



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

P.C.T.

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 **EXPEDIENTE No** **06-129578**

54 **TÍTULO** Métodos Relacionados con un Único
Polimorfismo Nucleotídico del Receptor
Acoplado a la proteína G, GPR40

51 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C12Q 1/68

71 **SOLICITANTE** Pfizer Products Inc.

DOMICILIO EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT
06340 E U A

74 **APODERADO** Carlos R. Duarte

22 **BOGOTÁ, D. C.,** 27 de Diciembre de 2006

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

30-01-2007

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: PFIZER PRODUCTS INCDirección: Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340 E.U.A.Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE
Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓNC.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olarteraisbeck.com**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295**INVENTOR (ES)**
(72)Nombre: POULABI BANERJEE / KAREN LYNNE HOUSEKNECHTDirección: Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, E.U.A.Nacionalidad o Domicilio: INDIA y ESTADOUNIDENSE

3

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/001962Fecha Junio 20, 2005Publicación Internacional No. WO 2006/006062Fecha Enero 19, 2006

4

Título (54) METODOS RELACIONADOS CON UN UNICO POLIMORFISMO
NUCLEOTIDICO DEL RECEPTOR ACOPLADO A LA PROTEINA G, GPR40**Clasificación Internacional (51)** C12Q 1/68.**Prioridad**

SI

☒

N

☐**(33) País de Origen**USUS**(32) Fecha**Junio 30, 2004Enero 28, 2005**(31) Número de Solicitud**60/584.68611/046.020

5

Comprobante de pago No. 06 -97.317**Fecha** Diciembre 19, 2006

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 06-051.744

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☒

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-129578- -00000-0000
Feb 2006-12-27 16:54:20 Dep. 3020 NUECREACIONES
Fra. 11 PATENTEYS
Sre: 379 FASENACIONALI
Act411 PRESENTACION Folio: 143

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 97,317
FECHA : DICIEMBRE 19 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISBERG	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	41778697	18/12/2006	4,286,000.

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE GOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

SUM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por PFIZER PRODUCTS, INC., a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por Grover F. Fuller, Jr. el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de Grover F. Fuller, Jr, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por Susan Z. Killian, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mi el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. G. A. T. E.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No 0138 del 11/2/2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. E. 773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES / INGLES - ESPAÑOL
REGISTRACION No. 0130 DE FEBRERO 11, 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
El presente documento público
2. Fue firmado por: Norman Goodman
3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado
4. Lleva el sello del Condado de Nueva York
Se certificó:
5. En Nueva York, Nueva York
6. El 22 de noviembre de 2005
7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York
8. Bajo el Número NYC-10404952A
9. Aparece Sello del Estado de Nueva York
10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C.C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
Nº 5001 CONTADO 11 DE DICIEMBRE DE 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

- 7
1. Country: **United States of America**
This public document
 2. has been signed by **Norman Goodman**
 3. acting in the capacity of **County Clerk**
 4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro
Zayde Chirín
Zaava David
Jacqueline Chaparro
Jose Luis Londoño
Camilo Álvarez
Felipe Mendez
Camilo Rodríguez
Santiago Parlo

Of Counsel
Guillermo Chirín
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

PFIZER PRODUCTS INC.,

By:

Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In-Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

City/Country/Ciudad,País: New York, NY USA

State of New York
County of New York, } ss:

NEW YORK COUNTY CLERK

467518

Form 1

I, IRMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal, DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

Seixen Z. Kellian

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

FILED PAID \$3.00

1914 DEC 2 2015

Irman Goodman

County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street

City New York

State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of PFIZER PRODUCTS INC.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That PFIZER PRODUCTS INC, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

4. Que con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

NOTARY PUBLIC (Signature):

Shawn E. Kilham



SHAWN E. KILHAM
Notary Public, State of New York
No. 01K6116521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
Shawn E. Kilham
Notary Public
Nov. 2nd 2005

11

Sébase que Yo, STEPHEN DAVID FINN, de 31 Amersham Hill Drive Hight Wycombe Buckinghamshire Reino Unido un Notario Público debidamente autorizado.

**CERTIFICO UNICAMENTE QUE EL DOCUMENTO ANEXADO AL PRESENTE
LLAMADO:**

CESION, firmada por POULABI BANERJEE y KAREN LYNNE HOUSEKNECHT

Ha sido presentado ante mi por los Servicios Consulares de Blair en nombre de Pfizer con base en un documento original con firmas debidamente autenticas.

Firmado y sellado en 31 Amersham Hill Drive según lo dicho anteriormente, el día de hoy 03 de noviembre de 2006.

[Firmado y sellado]

**STEPHEN FINN
Notario Público**

Apostilla

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público ha sido firmado por: Stephen David Finn
3. obrando en su condición de Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

Certificado

5. en Londres
6. el 06 de noviembre de 2006
7. por: Secretario Principal de Estado de su Majestad para Asuntos Extranjeros
8. No. H191338
9. Sello / Estampilla
[Sellado]
10. Firma: Christopher Jones
[Firmado]

PC26139A

CO-1

CESIÓN

A cambio de una contraprestación de valor, la cual me (nos) pagó PFIZER PRODUCTS INC., una sociedad de responsabilidad limitada constituida y existente bajo las leyes del Estado de Connecticut, Estados Unidos de América, cuya dirección de correos es Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América, por el presente le vendo y le cedo (le vendemos y le cedemos) a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.** la totalidad de mis (nuestros) derechos, el título y el interés que tengo (tenemos) en mi (nuestro) invento de una cierta mejora, nueva y útil, del **"METODOS RELACIONADOS CON UN UNICO POLIMORFISMO NUCLEOTIDICO DEL RECEPTOR ACOPLADO A LA PR TEINA G, GPR40.**, en la medida en que esta cesión concierna a la República de Colombia, tal y como se describe plenamente el mismo en las especificaciones, y yo (nosotros) autorizo (autorizamos) y le solicito (solicitamos) por el presente a la Oficina de Patentes de Colombia que le expida dicha patente a la citada **PFIZER PRODUCTS INC.** de conformidad con la presente cesión.

En fe de lo cual firmamos el presente el día de hoy.

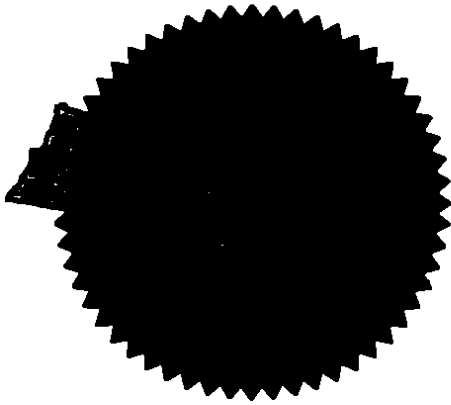
New York, USA 19 de 2006 (Fdo) Poulabi BANERJEE

Lugar, fecha y firma – Poulabi BANERJEE

(Fdo) Karen Lynne HOUSEKNECHT, 27 de octubre de 2006, Groton CT, USA

Lugar, fecha y firma – Karen Lynne HOUSEKNECHT

06/260 14



BE IT KNOWN that I, STEPHEN DAVID FINN of 31 Amersham Hill Drive
High Wycombe Buckinghamshire United Kingdom a duly authorised Notary
Public

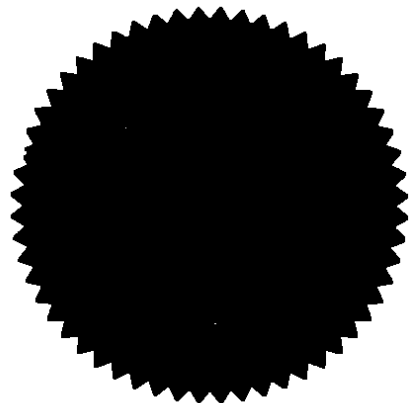
CERTIFY ONLY that the document annexed hereto, namely:

**ASSIGNMENT signed by POULABI BANERJEE and
KAREN LYNNE HOUSEKNECHT**

has been presented before me by Blair Consular Services on behalf of Pfizer
on the basis that it is an authentic duly signed original document

SIGNED and sealed at 31 Amersham Hill Drive aforesaid on 3rd November
2006

Stephen Finn
Notary Public



5793

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by Stephen David Finn
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres
6. the/le 06 November 2006
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **H191338**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: Christopher Jones



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER PRODUCTS INC.** a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER PRODUCTS INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **METHODS RELATED TO A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF THE G PROTEIN COUPLED RECEPTOR, GPR40** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER PRODUCTS INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

NEW YORK, USA OCTOBER 19th 2006 Poulabi Banerji
Place, date and signature - Poulabi BANERJEE

Karen Lynne Houseknecht
Place, date and signature - Karen Lynne HOUSEKNECHT



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 January 2006 (19.01.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/006062 A1

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68

(21) International Application Number:
PCT/IB2005/001962

(22) International Filing Date: 30 June 2005 (30.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/584,686 30 June 2004 (30.06.2004) US
11/046,030 28 January 2005 (28.01.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER
PRODUCTS INC. [US/US]; Eastern Point Road, Groton,
CT 06340 (US).

(72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): BANERJEE,
Poulabi [IN/US]; Pfizer Global Research & Development,
Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US). HOUSE-
KNECHT, Karen, Lynne [US/US]; Pfizer Global
Research & Development, Eastern Point Road, Groton,
CT 06340 (US).

(74) Agents: FULLER, Grover, F., Jr. et al.; c/o
LAWRENCE, Jackie, Pfizer Inc., MS8260-1615, Eastern
Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BE, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2006/006062 A1

(54) Title: METHODS RELATED TO A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF THE G PROTEIN COUPLED RECP-
TOR, GPR40

(57) Abstract: This invention relates to genotyping methods, methods of treatment, diagnostic tests and methods of characterizing
an agent, related to a single nucleotide polymorphism of the GPR40 gene.

**METHODS RELATED TO A SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM
OF THE G PROTEIN COUPLED RECEPTOR, GPR40**

FIELD OF THE INVENTION

5 This invention relates to genotyping methods, methods of treatment, diagnostic tests and kits and methods of characterizing an agent, related to a single nucleotide polymorphism of the GPR40 gene.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Diabetes is a serious and sometimes fatal disease that affects over 17 million Americans and 151 million people worldwide. Gadsby (2002). Diabetes results from the body's failure to produce or properly respond to insulin. Glucose is the major substrate that regulates insulin secretion but other nutrients like free fatty acids (FFA) and amino acids can modify insulin secretion. Haber et al. (2002).

15 There are two major types of diabetes. In Type I diabetes, insulin producing pancreatic β -cells are destroyed by the body's own immune system, leading to insulin deficiency. Type II diabetes results from the loss of sensitivity by the cells of the body to the action of insulin and the inability of the pancreas to release insulin appropriately. The incidence of Type II diabetes is increasing, and, in the U.S., has become especially prevalent in certain at risk populations. Gadsby (2002).

