente a un compuesto marcado con  $^{125}\text{I}$  usando  $\text{Na}^{125}\text{I}$ . Zhu, D.-G. y colaboradores notificaron un procedimiento representado en J. Org. Chem. 67:943-948 (2002)). **B.** Orto  $^{125}\text{I}$  yodación de fenoles -este procedimiento permite la incorporación de  $^{125}\text{I}$  en la posición orto de un fenol tal como notificó Collier, T. L.

y colaboradores en J. Labelled Compd Radiopharm., 42: S264-S266 (1999)). C. Intercambio de bromuro de arilo y heteroarilo con  $^{125}\text{I}$  -Este procedimiento es generalmente un procedimiento en dos etapas. La primera etapa es la conversión del bromuro de arilo o heteroarilo en el correspondiente intermedio de trialquilestaño utilizando por ejemplo, una reacción catalizada por Pd [es decir, Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>] o mediante un aril o heteroaril litio, en presencia de un haluro de trialquilestaño o hexaalquildiestaño [por ejemplo, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SnSn(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]. Bas, M. D y colaboradores notificaron un procedimiento representado en J. Labelled Compd Radiopharm., 44:S280-S282 (2001)).

Se puede usar un compuesto radiomarcado GPR41 de la Tabla 1 o la Tabla 2 en un ensayo de selección para identificar/evaluar los compuestos. En términos generales, se puede evaluar un compuesto sintetizado o identificado recientemente (es decir, compuesto candidato) para su capacidad de reducir la unión del compuesto "radiomarcado de la Tabla 1 o la Tabla 2" con el receptor de GPR41. Por consiguiente, la capacidad de un compuesto candidato de competir con el compuesto "radiomarcado de la Tabla 1 o la Tabla 2" para la unión del receptor de GPR41 se correlaciona directamente con su afinidad de unión.

Un aspecto de la presente invención pertenece a un compuesto estabilizador de la glucemia, mencionado anteriormente, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal para terapia.

Otro aspecto de la presente invención pertenece al compuesto estabilizador de la glucemia mencionado anteriormente, para uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina, del cuerpo humano o animal mediante tratamiento.

Otro aspecto de la presente invención pertenece a un compuesto estabilizador de la glucemia, tal como se ha mencionado anteriormente, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina del cuerpo humano o animal mediante tratamiento.

Los solicitantes se reservan el derecho de excluir uno cualquiera o más compuestos candidatos de cualquiera de las realizaciones de la invención. Los solicitantes se reservan también el derecho de excluir uno o más moduladores de cualquiera de las realizaciones de la invención. Los solicitantes se reservan adicionalmente el derecho de excluir cualquier trastorno relacionado con la insulina, o cualquier dolencia relacionada con una concentración elevada de glucosa en sangre a partir de cualquiera de las realizaciones de la invención.

Otros usos de los receptores y procedimientos descritos serán evidentes para los expertos en la técnica basándose en, entre otros, una revisión de este documento de patente.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar la invención y no se pretende que sean inclusivos de cualquier manera:

## EJEMPLOS

Se proporcionan los ejemplos para definir adicionalmente la invención sin, sin embargo, limitar la invención a lo específico de estos ejemplos.

### Ejemplo 1

#### **Análisis de inmunotransferencia de la expresión de GPR41 humana en tejidos humanos de adulto y fetal**

En este ejemplo, se determinó el nivel de expresión de la GPR41 humana en varios adultos y tejidos fetales humanos usando una inmunotransferencia.

Una inmunotransferencia que contiene ARNm de tejido adulto y fetal humano se adquirió de Clontech (BD Bioscience Palo Alto, CA). El orden de los ARNm tisulares de la transferencia es:: A1=cerebro total, A2=amígdala, A3=núcleo caudado, A4=cerebelo, A5=corteza cerebral, A6=corteza frontal, A7=hipocampo, A8=médula oblonga, B1=corteza occipital, B2=putamen, B3=sustancia negra, B4=corteza temporal, B5=tálamo, B6=núcleo accumbens, B7=médula espinal, C1= corazón, C2=aorta, C3=músculo esquelético, C4=colon, C5=vejiga, C6=útero, C7=próstata, C8=estómago, D1=testículo, D2=ovario, D3=páncreas, D4=glándula pituitaria, D5=glándula adrenal, D6=tiroides, D7=glándula salival, D8=glándula mamaria, E1=riñón, E2=hígado, E3=intestino delgado, E4=bazo, E5=timo, E6=leucocitos periféricos, E7=ganglios linfáticos, E8=médula ósea, F1=apéndice, F2=pulmón, F3=tráquea, F4=placenta, G1=cerebro de feto, G2=corazón de feto; G3=riñón de feto, G4=hígado de feto, G5=bazo de feto, G6=timo de feto, G7=pulmón de feto. Se hibridó la transferencia con la sonda GPR41 utilizando "Express Hyb" de Clontech en las condiciones recomendadas por Clontech. Véase la Figura 1.

### Ejemplo 2

#### **Análisis de RT-PCR y Taqman de la expresión de GPR41 en tejidos y células de ratón**

En este ejemplo, se determinó el nivel de expresión de GPR41 de ratón en algunos tipos de células y tejidos de ratón

usando un ensayo de RT-PCR y el ensayo Taqman de la PCR cuantitativa. Tal como se muestra en la Figura 2, se observó el nivel de expresión más elevado de GPR41 de ratón en el páncreas y las células de los islotes pancreáticos. Además, tal como se muestra en la Figura 2, GPR41 se reguló en exceso en los islotes pancreáticos de ratones db/db en comparación con ratones silvestres y ob/ob.

Se evaluó la expresión de GPR41 en tejidos de ratón mediante la RT-PCR usando los siguientes cebadores: 5'-ATG GGG ACA AGC TTC TTT CT-3' (SEC ID N°:3) y 5'-CTA GCT CGG ACA CTC CTT GG-3' (SEC ID N°:4). Se sintetizaron ADNc de tejidos de ratón a partir de ARN poli A comercial adquirido de Clontech utilizando el kit de síntesis del ADNc BioRad iScript. Se prepararon ADNc de líneas de células de ratón que incluían líneas de células beta pancreáticas productoras de insulina (NIT-1,  $\beta$ TC-6, y MIN-6) procedentes de ARN total aislado utilizando Triazol (Invitrogen).

Para el experimento de la PCR cuantitativa mediante Taqman que se muestra en el panel inferior de la Figura 2, se preparó una supermezcla 1X TaqMan en un tubo de polipropileno de 5 ml. Se añadieron cebadores directos e inversos para dar una concentración final de 300 nM; Se añadió una cantidad adecuada de sonda para dar una concentración final de 200 nM. El volumen total por pocillo fue de 20  $\mu$ l. 2  $\mu$ l eran de ADNc, mientras que los otros 18  $\mu$ l eran de supermezcla y agua exenta de nucleasa.

Los cebadores se ordenaron a partir de Prologo y se sintetizó la sonda mediante ABI. Las secuencias para los cebadores y la sonda fueron:

Cebador 5' GCCGGCGCAAGAGGATA (SEC ID N°:5)  
 Cebador 3' CCGAAGCAGACGAAGAAGATG 3' (SEC ID N°:6)  
 Sonda: TTCTTGCAGCCCACTG-MGBNFQ 3' (SEC ID N°:7)

Se muestran las condiciones del termociclador usadas en el siguiente diagrama (Tabla 3).

Tiempos y Temperaturas			
Etapas iniciales		Cada uno de 40 ciclos	
		Fusión	Hibridación/Extensión
MANTENER	MANTENER	CICLO	
2 min*	10 min**	15 s	1 min
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
*Se requieren los 2 min de hdd a 50 °C para una Am-óptima actividad de pErasa UNG			
**Se requieren los 10 min de hdd a 95 °C para AmpITaq Activación de la ADN Polimerasa Gold			

**Ejemplo 3**

**Ensayo de protección de la ARNasa de GPR41 de ratón**

En este ejemplo, se determinó el nivel de expresión de GPR41 de ratón en varios tipos de células y tejidos de ratón utilizando un ensayo de protección de la ARNasa. Tal como se muestra en la Figura 3, se observó la expresión del nivel más elevado de GPR41 de ratón en islotes pancreáticos y líneas de células de islotes pancreáticos que incluían MIN6, una línea celular de insulinoma de ratón, NIT-1, y  $\beta$ TC-6.

Se obtuvieron comercialmente ARN de tejido de ratón (Clontech). Las células (tal como se indica en las figuras) usadas para el aislamiento del ARN son líneas de células pancreáticas proporcionadas por ATCC (NIT-1: ATCC CRL-2055, y  $\beta$ TC-6: ATCC CRL-11506) u obtenidas de Jeffrey Pessin en SUNY en Stony Brook (MIN-6). Se aislaron los ARN utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante

Brevemente, Se clonó un fragmento de 257 pb de GPR41 de ratón en el vector de clonación pCR II TOPO (Invitrogen). Se linealizó el plásmido con Xho1 y se purificó el gel usando el Kit Sephaglass Bandprep (Amersham). Tras la purificación en gel del fragmento, se preparó una ribosonda mediante la transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa SP6 (Ambion Maxiscript Kit). Se purificó la sonda mediante electroforesis en gel de acrilamida y se hibridó con 20 mg de ARN total a 47 °C durante la noche. Se digirieron los híbridos con ARNasa el día siguiente y se hicieron avanzar sobre un gel de acrilamida al 5 % para detectar los resultados (Ambion, kit RPA III). En todos los procedimientos para la transcripción *in vitro* y reacciones RPA se siguieron las instrucciones del fabricante.

Secuencia GPR41 de ratón para la sonda RPA:

5'-

GTGGGGCTGAGGGTTACACACAGAGGTGGCACCTTGGTGATGTCGA  
 CACTGGGTGAGGGACAGGAAACCAGGGAGGTAGGCAGGACCACCTGCAGGG  
 GAGAGCATGTGGAGCTATGGTGGTGGGGTGTAGGCAGTGTAGACAGCAATC  
 TTGCCTGATGGGTAAGAGTCTCCAGTGAGGGAACCCCAACTCTCAACACAT  
 TCCCTCTGTCTCATTAGCATCTGTGACCATGGGGACAAGCTTCTTTCTTGGC  
 AATT-3' (SEC. ID N°:8)

Cebadores de la PCR de GPR41 de ratón para la sonda RPA

- 5 5'-GTGGGGCTGAGGGTTACA-3' (SEC ID N°:9)  
 5'-AATTGCCAAGAAAGAAGC-3' (SEC ID N°:10)

#### Ejemplo 4

#### 10 Acoplamiento de GPR41 con G-alfa i

En este ejemplo, se determinó el acoplamiento de GPR41 con G-alfa i (G $\alpha$ i) usando una quimera Gq/Gi. Se midió la función de GPR41 utilizando un ensayo IP3 tal como se describe a continuación. Véase también la Figura 4.

#### 15 Ensayo IP3 de GPR41 expresado en células HEK 293 transfectadas con Gq/Gi

Se llevaron a cabo los ensayos de acumulación de IP3 intracelular utilizando células HEK293 transfectadas transitoriamente con plásmidos de expresión para GPR41 y la quimera Gq/Gi (véase el Ejemplo 13 para la estructura de la quimera Gq/Gi). Los ADN usados en la transfección para este ensayo fueron GPR41 y GPR41(k) clonado en el vector de expresión de mamífero pCMV y ADNc de quimeras Gq/Gi clonado en un vector de expresión pcDNA3.1(+)(Invitrogen). GPR41(k) es una mutación de un único aminoácido de GPR41 donde el aminoácido 224 está mutado en una lisina.

Se llevaron a cabo las transfecciones usando reactivo de transfección de Lipofectamina (Invitrogen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, El día 1 se sembraron en placa las células en placas de 96 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/placa. El día siguiente, se preparó una mezcla de ADN/Lipofectamina para cada placa como sigue: 1  $\mu$ l de ADN (40 ng de pCMV-GPR41) por 3 pocillos, o 2  $\mu$ l de ADN (20 ng de pCMV-GPR41 combinados con pcDNA-Gq/Gi) en 25  $\mu$ l de OPTI-MEM (Gibco) se mezclaron suavemente con 2  $\mu$ l de reactivo de Lipofectamina en 25  $\mu$ l de OPTI-MEM y la solución resultante se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 96  $\mu$ l de OPTI-MEM para dar un volumen final de 150  $\mu$ l. A continuación se lavaron las células una vez con 100  $\mu$ l/pocillo de PBS, y a continuación se añadió suavemente a la placa una mezcla de ADN-Lipofectamina (50  $\mu$ l/pocillo). A continuación se incubaron las células durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5%. Se añadió medio celular regular al reactivo de transfección. A continuación se incubaron las células a 37 °C/CO<sub>2</sub>/5 %, durante la noche.

El día 3, se retiró cuidadosamente el medio de crecimiento regular de los pocillos con 100  $\mu$ l de DMEM exento de suero/exento de inositol (Gibco) que contenía 0,4 uCi de [<sup>3</sup>H]-mio-inositol (Perkin-Elmer). Se incubaron las células durante la noche a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%. El día 4, [<sup>3</sup>H]-mio-inositol que contenía medio marcado se retiró y se substituyó con 100  $\mu$ l de DMEM exento de suero/exento de inositol que contenía 10  $\mu$ M de pargilina (Sigma) y 10 mM de cloruro de litio (Sigma). Se incubaron las células durante 1 hora a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5%. A continuación se retiró la solución cuidadosamente y se añadieron 160  $\mu$ l por pocillo de ácido fórmico 0,1 M frío en hielo a las células. Se lisaron las células incubando placas a -80 °C durante al menos 1 hora.

Se llevó a cabo la separación de IP3 de los lisados celulares utilizando la cromatografía sobre una resina de formiato de AG1-X8 (Bio-Rad). Se añadieron 400  $\mu$ l de una suspensión de resina de formiato (0,1 g de resina en 1 ml de agua) por cada pocillo de una placa con filtro Multiscreen (Millipore). Se drenó el agua de los pocillos y a continuación se lavó la resina con 200  $\mu$ l de agua usando una unidad de filtración Millipore. Las placas con células lisadas se descongelaron y los lisados se transfirieron en una placa con un filtro Multiscreen, que contenía una resina de formiato. Se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se drenaron los lisados de las placas con filtro con una unidad de filtración. Se lavaron las placas cuatro veces con agua (200  $\mu$ l/pocillo) y se drenaron vigorosamente. A continuación se añadió tampón de elución a la resina (180  $\mu$ l/pocillo) y se incubaron las placas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se drenaron los eluyentes en placas de recogida de 96 pocillos usando un manguito de vacío, se transfirieron a viales de centelleo que contenían 5ml de un cóctel de centelleo Optiphase HiSafe3 (Perkin-Elmer) y

se contaron en un Contador de Centelleo Wallac.