20 Metabolic syndrome is a clustering of metabolic conditions that increases the risk for developing diabetes and cardiovascular disease. Park et al. (2003). Conditions including obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and hypertension have been reported as being key components of metabolic syndrome. Reilly and Rader (2003); Park et al. (2003); Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001).

25 Obesity has been identified as a core factor contributing to metabolic syndrome. It has been proposed that a reduction in excess body weight would minimize the risks associated with metabolic syndrome. Shirai (2004).

30 The G-protein coupled receptors (GPCRs) are a superfamily of membrane proteins characterized by the presence of seven transmembrane α -helix segments (designated TM1 to TM7) connecting alternating intracellular and extracellular loops. Gether (2000). GPCRs mediate signaling between signal molecules, such as hormones, neurotransmitters and local mediators, and intracellular enzymes, ion channels and transporters. See Johnson and DhanaSekaran (1989).

Sawzdargo et al. (1997) disclose the identification of the GPCR gene, GPR40, localized on chromosome 19q13.1, encoding a 300 amino acid protein and identified by GenBank® accession number AF024687.

Haga et al. (2002) disclose 190,562 genetic variations of the human genome, including a single nucleotide polymorphism of the GPR40 gene in which nucleotide 632 of the coding sequence (corresponding to nucleotide 642 in the sequence of GenBank accession number AF024687) may be either guanine (G) or adenine (A), such that amino acid 211 is either arginine or histidine. This single nucleotide polymorphism is identified in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) dbSNP database as accession number rs2301151.

International Patent Application Publication No. WO 02/057783 and Briscoe et al. (2003) disclose that GPR40 is specifically expressed in pancreatic β -cells as well as in brain of the human, mouse and rat. Furthermore, WO 02/057783 and Briscoe et al. identify medium and long chain saturated and unsaturated fatty acid ligands of GPR40 from experiments measuring calcium ion concentration.

Kotarsky et al. (2003) disclose that GPR40 is activated, not only by a range of fatty acids, but also by antidiabetic thiazolidinedione drugs, as measured by a reporter system linked to the GPR40 receptor.

Itoh et al. (2003) disclose that binding and activation of GPR40 by free fatty acids increases insulin secretion.

International Patent Application Publication No. WO 04/072650 disclose nucleic acid sequences and amino acid sequences of human GPR40 and its regulation for the treatment of hematological diseases, disorders of the peripheral and central nervous system, gastrointestinal diseases, respiratory diseases, metabolic diseases, cancer, cardiovascular diseases, and urological diseases in mammals.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates, in part, to genotyping methods, comprising determining the amino acid that is encoded by the GPR40 gene of a human subject at amino acid number 211. In a preferred embodiment, the amino acid encoded at amino acid number 211 of both alleles of the GPR40 gene is determined. In another preferred embodiment, said genotyping methods involve determining whether said amino acid number 211 is other than histidine. In a further preferred embodiment, said genotyping methods involve determining whether said amino acid number 211 is arginine. In an additional preferred embodiment, said genotyping methods involve determining whether said amino acid number 211 is histidine. In a still further

preferred embodiment, said genotyping methods comprise, isolating nucleic acid from a human subject, amplifying a contiguous sequence of said nucleic acid, wherein said contiguous sequence comprises the nucleotides of GPR40 that encode amino acid number 211, or the complementary sequence thereof, treating
5 contiguous sequence with a nucleotide probe that enables determination of the amino acid encoded at amino acid number 211 of the GPR40 gene of said subject; and determining whether said probe hybridizes to said contiguous sequence under conditions of high stringency. In a preferred embodiment, said probe consists of a contiguous portion of a nucleotide sequence of SEQ. ID. NO: 9 or of SEQ. ID. NO: 10
10 having a length of about 13 to about 35 nucleotides, linked to a detectable label, and including the nucleotides encoding amino acid 211, or the complementary nucleotide sequence thereof.

A further aspect of the invention provides methods of treatment, comprising, determining the amino acid that is encoded by the GPR40 gene of a human subject
15 at amino acid number 211 and treating said subject with a therapeutically effective amount of an Agent for treatment or prevention of a disease or pathological condition mediated by having at least one allele, and preferably both alleles, of the GPR40 gene wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine, preferably arginine. In a preferred embodiment, said Agent is selected from insulin, an insulin
20 secretion stimulating sulfonylurea compound, a glycogen phosphorylase inhibitor, a biguanide hepatic glucose output inhibitor, an alpha-glucosidase inhibitor, a protein tyrosine phosphatase-1B inhibitor, a dipeptidyl peptidase IV inhibitor, a glycogen synthase kinase-3 beta inhibitor, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, a glucagon receptor antagonist, a selective serotonin reuptake inhibitor, a 3-
25 hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, a gamma-aminobutyric acid agonist, an angiotensin converting enzyme inhibitor, an angiotensin-II receptor antagonist, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, a sorbitol dehydrogenase inhibitor and an aldose reductase inhibitor, a pharmaceutically acceptable prodrug thereof or pharmaceutically acceptable salt thereof. In another preferred embodiment, said
30 Agent is an anti-obesity agent, preferably selected from an apolipoprotein-B secretion/microsomal triglyceride transfer protein inhibitor, an 11 β -hydroxy steroid dehydrogenase-1 inhibitor, a peptide YY₃₋₃₆, an analog of a peptide YY₃₋₃₆, a cannabinoid antagonist, an MCR-4 agonist, a cholecystokinin-A agonist, a monoamine reuptake inhibitor, a sympathomimetic agents, a β_2 adrenergic receptor
35 agonist, a dopamine agonist, a melanocyte-stimulating hormone receptor analog, a 5HT_{2c} agonist, a melanin concentrating hormone antagonist, leptin, a leptin analog,

a leptin receptor agonist, a galanin antagonist, a lipase inhibitor, an anorectic agent, a neuropeptide-Y receptor antagonist, a thyromimetic agent, dehydroepiandrosterone, an analog of dehydroepiandrosterone, a glucocorticoid receptor agonist, a glucocorticoid receptor antagonist, an orexin receptor antagonist, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, a ciliary neurotrophic factor, a human agouti-related protein, a ghrelin receptor antagonist, a histamine 3 receptor antagonist, a histamine 3 receptor inverse agonist and a neuromedin U receptor agonist.

Another aspect of the invention relates to kits, comprising a nucleotide probe that enables determination of the amino acid encoded at amino acid number 211 of the GPR40 gene of a human subject. In a preferred embodiment, said probe enables determination whether amino acid number 211 of said GPR40 gene is histidine. In another embodiment, said probe enables determination whether amino acid number 211 of said GPR40 gene is other than histidine, preferably arginine. In a further preferred embodiment, said probe consists of a contiguous portion of a nucleotide sequence of SEQ. ID. NO: 9 or of SEQ. ID. NO: 10 having a length of about 13 to about 35 nucleotides, linked to a detectable label, and including the nucleotides encoding amino acid 211, or the complementary nucleotide sequence thereof. In an additional preferred embodiment, said kits further comprise either: a first polymerase chain reaction nucleotide primer that is complementary to a nucleotide sequence that is downstream from the nucleotides encoding amino acid 211 of said GPR40 gene and a second polymerase chain reaction primer that is complementary to a nucleotide sequence that is upstream from the nucleotides encoding said amino acid 211; or, a first primer that is complementary to a nucleotide sequence that is upstream from the nucleotides encoding said amino acid 211 and a second polymerase chain reaction primer that is complementary to a nucleotide sequence that is downstream from the nucleotides encoding said amino acid 211. In another preferred embodiment said kits further comprise a container.

A further aspect of the invention relates to methods of characterizing an Agent, comprising measuring the competitive inhibition by a test Agent of binding of a GPR40 ligand to a first human GPR40 receptor wherein amino acid number 211 is histidine and measuring the competitive inhibition by said compound of binding of a GPR40 ligand to a second human GPR40 receptor wherein amino acid number 211 is other than histidine. In a preferred embodiment, amino acid number 211 of said second receptor is arginine. In a further preferred embodiment, the methods further comprise comparing the competitive inhibition of binding by said compound of said first receptor and said second receptor.

An additional aspect of the invention relates to methods of characterizing an Agent, comprising, measuring the activation by a test Agent of a first human GPR40 receptor wherein amino acid number 211 is histidine and measuring the activation by a test Agent of a second human GPR40 receptor wherein amino acid number 211 is other than histidine. In a preferred embodiment, the amino acid number 211 of said second receptor is arginine. In a further preferred embodiment, said methods further comprise comparing the activation by said compound of said first receptor and said second receptor.

Another aspect of the invention provides methods of characterizing an Agent, comprising measuring the inhibition by a test Agent of activation of a first human GPR40 receptor by an activator of GPR40, wherein amino acid number 211 of said first receptor is histidine and measuring the inhibition by a test Agent of activation of a second human GPR40 receptor by an activator of GPR40, wherein amino acid number 211 of said second receptor is other than histidine, preferably, arginine. In a further preferred embodiment, said methods further comprise comparing the inhibition of activation by said compound of said first receptor and said second receptor.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 illustrates the activation of GPR40 by thiazolidinedione compounds as measured by intracellular calcium ion release in GPR40 expressing HEK 293 cells as compared to HEK 293 cells that do not express GPR40.

Figure 2 shows a comparison between the activation by thiazolidinedione compounds of GPR40 having histidine versus arginine at amino acid 211 as measured by intracellular calcium ion release in GPR40 expressing HEK 293 cells.

Figure 3 shows logistic regression curves (solid lines) with 95% confidence limits (dotted lines) and individual data points for each genotype of GPR40 in a population of 2465 subjects (1332 male and 857 female) comparing body mass index to the likelihood of having diabetes. The data points at the top of the plot indicate the body mass index of individuals with diabetes. The data points at the bottom of the plot indicate the body mass index of individuals who do not have diabetes.

Figure 4 shows a restriction map of the expression vector used to prepare GPR40 expressing HEK 293 cells.

Figure 5 shows nucleotide and amino acid sequences (SEQ. ID. NO:1 and 2 respectively) that encodes human GPR40 wherein the nucleotides that encode amino acid number 211 and amino acid number 211 as arginine are highlighted.

Figure 6 shows nucleotide and amino acid sequences (SEQ. ID. NO:3 and 4 respectively) that encodes human GPR40 wherein the nucleotides that encode amino acid number 211 and amino acid number 211 as histidine are highlighted.

Figure 7 shows the sequences of PCR primers and PCR probes that may be used to amplify and detect sequences containing the GPR40 alleles. Figure 7 also shows nucleotide sequences encoding amino acid number 211 as either histidine (SEQ. ID. NO: 9) or arginine (SEQ. ID. NO: 10).