### Ejemplo 5

#### 5 **Acoplamiento de GPR41 con G-alfa 12/13**

En este ejemplo, Se determinó el acoplamiento de GPR41 con G-alfa 12/13 (G $\alpha$ 12/13) utilizando un ensayo del AMPc tal como se describe a continuación. Véase también la Figura 5.

10 Brevemente, Se llevó a cabo el experimento como sigue: Se transfectaron células 293 con el plásmido de expresión impulsado por CMV indicado en el eje x, junto con una de las siguientes quimeras: (a) "control": plásmido de expresión de CMV progenitor, (b) "quimera Gs/G12": el plásmido CMV-Gs/G12 que codifica Gs humana en el que 11 aminoácidos del extremo C se cambiaron por aquellos correspondientes el extremo C de G12, o (c) "quimera Gs/G13": el plásmido CMV-Gs/G13 que codifica Gs humana en que los 11 aminoácidos del extremo C se cambiaron por aquellos correspondientes al extremo C de G13. 24 horas después, se analizaron las células para determinar los niveles de AMPc usando un kit "Flash Plate" tal como se describe a continuación.

20 Un kit de la adenilil ciclasa Flash Plate<sup>TM</sup> (New England Nuclear; N° de Cat. SMP004A) diseñado para los ensayos basados en células se modificó para el uso con membranas plasmáticas brutas. Los pocillos Flash Plate contenían un revestimiento de centelleo que contiene también un anticuerpo específico que reconoce el AMPc. Se cuantificó el AMPc generado en los pocillos mediante una competición directa por la unión del trazador del AMPc radioactivo con el anticuerpo de AMPc. Los siguiente sirve como un breve protocolo para la medida de los cambio en los niveles de AMPc en células completas que expresan GPR41. Veinticuatro horas después de la transfección transitoria

25 Las células transfectadas se recogieron aproximadamente veinticuatro horas después de la transfección transitoria Se eliminaron cuidadosamente los medios mediante aspiración y se descartaron. Se añadieron cuidadosamente 5 ml de tampón de disociación celular a cada placa. Se eliminaron mediante pipeteado las células de la placa y la suspensión celular se recogió en un tubo cónico de centrifuga de 50 ml. A continuación se centrifugaron las células a temperatura ambiente a 1.100 rpm durante 5 minutos. El aglomerado celular se volvió a suspender cuidadosamente en un volumen adecuado de Tampón de Ensayo que consistía en un vol 1/2 de PBS y un vol 1/2 de tampón de estimulación (aproximadamente 3 ml/placa). A continuación se contaron las células usando un hemocitómetro y se añadió un tampón de ensayo adicional para dar el número adecuado de células (con un volumen final de 50  $\mu$ l/pocillo).

35 Se prepararon AMPc normalizados y Tampón de Detección (que comprende 1  $\mu$ Ci de AMPc trazador [<sup>125</sup>I] (50  $\mu$ l) a 11 ml de Tampón de Detección) y se mantuvieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se inició el ensayo mediante la adición de 50 $\mu$ l de AMPc normalizados a los pocillos adecuados seguido por la adición de 50  $\mu$ l de PBS a los pocillos H11 y H12 de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 50 ml de tampón de estimulación a los pocillos normalizados. Se añadieron las células a los pocillos adecuados. Se diluyó forskolina con tampón de ensayo en una solución madre 2x, a continuación se añadió a las células a 50  $\mu$ l/pocillo y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. 100  $\mu$ l de mezcla de detección que contenían AMPc trazador se añadieron a continuación a los pocillos. A continuación se incubaron las placas durante 2 horas más seguido por un recuento en un contador de centelleo MicroBeta de Wallac. A continuación se extrapolaron los valores de AMPc/pocillo a partir de una curva de AMPc normalizada que contenía cada placa de ensayo

### 45 **Ejemplo 6**

#### **Identificación de los moduladores de GPR41**

50 En este ejemplo, Se identificaron los agonistas de GPR41 utilizando un protocolo de selección en melanóforos de Xenopus.

#### Tecnología del melanóforo

55 Los melanóforos son células de la piel que se encuentran en vertebrados inferiores. Contienen orgánulos pigmentados denominados melanosomas. Los melanóforos son capaces de redistribuir estos melanosomas a lo largo de una red de microtúbulos tras la activación del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) El resultado de este movimiento del pigmento es la aparente iluminación u oscurecimiento de las células. En los melanóforos, los niveles disminuidos de AMPc intracelular que resultan de la activación del receptor acoplado a Gi hacen que los melanosomas migren al centro de la célula, dando como resultado una drástica iluminación en el color. Si a continuación aumentan los niveles del AMPc, tras la activación de un receptor acoplado a Gs, los melanosomas se vuelven a dispersar y las células parecen oscurecerse de nuevo. Los niveles aumentados de diacilglicerol que resultan de la activación de los receptores acoplados a Gq pueden inducir también esta redistribución. Además, la tecnología es también adecuada para el estudio de determinadas tirosina quinasas receptoras. La respuesta de los melanóforos tiene lugar unos minutos después de la activación del receptor y da como resultado un cambio de color sencillo y sólido. La respuesta puede detectarse fácilmente utilizando un lector de microplacas a una absorbancia convencional o un sistema sencillo

de formación de imágenes de vídeo. A diferencia de otras células de la piel, los melanóforos derivan de la cresta neural y parecen expresar un complemento completo de las proteínas de señalización. En particular, las células expresan una gama extremadamente amplia de proteínas G y son de esta manera capaces de expresar funcionalmente casi todos los GPCR.

Los melanóforos se pueden utilizar para identificar compuestos, incluyendo ligandos naturales, que se unen a y/o activan los GPCR. Se puede llevar a cabo este procedimiento introduciendo células de ensayo de una línea de células pigmentada capaces de dispersar o agregar su pigmento en respuesta a un estímulo específico y de expresar un clon exógeno que codifica el GPCR. Se puede configurar un estado inicial de disposición del pigmento utilizando por ejemplo, melatonina, MSH o luz. A continuación se ponen en contacto las células de ensayo con compuestos químicos, y se determina si la disposición del pigmento en las células cambió desde el estado inicial de disposición del pigmento. La dispersión de células pigmentadas debida al compuesto candidato, incluye, pero no se limita a un ligando, el acoplamiento al GPCR aparecerá oscuro en la placa petri, mientras que la agregación de pigmento aparecerá iluminada.

Se siguieron los materiales y los procedimientos de acuerdo con la divulgación de la patente de los Estados Unidos número 5.462.856 y la patente de los Estados Unidos número 6.051.386. Estas divulgaciones de patentes se incorporan por la presente por referencia en su totalidad.

Se transfectaron los melanóforos mediante electroporación con un plásmido que contenía la secuencia de codificación de GPR41 humana. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos. 48 horas después de la transfección, la mitad de las células de cada placa se trató con 10 nM de melatonina. La melatonina activa un receptor acoplado a Gi endógeno en los melanóforos y da lugar a que se agreguen a su pigmento. La mitad restante de las células se transfirieron a un medio exento de suero 0,7X L-15 (Gibco). Después una hora, las células en medio exento de suero permanecieron en un estado disperso en pigmento mientras que las células tratadas con melatonina estaban en un estado agregado a un pigmento. En este momento, las células se trataron con diferentes compuestos de una biblioteca de compuestos patentados que contenía 140.000-150.000 compuestos orgánicos de molécula pequeña. Si se une GPR41 al compuesto, podría esperarse que los melanóforos experimenten un cambio de color en respuesta al compuesto. Debido a que el receptor puede acoplarse a Gi, las células dispersas en pigmento experimentan una agregación de pigmento dependiente de la dosis.

## Ejemplo 7

### Eficacia de los agonistas de GPR41 en células transfectadas simultáneamente con Gq/Gi

En este ejemplo, la eficacia de los agonistas de GPR41 seleccionados o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitrofenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico (CPD1 en la Figura 6) y 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster del ácido ciclopropanocarboxílico (CPD2 en la Figura 5) se ensayó en células HEK 293 transfectadas simultáneamente con Galfa Gq/Gi química.

Se llevaron a cabo las transfecciones usando reactivo de transfección de Lipofectamina (Invitrogen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, El día 1 se sembraron en placas las células en placas de 96 pocillos a una densidad de  $4 \times 10^5$  células/placa El día siguiente, se preparó una mezcla de ADN/Lipofectamina para cada placa como sigue: 2,5  $\mu$ l de ADN (250 ng de pCMV-GPR41 o vector pCMV blanco) por 8 pocillos y 2,5  $\mu$ l de ADN (250 ng de pcDNA 3.1-Gq/Gi) en 200  $\mu$ l de DME (Gibco) se mezclaron suavemente con 2,5  $\mu$ l de reactivo de Lipofectamina en 200  $\mu$ l de DME y la solución resultante se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó mediante aspiración el medio de crecimiento de las células y se añadieron 55  $\mu$ l/pocillo de DME. A continuación se añadió suavemente una mezcla de ADN-Lipofectamina a la placa (45  $\mu$ l/pocillo). A continuación se incubaron las células durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5 %. Se añadió medio de crecimiento regular al reactivo de transfección. A continuación se incubaron las células a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche.

El día 3, se retiró cuidadosamente el medio de crecimiento regular de la células y se sustituyó con 100  $\mu$ l de DMEM exento de suero / exento de inositol (Gibco) que contenía 0,4  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-mio-inositol (Perkin-Elmer). Se incubaron las células durante la noche a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. El día 4, se retiró el medio de marcado que contenía [<sup>3</sup>H]-mio-inositol y se sustituyó con 100  $\mu$ l de DMEM exento de suero/exento de inositol que contenía 10  $\mu$ M de pargilina (Sigma) y 10 mM de cloruro de litio (Sigma) con/sin compuesto. Se incubaron las células durante 3 horas a 37 °C /CO<sub>2</sub> al 5 %. A continuación se retiró la solución cuidadosamente y se añadieron 160  $\mu$ l por pocillo de ácido fórmico 0,1 M frío en hielo a las células. Se lisaron las células incubando placas a -80 °C durante al menos 1 hora.

Se llevó a cabo la separación de IP3 de los lisados celulares utilizando la cromatografía sobre una resina de formiato de AG1-X8 (Bio-Rad). Se añadieron 400  $\mu$ l de una suspensión de resina de formiato (0,1 g de resina en 1ml de agua) por cada pocillo de una placa con filtro Multiscreen (Millipore). Se drenó el agua de los pocillos y a continuación se lavó la resina con 200  $\mu$ l de agua usando una unidad de filtración Millipore. Las placas con células lisadas se descongelaron y los lisados se transfirieron en una placa con un filtro Multiscreen, que contenía una resina de formiato. Se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se drenaron los lisados de las placas con filtro con una unidad de filtración. Se lavaron las placas cuatro veces (200  $\mu$ l/pocillo) y se drenaron vigorosamente. A

continuación se añadió tampón de elución a la resina (180µl/pocillo) y se incubaron las placas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se drenaron los eluyentes en placas de recogida de 96 pocillos usando un manguito de vacío, se transfirieron 60 µl a una placa de 96 pocillos GF/C Whatman Unifilter (Perkin Elmer 1450-525) y se añadieron 50 µl de Optima Gold (Perkin Elmer). Se llevó a cabo el recuento en un Contador de Centelleo Wallac.

5

### Ejemplo 8

#### Un agonista de GPR41 inhibe la secreción de insulina en células MIN6 de insulinoma

10 En este ejemplo, se evaluó un agonista de GPR41, ácido ciclopropanocarboxílico (CPC) para su efecto sobre la secreción de insulina en una línea celular de insulinoma. Véase la Figura 7.

15 Línea de insulinoma de ratón, MIN6, se sembraron placas en placas de cultivo multipocillo y se cultivaron 2 días en Medio Esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de feto bovino al 15 %. Se enjuagaron las células y se les suministró tampón bicarbonato de Krebs-Ringer con un bajo contenido de glucosa (10 mg/dl) durante algunas horas antes de un estímulo de 30 minutos con 300 mg/dl de glucosa y los compuestos de interés: péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) y ácido ciclopropanocarboxílico (CPC). GLP-1, amida 7-36, un inhibidor conocido de la secreción de insulina, se adquirió de Sigma y se usó a una concentración 25 nM y se adquirió CPC de Aldrich y se usó a 5 µM o 1 µM. Se ensayaron pocillos control solo con glucosa (10 mg/dl y 300 mg/dl) para comparación. Los sobrenadantes procedentes del estímulo con glucosa se cosecharon y congelaron. Se evaluaron mediante ELISA (Crystal Chem, Inc.) para la insulina.

20

### Ejemplo 9

#### Test oral de tolerancia a la glucosa

25 Se puede ensayar un **modulador de GPR41** tal como un agonista, antagonista o agonista inverso para su efecto sobre glucosa plasmática después que se ensaya la administración oral de glucosa.

30 Por ejemplo, ratones macho C57bl/6 con una edad de 67 se pueden someter a ayuno durante 18 horas y agruparse aleatoriamente para recibir un modulador de GPR41 a las dosis seleccionadas, o vehículo (PET, que contiene 80 % de PEG, 10 % de Tween80, y 10 % de Etanol): El modulador de GPR41 se administra por vía oral mediante una aguja de sonda nasogástrica (por vía oral, volumen a 100 µl). Treinta minutos después de la administración del modulador de GPR41 o el vehículo, se administró a los ratones por vía oral con dextrosa a una dosis de 3 g/kg. Se determinaron los niveles de glucosa en sangre en diversos puntos temporales usando un Glucómetro Elite XL (Bayer).

35

40 Se puede ensayar también la tolerancia a la glucosa usando la administración de glucosa i.p. Por ejemplo, se trataron ratones C57Bl/6 macho de 68 días de edad con un modulador de GPR41 a 100 mg/kg o con un vehículo PET tras 18 horas de ayuno. Treinta minutos después de la administración del modulador de GPR41 o el vehículo, se administró a los ratones por vía i.p. con dextrosa a una dosis de 2 g/kg. Se determinaron los niveles de glucosa en sangre y se seleccionaron los puntos temporales usando el Glucómetro Elite XL (Bayer).

40

### Ejemplo 10

#### El agonista de GPR41 invierte el efecto beneficioso del compuesto que disminuye la tolerancia a la glucosa en el test oral (oGTT)

50 Un compuesto que tiene un efecto de disminución de la glucemia en la oGTT, (2-fluoro-4-metanosulfonil-fenil)-{6-[4-(3-isopropil-[1,2,4]oxadiazol-5-yl)-piperidin-1-il]-5-nitro-pirimidin-4-il}-amina, que se denomina Compuesto B111 en el documento WO 2004/065380 A1 presentado el 14 de enero de 2004, se utilizó solo o junto con el Compuesto 4 agonista de GPR41, descrito en el presente documento. Tal como se muestra en la Figura 8, el agonista de GPR41 revirtió el efecto de disminución de la glucemia del Compuesto B111, produciendo un aumento en la glucosa plasmática. Estos resultados indican que un antagonista o agonista inverso de GPR41 puede tener un efecto de disminución de la glucemia.