Figure 8 shows the sequence of an expression vector construct containing a GPR40 allele that encodes histidine at amino acid number 211.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The terms used herein have their usual meaning in the art. However, to even further clarify the present invention and for convenience, the meaning of certain terms and phrases employed in the specification, including the examples and appendant claims are provided below.

The terms "Agent(s)" means substances, including peptides, and compounds for treatment or prevention of a disease or pathological condition that is mediated by having at least one allele, preferably both alleles, of the GPR40 gene wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine, preferably arginine, as further described herein.

The term "amino acid number 211" with respect to the GPR40 gene refers to amino acid residue number 211 in the sequence of GenBank accession number AF024687, also shown in SEQ. ID. Nos. 2 and 4.

The term "conditions of high stringency" means wash conditions of 68°C in the presence of about 0.2 x SSC and about 0.1% SDS, for 1 hour. Useful variations on these wash conditions will be readily apparent to those of ordinary skill in the art. Generally, stringency of hybridization is expressed, in part, with reference to the temperature under which the wash step is carried out. Generally, such wash temperatures are selected to be about 5 °C to 20 °C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. An equation for calculating T_m and conditions for nucleic acid hybridization are well known and can be found in Sambrook (1989), at see volume 2, chapter 9.

The term "diabetes" means diabetes mellitus as understood by those of skill in the art. The term includes Type I diabetes mellitus, also known as insulin

dependent diabetes mellitus (IDDM), and Type II diabetes mellitus, also known as non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). The World Health Organization (W.H.O.) has suggested criteria for diagnosing diabetes mellitus (W.H.O. 1980/85 Technical Report Series No. 646/727). Diabetes has also been characterized by the
 5 National Diabetes Data Group (see National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance, Diabetes, 28:1039-1044, 1979). However, more recently, guidelines have been set forth, for example by the American Diabetes Association, to enable diagnosis of Type I and Type II diabetes (see, for example, ADA (2004)).

10 The term "therapeutically effective amount" means an amount of an agent that (i) treats or prevents a particular disease, condition or disorder; (ii) attenuates, ameliorates or eliminates one or more symptoms of a particular disease, condition or disorder; or (iii) prevents or delays the onset of one or more symptoms of a particular disease, condition or disorder. A therapeutically effective amount can be determined
 15 by one of ordinary skill in the art, based upon the present disclosure, on an individual basis and will be based, at least in part, on considerations of the species of the subject, the size of the subject, the type of delivery system used, and the type of administration relative to the progression of the disease.

The expression "pharmaceutically acceptable salts" includes both
 20 pharmaceutically acceptable acid addition salts and pharmaceutically acceptable cationic salts, where appropriate. Pharmaceutically acceptable cationic salts include, but are not limited to, salts such as the alkali metal salts, (e.g., sodium and potassium), alkaline earth metal salts (e.g., calcium and magnesium), aluminum salts, ammonium salts, and salts with organic amines such as benzathine (N,N'-dibenzylethylenediamine), choline, diethanolamine, ethylenediamine, meglumine (N-methylglucamine), benethamine (N-benzylphenethylamine), diethylamine, piperazine, tromethamine (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) and procaine. The expression "pharmaceutically-acceptable acid addition salts" is intended to include, but is not limited to, such salts as the hydrochloride, hydrobromide, sulfate, hydrogen
 30 sulfate, phosphate, hydrogen phosphate, dihydrogenphosphate, acetate, succinate, citrate, methanesulfonate (mesylate) and p-toluenesulfonate (tosylate) salts. A particularly preferred salt is sodium salt. Descriptions of compounds appearing herein which include the phrase "prodrugs thereof or pharmaceutically acceptable salts thereof" or a substantially similar phrase are meant to include both
 35 pharmaceutically acceptable salts of the applicable compounds as well as pharmaceutically acceptable salts of such prodrugs.

The term "prodrug" means a compound that is transformed in vivo to yield a compound of the present invention. The transformation may occur by various mechanisms, such as through hydrolysis in blood. A discussion of the use of prodrugs is provided by Higuchi and Stella (1987). For example, when a compound of the present invention contains a carboxylic acid functional group, a prodrug can comprise an ester formed by the replacement of the hydrogen atom of the acid group with a group such as (C1-C8)alkyl, (C2-C12)alkanoyloxymethyl, 1-(alkanoyloxy)ethyl having from 4 to 9 carbon atoms, 1-methyl-1-(alkanoyloxy)-ethyl having from 5 to 10 carbon atoms, alkoxycarbonyloxymethyl having from 3 to 6 carbon atoms, 1-(alkoxycarbonyloxy)ethyl having from 4 to 7 carbon atoms, 1-methyl-1-(alkoxycarbonyloxy)ethyl having from 5 to 8 carbon atoms, N-(alkoxycarbonyl)aminomethyl having from 3 to 9 carbon atoms, 1-(N-(alkoxycarbonyl)amino)ethyl having from 4 to 10 carbon atoms, 3-phthalidyl, 4-crotonolactonyl, gamma-butyrolacton-4-yl, di-N,N-(C1-C2)alkylamino(C2-C3)alkyl (such as b-dimethylaminoethyl), carbamoyl-(C1-C2)alkyl, N,N-di(C1-C2)alkylcarbamoyl-(C1-C2)alkyl and piperidino-, pyrrolidino- or morpholino(C2-C3)alkyl. Similarly, when a compound of the present invention comprises an alcohol functional group, a prodrug can be formed by the replacement of the hydrogen atom of the alcohol group with a group such as (C1-C8)alkanoyloxymethyl, 1-(C1-C8)alkanoyloxy)ethyl, 1-methyl-1-(C1-C8)alkanoyloxy)ethyl, (C1-C8)alkoxycarbonyloxymethyl, N-(C1-C8)alkoxycarbonylaminomethyl, succinoyl, (C1-C8)alkanoyl, alpha-amino(C1-C4)alkanoyl, arylacyl and alpha-aminoacyl, or alpha-aminoacyl-alpha-aminoacyl, where each alpha-aminoacyl group is independently selected from the naturally occurring L-amino acids, P(O)(OH)2, -P(O)(O(C1-C8)alkyl)2 or glycosyl (the radical resulting from the removal of a hydroxyl group of the hemiacetal form of a carbohydrate). When a compound of the present invention comprises an amine functional group, a prodrug can be formed by the replacement of a hydrogen atom in the amine group with a group such as RX-carbonyl, RXO-carbonyl, NRXR'-carbonyl where RX and RX' are each independently (C1-C10)alkyl, (C3-C7)cycloalkyl, benzyl, or RX-carbonyl is a natural alpha-aminoacyl or natural alpha-aminoacyl-natural alpha-aminoacyl, -C(OH)C(O)OYX wherein YX is H, (C1-C8)alkyl or benzyl), -C(OYX0) YX1 wherein YX0 is (C1-C4) alkyl and YX1 is (C1-C8)alkyl, carboxy(C1-C8)alkyl, amino(C1-C4)alkyl or mono-N- or di-N,N-(C1-C8)alkylaminoalkyl, -C(YX2) YX3 wherein YX2 is H or methyl and YX3 is mono-N- or di-N,N-(C1-C8)alkylamino, morpholino, piperidin-1-yl or pyrrolidin-1-yl.

"Nucleotide sequence" and "polynucleotide" means DNA or RNA, whether in single-stranded or double-stranded form. The term "complementary nucleotide sequence" means a nucleotide sequence that anneals (binds) to a another nucleotide sequence according to the pairing of a guanine nucleotide (G) with a cytidine nucleotide (C) and adenosine nucleotide (A) with thymidine nucleotide (T), except in RNA where a T is replaced with a uridine nucleotide (U) so that U binds with A.

The abbreviations used herein have their usual meaning in the art. However, to even further clarify the present invention, for convenience, the meaning of certain abbreviations are provided as follows: "°C" means degrees centigrade; "CO₂" means carbon dioxide; "DMEM" means Dulbecco's modified Eagle's medium; "DNA" means deoxyribonucleic acid; "FBS" means fetal bovine serum; "g" means gram; "HEPES" means 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; "kg" means kilogram; "mg" means milligram; "mL" means milliliter; "mM" means millimolar; "μ" means microliter; "μM" means micromolar; "ng" means nanogram; "nm" means nanometer; "nM" means nanomolar; "PCR" means polymerase chain reaction; "Pen/Strep" means a mixture containing penicillin and streptomycin; "RNA" means ribonucleic acid; "RPM" means revolutions per minute; and "xg" means times gravity.

The following amino acid abbreviations are used in this disclosure:

A - Alanine	T - Threonine
V - Valine	C - Cysteine
L - Leucine	Y - Tyrosine
I - Isoleucine	N - Asparagine
P - Proline	Q - Glutamine
F - Phenylalanine	D - Aspartic Acid
W - Tryptophan	E - Glutamic Acid
M - Methionine	K - Lysine
G - Glycine	R - Arginine
S - Serine	H - Histidine

The GPCR gene, GPR40, identified by GenBank accession number AF024687, encodes a 300 amino acid protein. Sawzdargo et al. (1997). GPR40, which is highly expressed in pancreatic islet cells has been linked to the regulation of insulin secretion and, thus, has been proposed as a target for the treatment of diabetes. Briscoe et al. (2003); Itoh et al. (2003). Kotlarsky et al. (2003) propose that GPR40 mediates responses to thiazolidinedione-type diabetes drugs.

As with other GPCRs, GPR40 is involved in transmitting extracellular signals into the cell. Activation of GPR40 elicits release, via the pathway involving the G_i protein, of intracellular calcium. Briscoe et al. (2003). The resulting calcium flux is useful for detecting GPR40 activation by methods known to those of skill in the art

based upon the present disclosure (see, for example: Kotarsky et al. (2003); Briscoe et al. (2003)).

Thiazolidinedione and certain fatty acids are known to activate GPR40. Kotarsky et al. (2003) and Briscoe et al. (2003). As illustrated by Figure 1, herein, 5 thiazolidinedione compounds stimulate intracellular calcium ion release in GPR40 expressing cells as compared to cells that do not express GPR40.

This invention is based, in part, on the discovery that a single nucleotide polymorphism influences activation of GPR40, for example, by thiazolidinedione-type drugs. This polymorphism, which occurs at nucleotide 632 of the GPR40 coding 10 sequence (corresponding to nucleotide 642 in the sequence of GenBank accession number AF024687), involves a substitution of A to a nucleotide other than A, preferably G, resulting in an amino acid substitution at residue 211 from histidine to an amino acid other than histidine, preferably arginine. Nucleotide and amino acid sequences of GPR40 wherein amino acid 211 is arginine appear at SEQ. ID. Nos. 1 15 and 2 respectively. Nucleotide and amino acid sequences of GPR40 wherein amino acid 211 is histidine appear at SEQ. ID. Nos. 3 and 4 respectively.

As illustrated by Figure 2, cells in which nucleotide 632 of GPR40 is G have a higher response to, for example, thiazolidinedione activation, as compared to cells having the A nucleotide at position 632. Figure 2 shows the results of a cell-based 20 assay measuring intracellular calcium ion in cells having the G versus A nucleotide at position 632.

Furthermore, this invention is based, in part, on the discovery that individuals who have G at nucleotide 642, particularly those who have G on both alleles, have a higher risk for diabetes compared to individuals in which the nucleotide is A. As 25 illustrated by Figure 3, for a given body mass index subjects that are heterozygous or homozygous A at nucleotide 642 have a significantly lower chance of having Type II diabetes than a subject that is homozygous G.

The present invention encompasses characterization methods and methods of treatment or prevention of diseases or pathological conditions that are related to 30 having at least one allele, preferably both alleles, of GPR40 wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine, preferably arginine. Genotyping of subjects for the methods of the invention may be performed by methods known to those of skill in the art based upon the present disclosure. Exemplary methods are described, for example, in Chapter 2 of Dracopoli et al. (2004).

35 Genotyping may be performed using an appropriate tissue of a subject as is known to those of skill in the art based upon the present disclosure. In a preferred embodiment, DNA for genotyping is isolated from whole a blood sample by

procedures well known to those of skill in the art based upon the present disclosure. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits, such as, the Puregene® DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN), DNA Isolation Kit for Blood (catalog no. 2-032-805, Roche Diagnostics Corporation),

5 GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit (catalog no. 27-5238-01, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ), PAXgene Blood DNA Kit (catalog no. 761133, QIAGEN Inc., Valencia, CA), GNOME® Whole Blood DNA Isolation Kit (catalog no. 2011-800, Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA) and Wizard® Genomic DNA Purification Kit (catalog no. A1120, Promega U.S., Madison, WI).

10 The nucleic acid region containing the single nucleotide polymorphism may be amplified, for example, by PCR techniques using a sense and an anti-sense primer and a detection probe. However, other nucleic acid amplification methods may also be used, including ligase chain reaction (see, for example, Abrahaya, K. et al. (1995), branched DNA signal amplification (see, for example, Jorde, M.S. et al.

15 (1993)), isothermal nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) (see, for example, Kevita, T. et al. (1991)), and other self-sustained sequence replication assays.

Methods for preparing PCR primers and probes are well known in the art, and are described, for example, in Sambrook et al. (1989), Ausubel et al. (1994) and Innis et al. (1990). PCR primer pairs can be derived from known sequences, for example,

20 by using computer programs intended for that purpose such as Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA).

Oligonucleotides for use as primers may be selected using software known in the art for such purposes. For example, OLIGO® version 6 software (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, www.oligo.net) is useful for the selection of PCR

25 primer pairs of up to 100 nucleotides each. Similar primer selection programs have incorporated additional features for expanded capabilities. For example, the PrimOU primer selection program (available to the public from the Genome Center at University of Texas, South West Medical Center, Dallas TX,

30 ftp://ftp.genome.ou.edu/pub/programs/primou_src.tar) is capable of choosing specific primers from megabase sequences and is thus useful for designing primers on a genome-wide scope. The Primer3, version 0.9, primer selection program (available to the public from the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MA, http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)

35 allows the user to input a "mispriming library," in which sequences to avoid as primer binding sites are user-specified. Primer3 is useful, in particular, for the selection of oligonucleotides for microarrays. (The source code for the latter two primer selection

programs may also be obtained from their respective sources and modified to meet the user's specific needs.) The PrimeGen program (available to the public from the UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK, <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/primegen.html>) designs primers based on multiple sequence alignments, thereby allowing selection of primers that hybridize to either the most conserved or least conserved regions of aligned nucleic acid sequences. Hence, this program is useful for identification of both unique and conserved oligonucleotides and polynucleotide fragments. Other oligonucleotide selection methods will be apparent to those of skill in the art based upon the present disclosure.

Preferably, the length of the sequence used for probes is minimized using a minor groove binder (MGB) linked to the probe sequence in order to discriminate between the two SNPs. MGBs are known to those of skill in the art, for example, as disclosed in U.S. Patent Nos.: 5,801,155; 6,084,102; 6,426,408; 6,312,894; and 6,683,173.

In a preferred embodiment, the Primer Express® version 1.5 software (Applied Biosystems, Foster City, CA) is used to design PCR primers and probes for the practice of the invention. Exemplary primers include CTTGGCCATCACAGCCTTCT for the forward primer (SEQ. ID. NO: 5) and CCACGTTGGAGGCGTTGT for the reverse primer (SEQ. ID. NO: 6). Probes may be FAM™ and VIC® dye-labeled TaqMan® MGB probes (Applied Biosystems) having the sequences 6FAM-CACTGGCCCGCTCT and VIC-CACTGGCCCGCTC (SEQ. ID. Nos. 7 and 8 respectively). Isolated DNA of a subject is treated with the PCR reagents, including the primers and probes, and exposed to repeated thermal cycling in order to develop the PCR reaction. Detection of the SNP may be performed, for example, using a fluorescence based sequence detection system such as the ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (ABI Bioscience, Torred, Norway).

The invention also encompasses diagnostic test kits for determining whether a subject has a nucleotide other than A, preferably G, at nucleotide 632 of the GPR40 coding sequence. For example, the kit can comprise a reagent such as a labeled or labelable nucleic acid probe capable of detecting whether a subject has A or G at nucleotide 632 of the GPR40 coding sequence. Such a probe is preferably less than 35 nucleotides in length, more preferably, less than 25 nucleotides and, even more preferably, between 13 and 25 nucleotides. The kit can further comprise reagents, such as PCR primers, for amplifying the nucleic acid region containing nucleotide 632. The reagents can be packaged in a suitable container. The kit can

further comprise instructions for using the kit to detect whether a subject has A or G at nucleotide 632 of the GPR40 coding sequence.

The present invention provides methods for identifying test Agents that activate GPR40 by comparing activation by a test Agent of a first human GPR40 receptor wherein amino acid 211 is other than histidine, preferably arginine, to activation by a test Agent of a second human GPR40 receptor wherein amino acid 211 is histidine. Any appropriate method that measures activation of GPR40 may be used in the practice of this invention. Such methods are known or will be apparent to those of skill in the art based upon the present disclosure. For example, in a preferred embodiment, such methods involve the use of calcium sensitive dyes in a fluorometric imaging plate reader system (i.e., FLIPR®) which measure calcium flux following activation of G protein coupled receptors mediated through the G_s protein (see, for example, Chambers et al. (2003). Other methods known in the art include the use of calcium binding proteins (Miyawaki et al. (1997), Kain (1999)) and calcium sensitive luciferase (Button and Brownstein (1997), Stables et al. (1997)).

The invention further provides methods for identifying test Agents that inhibit activation of GPR40 by comparing inhibition of activation by a test Agent of a first human GPR40 receptor wherein amino acid 211 is histidine, to inhibition of a second human GPR40 receptor wherein amino acid 211 is other than histidine, preferably arginine. Such methods may utilize the activation assays described above using a known activator of GPR40 in combination with a test Agent. The detectable signal produced is compared to the signal that would be expected if the known activator were used by itself. Various activators of GPR40 are known in the art and may be used for such methods, including those described in Kotarsky et al. (2003), Briscoe et al. (2003) and International Patent Application Publication No. WO 02/057783.

This invention also encompasses methods for identifying test Agents that bind to GPR40, by comparing the competitive inhibition by a test Agent of binding of a known GPR40 ligand to a first human GPR40 receptor wherein amino acid 211 is histidine to competitive inhibition by the compound of binding the known ligand to a second human GPR40 receptor wherein amino acid 211 is other than histidine, preferably arginine. The ligand may be labeled with a detectable label as is well known in the art, including, for example, radiolabels, fluorescent dyes and enzymes. Various ligands of GPR40 are known in the art and may be used for such methods, including those described in Kotarsky et al. (2003), Briscoe et al. (2003) and International Patent Application Publication No. WO 02/057783.

Those of skill in the art will appreciate, based upon the present disclosure, that the comparison of activation, inhibition or activation and inhibition of binding of

the methods for identifying test Agents of this invention may be performed by any of a number of ways. For example, the measurement of activation and inhibition of activation of GPR40 may be performed using fluorometric or colorimetric methods that measure calcium flux (e.g., FLIPR). Hence, activation of GPR40 may be accurately quantified by such methods, for example, by using a light detector instrument that generates a numerical value. The resulting values from such measurements may be compared by automated or manual means. For example, a practical method, particularly where large numbers of values have been generated, would involve comparing the values using a computerized system by methods well known to those with skill in the art.

Furthermore, the present invention encompasses methods of treatment or prevention of diseases or pathological conditions that are related to having at least one allele, preferably both alleles, of GPR40 wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine, preferably arginine. Methods of identifying such diseases or conditions are well known to those skilled in the art or will be apparent based upon the present disclosure. For example, Figure 3 illustrates the results of a study comparing the genotype of subjects with Type II diabetes with subjects who do not have diabetes. It will be apparent to those skilled in the art that methods similar to those described in Figure 3 and Example 5 may be employed to identify other diseases or conditions that are related to having at least one allele, preferably both alleles, of GPR40 wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine, preferably arginine.

In one embodiment of the present invention, a disease or pathological condition mediated by having at least one allele, preferably both alleles, of GPR40 wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine, preferably arginine is diabetes, preferably Type II diabetes. In another embodiment, the diseases or conditions are complications associated with diabetes. Such complications include arteriosclerosis, diabetic cardiomyopathy, cataracts, foot ulcers, diabetic macroangiopathy, diabetic microangiopathy, diabetic nephropathy, diabetic retinopathy and diabetic neuropathy. In a further embodiment, such diseases or conditions are any of the risk factors associated with metabolic syndrome, including obesity, hypertension, insulin resistance, Type II diabetes and dyslipidemia.

The present invention provides methods of treatment relating to the administration of an Agent for treatment or prevention of a disease or pathological condition mediated by having at least one allele, preferably both alleles, of the GPR40 gene wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine,

preferably arginine (previously defined as the "Agents"). The Agents will be apparent to those skilled in the art based upon this disclosure or may be readily identified by methods known in the art. For example, the Agents may include insulin, insulin secretion stimulating sulfonylurea compounds, glycogen phosphorylase inhibitors (GPI), biguanide hepatic glucose output inhibitors, thiazolidinedione antidiabetic compound, alpha-glucosidase inhibitors, protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) inhibitors, dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibitors, glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) inhibitors, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonists, glucagon receptor antagonists, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI's), 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins), γ -aminobutyric acid (GABA) agonists, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, angiotensin-II (A-II) receptor antagonists, phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors, sorbitol dehydrogenase inhibitors (SDI) and aldose reductase inhibitors (ARI).