55

60 Para la oGTT, ratones C57bl/6 macho se dejaron en ayunas durante aproximadamente 18 horas y se agruparon de manera aleatoria para recibir los compuestos indicados en la Figura 8 en las dosis indicadas, o vehículo (PET, que contiene 80 % de PEG, 10 % de Tween80, y 10 % de Etanol). El(los) compuesto(s) indicado(s) se administraron por vía oral mediante una aguja de sonda nasogástrica (por vía oral, volumen a 100 ml). Treinta minutos después de administrar el compuesto o compuestos o el vehículo, se administró a los ratones dextrosa por vía oral a una dosis de 3 g/kg. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron en varios puntos temporales mediante el Glucometer Elite XL (Bayer).

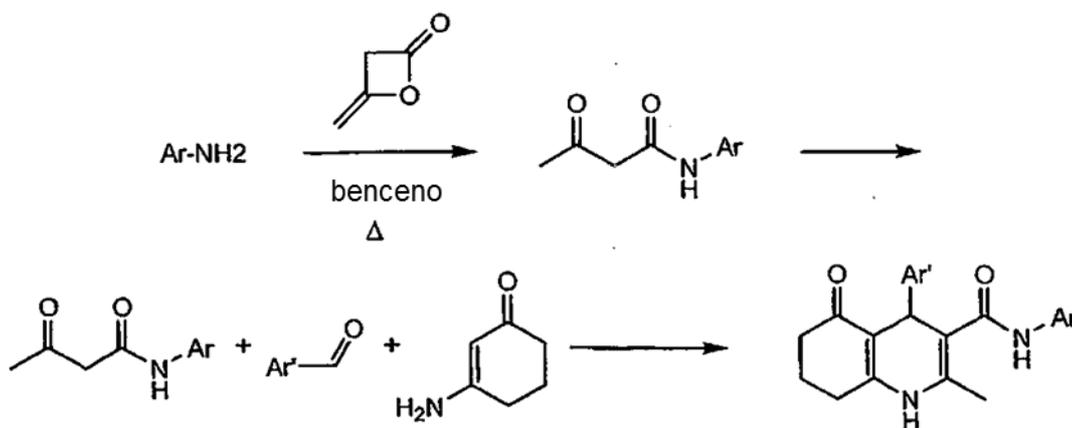
60

### Ejemplo 11

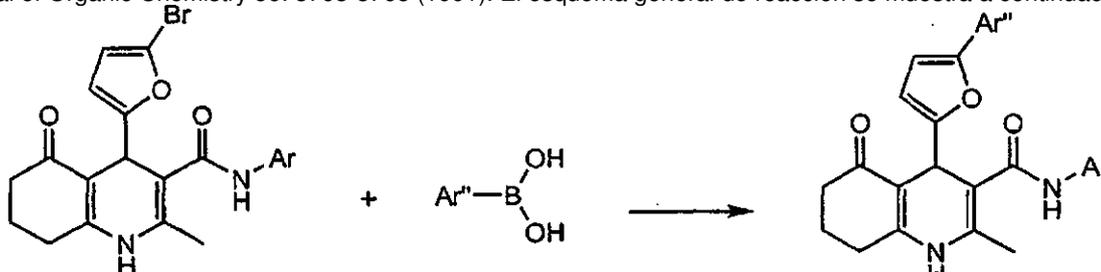
#### Síntesis de compuestos

65

Los compuestos descritos en el presente documento bien están comercialmente disponibles o bien se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, El Compuesto 1 [es decir, o-tolidamida del ácido 2-metil-4-(4-nitrofenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico se adquirió de ASINEX Ltd., 5 Gabrichevskogo St. Bldg 8, Moscú 123367, Rusia; El Compuesto 2 ( 4-[1,2,3]tiadiazol-4-il-fenil éster del ácido ciclopropanocarboxílico) se adquirió de Tripos, Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2319; y el Compuesto 3 (ácido ciclopropanocarboxílico) se adquirió de Sigma-Aldrich, 3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103. Los compuestos 4 a 9 se prepararon mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, la síntesis tricompone de dichidropiridina de Hantzsch tal como se describe esencialmente por Carroll, y col., Journal of Medicinal Chemistry 47: 3180-3192 (2004) (por ejemplo, calentando los componentes a temperatura de reflujo en isopropanol durante 18-36 horas). El esquema de reacción general para la preparación de determinados compuestos de la invención se muestra a continuación:



Algunos compuestos descritos en el presente documento también requieren una etapa de acoplamiento adicional, por ejemplo, una etapa de acoplamiento de Suzuki. La reacción de acoplamiento de Suzuki es bien conocida en la técnica, y se ha notificado varias condiciones y variaciones de la misma, por ejemplo, el procedimiento de Snieckus, y col., Journal of Organic Chemistry 56: 3763-3768 (1991). El esquema general de reacción se muestra a continuación:



### Ejemplo 12

#### Ensayos para determinar la activación de GPCR

Están disponibles diferentes soluciones para evaluar la activación de los GPCR humanos. Los siguientes son ilustrativos; las personas normalmente expertas en la técnica tienen la capacidad de determinar las técnicas que son especialmente beneficiosas para las necesidades del técnico.

#### 1. Ensayos de unión a membrana Ensayo [<sup>35</sup>S]GTPγS

Cuando un receptor acoplado a la proteína G está en su estado activado, bien como resultado de la unión de un ligando o por activación constitutiva, el receptor se acopla a una proteína G y estimula la liberación de GDP y la posterior unión de GTP a la proteína G. La subunidad alfa del complejo proteína G-receptor actúa como una GTPasa e hidroliza lentamente GTP a GDP, en cuyo momento el receptor normalmente se desactiva. Los receptores activados continúan intercambiando GDP por GTP. El análogo de GTP no hidrolizable, [<sup>35</sup>S]GTPγS se puede utilizar para demostrar la unión potenciada de [<sup>35</sup>S]GTPγS a membranas que expresan receptores activados. La ventaja de utilizar la unión de [<sup>35</sup>S]GTPγS para medir la activación es que: (a) se puede aplicar de manera genérica a todos los receptores acoplados a proteínas G; (b) está cercano a la membrana superficial, lo que le convierte en menos probable de recoger moléculas que afecten la cascada intracelular.

El ensayo utiliza la capacidad de los receptores acoplados a proteína G para estimular la unión de [<sup>35</sup>S]GTPγS a

membranas que expresan los receptores relevantes. El ensayo puede, por lo tanto, utilizarse en el procedimiento de identificación directa para cribar compuestos candidatos para los GPCR endógenos, y los GPCR no endógenos activados constitutivamente. El ensayo es genérico, y se aplica al descubrimiento de fármacos para todos los receptores acoplados a proteína G.

El ensayo [<sup>35</sup>S]GTPγS se incubaba en HEPES 20 mM HEPES y con MgCl<sub>2</sub> entre 1 y aproximadamente 20mM (esta cantidad se puede ajustar para optimización de los resultados, aunque se prefiere 20 mM) pH 7,4, tampón de unión con [<sup>35</sup>S]GTPγS entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 1,2 mM esta cantidad se puede ajustar para optimización de los resultados, aunque se prefiere 1,2) y de ;12,5 a to 75 μg de proteína de membrana (por ejemplo, células 293 que expresan el GPR41; esta cantidad se puede ajustar para optimización) y GDP 10 μM (esta cantidad se puede cambiar para optimización) durante 1 h. Perlas de aglutinina Wheatgerm (25 μl; Amersham) se añadieron a continuación y la mezcla se incubó durante 30 minutos más a temperatura ambiente. A continuación, los tubos se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se contaron en un contador de centelleo.

## 2. Adenililo ciclasa

Un kit de la adenilil ciclasa Flash Plate™ (New England Nuclear; Nº de Cat. SMP004A) diseñado para ensayos celulares se puede modificar para su uso con membranas de plasma bruto. Los pocillos Flash Plate pueden contener un revestimiento de centelleo que también incluye un anticuerpo específico que reconoce AMPc. El AMPc generado en los pocillos se puede cuantificar mediante una competición directa por unión del trazador AMPc radioactivo con el anticuerpo de AMPc. Lo siguiente sirve como un breve protocolo para la medida de los cambios en los niveles de AMPc en células completas que expresan un receptor.

Las células transfectadas se recogieron aproximadamente veinte horas después de la transfección transitoria. El medio se aspiró cuidadosamente y se descartó. 10 ml de PBS se añadieron suavemente a cada placa de células, seguido por aspiración cuidadosa. 1 de tampón de disociación de células Sigma y 3 ml de PBS se añadieron a cada placa. Las células se eliminaron por pipeteo de la placa, y la suspensión celular se recogió en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml. A continuación, las células se centrifugaron a temperatura ambiente a 1.100 rpm durante 5 minutos. El aglomerado celular se resuspendió cuidadosamente en un volumen adecuado de PBS (aproximadamente 3 ml/placa). A continuación las células se contaron con un hemocitómetro y se añadió más PBS para obtener el número adecuado de células (con un volumen final de aproximadamente 50 μl/pocillo).

Se prepararon patrones de AMPc y tampón de detección (que comprende 1 μCi de trazador [<sup>125</sup>I] AMPc (50 μl) a 11 ml de tampón de detección) y se mantuvieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de ensayo se preparó reciente para cribado y contiene 50 μl de tampón de estimulación, 3 μl de compuesto candidato (concentración final del ensayo 12 μM) y 50 μl de células. El tampón de ensayo se almacenó sobre hielo hasta su uso. El ensayo que se lleva a cabo preferiblemente, por ejemplo, en una placa de 96 pocillos, se inicia por adición de of 50 μl de patrones de AMPc a los pocillos adecuados, seguido por la adición de 50 μl de PBSA a los pocillos H11 y H12. Se añadieron a los pocillos 50 μl de tampón de estimulación. DMSO (o los compuestos candidatos seleccionados) se añadió a los pocillos adecuados usando una herramienta de tipo horquilla que puede dispensar 3 μl de solución de compuesto, con una concentración final del ensayo para el compuesto candidato de 12 μM y un volumen total del ensayo de 100 μl. A continuación, las células se añadieron a los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación se añadieron a los pocillos 100 μl de mezcla de detección que contenía AMPc trazador. A continuación, las placas se incubaron durante 2 horas más seguido por recuento en un contador de centelleo Wallac MicroBeta. Los valores de AMPc/pocillo se extrapolaron a continuación de una curva patrón de AMPc que estaba incluido en cada placa de ensayo.

## 3. AMPc en células para GPCR dianas acopladas a Gi

TSHR es un GPCR acoplado a Gs que ocasiona la acumulación de AMPc tras activación. TSHR se puede activar de forma constitutiva por mutación del resto de aminoácido 623 (es decir, cambiando un resto alanina por un resto isoleucina). Se espera que un receptor acoplado a Gi inhiba la adenililo ciclasa, y, por lo tanto, disminuya el nivel de producción de AMPc, lo que puede convertir en un desafío la valoración de los niveles de AMPc. Una técnica eficaz para medir la disminución en la producción de AMPc como indicación de la activación de un receptor acoplado a Gi se puede llevar mediante una transfección simultánea no endógena de TSHR activado constitutivamente (TSHR-A623I) (o bien un reactor acoplado a Gs activado constitutivamente) como "potenciador de la señal" con una GPCR diana unida a Gi para establecer un nivel inicial del AMPc. Después de crear una versión endógena o no endógena del receptor acoplado a Gi, el GPCR diana se transfecta simultáneamente con el potenciador de la señal, y de esta forma, el material se puede utilizar para cribado. En algunas realizaciones, esta solución se utiliza preferiblemente en la identificación directa de compuestos candidatos contra receptores acoplados a Gi. Se debe resaltar que para un GPCR acoplado a Gi, cuando se utiliza esta solución, un agonista inverso del GPCR diana aumentará la señal de AMPc y un agonista disminuirá la señal de AMPc.

El día uno, se sembraron en placas 2x10<sup>4</sup> células 293/pocillo. El día dos, se prepararon dos tubos de reacción (las

proporciones que se indican para cada tubo son por placa); el tubo A se preparó mezclando 2 µg de ADN de cada receptor transfectado en las células de mamífero, para un total de 4 µg de ADN (por ejemplo, un vector pCMV; un vector pCMV con THSR mutado (TSHR-A6231); TSHR-A6231 y GPCR, etc.) en 1,2 ml de DMEM exento de suero (Irvine Scientific, Irvine, CA); el tubo B se preparó mezclando 120 µl de lipofectamina (Gibco BRL) en 1,2 ml de DMEM exento de suero. A continuación, los tubos A y B se premezclaron por inversión (varias veces), seguido por incubación a temperatura ambiente durante 30-45 minutos. La premezcla se denomina "mezcla de transfección". Las células 293 sembradas se lavaron con 1X PBS, seguido por adición de 10 ml de DMEM exento de suero. 2,4 ml de la mezcla de transfección se añadieron a las células a continuación, seguido por incubación durante 4 horas a 37°C/CO<sub>2</sub> 5 %. La mezcla de transfección se eliminó a continuación por aspiración, seguido por la adición de 25 ml de DMEM/suero de feto de ternera al 10 % A continuación las células se incubaron a 37°C/CO<sub>2</sub> 5 %. Transcurridas 24 horas de incubación, las células se recogieron y se utilizaron para análisis.

Un kit de la adenilil ciclasa Flash Plate™ (New England Nuclear; N° de Cat. SMP004A) se diseñó para el análisis celular, pero se puede modificar para su uso con membranas plasmáticas brutas dependiendo de la necesidad del técnico experto. Los pocillos Flash Plate contienen un revestimiento de centelleo que también incluye un anticuerpo específico que reconoce AMPc. El AMPc generado en los pocillos se puede cuantificar mediante una competición directa por unión del trazador AMPc radioactivo con el anticuerpo de AMPc. Lo siguiente sirve como un breve protocolo para la medida de los cambios en los niveles de AMPc en células completas que expresan un receptor de interés.

Las células transfectadas se recogieron aproximadamente veinte horas después de la transfección transitoria. El medio se aspiró cuidadosamente y se descartó. 10 ml de PBS se añadieron suavemente a cada placa de células, seguido por aspiración cuidadosa. 1 de tampón de disociación de células Sigma y 3 ml de PBS se añadieron a cada placa. Las células se eliminaron por pipeteo de la placa, y la suspensión celular se recogió en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml. A continuación, las células se centrifugaron a temperatura ambiente a 1.100 rpm durante 5 minutos. El aglomerado celular se resuspendió cuidadosamente en un volumen adecuado de PBS (aproximadamente 3 ml/placa). A continuación las células se contaron con un hemocitómetro y se añadió más PBS para obtener el número adecuado de células (con un volumen final de aproximadamente 50 µl/pocillo).