15 The Agents may include any protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) inhibitor. The term protein tyrosine phosphatase-1B inhibitor refers to any compound that inhibits the enzyme protein tyrosine phosphatase-1B. PTP-1B is believed to inhibit the ability of insulin to reduce blood sugar levels.

Exemplary PTP-1B inhibitors, assays for identifying such inhibitors and preferred dosage and methods of administration are disclosed in the following US patents, International Patent Application publications and other publications: US 6,251,938, US 6,221,902, US 6,057,316, US 6,001,867, US 5,753,667, WO 01/46203, WO 01/46204, WO 01/46206, WO 01/17516, WO 00/53583, WO 99/58518, WO 98/61435, WO 99/58521, WO 99/58522, WO 99/58514, WO 99/58520, WO 99/58519, WO 99/58511, WO 98/61410, WO 99/15529, Malamas et al. (2000A), Bleasdale et al. (2001), Wrobel et al. (1999), Malamas et al. (2000B), Wang et al. (1998), Andersen et al. (2000), Iversen et al., (2000), Wrobel et al. (2000) and Kees (1996).

30 The Agents may include any glucagon receptor antagonist. The term glucagon receptor antagonists refers to any compound that antagonizes the glucagon receptor, thus inhibiting the release of glucose induced by glucagon binding to the glucagon receptor. Such antagonism is readily determined by those skilled in the art according to assays known to those skilled in the art.

Exemplary glucagon receptor antagonists, assays for identifying such antagonists and preferred dosage and methods of administration are disclosed in the following US patents, International Patent Application publications and other

publications: US 6,218,431, US 5,138,090, WO 98/04528, WO 99/01423, WO 00/39088, WO 00/69810, WO 98/21957, WO 98/22109, WO 98/22108, WO 97/16442, Livingston et al. (1999), Madsen et al. (1998), de Laszlo et al. (1999), Chang et al. (2001), Cascieri et al. (1999), Ling et al. (2001) and Gullion et al. (1998).

5 The Agents may include any glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) antagonist. Exemplary GSK-3 β antagonists, assays for identifying such antagonists and preferred dosage and methods of administration are disclosed in the following US patents, International Patent Application publications and other publications: US 6,057,288, WO 01/58567, WO 01/09108, WO 01/49709, WO 01/44248, WO 10 01/44208, WO 01/42224, WO 00/21927, WO 00/38875, WO 99/65897, WO 98/16528, Coghlan et al. (200), Smith et al. (2001), Cross et al. (2001) and Lockheed et al. (2001).

The Agents for the invention may include alpha-glucosidase inhibitors. Any alpha-glucosidase inhibitor may be used as an Agent in the invention. Exemplary 15 alpha-glucosidase inhibitors include acarbose (also known as Precose[®]) and miglitol (also known as Glyset[®]), and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts of those alpha-glucosidase inhibitors.

The Agents may include insulin secretion stimulating sulfonylurea compounds. Any insulin secretion stimulating sulfonylurea compound may be used 20 as an Agent for the invention. Exemplary insulin secretion stimulating sulfonylurea compounds include glipizide, also known as Glucotrol[®] and Glucotrol XL[®], glimepiride (also known as Amaryl[®]), glyburide and chlorpropamide (also known as Diabinese[®]); and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts thereof. A preferred insulin secretion stimulating sulfonylurea compounds is glipizide.

25 The Agents may include biguanide hepatic glucose output inhibitors. Any biguanide hepatic glucose output inhibitor may be used as an Agent in the practice of the invention. An exemplary biguanide is metformin, also known as Glucophage[®].

The Agents may include PPAR γ agonists, including thiazolidinedione and non-thiazolidinedione compounds. PPAR γ agonists increase insulin sensitivity in 30 tissues important for insulin action such as adipose tissue, skeletal muscle, and liver.

Any PPAR γ agonists may be used as an Agent in the practice of the invention. Exemplary PPAR γ agonists include those described in the following US Patents: US 4,340,805; US 4,342,771; US 4,367,234; US 4,617,312; US 4,687,777 and US 4,703,052; and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically 35 acceptable salts thereof. Preferred PPAR γ agonists include darglitazone, ciglitazone, englitazone, pioglitazone, also known as Actos[®], and rosiglitazone, also known as

Avandia® and BRL-49653. PPAR γ agonists are preferably administered in amounts ranging from about 0.1 mg/day to about 100 mg/day in single or divided doses, preferably about 0.1 mg/day to about 50 mg/day for an average subject, depending upon the thiazolidinedione antidiabetic compound and the route of administration.

5 However, some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The individual responsible for dosing will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may include any dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors. The term DPP IV inhibitor refers to any compound which inhibits the enzyme dipeptidyl

10 peptidase. Such inhibition is readily determined by those skilled in the art according to assays such as those disclosed in International Patent Application publication number WO 98/19998.

Exemplary DPP IV inhibitors include those disclosed in US Patent Numbers US 6,124,305, US 6,110,949 and US 6,124,305, in International Patent Application

15 Publication Nos. WO 01/34594, WO 99/81431, WO 98/19998, WO 97/40832 and WO 95/15309 and in Augustyns et al. (1997); and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts thereof.

Preferred dosage and methods of administration are according to those provided in WO 01/34594 and WO 98/19998. Some variation in dosage may

20 necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The individual responsible for dosing will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may also comprise any selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI). The term selective serotonin reuptake inhibitor refers to a compound which

25 inhibits the reuptake of serotonin by afferent neurons. Such inhibition is readily determined by those skilled in the art according to standard assays such as those disclosed in US 4,536,518 and other US patents recited in the next paragraph.

Preferred SSRIs which may be used in accordance with this invention include

30 femoxetine, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 3,912,743; fluoxetine, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 4,314,081; fluvoxamine, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 4,085,225; indalpine, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 4,084,255; indeloxazine, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 4,109,088; milnacipran, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 4,478,836;

35 paroxetine, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 3,912,743 or U.S. Patent No. 4,007,198; sertraline, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 4,536,518; sibutramine, which may be prepared as described in U.S.

Patent No. 4,929,829; and zimeldine, which may be prepared as described in U.S. Patent No. 3,928,369. Fluoxetine is also known as Prozac[®]. Sertraline hydrochloride, also known as Zoloft[®], may be prepared as set forth in US 4,538,518. Sibutramine is also known as Meridia[®]. SSRIs that may be used as Agents include
5 analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts of the SSRIs described above.

SSRIs are preferably administered in amounts ranging from about 0.01 mg/kg/day to about 500 mg/kg/day in single or divided doses, preferably about 10 mg to about 300 mg per day for an average subject, depending upon the SSRI and the
10 route of administration. However, some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The individual responsible for dosing will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may further comprise any 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor (statin). The term 3-hydroxy-3-methylglutaryl
15 coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor refers to a pharmaceutical compound which inhibits the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase. This enzyme is involved in the conversion of HMG-CoA to mevalonate, which is one of the steps in cholesterol biosynthesis. Such inhibition is readily determined according to standard assays well known to those skilled in the art.

Preferred statins which may be used in accordance with this invention include atorvastatin, disclosed in U.S. Patent No. 4,681,893, atorvastatin calcium, disclosed
20 in U.S. Patent No. 5,273,995, cerivastatin, disclosed in U.S. Patent No. 5,502,199, dalvastatin, disclosed in European Patent Application Publication No. 738,510 A2, fluvastatin, disclosed in European Patent Application Publication No. 363,934 A1, fluvastatin, disclosed in U.S. Patent No. 4,739,073, lovastatin, disclosed in U.S. Patent No. 4,231,938, mevastatin, disclosed in U.S. Patent No. 3,983,140, pravastatin, disclosed in US 4,348,227, simvastatin, disclosed in U.S. Patent No. 4,444,784 and velostatin, disclosed in U.S. Patent No. 4,448,784 and U.S. Patent
25 No. 4,450,171. Especially preferred 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors include atorvastatin, atorvastatin calcium, also known as Lipitor[®], lovastatin, also known as Mevacor[®], pravastatin, also known as Pravachol[®], and simvastatin, also known as Zocor[®]; and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts thereof.
30

Statins are preferably administered in amounts ranging from about 0.1 mg/kg to about 1000 mg/kg/day in single or divided doses, preferably about 1 mg/kg/day to about 200 mg/kg/day for an average subject, depending upon the statin and the route
35 of administration. However, some variation in dosage will necessarily occur

depending on the condition of the subject being treated. The individual responsible for dosing will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may include any angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. The term angiotensin converting enzyme inhibitor refers to a pharmaceutical compound which inhibits angiotensin converting enzyme activity. ACE is involved in the conversion of angiotensin I to the vasoconstrictor, angiotensin II. The activity of ACE inhibitors may readily be determined by methods known to those skilled in the art, including any of the standard assays described in the patents listed below.

Preferred ACE inhibitors include: alacepril, disclosed in U.S. Patent No. 4,248,883; benazepril, disclosed in U.S. Patent No. 4,410,520; captopril, disclosed in U.S. Patent Nos. 4,046,869 and 4,105,776; caronapril, disclosed in U.S. Patent No. 4,452,790; delapril, disclosed in U.S. Patent No. 4,385,051; enalapril, disclosed in U.S. Patent No. 4,374,829; fosinopril, disclosed in U.S. Patent No. 4,337,201; imadapril, disclosed in U.S. Patent No. 4,508,727; lisinopril, disclosed in U.S. Patent No. 4,555,502; moexipril, disclosed in U.S. Patent No. 4,344,949; moxipril, disclosed in Belgian Patent No. 893,553; perindopril, disclosed in U.S. Patent No. 4,508,729; quinapril, disclosed in U.S. Patent No. 4,344,949; ramipril, disclosed in U.S. Patent No. 4,567,258; spirapril, disclosed in U.S. Patent No. 4,470,972; temocapril, disclosed in U.S. Patent No. 4,699,905; andtrandolapril, disclosed in U.S. Patent No. 4,933,361; and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts thereof.

ACE inhibitors are preferably administered in amounts ranging from about 0.01 mg/kg/day to about 500 mg/kg/day in single or divided doses, preferably about 10 mg to about 300 mg per day for an average subject, depending upon the ACE inhibitor and the route of administration. However, some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The individual responsible for dosing will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may include any angiotensin-II receptor (A-II) antagonist. The term angiotensin-II receptor antagonist refers to a pharmaceutical compound that blocks the vasoconstrictor effects of angiotensin II by blocking the binding of angiotensin II to the AT₁ receptor found in many tissues, (e.g., vascular smooth muscle, adrenal gland). The activity of an A-II antagonist may readily be determined by methods known to those skilled in the art, including any of the standard assays described in the patents listed below.