Se prepararon patrones de AMPc y tampón de detección (que comprende 1 µCi de trazador [<sup>125</sup>I] AMPc (50 µl) a 11 ml de tampón de detección) y se mantuvieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de ensayo se debe preparar reciente para cribado y contiene 50 µl de tampón de estimulación, 3 µl de compuesto candidato (concentración final del ensayo 12 µM) y 50 µl de células. El tampón de ensayo se puede almacenar sobre hielo hasta su uso. El ensayo se inicia por adición de 50 µl de patrones de AMPc a los pocillos adecuados, seguido por la adición de 50 ml de PBSA a los pocillos H11 y H12. Se añadieron a los pocillos cincuenta ml de tampón de estimulación. Los compuestos seleccionados (por ejemplo, TSH) se añadieron a los pocillos adecuados usando una herramienta de tipo horquilla que puede dispensar 3 ml de solución de compuesto, con una concentración final del ensayo para el compuesto candidato de 12 µM y un volumen total del ensayo de 100 µl. A continuación, las células se añadieron a los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. A continuación se añadieron a los pocillos 100 µl de mezcla de detección que contenía AMPc trazador. A continuación, las placas se incubaron durante 2 horas más seguido por recuento en un contador de centelleo Wallac MicroBeta. Los valores de AMPc/pocillo se extrapolaron de una curva patrón de AMPc que estaba incluido en cada placa de ensayo.

#### 4. Ensayos de indicador

##### a. Ensayo indicador CRE-LUC (receptores asociados a Gs)

Células 293 o 293T se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10<sup>4</sup> células por pocillo, y se transfectaron con reactivo Lipofectamina (BRL) el día siguiente según las instrucciones del fabricante. Se preparó una mezcla de ADN/lípido para cada transfección de 6 pocillos de la siguiente forma: 260 ng de ADN plásmido en 100 µl de DMEM se mezclaron suavemente con 2 µl de lípido en 100 µl de DMEM (los 260 ng de ADN plásmido consisten en 200 ng de un plásmido indicador 8xCRE-Luc, 50 ng de pCMV que incluye receptor endógeno o receptor no endógeno o pCMV solo, y 10 ng de un plásmido de expresión GPRS (GPRS en pcDNA3 (Invitrogen)). El plásmido indicador 8XCRE-Luc se prepara de la siguiente forma: el vector SRIF-β-gal se obtiene por clonación del promotor de la somatostatina de rata (-71/+51) en el sitio BglV-HindIII del vector ppgal-Basic (Clontech). Ocho (8) copias del elemento de respuesta a AMPc se obtuvieron mediante PCR a partir de un molde de adenovirus AdpCF126CCRE8 (véase, Suzuki y col., Hum Gene Ther 7:1883-1893 (1996); cuya descripción se incorpora por la presente por referencia en su totalidad) y se clonó en el vector SRIF-p-gal en el sitio Kpn-BglV, dando como resultado el gen indicador 8xCRE-β-gal. El plásmido indicador 8xCRE-Luc se genera por sustitución del gen de la beta-galactosidasa en el vector indicador 8xCRE-p-gal por el gen de la luciferasa obtenido a partir del vector pGL3-Basic (Promega) en el sitio HindIII-BamHI. Después de una incubación de 30 horas a temperatura ambiente, la mezcla de ADN/lípido se diluyó con 400 µl de DMEM y 100 µl de la mezcla diluida se añadieron a cada pocillo. 100 µl de DMEM con FCS al 10 % se añadieron a cada pocillo tras una incubación de cuatro horas en una incubadora de cultivo celular. El día siguiente, las células transfectadas se cambiaron con 200 µl/pocillo de DMEM con FCS al 10 %. Ocho (8) horas después, los pocillos se cambiaron a 100 µl /pocillo de DMEM sin rojo de fenol, después de un lavado con PBS. La actividad luciferasa se midió

al día siguiente usando el kit de ensayo del gen indicador LucLite™ (Packard) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se leyó en un contador de centelleo y luminiscencia 1450 MicroBeta™ (Wallac).

b. Ensayo indicador AP1 (receptores asociados a Gq)

Un procedimiento para detectar la estimulación de Gq depende de la propiedad conocida de la fosfolipasa C dependiente de Gq para ocasionar la activación de genes que contienen elementos AP1 en su promotor. A El sistema de cis-indicador Pathdetect™ AP-1 (Stratagene, nº de catálogo 219073) se puede utilizar siguiendo el protocolo definido anteriormente para el ensayo indicador CREB, salvo que los componentes del precipitado de fosfato de calcio son 410 ng de pAP1-Luc, 80 ng de plásmido de expresión pCMV-receptor, y 20 ng de CMV-SEAP..

c. Ensayo indicador SRF-LUC (receptores asociados a Gq)

Un procedimiento para detectar la estimulación de Gq depende de la propiedad conocida de la fosfolipasa C dependiente de Gq para ocasionar la activación de genes que contienen factores de respuesta séricos en su promotor. Se puede utilizar un sistema indicador Pathdetect™ SRF-Luc (Stratagene) para ensayar la actividad acoplada de Gq en, por ejemplo, células COS7. Las células se transfectaron con los componentes plásmidos del sistema, y el plásmido de expresión indicado que codifica el GPCR endógeno o no endógeno usando un kit Mammalian Transfection™ Kit (Stratagene, nº de catálogo 200285) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 410 ng de SRF-Luc, 80 ng del plásmido que expresa pCMV-receptor y 20 ng de CMV-SEAP (plásmido que expresa fosfatasa alcalina secretada; la actividad fosfatasa alcalina se mide en los medios de las células transfectadas para controlar las variaciones en la eficacia de la transfección entre las muestras) se combinaron en un precipitado de fosfato de calcio según las instrucciones del fabricante. La mitad del precipitado se distribuyó por igual entre 3 pocillos de una placa de 96 pocillos y las células se mantuvieron en un medio exento de suero durante 24 horas. Durante las últimas 5 horas, las células se incubaron con, por ejemplo, 1 µM, compuesto candidato. A continuación, las células se lisaron y se ensayaron para determinar la actividad luciferasa con un kit LucLite™ (Packard, Nº de Cat. 6016911) y líquido de centelleo "Trilux 1450 Microbeta" y un contador de luminiscencia (Wallac) según las instrucciones del fabricante. Los datos se pueden analizar mediante GraphPad Prism™ 2.0a (GraphPad Software Inc.).

d. Ensayo de acumulación intracelular de IP3 (receptores asociados a Gq)

El día 1, las células que comprenden el receptor de interés (endógeno o no endógeno) se pueden sembrar en placas de 24 pocillos. Habitualmente  $1 \times 10^5$  células/pocillo (aunque este número se puede optimizar). El día 2, las células se puede transfectar mezclando en primer lugar 0,25 µg de ADN en 50 µl de DMEM exento de suero/pocillo y 2 µl de lipofectamina en 50 µl de DMEM exento de suero/pocillo. Las soluciones se mezclaron suavemente y se incubaron durante 15-30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células con 0,5 ml de PBS y a continuación 400 µl de medio exento de suero se mezclaron con el medio de transfección y se añadieron a las células. A continuación, las células se incubaron durante 3-4 horas a 37°C/CO<sub>2</sub> 5 %, y a continuación el medio de transfección se eliminó y se sustituyó con 1 ml/pocillo de medio de crecimiento normal. El día 3, las células se marcaron con <sup>3</sup>H-mio-inositol. Brevemente, el medio se eliminó y las células se lavaron con 0,5 ml de PBS. A continuación se añadieron 0,5 ml de medio exento de inositol/exento de suero (GIBCO BRL) a cada pocillo con 0,25 µCi de <sup>3</sup>H-mio-inositol/pocillo, y las células se incubaron durante 16-18 horas durante la noche a 37°C/CO<sub>2</sub> 5 %. El día 4, las células se lavaron con 0,5 ml de PBS y se añadieron 0,45 ml de medio de ensayo que contenía medio exento de inositol/exento de suero, 10 µM de pargilina, 10 mM de cloruro de litio o 0,4 ml de medio de ensayo y 50 µl de 10x ketanserina (ket) hasta una concentración final de 10 µM, si se utiliza una construcción de control que contiene un receptor de la serotonina. A continuación las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación, las células se lavaron con 0,5 ml de PBS y 200 µl de una solución de detención enfriada/en hielo (KOH 1M; Na-borato 18 mM; EDTA 3,8 mM) se añadieron a cada pocillo. La solución se mantuvo en hielo durante 5-10 minutos hasta que las células se lisaron y a continuación se neutralizaron con 200 µl de una solución de neutralización enfriada/en hielo. (7,5 % HCl). A continuación el lisado se transfirió a tubos eppendorf de 1,5 ml y se añadió a cada tubo 1 ml de cloroformo/metanol (1:2). La solución se vortizó durante 15 segundos, y la fase superior se aplicó a una resina de intercambio aniónico Biorad AG1-X8™ (malla 100-200). En primer lugar, la resina se lavó con agua a 1:1.25 P/V y se cargaron 0,9 ml de la fase superior sobre la columna. La columna se lavó con 10 ml de mio-inositol 5 mM y 10 ml de Na-borato 5 mM/Na-formiato 60 mM. Los trifosfatos de inositol se eluyeron en viales de centelleo que contenían 10 ml de cóctel de centelleo con 2 ml de ácido fórmico 0,1 M / formiato de amonio 1 M. Las columnas se regeneraron por lavado con 10 ml de ácido fórmico 0,1 M/formiato de amonio 3 M y se enjuagaron dos veces con H<sub>2</sub>O dd y se almacenaron a 4°C en agua.

**Ejemplo 13**

**Preparación de la proteína de fusión**

a. Construcción de fusión GPCR:Gs

El diseño de la construcción de la proteína de fusión GPCR-G se puede llevar a cabo de la siguiente forma: los extremos 5' y 3' de G $\alpha$  de la proteína G de rata (forma larga; Itoh, H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:3776 (1986)) se diseñaron mediante ingeniería genética para incluir en ellos una secuencia HindIII. Tras la confirmación de la secuencia correcta (incluyendo las secuencias que flanquean HindIII), la secuencia completa se introdujo en pcDNA3.1(-) (Invitrogen, nº de catálogo V795-20) mediante subclonación usando el sitio de restricción HindIII de dicho vector. La orientación correcta de la secuencia G $\alpha$  se determina después de la subclonación en pcDNA3.1(-). El pcDNA3.1(-) modificado que contiene el gen G $\alpha$  de rata en la secuencia HindIII se verifica a continuación; este vector ahora está disponible como un vector "universal" de la proteína G $\alpha$ . El vector pcDNA3.1(-) contiene varios sitios de restricción bien conocidos en dirección 5' del sitio HindIII, lo que proporciona de forma beneficiosa la capacidad de insertar, en dirección 5' de la proteína Gs, la secuencia de codificación de un receptor de interés. Este mismo enfoque se puede utilizar para crear otros vectores "universales" de la proteína G, y, por supuesto, se pueden utilizar otros vectores comerciales o patentados conocidos del experto, ya que el criterio importante es que la secuencia de GPCR esté en dirección 5' de y en el marco junto con la proteína G.

#### 15 b. Construcción de fusión Gq (deleción de 6 aminoácidos)/Gi

El diseño de una construcción de fusión Gq(del)/Gi se puede llevar a cabo de la siguiente forma: los seis (6) aminoácidos del extremo N (aminoácidos del 2 al 7, que la secuencia de TLESIM (SEC. ID Nº:11)) de la subunidad G[alfa]q se eliminan, y los cinco (5) aminoácidos del extremo C que tienen la secuencia EYNLV (SEC. ID Nº:12) se sustituyen por los correspondientes aminoácidos de la proteína G[alfa]i que tienen la secuencia DCGLF (SEC. ID Nº:13). Esta construcción de fusión se puede obtener mediante PCR usando los siguientes cebadores:

5'-gatcAAGCTTCCATGGCGTGCTGCCTGAGCGAGGAG-3' (SEC. ID Nº:14) y

5'-

**gatcGGATCCTTAGAACAGGCCGCGAGTCCTTCAGGTTTCAGCTGCAGGATGGTG-**

**3' (SEC. ID Nº:15)**

y el Plásmido 63313 que contiene la versión natural de G[alfa]q de ratón con una etiqueta de hemaglutinina como plantilla. Los nucleótidos de los extremos inferiores están incluidos como separadores.

Se puede utilizar la ADN polimerasa TaqPlus Precision (Stratagene) para la amplificación en los siguientes ciclos, donde las etapas 2 a 4 se repiten 35 veces: 95°C durante 2 min; 95°C durante 20 s; 56°C durante 20 s; 72°C durante 2 min; y 72°C durante 7 min. El producto de la PCR se puede clonar en un vector pCRII-TOPO (Invitrogen) y secuenciarse con el kit ABI Big Dye Terminator (P.E. Biosystems). Las inserciones procedentes de un clon TOPO que incluye la secuencia de la construcción de fusión se puede introducir en el vector de expresión pcDNA3.1(+) en el sitio HindIII/BamHI mediante un procedimiento de clonación en 2 etapas. Véase también, la solicitud PCT con número PCT/US02/05625 publicada como documento WO02068600 el 6 de septiembre de 2002, cuya divulgación se incorpora por referencia en su totalidad.

#### Ejemplo 14

##### Ensayo [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S

##### A. Preparación de la membrana

En algunas realizaciones, las membranas que comprenden el GPCR diana de interés para su uso en la identificación de compuestos candidatos tales como por ejemplo, agonistas, agonistas inversos o antagonistas, se prepararan de la siguiente forma:

##### a. Materiales

El "tampón de rascado de membranas" está compuesto por HEPES 20 mM y EDTA 10 mM, pH 7,4; el "tampón de lavado de membranas" está compuesto por HEPES 20 mM y EDTA 0,1 mM, pH 7,4; el "tampón de unión" está compuesto por HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4.

##### b. Procedimiento

Todos los materiales se mantuvieron sobre hielo durante la totalidad del procedimiento. En primer lugar, el medio se aspiró desde una monocapa confluyente de células, seguido por enjuagado con 10 ml de PBS frío, seguido por aspiración. A continuación, se añadieron 5 ml de tampón de rascado de membranas para rascar las células; esto fue seguido por transferencia del extracto celular a tubos de centrifuga de ml (centrifugados a 20.000 rpm durante 17

minutos a 4°C). A continuación, el sobrenadante se aspiró, y el aglomerado se resuspendió en 30 ml de tampón de lavado de membranas, seguido por centrifugación a 20.000 rpm durante 17 minutos a 4°C. A continuación, el sobrenadante se aspiró, y el aglomerado se resuspendió en tampón de unión. A continuación, este se homogeneizó en un homogeneizador Brinkman Polytron™ (activaciones de 15-20 segundos hasta que todo el material queda en suspensión). Esto se denomina en el presente documento como "proteína de membranas".

#### Ensayo de proteína Bradford

Después de la homogeneización, la concentración de proteína de las membranas se determinó usando el ensayo de proteína Bradford (la proteína se puede diluir hasta aproximadamente 1,5 mg/ml, tomarse alícuotas y congelarse (-80°C) hasta uso posterior; cuando se congela, el protocolo de uso será el siguiente: el día del ensayo, la proteína de las membranas congelada se descongela a temperatura ambiente, seguido de vortización y a continuación se homogeneiza con un Polytron a aproximadamente 12 x 1.000 rpm durante aproximadamente 5-10 segundos; se resalta que, para múltiples preparaciones, el homogeneizador debe limpiarse completamente entre la homogeneización de preparaciones diferentes).

##### a. Materiales

Tampón de unión (como anteriormente); reactivo colorante Bradford; se utiliza patrón de proteína Bradford; siguiendo las instrucciones del fabricante (Biorad, nº de catálogo 500-0006:

##### b. Procedimiento

Se prepararon tubos duplicados, uno incluyendo la membrana, y uno como "blanco" de control. Cada tubo contiene 800 µl de tampón de unión. A continuación, se añadieron a cada tubo 10 µl de patrón de proteína Bradford (1 mg/ml), y se añadió a continuación 10 µl de proteína de membranas solamente a un tubo (no al blanco). A continuación, se añadieron a cada tubo 200 µl de reactivo colorante Bradford a cada tubo, seguido por vortización de cada tubo. Tras cinco (5) minutos, los tubos se volvieron a vortizar y el material de su interior se transfirió a cubetas. Las cubetas se leyeron con un espectrofotómetro CECIL 3041, a una longitud de onda de 595.

#### Ensayo de identificación

##### a. Materiales

El tampón GDP está compuesto por 37,5 ml de tampón de unión y 2 mg de GDP (Sigma, nº cat. G-7127), seguido por una serie de diluciones en tampón de unión para obtener GDP 0,2 µM GDP (concentración final de GDP en cada pocillo es GDP 0,1 µM); cada pocillo que comprende un compuesto candidato tiene un volumen final de 200 µl que consiste en 100 µl de tampón GDP (concentración final GDP 0,1 mM), 50 µl de proteína de membranas en tampón de unión, y 50 µl de [<sup>35</sup>S]GTPγS (0,6 nM) en tampón de unión (2,5 µl de [<sup>35</sup>S]GTPγS por 10 µl de tampón de unión).

##### b. Procedimiento

Los compuestos candidatos se pueden cribar en un formato de placa de 96 pocillos (estos se pueden congelar a -80°C). Las proteínas de membrana (o las membranas con el vector de expresión excluyendo el GPCR diana de control), se homogeneizaron durante un corto tiempo en suspensión. La concentración de proteína se determina con el ensayo de proteína Bradford establecido anteriormente. Las proteínas de membrana (y el control) se diluyeron a 0,25 mg/ml en tampón de unión (concentración final del ensayo 12,5 µg/pocillo). A continuación, se añadieron 100 µl de tampón GDP a cada pocillo de un Wallac Scintistrip™ (Wallac). Se utilizó una herramienta de horquilla de 5 µl para transferir 5 µl de un compuesto candidato a cada uno de dichos pocillos (es decir, 5 µl de un volumen total de ensayo de 200 µl es una relación 1:40 de forma que la concentración final de cribado del compuesto candidato es 10 µM). De nuevo, para evitar la contaminación, después de cada etapa de transferencia, la herramienta de horquilla se debe enjuagar en tres depósitos que comprenden agua (1X), etanol (1X) y agua (2X) -el exceso de líquido se deberá sacudir de la herramienta después de cada enjuagado y secarse con papel y toallitas kimwipes. A continuación, se añadieron 50 µl de proteína de membranas se añadieron a cada pocillo (también se utiliza un pocillo de control que comprende membranas sin el GPCR diana) y preincubarse durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 µl de [<sup>35</sup>S]GTPγS (0,6 nM) en tampón de unión a cada pocillo, seguido por la incubación en un agitador durante 60 minutos a temperatura ambiente (placas recubiertas con película). El ensayo se detuvo a continuación rotando las placas a 4000 RPM durante 15 minutos a 22°C. Las placas se aspiraron con un manguito de 8 canales y se precintaron con cubiertas para placas. Las placas se leyeron en un Wallac 1450 con el escenario "Prot. nº 37" (según las instrucciones del fabricante).

#### Ejemplo 15

##### Ensayo de AMP cíclico

Otro enfoque de ensayo para identificar compuestos candidatos como, por ejemplo, agonistas, agonista inverso, o

antagonistas, se puede llevar a cabo usando un ensayo basado en ciclasa. Además de la identificación directa, este enfoque de ensayo se puede utilizar un enfoque independiente para proporcionar confirmación de los resultados del enfoque de [<sup>35</sup>S]GTPγS que se ha definido en el ejemplo anterior.

- 5 Un kit de adenililo ciclasa Flash Plate™ modificado (New England Nuclear; N° de Cat. SMP004A) se puede utilizar para la identificación directa de compuestos candidatos como agonistas inversos y agonistas de un receptor de interés de acuerdo con el siguiente protocolo.

10 Las células transfectadas se recogieron aproximadamente tres días después de la transfección. Las membranas se prepararon por homogeneización de las células suspendidas en tampón que contenía HEPES 20 mM, pH 7,4 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. La homogeneización se lleva a cabo sobre hielo con un instrumento Brinkman Polytron™ durante aproximadamente 10 segundos. El homogenado resultante se centrifuga a 49.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El aglomerado resultante se resuspendió a continuación en tampón que contenía HEPES 20 mM, pH 7,4 y EDTA 0,1 mM, se homogeneizó durante 10 segundos, seguido por centrifugación a 49.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El aglomerado resultante se almacenó posteriormente a -80°C hasta su uso. El día del cribado por identificación directa, el aglomerado de las membranas se descongela a temperatura ambiente, se resuspende en tampón que contienen HEPES 20 mM, pH 7,4 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, para dar una concentración final de proteína de 0,60 mg/ml (las membranas resuspendidas se colocaron sobre hielo hasta su uso).

20 Se prepararon patrones de AMPc y tampón de detección (que comprende 2 μCi de trazador [<sup>125</sup>I] AMPc (100 μl) a 11 ml de tampón de detección) y se mantuvieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de ensayo se preparó reciente para cribado y contiene HEPES 20 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, fosfocreatina 20 mM (Sigma), 0,1 unidades/ml de creatina fosfoquinasa (Sigma), 50 μM de GTP (Sigma), y ATP 0,2 mM (Sigma); El tampón de ensayo se almacenó posteriormente sobre hielo hasta su uso.

25 Los compuestos candidatos se añadieron, por ejemplo, a los pocillos de una placa de 96 pocillos (3 μl/pocillo; 12 μM concentración final del ensayo), junto con 40 μl de proteína de membranas (30 μg/pocillo) y 50 μl de tampón de ensayo. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave.

30 Tras la incubación, se añadieron a cada pocillo 100 μl de tampón de detección, seguido por incubación durante 2-24 horas. A continuación las placas se contaron en un lector de placas Wallac MicroBeta™ usando "Prot. n° 31" (según las instrucciones del fabricante).

### Ejemplo 16

#### 35 **Ensayo de lectura de placas por imagen fluorométrica (FLIPR) para la medida de la concentración de calcio intracelular**

40 Células transfectadas de manera estable con el receptor diana (experimental) y pCMV (control negativo) procedentes de las líneas clonales respectivas se sembraron en placas de 96 pocillos tratadas con poli-D-lisina (Becton-Dickinson, n° 356640) a 5,5 x10<sup>4</sup> células/pocillo con medio de cultivo completo (DMEM con FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM) para ensayo al día siguiente. Como GPR41 está acoplado a Gi, las células que comprenden GPR41 pueden comprender además Gα15, Gα16, o la subunidad quimérica Gq/Gi. Sin embargo, puesto que GPR41 también está acoplado a Gα12/13 (véase el Ejemplo 5 y la Figura 5), una proteína G promiscua tal como Gα15, Gα16, 45 o la subunidad quimérica Gq/Gi alfa puede no ser necesaria para ocasionar un flujo de calcio detectable. Para preparar Fluo4-AM (Molecular Probe, n° F14202, solución madre de tampón de incubación), 1 mg de Fluo4-AM se disolvió en 467 μl de DMSO y ácido plurónico 467#μl (Molecular Probe, n° P3000) para dar una solución madre 1 mM que se puede almacenar a -20°C durante un mes. Fluo4-AM es un colorante indicador del calcio fluorescente.

50 Los compuestos candidatos se preparan en tampón de lavado (1X HBSS//HEPES 20 mM a pH 7,4).

En el momento del ensayo, el medio de cultivo se eliminó de los pocillos y las células se cargaron con 100 μl de Fluo4-AM/Probenicid 2,5 mM 4 μM (Sigma, n° P8761)/HEPES 20 mM/medio completo a pH 7,4. Se permite incubar a 37°C /CO<sub>2</sub> 5 % durante 60 minutos.

55 Después de 1 hora de incubación, el tampón de incubación Fluo4-AM se eliminó y las células se lavaron 2X con 100 μl de tampón de lavado reciente. En cada pocillo se dejaron 100 μl de tampón de lavado, La placa se devolvió a la incubadora a 37°C /CO<sub>2</sub> 5 % durante 60 minutos.

60 Un instrumento FLIPR (lector de placas por imagen fluorométrica; Molecular Device) se programó para añadir 50 μl de compuesto candidato a los 30 segundos, y para registrar los cambios transitorios en la concentración intracelular de calcio ([Ca<sup>2+</sup>]) evocada por el compuesto candidato durante 150 segundos más. Las cuentas totales de fluorescencia se utilizan para determinar la actividad agonista con el programa informático FLIPR. El programa informático del instrumento normaliza la lectura de fluorescencia para proporcionar lecturas iniciales equivalentes a cero.

65 Aunque lo anterior proporciona un ensayo FLIPR para determinar la actividad agonista con células transfectadas de

forma estable, una persona normalmente experta en la técnica será capaz de modificar de manera sencilla el ensayo para caracterizar la actividad antagonista. Dicha persona normalmente experta en la técnica también apreciará que, alternativamente, también se pueden utilizar células transfectadas de forma transitoria.

## 5 Ejemplo 17

### Ensayo con la quinasa MAP

10 La quinasa MAP (quinasa activada por mitógeno) se puede controlar para evaluar la activación del receptor. La quinasa MAP se puede detectar de diferentes formas. Una de ellas se basa en la evaluación del estado de fosforilación, tanto no fosforilada (inactiva) como fosforilada (activa). La proteína fosforilada tiene una movilidad inferior en SDS-PAGE y por tanto se puede comparar con la proteína no estimulada usando transferencias Western. Como alternativa, están disponibles anticuerpos específicos de la proteína fosforilada (New England Biolabs) que se pueden utilizar para detectar un aumento en la quinasa fosforilada. En cualquiera de los procedimientos, las células se estimulan con el compuesto candidato y a continuación se extraen con tampón Laemmli. La fracción soluble se aplica a un gel SDS-PAGE y las proteínas se transfieren electroforéticamente a nitrocelulosa o Immobilon. Las bandas inmunoreactivas se detectan mediante la técnica convencional de transferencia Western. Las señales visibles o quimioluminiscentes se registran en una película y se pueden cuantificar mediante densitometría.

20 Otra solución se basa en la evaluación de la actividad de la quinasa MAP mediante un ensayo de fosforilación. Las células se estimulan con el compuesto candidato y se prepara un extracto soluble. El extracto se incuba a 30 °C durante 10 minutos con gamma-<sup>32</sup>P-ATP, un sistema regenerador de ATP, y un sustrato específico de la quinasa MAP tal como una proteína fosforilada estable al calor y a los ácidos regulada por insulina, o PHAS-I. La reacción se termina por adición de  $H_3PO_4$  y las muestras se transfirieron a hielo. Una alícuota se repartió sobre papel cromatográfico Whatman P81, que retiene la proteína fosforilada. El papel de cromatografía se lavó y se contó para determinar <sup>32</sup>P en un contador de centelleo en medio líquido. Como alternativa, el extracto celular se incubó con gamma-<sup>32</sup>P-ATP, un sistema regenerador de ATP, y se unió proteína básica de mielina biotinilada a estreptavidina en un soporte filtro. La proteína básica de mielina es un sustrato de la quinasa MAP activada. La reacción de fosforilación se lleva a cabo durante 10 minutos a 30 °C. El extracto se aspiró a continuación a través del filtro, que retiene la proteína básica de mielina fosforilada. El filtro se lava y se cuenta para determinar <sup>32</sup>P por recuento de centelleo en medio líquido.

## Ejemplo 18

### Ensayo de unión al receptor

35 Además de los procedimientos descritos en el presente documento, otro medio para evaluar un compuesto candidato es determinar las afinidades de enlace con el receptor GPR41. Este tipo de ensayo requiere por lo general un ligando radiomarcado unido al receptor GPR41. Además del uso de ligandos conocidos del receptor GPR41 y sus radiomarcas, los compuestos agonistas de GPR41 descritos en el presente documento se pueden marcar con un radioisótopo y utilizarse en un ensayo para evaluar la afinidad de un compuesto candidato por el receptor GPR41.

45 Un compuesto de GPR41 radiomarcado tal como un agonista de GPR41 descrito en el presente documento se puede utilizar en un ensayo de cribado para evaluar compuestos. En términos generales, se puede evaluar un compuesto sintetizado o identificado recientemente (es decir, un compuesto candidato) se puede evaluar para determinar su capacidad para reducir la unión del agonista de GPR41 radiomarcado con el receptor de GPR41. Por consiguiente, la capacidad de competir con el agonista de GPR41 radiomarcado por la unión al receptor GPR41 se correlaciona de manera directa con la afinidad de enlace del compuesto candidato por el receptor GPR41.