Preferred A-II antagonists include: candesartan, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 5,196,444; eprosartan, which may be prepared as

disclosed in U.S. Patent No. 5,185,351; Irbesartan, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 5,270,317; losartan, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 5,138,069; and valsartan, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 5,399,578; and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts thereof. More preferred angiotensin-II receptor antagonists are losartan, Irbesartan and valsartan.

A-II antagonists are preferably administered in amounts ranging from about 0.01 mg/kg/day to about 500 mg/kg/day in single or divided doses, preferably about 10 mg to about 300 mg per day for an average subject, depending upon the A-II antagonist and the route of administration. However, some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The individual responsible for dosing will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may include any γ -aminobutyric acid (GABA) agonist. The term γ -aminobutyric acid agonist refers to a pharmaceutical compound that binds to GABA receptors in the mammalian central nervous system. GABA is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. The activity of a GABA agonist may readily be determined by methods known to those skilled in the art, including the procedures disclosed in Janssens de Verebeke, P. et al., Biochem. Pharmacol., **31**, 2257-2281 (1982), Loescher, W., Biochem. Pharmacol., **31**, 837-842, (1982) and/or Phillips, N. et al., Biochem. Pharmacol., **31**, 2257-2281.

Preferred GABA agonists include: muscimol, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 3,242,190; progabide, which may be prepared as disclosed in US 4,094,992; riluzole, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 4,370,338; baclofen, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 3,471,548; gabapentin (Neurontin[®]), which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 4,024,175; vigabatrin, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 3,980,927; tiagabine (Gabitril[®]), which may be prepared as disclosed in US 5,010,090; lamotrigine (Lamictal[®]), which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 4,802,017; pregabalin, which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 6,028,214; phenytoin (Dilantin[®]), which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 2,409,754; carbamazepine (Tegretol[®]), which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 2,948,718; and topiramate (Topamax[®]) which may be prepared as disclosed in U.S. Patent No. 4,513,008; and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts of those GABA agonists.

In general, in accordance with this invention, the GABA agonist used as the Agents will be administered in a dosage of about 4 mg/kg body weight of the subject to be treated per day to about 60 mg/kg body weight of the subject to be treated per day, in single or divided doses. However, some variation in dosage will necessarily occur depending upon the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. In particular, when used as the GABA agonist in this invention, pregabalin will be dosed at about 300 mg to about 1200 mg per day; gabapentin will be dosed at about 600 mg to about 3600 mg per day.

The Agents may include any glycogen phosphorylase inhibitor (GPI). The term glycogen phosphorylase inhibitor refers to any substance or compound or any combination of substances and/or compounds which reduces, retards, or eliminates the enzymatic action of glycogen phosphorylase. Such actions are readily determined by those skilled in the art according to standard assays as described in U.S. Patent No. 5,988,463. U.S. Patent No. 5,988,463, International Patent Application Publication No. WO 96/39384 and International Patent Application Publication No. WO 96/39385 exemplify GPIs that may be Agents.

GPIs are preferably administered in amounts ranging from about 0.005 mg/kg/day to about 50 mg/kg/day in single or divided doses, preferably about 0.1 mg/kg to about 15 mg/kg per day for an average subject, depending upon the GPI and the route of administration. However, some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The individual responsible for dosing will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may include any sorbitol dehydrogenase inhibitor (SDI). The term sorbitol dehydrogenase inhibitor refers to any substance or compound or any combination of substances and/or compounds which reduces, retards, or eliminates the enzymatic action of sorbitol dehydrogenase. Sorbitol dehydrogenase catalyzes the oxidation of sorbitol to fructose.

Exemplary SDIs include those disclosed in commonly assigned U.S. Patent No. 5,728,704, U.S. Patent No. 5,888,578 and International Patent Application Publication No. WO 00/58510; and analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts thereof.

SDIs are preferably administered in amounts ranging from about 0.001 mg/kg/day to about 100 mg/kg/day in single or divided doses, preferably about 0.01 mg/kg to about 10 mg/kg per day for an average subject, depending upon the SDI and the route of administration. However, some variation in dosage will necessarily

occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may include any phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitor. The term phosphodiesterase type 5 inhibitor refers to any substance or compound or any combination of substances and/or compounds which reduces, retards, or eliminates the enzymatic action of cyclic guanosine monophosphate (c-GMP)-specific PDE-5. Such actions are readily determined by those skilled in the art according to assays as described in International Patent Application Publication No. WO 00/24745.

The following patent publications exemplify phosphodiesterase type 5 inhibitors which can be used as the Agents of this invention, and refer to methods of preparing those phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors: International Patent Application Publication No. WO 00/24745; International Patent Application Publication No. WO 94/28902; European Patent Application Publication No. 0463756A1; European Patent Application Publication No. 0528004A1 and European Patent Application Publication No. 0201188A2. Preferred phosphodiesterase type 5 inhibitor are sildenafil (preferably sildenafil citrate, also known as Viagra®) which may be prepared as set forth in U.S. Patent Nos. 5,250,534 and 5,955,611, tadalafil (also known as Cialis®) which may be prepared as set forth in U.S. patent No. 5,859,006 and vardenafil (also known as Levitra®) which may be prepared as set forth in U.S. Patent No. 6,362,178. Exemplary PDE-5 inhibitors also include analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts of the PDE-5 inhibitors listed above.

PDE-5 inhibitors are preferably administered in amounts ranging from about 5 mg/day to about 500 mg/day in single or divided doses, preferably about 10 mg/day to about 250 mg/day, for an average subject depending upon the PDE-5 inhibitor and the route of administration. However, some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The individual responsible for dosing will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The Agents may include any aldose reductase inhibitor. The term aldose reductase inhibitor refers to compounds that inhibit the bioconversion of glucose to sorbitol catalyzed by the enzyme aldose reductase. Exemplary aldose reductase inhibitors include ponirestat, disclosed in U.S. Patent No. 4,251,528, tolrestat, disclosed in U.S. Patent No. 4,600,724, epalrestat, disclosed in U.S. Patents Nos. 4,464,382, 4,791,126 and 4,831,045, zanarestat, disclosed in U.S. Patent Nos. 4,734,419, and 4,883,800, zopolrestat disclosed in U.S. Patent No. 4,939,140 and preferred aldose reductase inhibitors disclosed in U.S. Patent No. 6,579,879.

Exemplary aldose reductase inhibitors also include analogs, derivatives, prodrugs and pharmaceutically acceptable salts of the aldose reductase inhibitors listed above.

5 The amount of aldose reductase inhibitor that is administered per dose and the intervals between doses will depend upon the aldose reductase inhibitor being used, the type of pharmaceutical compositions being used, the characteristics of the subject being treated and the severity of the conditions, if any, being treated. Aldose reductase inhibitors are preferably administered in amounts ranging from about 0.001 mg/kg/day to about 1000 mg/kg/day in single or divided doses, preferably about 0.01 mg/kg to about 500 mg/kg per day for an average subject, depending upon the
10 aldose reductase inhibitor and the route of administration. However, some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. A preferred aldose reductase inhibitor is zopolrestat which is administered preferably at a dosage of between 250 mg and 500 mg per day.
15

The Agents may also include anti-obesity agents such as apolipoprotein-B secretion/microsomal triglyceride transfer protein (apo-B/MTP) inhibitors, 11 β -hydroxy steroid dehydrogenase-1 (11 β -HSD- type 1) inhibitors, peptide YY₃₋₃₆ or analogs thereof, cannabinoid antagonists (e.g., CB-1 antagonists, such as rimonabant and purine compounds described in U.S. Patent Publication No. 2004/0092520), MCR-4 agonists, cholecystokinin-A (CCK-A) agonists, monoamine reuptake inhibitors (such as sibutramine), sympathomimetic agents, β_3 adrenergic receptor agonists, dopamine agonists (such as bromocriptine), melanocyte-stimulating hormone receptor analogs, 5HT_{2c} agonists, melanin concentrating hormone antagonists, leptin (the OB protein), leptin analogs, leptin receptor agonists, galanin antagonists, lipase inhibitors (such as tetrahydropstatin, i.e. orlistat), anorectic agents (such as a bombesin agonist), neuropeptide-Y receptor antagonists (e.g., NPY Y5 receptor antagonists, such as the spiro compounds described in U.S. Patent Nos. 6,566,367, 6,649,624, 6,638,942, 6,605,720, 6,495,559, 6,462,053, 6,388,077, 6,335,345, and 6,326,375, U.S. Patent Publication Nos. 2002/0151456
20 and 2003/036652, and PCT Publication Nos. WO 03/010175, WO 03/082190 and WO 02/048152), thyromimetic agents, dehydroepiandrosterone or an analog thereof, glucocorticoid receptor agonists or antagonists, orexin receptor antagonists, glucagon-like peptide-1 receptor agonists, ciliary neurotrophic factors (such as Axokine™ available from Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY and Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH), human agouti-related proteins (AGRP),
25
30
35

- ghrelin receptor antagonists, histamine 3 receptor antagonists or inverse agonists, neuromedin U receptor agonists and the like. Other anti-obesity agents, are well known, or will be readily apparent in light of the instant disclosure, to one of ordinary skill in the art. Especially preferred are anti-obesity agents selected from the group
- 5 consisting of orlistat (prepared as described prepared as described in U.S. Patent Nos. 5,274,143, 5,420,305, and 5,540,917), sibutramine (prepared as described prepared as described in U.S. Patent No. 4,929,629), bromocriptine (U.S. Patent Nos. 3,752,814 and 3,752,888), ephedrine, leptin, pseudoephedrine; rimonabant (prepared as described prepared as described in U.S. Pat. No. 5,624,941), peptide
- 10 YY₃₋₃₆ or an analog thereof (prepared as described in U.S. Patent Publication No. 2002/0141985 and PCT Publication No. WO 03/027637); and and the NPY Y5 receptor antagonist 2-oxo-N-(5-phenylpyrazinyl)spiro-[isobenzofuran-1(3H),4'-piperidine]-1'-carboxamide. Other preferred NPY Y5 receptor antagonists are those described in PCT Publication No. WO 03/082190, including 3-oxo-N-(5-phenyl-2-
- 15 pyrazinyl)spiro[isobenzofuran-1(3H), 4'-piperidine]-1'-carboxamide; 3-oxo-N-(7-trifluoromethylpyrido[3,2-b]pyridin-2-yl)-spiro-[isobenzofuran-1(3H), 4'-piperidine]-1'-carboxamide; N-[5-(3-fluorophenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H), [4'-piperidine]-1'-carboxamide; *trans*-3'-oxo-N-(5-phenyl-2-pyrimidinyl)]
- 20 spiro[cyclohexane-1,1'(3'H)-isobenzofuran]-4-carboxamide; *trans*-3'-oxo-N-[1-(3-quinolyl)-4-imidazolyl]spiro[cyclohexane-1,1'(3'H)-isobenzofuran]-4-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(5-phenyl-2-pyrazinyl)spiro[4-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-N-[5-(3-fluorophenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[5-azaisobenzofuran-1(3H), 1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-N-[5-(2-fluorophenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[5-azaisobenzofuran-1(3H), 1'-cyclohexane]-
- 25 4'-carboxamide; *trans*-N-[1-(3,5-difluorophenyl)-4-imidazolyl]-3-oxospiro[7-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(1-phenyl-4-pyrazolyl)spiro[4-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-N-[1-(2-fluorophenyl)-3-pyrazolyl]-3-oxospiro[6-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(1-phenyl-3-pyrazolyl)spiro[6-
- 30 azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(2-phenyl-1,2,3-triazol-4-yl)spiro[6-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexane]-4'-carboxamide, and and pharmaceutically acceptable salts and prodrugs thereof. Preferably, compounds of the present invention and combination therapies are administered in conjunction with exercise and a sensible diet.
- 35 The Agents are employed for the methods of this invention either alone or in combination with one or more other Agents. The Agents may be administered alone