## 50 PROTOCOLO DE ENSAYO PARA DETERMINAN LA UNIÓN AL RECEPTOR PARA GPR41:

### A. PREPARACIÓN DEL RECEPTOR GPR41

55 Por ejemplo, Células HEK293 (riñón humano, ATCC) se pueden transfectar de forma transitoria o estable con GPR41 tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, Células 293 se puede transfectar de forma transitoria con 10 µg de receptor GPR41 humano y 60 µl de Lipofectamine (pen placas de 15 cm), y se hicieron crecer en la placa durante 24 horas (confluencia del 75 %) con un cambio de medio. Las células se eliminaron con 10 ml/placa de tampón Hepes-EDTA (Hepes 20 mM + EDTA 10 nM, pH 7,4). A continuación, las células se centrifugaron en una centrífuga Beckman Coulter durante 20 minutos, 17.000 rpm (rotor LA-25.00). Posteriormente, el aglomerado se resuspendió en Hepes 20 mM + EDTA 1 nM, pH 7,4 y se homogeneizó con un homogeneizador Dounce de 50 ml y se volvió a centrifugar. Tras eliminar el sobrenadante, los aglomerados se almacenaron a -80 °C, hasta su uso en el ensayo de unión. Cuando se utilizan en el ensayo, las membranas se descongelan en hielo durante 20 minutos y a continuación se añaden 10 ml de tampón de incubación (Hepes 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). A continuación, las membranas se vortizaron para resuspender el aglomerado de membrana bruto y se homogeneizaron con un homogeneizador Brinkmann PT-3100 Polytron durante 15 segundos con la selección 6. La concentración de proteínas de la membrana se determina con el ensayo de proteínas BRL Bradford.

### B. ENSAYO DE UNIÓN

Para la unión total, un volumen total de 50 µl de membranas adecuadamente diluidas (diluidas en tampón de ensayo que contenía Tris HCl 50 mM (pH 7,4), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y EDTA 1 mM; 5-50 µg de proteína) se añadieron a placas de microvaloración de 96 pocillos seguido por la adición de 100 µl de tampón de ensayo y 50 µl de agonista de GPR41 radiomarcado. Para la unión no específica, se añadieron 50 µl de tampón de ensayo en lugar de 100 µl y se añadieron 50 µl más de GPR41 10 µM frío antes de añadir 50 µl de agonista de GPR41 radiomarcado. Las placas a continuación se incubaron a temperatura ambiente durante 60-120 minutos. La reacción de unión se finalizó filtrando las placas de ensayo a través de una placa de filtración de Microplate Devices GF/C Unifilter con una placa cosechadora Brandell de 96 pocillos seguido por lavado con Tris HCl 50 mM frío, pH 7,4 que contenía NaCl al 0,9 %. Después, se precintó la parte inferior de las placas de filtración, se añadieron a cada pocillo 50 µl de Optiphase Supermix, se precintó la parte superior de las placas, y las placas se contaron en un contador de centelleo Trilux MicroBeta. Para los estudios de competición de compuestos, en lugar de añadir 100 µl de tampón de ensayo, se añadieron 100 µl del compuesto candidato adecuadamente diluido en los pocillos adecuados seguido por la adición de 50 µl de agonista de GPR41 radiomarcado.

### C. CÁLCULOS

Los compuestos candidatos se ensayaron inicialmente a 1 y a 0,1 µM y a continuación en un intervalo de concentraciones seleccionada de forma tal que la dosis intermedia causara un 50 % de inhibición en la unión del agonista de GPR41 (es decir, CI<sub>50</sub>). La unión específica en ausencia del compuesto candidato (B<sub>0</sub>) es la diferencia entre la unión total (B<sub>T</sub>) menos la unión no específica (NSB) y análogamente, la unión específica (en presencia del compuesto candidato) (B) es la diferencia entre la unión de desplazamiento (B<sub>d</sub>) menos la unión no específica (NSB). La CI<sub>50</sub> se determina a partir de la curva de respuesta a la inhibición, representación gráfica logit-log del % B/B<sub>0</sub> vs concentración de compuesto candidato.

K<sub>i</sub> se calcula por la transformación de Cheng y Prustoff:

$$K_i = CI_{50} / (1 + [L] / K_D)$$

donde [L] es la concentración del agonista de GPR41 radiomarcado utilizado en el ensayo y K<sub>d</sub> es la constante de disociación de un agonista de GPR41 radiomarcado determinado independientemente en las mismas condiciones de unión.

### Ejemplo 19

#### Modelo de diabetes en roedores

Se ha desarrollado un modelo de la diabetes tipo 2 en roedores asociado con la obesidad y la resistencia a la insulina. Los modelos genéticos tales como db/db y ob/ob [véase Diabetes (1982) 31:1-6] en ratones y fa/fa en ratas Zucker para comprender la patofisiología de la enfermedad y para ensayar compuestos terapéuticos candidatos [Diabetes (1983) 32:830-838; Annu Rep Sankyo Res Lab (1994) 46:1-57]. Los animales homocigóticos, ratones C57 BL/KsJ-db/db desarrollados por Jackson Laboratory son obesos, hiperglucémicos, hiperinsulinémicos y resistentes a la insulina [J Clin Invest (1990) 85:962-967], mientras que los heterocigóticos son normoglucémicos. En el modelo db/db, los ratones desarrollan progresivamente insulinoopenia con la edad, un rasgo habitualmente observado en las etapas finales de la diabetes de tipo 2 humana cuando los niveles de azúcar están insuficientemente controlados. Puesto que este modelo se parece a la diabetes de tipo 2 humana, los compuestos de la presente invención se ensayan para determinar sus actividades entre las que se incluyen, a título enunciativo, la disminución de la glucosa y los triglicéridos en plasma. Las ratas Zucker (fa/fa) son gravemente obesas, hiperinsulinémicas, y resistentes a la insulina [Coleman, Diabetes (1982) 31:1; E Shafir en Diabetes Mellitus, H Rifkin y D Porte, Jr, Eds [Elsevier Science Publishing Co, Nueva York, ed. 4, (1990), pp. 299-340]], y la mutación fa/fa puede ser el equivalente en ratas de la mutación db murina [Friedman y col, Cell (1992) 69:217-220; Truett y col, Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88:7806]. Los ratones Tubby (tub/tub) se caracterizan por su obesidad, resistencia moderada a la insulina e hiperinsulinemia sin hiperglicemia significativa [Coleman y col, Heredity (1990) 81:424].

La presente invención abarca el uso de moduladores de GPR41 para reducir la resistencia a la insulina y la hiperglucemia en todo o parte de los modelos de diabetes anteriores en roedores, en seres humanos con diabetes de tipo 2 u otros trastornos relacionados con la insulina o trastornos del metabolismo de los lípidos anteriormente descritos, o en modelos basados en otros mamíferos. Se pueden ensayar los niveles de glucosa e insulina en plasma, así como otros factores incluyendo, a título enunciativo, ácidos grasos libres y triglicéridos en plasma.

Ensayo *In Vivo* de la actividad antihiperglicémica de los moduladores de GPR41

Ratones diabéticos obesos genéticamente alterados (db/db) (machos, 7-9 semanas de edad) se alojaron (7-9 ratones/jaula) en condiciones normalizadas de laboratorio a 22 °C y humedad relativa del 50 %, y se mantuvieron con una dieta de pienso para roedores de Purina y agua a voluntad. Antes del tratamiento, se extrajo sangre de la vena de

la cola de cada animal, y se determinaron las concentraciones de glucosa en sangre con un sistema One Touch Basic Glucose Monitor (Lifescan). Se emplearon los ratones que mostraban valores de glucosa en plasma comprendidos entre 250 y 500 mg/dl. Cada grupo de tratamiento estuvo compuesto por siete ratones distribuidos de tal forma que los niveles de glucosa promedio eran equivalentes en cada grupo al principio del estudio. Los ratones db/db recibieron la dosis mediante microbombas osmóticas, insertadas con anestesia de isoflurano, para proporcionar los compuestos de la presente invención, solución salina, o un compuesto irrelevante a los ratones por vía subcutánea (s.c.). La muestra de sangre se extrajo de la vena de la cola posteriormente en intervalos y se analizó para determinar las concentraciones de glucosa en sangre. Las diferencias significativas entre grupos (comparación de los compuestos de interés con el tratamiento con suero) se evaluaron con la prueba de la t de Student.

Lo anterior se proporciona a modo ilustrativo y no de limitación. Otros modelos de roedores para la diabetes de tipo 2 ilustrativos se han descrito [Moller DE, Nature (2001) 414:821-7 y referencias citadas en el mismo; y en Reed MJ y col., Diabetes, Obesity and Metabolism (1999) 1:75-86 y referencias citadas en el mismo; cuya divulgación de cada uno de ellos se ha incorporado por referencia en su totalidad al presente documento.

## Ejemplo 20

### Modelo de aterosclerosis en ratón

Se ha demostrado que ratones deficientes en adiponectina generados por desactivación genética del gen de la adiponectina están predispuestos a la aterosclerosis y a ser resistentes a la insulina. Los ratos son también un modelo adecuado de la cardiopatía isquémica [Matsuda, M y col. J Biol Chem (2002) julio, y las referencias citadas en el mismo, cuya divulgación se ha incorporado por referencia en su totalidad al presente documento.

Ratones con la adiponectina desactivada genéticamente (7-9 semanas de edad) se alojaron (7-9 ratones/jaula) en condiciones normalizadas de laboratorio a 22°C y humedad relativa del 50 %. Los ratones db/db recibieron la dosis mediante microbombas osmóticas, insertadas con anestesia de isoflurano, para proporcionar los compuestos de la presente invención, solución salina, o un compuesto irrelevante a los ratones por vía subcutánea (s.c.). Se determinaron el engrosamiento de la neointima y la cardiopatía isquémica para diferentes grupos de ratones sacrificados en diferentes intervalos de tiempo. Las diferencias significativas entre grupos (comparación de los compuestos de interés con el tratamiento con suero) se evaluaron con la prueba de la t de Student.

El modelo de ratón anterior se proporciona a modo ilustrativo y no de limitación. A modo de ejemplo adicional, también se ha demostrado que los ratones deficientes en lipoproteína E están predispuestos a la aterosclerosis [Plump AS y col., Cell (1992) 71:343-353; cuya divulgación se ha incorporado por referencia en su totalidad al presente documento].

Otro modelo que se puede utilizar es el de la aterosclerosis inducida por la dieta en ratones C57BL/6J, una cepa endogámica conocida por ser susceptible a la lesión aterosclerótica inducida por la dieta. Este modelo es bien conocido de las personas normalmente expertas en la técnica [Kamada N y col., J Atheroscler Thromb (2001) 8:1-6; Garber DW y col., J Lipid Res (2001) 42:545-52; Smith JD y col., J Intern Med (1997) 242:99-109; cuya divulgación de cada uno de ellos se ha incorporado por referencia en su totalidad al presente documento.

## Ejemplo 21

### Modelo *In Vivo* en cerdo de colesterol HDL y aterosclerosis

La utilidad de un compuesto de interés como agente médico en la prevención o tratamiento de un cociente elevado de colesterol total/HDL-colesterol y las dolencias relacionadas con el mismo se demuestra, por ejemplo, por la actividad del compuesto para disminuir el cociente entre colesterol total y HDL-colesterol, para elevar el HDL-colesterol, o en la protección de la aterosclerosis en un modelo de cerdo *in vivo*. Los cerdos se utilizan como modelo animal debido a que reflejan la fisiología humana, especialmente el metabolismo de los lípidos, más precisamente que la mayoría del resto de modelos animales. Un modelo de cerdo *in vivo* ilustrativo no está previsto que sea limitante del presentado en el presente documento.

Cerdos Yorkshire albinos (peso corporal 25,5 ± 4 kg) se alimentaron con una dieta rica en ácidos grasos saturados (SFA-CHO) y dieta rica en colesterol durante 50 días (1 kg de pienso 35 kg-1 peso de cerdo), compuesto por pienso normalizado suplementado con colesterol al 2 % y sebo de ternera al 20 % [Royo T y col., European Journal of Clinical Investigation (2000) 30:843-52]. La relación entre ácidos grasos saturados y no saturados se modificó de 0,6 en el pienso normal de cerdo a 1,12 en la dieta SFA-CHO. Los animales se dividieron en dos grupos, un grupo (n = 8) se alimentó con la dieta SFA-CHO y se trató con placebo, y un grupo (n = 8) se alimentó con la dieta SFA-CHO y se trató con el modulador (3,0 mg kg-1). Los animales de control se alimentaron con pienso normalizado durante un periodo de 50 días. Se extrajeron muestras de sangre al principio (2 días después de la recepción de los animales), y 50 días después del inicio de la dieta. Se analizaron los lípidos de la sangre. Los animales se sacrificaron y se sometieron a necropsia.

Como alternativa, los análisis anteriores comprenden una pluralidad de grupos, cada uno de ellos tratados con una

dosis diferentes de compuesto de interés. Las dosis incluyen, por ejemplo: 0,1 mg kg<sup>-1</sup>, 0,3 mg kg<sup>-1</sup>, 1,0 mg kg<sup>-1</sup>, 3,0 mg kg<sup>-1</sup>, 10 mg kg<sup>-1</sup>, 30 mg kg<sup>-1</sup> y 100 mg kg<sup>-1</sup>. Como alternativa, los análisis anteriores se llevaron a cabo en una pluralidad de momentos temporales, por ejemplo, 10 semanas, 20 semanas, 30 semanas, 40 semanas, y 50 semanas.

5 HDL-Colesterol

10 La sangre se recogió en citrato de trisodio (3,8 %, 1:10). Se obtuvo el plasma tras centrifugación (1200 g 15 min) y se procesó inmediatamente. El colesterol total, HDL-colesterol, y LDL-colesterol se midieron en un analizador automático Kodak Ektachem DT System (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EE.UU.). Las muestras con valores de los parámetros por encima del intervalo se diluyeron con la solución suministrada por el fabricante y se volvieron a analizar. Se determinó el cociente entre colesterol total/HDL-colesterol. Se realizó la comparación del nivel de HDL-colesterol entre grupos. Se realizó la comparación del cociente entre colesterol total/HDL-colesterol entre grupos.

15 La elevación del HDL-colesterol o la disminución del cociente entre colesterol total/HDL-colesterol tras la administración del compuesto de interés se toma como una indicación de que el compuesto tiene la utilidad anteriormente citada.

Aterosclerosis

20 Las aortas torácica y abdominal se extrajeron intactas, se abrieron longitudinalmente a lo largo de la superficie ventral, y se fijaron con formalina tamponada neutra tras la excisión de muestras de los emplazamientos habituales de las aortas torácica y abdominal para su exploración histológica y determinación de la composición de lípidos y estudios de síntesis. Tras la fijación, las aortas completas se tiñeron con Sudan IV y se pincharon planas, y se tomaron imágenes con una cámara de TV conectada a un sistema de análisis de imagen informatizado (Image Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD) para determinar el porcentaje de la superficie aórtica implicado en lesiones ateroscleróticas [Gerrity RG y col, Diabetes (2001) 50:1654-65; Comhill JF y col, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (1985) 5:415-26; cuya divulgación se han incorporado por referencia en su totalidad al presente documento. Se realiza una comparación entre grupos del porcentaje de la superficie aórtica implicado en lesiones ateroscleróticas.

30 La reducción del porcentaje de la superficie aórtica implicado en lesiones ateroscleróticas tras la administración del compuesto de interés se toma como una indicación de que el compuesto tiene la utilidad anteriormente citada.

Ácidos grasos libres en plasma

35 Será fácilmente evidente para una persona normalmente experta en la técnica que el modelo de cerdo *in vivo* anterior se puede modificar con facilidad para resolver, sin limitación, la actividad de un compuesto para disminuir los niveles de ácidos grasos libres en plasma.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Arena Pharmaceuticals Inc. Leonard, James N. chu, zhi-Liang Bruce, Marc A. Boatman, P. Douglas

45 <120> GPR41 Y SUS MODULADORES PARA EL TRATAMIENTO DE LOS TRASTORNOS RELACIONADOS CON LA INSULINA.

<130> 94.WO1

<160> 15

50 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1041

55 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 498 972 T3

```

atggatacag gccccgacca gtctacttc tccggcaatc actggttcgt cttctcggtg      60
taccttctca ctttctcggg ggggctcccc ctcaacctgc tggccctggg ggtcttcgtg      120
ggcaagctgc agcgcgcgcc ggtggccgtg gacgtgctcc tgctcaacct gaccgcctcg      180
gacctgctcc tgctgctggt cctgcctttc cgcattggtg aggcagccaa tggcatgcac      240
tggccctcgc ctttcatect ctgcccactc tctggattca tcttcttcac caccatctat      300
ctcaccgccc tcttctcggc agctgtgagc attgaacgct tcctgagtgt ggcccaccca      360
ctgtggtaca agaccgggcc gaggctgggg caggcaggtc tggtgagtgt ggccctgctgg      420
ctgttggcct ctgctcactg cagcgtgggc tacgtcatag aattctcagg ggacatctcc      480
cacagccagg gcaccaatgg gacctgctac ctggagtcc ggaaggacca gctagccatc      540
ctcctgcccg tgcggctgga gatggctgtg gtctctttg tggccccgct gatcatcacc      600
agctactgct acagccgcct ggtgtggatc ctcggcagag ggggcagcca ccgccggcag      660
aggagggtgg cggggctggt ggcggccacg ctgctcaact tccttgtctg ctttgggccc      720
tacaacgtgt cccatgtcgt gggctatata tgcggtgaaa gcccgcatg gaggatctac      780
gtgacgcttc tcagcaccct gaactcctgt gtcgaccct ttgttacta cttctcctcc      840
tccgggttcc aagccgactt tcatgagctg ctgaggaggt tgtgtgggct ctggggccag      900
tggcagcagg agagcagcat ggagctgaag gagcagaagg gaggggagga gcagagagcg      960
gaccgaccag ctgaaagaaa gaccagtgaa cactcacagg gctgtggaac tgggtggccag     1020
gtggcctgtg ctgaaagcta g                                             1041

```

<210> 2  
 <211> 346  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

ES 2 498 972 T3

Met Asp Thr Gly Pro Asp Gln Ser Tyr Phe Ser Gly Asn His Trp Phe  
1 5 10 15

Val Phe Ser Val Tyr Leu Leu Thr Phe Leu Val Gly Leu Pro Leu Asn  
20 25 30

Leu Leu Ala Leu Val Val Phe Val Gly Lys Leu Gln Arg Arg Pro Val  
35 40 45

Ala Val Asp Val Leu Leu Leu Asn Leu Thr Ala Ser Asp Leu Leu Leu  
50 55 60

Leu Leu Phe Leu Pro Phe Arg Met Val Glu Ala Ala Asn Gly Met His  
65 70 75 80

Trp Pro Leu Pro Phe Ile Leu Cys Pro Leu Ser Gly Phe Ile Phe Phe  
85 90 95

Thr Thr Ile Tyr Leu Thr Ala Leu Phe Leu Ala Ala Val Ser Ile Glu  
100 105 110

Arg Phe Leu Ser Val Ala His Pro Leu Trp Tyr Lys Thr Arg Pro Arg  
115 120 125

Leu Gly Gln Ala Gly Leu Val Ser Val Ala Cys Trp Leu Leu Ala Ser  
130 135 140

Ala His Cys Ser Val Val Tyr Val Ile Glu Phe Ser Gly Asp Ile Ser  
145 150 155 160

His Ser Gln Gly Thr Asn Gly Thr Cys Tyr Leu Glu Phe Arg Lys Asp  
165 170 175

Gln Leu Ala Ile Leu Leu Pro Val Arg Leu Glu Met Ala Val Val Leu  
180 185 190

Phe Val Val Pro Leu Ile Ile Thr Ser Tyr Cys Tyr Ser Arg Leu Val  
195 200 205

Trp Ile Leu Gly Arg Gly Gly Ser His Arg Arg Gln Arg Arg Val Ala  
210 215 220

Gly Leu Leu Ala Ala Thr Leu Leu Asn Phe Leu Val Cys Phe Gly Pro  
225 230 235 240



<220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 6  
 5 ccgaagcaga cgaagaagat g 21  
  
 <210> 7  
 <211> 17  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> sonda  
 15 <400> 7  
  
 ttctgcagc cacactg 17  
 20 <210> 8  
 <211> 257  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> sonda  
  
 <400> 8  
  
 gtggggctga gggttacaca cagaggtggc accttgggtga tgctcgacact gggtgagggg 60  
 caggaaacca gggaggtagg caggaccacc tgcaggggag agcatgtgga gctatgggtg 120  
 tgggggtgtag gcagtgtaga cagcaatctt gcctgatggg taagagtctc ccagtgaggg 180  
 aacccaact ctcaacacat tcctctctgt ctcattagca tctgtgacca tggggacaag 240  
 30 cttctttctt ggcaatt 257  
  
 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 9  
  
 gtggggctga gggttaca 18  
  
 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 10  
  
 aattgccaag aaagaagc 18  
 55 <210> 11  
 <211> 6

<212> PTR  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> péptido  
  
 <400> 11  
  
**Thr Leu Glu Ser Ile Met**  
**1 5**  
 10 <210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> péptido  
  
 <400> 12  
  
  
**Glu Tyr Asn Leu Val**  
**1 5**  
 20 <210> 13  
 <211> 5  
 <212> PTR  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> péptido  
  
 <400> 13  
  
 30  
  
**Asp Cys Gly Leu Phe**  
**1 5**  
  
 <210> 14  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 40 <400> 14  
  
  
 gatcaagctt ccatggcgtg ctgcctgagc gaggag 36  
  
 <210> 15  
 <211> 53  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 50 <400> 15  
  
 gatcggatcc ttagaacagg ccgcagtcct tcaggttcag ctgcaggatg gtg 53

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar un compuesto estabilizador de la glucemia, que comprende:

- a) poner en contacto un compuesto candidato con GPR41, y  
 b) determinar si la funcionalidad de GPR41 queda modulada,

donde una modulación en la funcionalidad de GPR41 es indicativa de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia, dicho GPR41 tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC. ID N°:2 o una de sus variantes u ortólogos, donde dicha variante es una variante alélica, variante de corte y empalme o variante de sustitución conservativa de aminoácidos de GPR41.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha variante retiene la función de un polipéptido con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC. ID N°:2

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho GPR41 es humano.

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha determinación comprende un ensayo de segundo mensajero.

5. Un compuesto estabilizador de la glucemia identificado mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre los siguientes compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables:

- o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 4-((5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico,  
 (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 2-Metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y  
 o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho compuesto estabilizador de la glucemia es una agonista de GPR41.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un compuesto seleccionado entre los siguientes compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables:

- o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 (2,5-dicloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 4-furan-2-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 (4-cloro-fenil)-amida del ácido 4-furan-3-il-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(4-metilsulfanil-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidroquinolina-3-carboxílico, y  
 o-tolilamida del ácido 2-metil-4-(3-nitro-fenil)-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho compuesto estabilizador de la glucemia es un agonista o antagonista inverso de GPR41.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho compuesto estabilizador de la glucemia comprende un compuesto seleccionado entre los siguientes compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables:

- o-tolilamida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-4-trifluorometil-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 4-((5-bifenil-2-il-furan-2-il)-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 (2-cloro-fenil)-amida del ácido 2-metil-4-[5-(2-nitro-fenil)-furan-2-il]-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-(4-fenoxi-fenil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico,  
 o-tolilamida del ácido 2-metil-5-oxo-4-[5-(2-trifluorometoxi-fenil)-furan-2-il]-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico, y  
 o-tolilamida del ácido 4-[5-(2,5-dicloro-fenil)-furan-2-il]-2-metil-5-oxo-1,4,5,6,7,8-hexahidro-quinolina-3-carboxílico.

- 5 10. Un procedimiento para preparar una composición que comprende un compuesto estabilizador de la glucemia, incluyendo dicho procedimiento premezclar dicho compuesto con un vehículo, donde dicho compuesto es un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
11. Una composición farmacéutica que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
- 10 12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina.
- 15 14. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con la insulina.
- 20 15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en un procedimiento de tratamiento de la hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa o diabetes.
- 25 16. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipoglucemia, un tumor secretor de insulina o dependiente de insulina, resistencia a la insulina, tolerancia deteriorada a la glucosa o diabetes.
- 30 17. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la etapa b) comprende determinar si la funcionalidad de GPR41 está disminuida, donde una disminución en la funcionalidad de GPR41 es indicativo de que el compuesto candidato es un compuesto estabilizador de la glucemia.
- 35 18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 donde dicho compuesto estabilizador de la glucemia es capaz de aumentar la secreción de insulina.
19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.

# Expresión de la inmunotransferencia de GPR41 en el páncreas

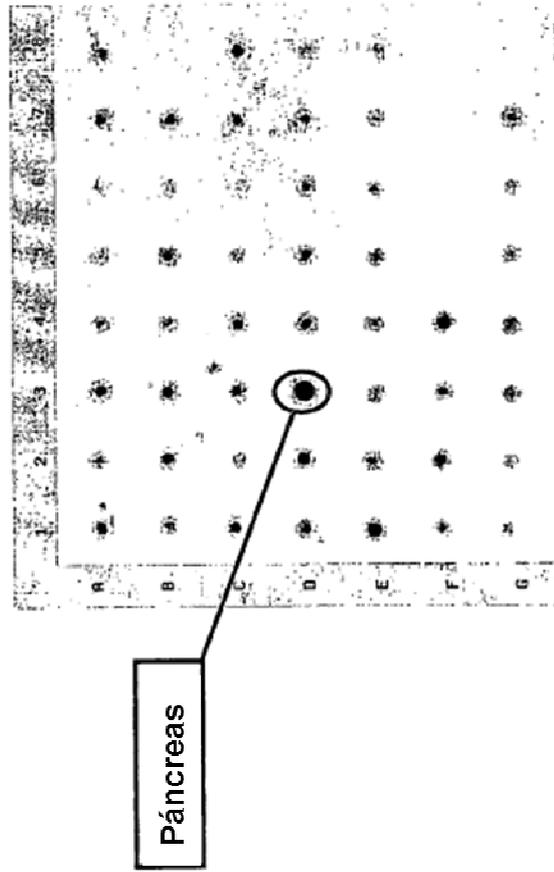
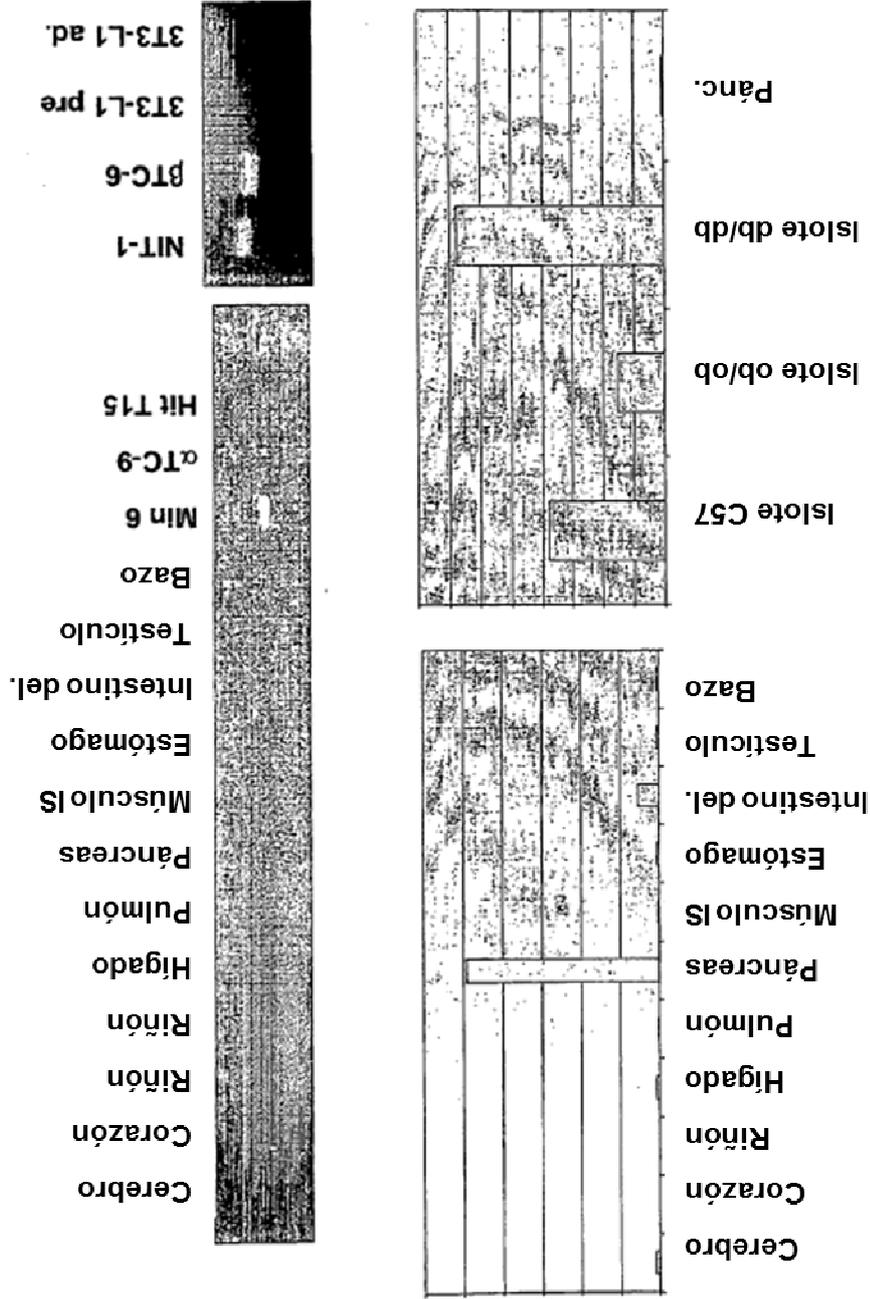