or with one or more pharmaceutically acceptable carriers, diluents or fillers. Pharmaceutical compositions containing the Agents may be readily administered in a variety of dosage forms such as tablets, powders, lozenges, syrups, injectable solutions and so forth. These pharmaceutical compositions may, if so desired, contain additional ingredients such as flavorings, binders, excipients and the like. For the purposes of oral administration, tablets containing various excipients such as sodium citrate, calcium carbonate, and calcium diphosphate may be used along with various disintegrants such as starch, alginic acid and certain complex silicates, together with binding agents such as polyvinylpyrrolidone, sucrose, gelatin and acacia. Additionally, lubricating agents such as magnesium stearate, sodium lauryl sulfate, and talc are often useful for tableting purposes. Solid compositions of a similar type may also be used as fillers in soft and hard filled gelatin capsules. Preferred materials for this use include lactose or milk sugar and high molecular weight polyethylene glycols. When aqueous suspensions or elixirs are desired for oral administration, the Agent therein may be combined with various sweetening or flavoring agents, coloring matter or dyes and, if desired, emulsifying or suspending agents; together with diluents such as water, ethanol, propylene glycol, glycerin or various combinations thereof.

For parenteral administration, solutions of the Agents useful in this invention, in sesame or peanut oil, aqueous propylene glycol, or in sterile aqueous solution may be employed. Such aqueous solutions should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, the sterile aqueous media employed are all readily available by standard techniques known to those skilled in the art. Methods of preparing various pharmaceutical compositions with a certain amount of active ingredient are known, or will be apparent in light of this disclosure, to those with skill in the art. For examples, methods of preparing pharmaceutical compositions are described in Gennaro (2003).

The disclosures of all patents, applications, publications and documents, including brochures and technical bulletins, cited herein, are hereby expressly incorporated by reference in their entirety. It is believed that one skilled in the art can, based on the present description, including the examples, drawings, and appendant claims, utilize the present invention to its fullest extent.

It is believed that one skilled in the art can, using the present description, including the Examples, sequence listings and attendant claims, utilize the present invention to its fullest extent. The following Examples are to be construed as merely

illustrative of the practice of the invention and not limitative of the remainder of the disclosure in any manner whatsoever.

EXAMPLES

Example 1

5 GPR40 Expressing 293 Cells

Expression vector constructs containing the GPR40 gene alleles were prepared based upon the vector, pIRESpuro, (catalog no. 6031-1, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). One such expression vector construct has the sequence of SEQ. ID. NO: 11 and the restriction map shown in Figure 4. Human embryonic
10 kidney (HEK) 293 cells which have been transformed with adenovirus 5 (available from the ATCC, catalog no. CRL-1573) were grown in media containing DMEM (catalog no. 11995-065, Invitrogen, Carlsbad, CA), 10% FBS (catalog no. 16140-071, Invitrogen) and 100 units Pen/Strep (catalog no. 15140-122, Invitrogen). When the cells reached 80% confluence, they were transfected with the GPR40 containing
15 expression vectors using Fugene-6 reagent (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Following 48 hours incubation, the media was aspirated and new media containing DMEM, 10% FBS, 100 units Pen/Strep and 1 µg/ml puromycin were added. At four weeks, cloning cylinders (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) were used to select stable clones having puromycin resistance conveyed by the
20 pIRESpuro vector. These colonies were allowed to amplify for an additional four weeks and fast growing colonies were selected resulting in HEK 293/GPR40 cells for use in the FLIPR assay of Example 2.

Example 2

GPR40 FLIPR Assay

25 On day one, HEK 293/GPR40 cells prepared according to Example 1 and control HEK 293 cells were plated in poly-D-lysine-coated 384-well black plates with clear bottom (catalog no. 354663, BD Biosciences) at 10,000 cells per well (30 µl per well of 3.3×10^5 cells/mL solution) in growth medium containing DMEM, 10% FBS
30 and Pen/Strep (100 µg/mL), with the addition of 1 µg/mL puromycin for HEK 293/GPR40 cells only, and incubated at 37 °C in 5% CO₂. On day two, the medium from each well was removed and replaced with 30 µl of serum-free medium (DMEM and Pen/Strep only, and no FBS), with the addition of 1 µg/mL puromycin for HEK 293/GPR40 cells only. On day three, dye vials of the FLIPR® Calcium 3 assay kit
35 (catalog no. R8091, Molecular Devices, Sunnyvale CA) were reconstituted with 11

mL Hanks' Buffered Saline Solution (component of FLIPR® assay kit) and 225 µl freshly-made 250 mM probenecid stock containing 5N NaOH (1 mL), probenecid (0.74 g) (catalog no. P8781, Sigma-Aldrich Co.) and 1X FLIPR buffer (9 mL) (made from 10X FLIPR buffer containing, per liter, NaCl (84.68 g), D(+) glucose anhydrous (18.02 g), MgSO₄·7H₂O (1.2 g), KCl (3.73 g), HEPES (23.8 g) and CaCl₂ (1.11 g), at pH 7.4). Fatty acids and other GPR40 ligand test compounds were diluted to concentrations of between 0.05 µM and 100 µM in FLIPR/DMSO (1X FLIPR buffer containing 0.25% DMSO). Thirty microliters of dye was added to each plate well and the plates were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for one hour. Calcium flux was measured using a FLIPR plate reader (Molecular Devices). Test compound solutions were injected into each well (15 µl per well) at a rate of 10 µl per second. Exposures were made every two seconds for 0.4 seconds per exposure for 90 exposures.

Example 3

DNA Isolation and Purification

DNA from a whole blood sample is isolated and purified using the Puregene® DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions. Alternatively, red blood cells from frozen whole blood samples may be lysed by mixing thawed whole blood (1 mL) with RBC Lysis Solution (Gentra Systems, Inc.), for example, in a 3:1 ratio (i.e., 3 mL RBC Lysis Solution to 1 mL whole blood) and mixed. The solution is incubated for 10 minutes at room temperature. After incubation, the solution is centrifuged at 1,800 xg for 10 minutes. The supernatant from the tube is poured off and the resulting pellet is re-suspended in the residual supernatant. Cell Lysis Solution (1 mL) (Gentra Systems, Inc.) is then added, for example, to a volume equivalent to that of the initial whole blood volume. RNase A Solution (5 µl) (Gentra Systems, Inc.) is added to the cell lysate and the tube is incubated at 37°C for 15 minutes. The sample is then cooled to room temperature. Protein Precipitation Solution (333 µl) (Gentra Systems, Inc.) is added to the cell lysate and the mixture is mixed by vortexing at high speed for at least 20 seconds. The mixture is then centrifuged at 1,800 xg for 10 minutes resulting in a tight protein pellet. The resulting supernatant containing DNA is poured into a clean 15 mL centrifuge tube containing a 10 mL of 100% isopropanol (2-propanol). The sample is mixed by gently inverting the tube (approximately 40-60 times) until DNA precipitates. If DNA does not appear, seven µl of Glycogen (20 µg/mL) per mL of whole blood (original starting material) is added and incubate at room temperature for 15 minutes. The sample is then centrifuged at 1,800 xg for three minutes resulting in a small white DNA pellet. The supernatant is poured off and the tube drained onto

absorbent paper. Ten mL of 70% ethanol are added and the tube inverted several times to wash the DNA pellet. The sample is centrifuged for one minute at 1,800 xg. The supernatant is then be poured off, and the tube is inverted and air-dried.

Example 4

5

Allelic Discrimination

Primers and Taqman® MGB probes (Applied Biosystems) were designed using the software Primer Express version 1.5 (Applied Biosystems). The PCR reaction was carried out in a volume of 5 µl consisting of: 2.5 µl of 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (no AmpErase), 200 nM of each probe, 900 nM of the forward and reverse primers, and water to 5 µl. Alternatively, primers and probes were obtained as a TaqMan Assays-on Demand™ (Applied Biosystems) and the PCR reaction was carried out in 5 µl consisting of: 2.5 µl of 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (no AmpErase), 2.25 µl water and 0.25 µl of 20 X Assay Mix. The 5 µl reaction mixture was added to approximately 10 ng of dried DNA in the well of a 96 well plate. The plates were placed on a titer plate shaker and shaken vigorously for 10 minutes and then briefly spun at 1000 RPM. Thermal cycling was performed in a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) with a dual 384-well sample block module using the following thermal cycling conditions: 95° C for 10 minutes, 40 cycles of 92 °C for 15 seconds and 60 °C for one minute. The fluorescent signal was detected using an ABI PRISM 7900HT Sequence Detector (Applied Biosystems) according to the manufacture's instructions. The data was analyzed with the Sequence Detection System (SDS) software version 2.1 (Applied Biosystems).

20

Example 5

25

Investigation of Variants for GPR40 in Type II Diabetic Patients

Of the 2485 subjects analysed, 1332 were male and 857 were female. Allele frequencies were estimated by counting the occurrences of the particular allele of GPR40, and then dividing by two times number of individuals to account for the two alleles contributed by each subject. Genotype frequencies were estimated by counting the occurrences of a particular genotype and then dividing by the number of individuals.