Figura 1

**Expresión de GPR41 en tejidos e islotes de ratón**



**Figura 2**

# Ensayo de protección de RNasa de GPR41

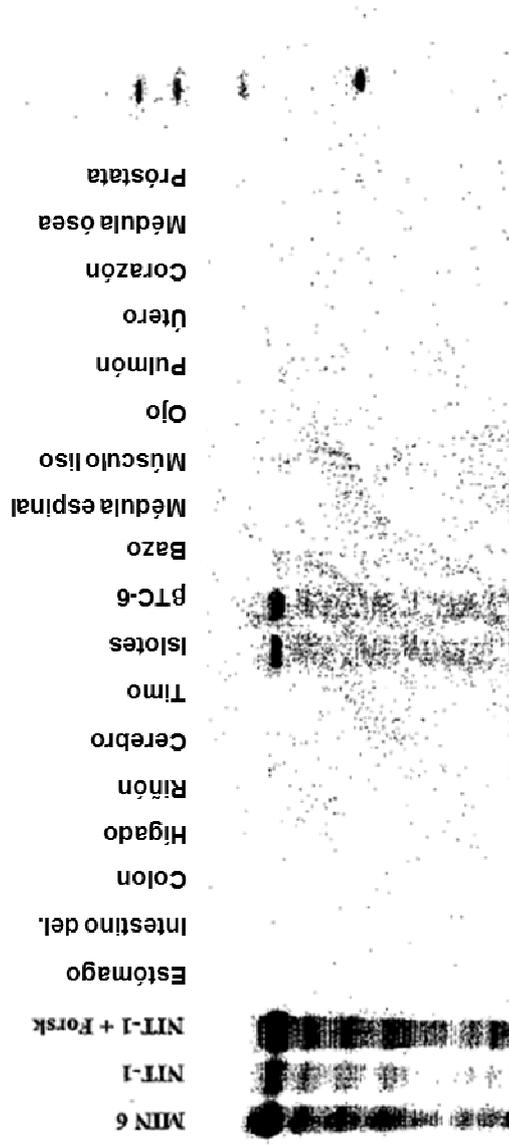


Figura 3

# GPR41 está unido a Gαi

Acoplamiento Gi: quimeras Gq/Gi

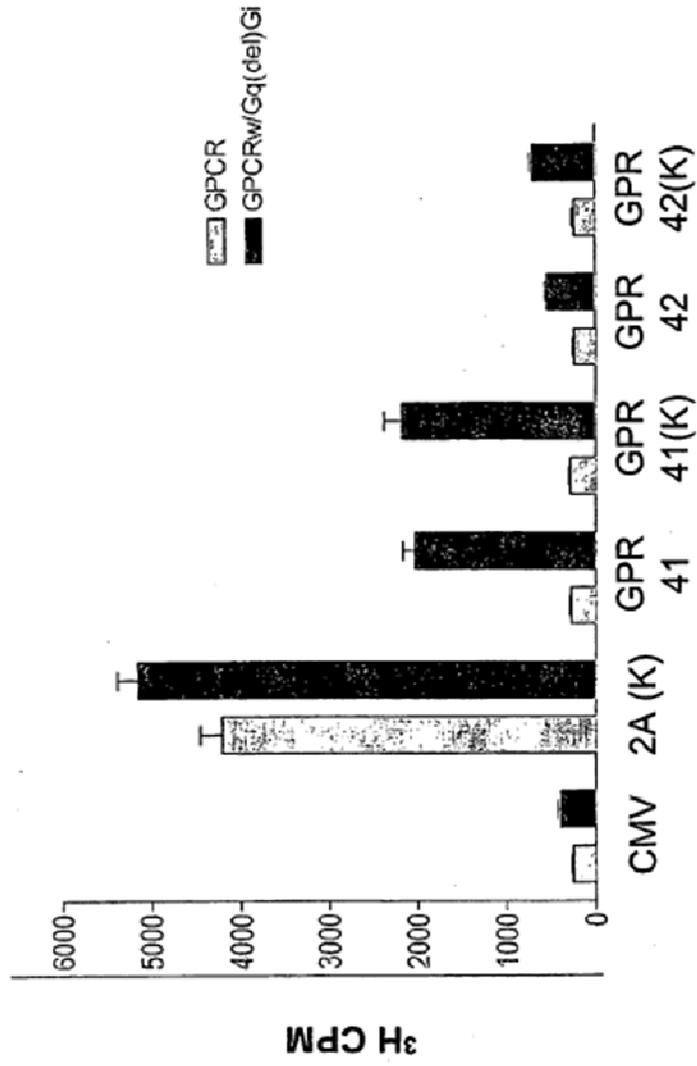


Figura 4

# GPR41 se acopla a G $\alpha$ 12/13

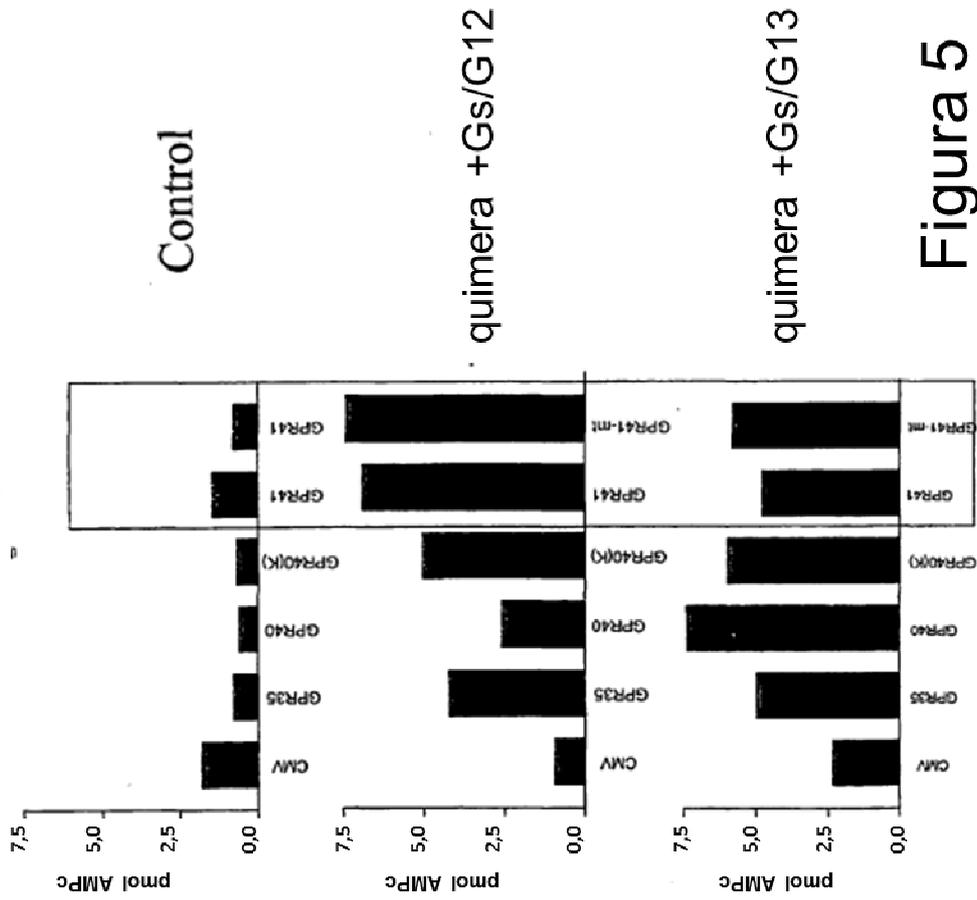


Figura 5

### Eficacia de los agonistas de GPR41 en células 293 transfectadas simultáneamente con Gq/Gi

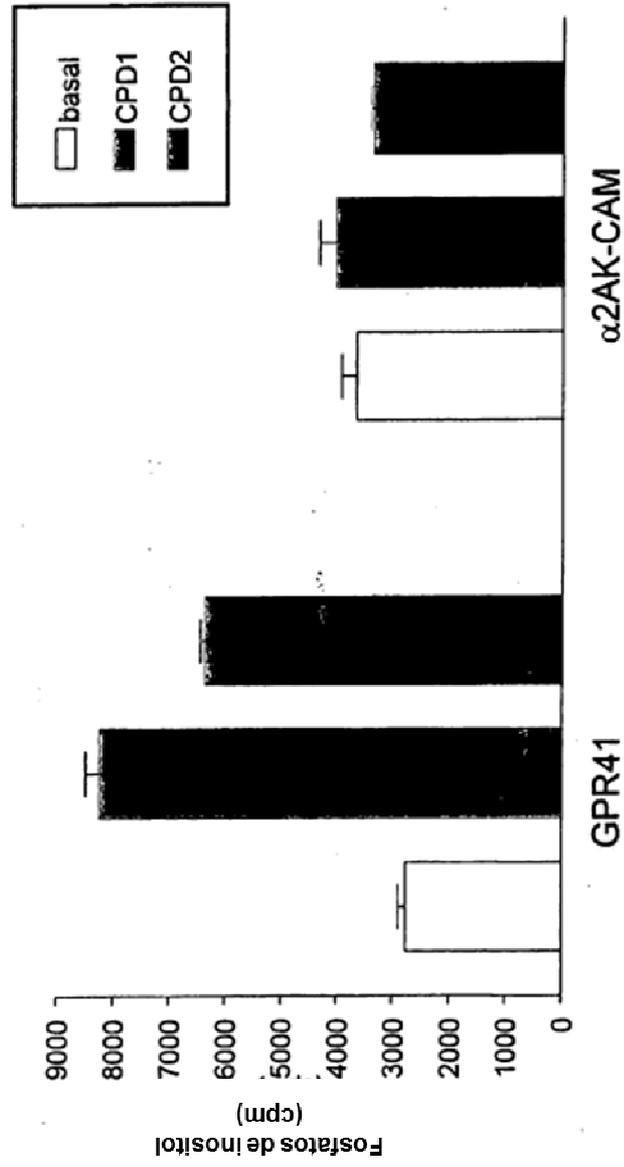


Figura 6

# El agonista de GPR41 inhibe la liberación de insulina en células de insulinoma MIN6

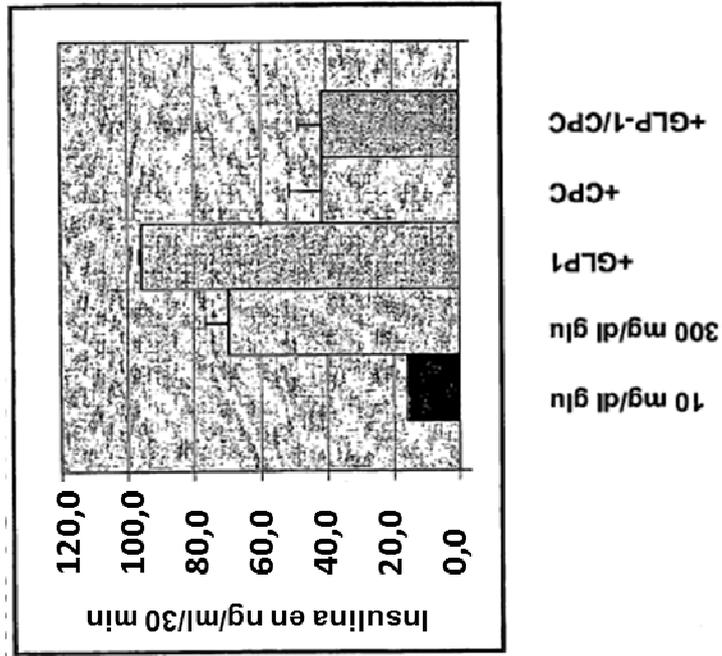
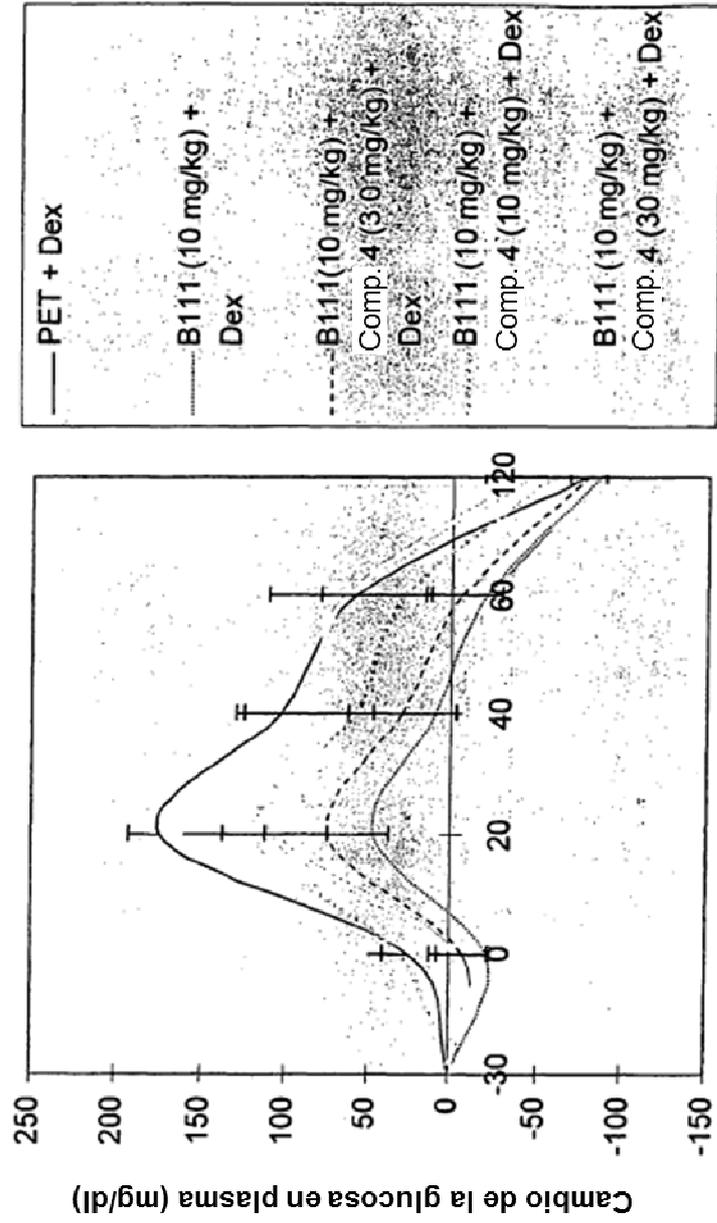


Figura 7

**El agonista de GPR41 en el ensayo oral de tolerancia a la glucosa (oGTT)**



**Figura 8**