30

References

- Abravaya, K. et al. (1995), *Nucleic Acids Research*, 23, 875-882;
- 5 ADA (2004), "Standards of medical care in diabetes (Clinical Practice Recommendations 2004)", *Diabetes Care*, 27 (Suppl 1), S15-S35;
- Andersen, HS et al. (2000), "2-(oxalylamino)-benzoic acid is a general, competitive inhibitor of protein-tyrosine phosphatases", *J. Biol. Chem.*, 275, 7101-7108;
- Armitage, P. (1955), "Tests for linear trends in proportions and frequencies", *Biometrics*, 11, 375-386;
- 10 Augustyns, KJL et al., *Eur. J. Med. Chem.*, 32, 301-308;
- Ausubel et al. (1994), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ;
- Bleasdale, JE, et al. (2001), "Small molecule peptidomimetics containing a novel phosphotyrosine biosostere inhibit protein tyrosine phosphatase 1B and augment insulin action", *Biochemistry*, 40, 5642-5654;
- 15 Biscoe, C.P. et al. (2003), "The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids", *J. Biol. Chem.*, 278, 11303-11311;
- Button, D. and Brownstein, M. (1997), "Aequorin-expressing mammalian cell lines used to report Ca²⁺ mobilization", *Cell Calcium*, 14, 663-671;
- 20 Casceri, MA et al. (1999), "Characterization of a novel, non-peptidyl antagonist of the human glucagon receptor", *J. Biol. Chem.*, 274, 8694-8697;
- Chambers, C. et al. (2003), "Measuring Intracellular Calcium Fluxes in High Throughput Mode", *Combinatorial Screening and High Throughput Screening*, 8, 355-362;
- 25 Chang, LL et al. (2001), "Substituted imidazoles as glucagon receptor antagonists", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 11, 2549-2553;
- Coghlan, MP et al. (2000), *Chemistry and Biology*, 7, 793-803;
- Cross, DA et al. (2001), "Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death", *Journal of Neurochemistry*, 77, 94-102;
- 30 de Laszlo, SE et al. (1999), "Potent, orally absorbed glucagon receptor antagonists", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 9, 641-646;
- Devlin, B. and Roeder, K. (1999), "Genomic control for association studies", *Biometrics*, 55, 997-1004;
- 35 Dracopoll et al. (2004), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ;
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (2001), "Executive Summary of the Third Report of the national Cholesterol Education Program (NCEP)," *JAMA* 285, 2486-2497;
- 40 Gadsby, R. (2002), "Epidemiology of diabetes", *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1165-1172;
- Gether, U. (2000), "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein coupled receptors", *Endocr. Rev.*, 21, 90-113;
- Guillon, J. et al. (1998), *European Journal of Medicinal Chemistry*, 33, 293-308;

- Haber, E.P., et al. (2002), "Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic β -cells", *J. Cell Physiol.*, 194, 1-12;
- Haga, H., et al. (2002), "Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: Identification of 190,562 genetic variations in the human genome", *J. Hum. Genet.*, 47, 605-610;
- 5 Higuchi, T. and Stella, W. (1987), "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, and in Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press;
- Innis et al. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego CA;
- 10 Itoh, Y., et al. (2003), "Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40", *Nature*, 173-176;
- Iversen, LF et al., (2000) "Structure-based design of a low molecular weight, nonphosphorus, nonpeptide, and highly selective inhibitor of protein-tyrosine phosphatase 1B", *J. Biol. Chem.*, 275, 10300-10307;
- 15 Johnson, G.L. and Dhanasekaran, N. (1989), "The G-protein family and their interaction with receptors", *Endocr. Rev.*, 10, 317-331;
- Jrdea, MS et al. (1993), *AIDS*, 7 (supp. 2), S11-S14;
- Kain, S.R. (1999), "Green fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery", *Drug Discov. Today*, 4, 304-312;
- 20 Kievits, T. et al. (1991), *J. Virological.*, Methods 35, 273-286;
- Kees, KL, et al. (1996), "New potent antihyperglycemic agents in db/db mice: synthesis and structure-activity relationship studies of (4-substituted benzyl) (trifluoromethyl)pyrazoles and -pyrazolones", *J. Med. Chem.*, 39, 3920-3928;
- 25 Kotarsky, K. et al. (2003), "A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301, 406-410;
- Ling, A et al. (2001), "Identification of alkylidene hydrazides as glucagon receptor antagonists", *J. Med. Chem.*, 44, 3141-3149;
- Livingston, et al. (1999), *Diabetes*, 48 Suppl.1, 0862;
- 30 Lochhead, PA et al. (2001), "Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression", *Diabetes*, 50, 937-946;
- Madsen, P. et al. (1998), "Discovery and structure-activity relationship of the first non-peptide competitive human glucagon receptor antagonists", *J. Med. Chem.*, 41, 5150-5157;
- 35 Malamas, MS, et al. (2000A), "New azolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties", *J. Med. Chem.*, 43, 995-1010;
- Malamas, MS et al. (2000B), "Novel benzofuran and benzothioephene biphenyls as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties", *J. Med. Chem.*, 43, 1293-1310;
- 40 Miyawaki, A. et al. (1997), "Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin", *Nature*, 388, 882-887;
- Park, YW et al. (2003), "The Metabolic Syndrome. Prevalence and associated risk factor findings in the U.S. population from the Third National and Nutrition Examination Survey, 1988-1994", *Arch. Intern. Med.*, 163, 427-436;
- 45

- Gennaro, AR (2003) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 20th Edition;
- Reilly, MP and Rader, DJ (2003), "The Metabolic syndrome. More than the sum of its parts?", *Circulation*, 108, 1548-1551;
- 5 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY;
- Sawzdargo, M. et al. (1997), "A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 18q13.1", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 543-547;
- 10 Shirai, K. (2004), "Obesity as the core of the metabolic syndrome and the management of coronary heart disease", *Curr. Med. Res. Opin.*, 20, 295-304;
- Smith, DG et al. (2001), "3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 11, 835-839;
- Stables, J. et al. (1997), "A bioluminescent assay for agonist activity at potentially any G-protein-coupled receptor", *Anal. Biochem.*, 252, 115-128;
- 15 Wang, Q. et al. (1998), "Naphthalenebis[alpha,alpha-difluoromethylene phosphonates] as potent inhibitors of protein tyrosine phosphatases", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 345-350;
- Weir, BS and Cockerham, CC (1979), "Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations", *Heredity*, 42, 105-111;
- 20 Wrobel, J., et al. (1999), "PTP1B inhibition and antihyperglycemic activity in the ob/ob mouse model of novel 11-arylbenzo[b]naphtho[2,3-d]furans and 11-arylbenzo[b]naphtho[2,3-d]thiophenes", *J. Med. Chem.*, 42: 3199-3202;
- Wrobel, J. et al. (2000), "Synthesis and PTP1B inhibition of novel 4-aryl-1-oxa-9-thiacyclopenta[b]fluorenes", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 10, 1535-1538.
- 25

CLAIMS

1. A genotyping method, comprising determining the amino acid that is encoded by the GPR40 gene of a human subject at amino acid number 211.
2. A method of claim 1 further comprising determining the amino acid
5 that is encoded at amino acid number 211 by both alleles of the GPR40 gene of said subject.
3. A genotyping method of claim 1 further comprising determining whether the GPR40 gene of a said subject encodes an amino acid number 211 that is other than histidine.
- 10 4. A genotyping method of claim 1 further comprising determining whether the GPR40 gene of a said subject encodes an amino acid number 211 that is arginine.
5. A genotyping method of claim 1 further comprising determining whether the GPR40 gene of a said subject encodes an amino acid number 211 that
15 is histidine.
6. A genotyping method of claim 1 further comprising:
isolating nucleic acid from a human subject;
amplifying a contiguous sequence of said nucleic acid, wherein said
contiguous sequence comprises the nucleotides of GPR40 that encode amino acid
20 number 211, or the complementary sequence thereof;
treating said contiguous sequence with a nucleotide probe that enables
determination of the amino acid encoded at amino acid number 211 of the GPR40
gene of said subject; and
determining whether said probe hybridizes to said contiguous sequence
25 under conditions of high stringency.
7. A method of claim 6 wherein said probe enables determination whether amino acid number 211 of said GPR40 gene is histidine.
8. A method of claim 6 wherein said probe enables determination whether amino acid 211 of said GPR40 gene is arginine.
- 30 9. A method of claim 6 wherein said probe consists of a contiguous portion of a nucleotide sequence of SEQ. ID. NO: 9 having a length of about 13 to about 35 nucleotides, linked to a detectable label, and including the nucleotides encoding amino acid 211, or the complementary nucleotide sequence thereof.
10. A method of claim 6 wherein said probe consists of a contiguous
35 portion of a nucleotide sequence of SEQ. ID. NO: 10 having a length of about 13 to

about 35 nucleotides, linked to a detectable label, and including the nucleotides encoding amino acid 211, or the complementary nucleotide sequence thereof.

11. A method of treatment, comprising:

5 determining the amino acid that is encoded by the GPR40 gene of a human subject at amino acid number 211; and

treating said subject with a therapeutically effective amount of an Agent for treatment or prevention of a disease or pathological condition mediated by having at least one allele of the GPR40 gene wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine.

10 12. A method of claim 11, wherein said Agent is a thiazolidinedione antidiabetic compound, a pharmaceutically acceptable prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

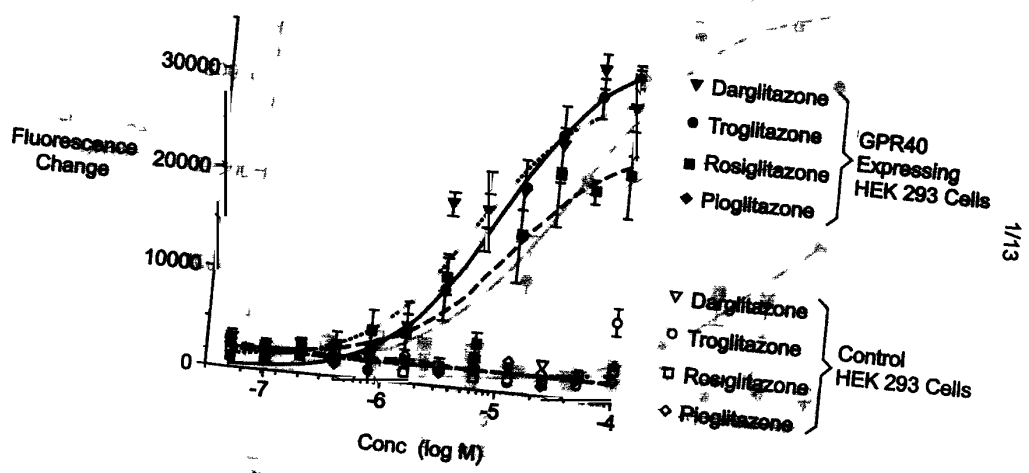
13. A method of claim 11, wherein said Agent is a dipeptidyl peptidase IV inhibitor, a pharmaceutically acceptable prodrug thereof or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

14. A kit, comprising a nucleotide probe that enables determination of the amino acid encoded at amino acid number 211 of the GPR40 gene of a human subject.

15. A method of characterizing an Agent, comprising:
20 measuring the competitive inhibition by a test Agent of binding of a GPR40 ligand to a first human GPR40 receptor wherein amino acid number 211 is histidine; and

measuring the competitive inhibition by said compound of binding of a GPR40 ligand to a second human GPR40 receptor wherein amino acid number 211 is other than histidine.

FIG. 24
FIG. 1



PCT/IB2005/001962

FIG 2A

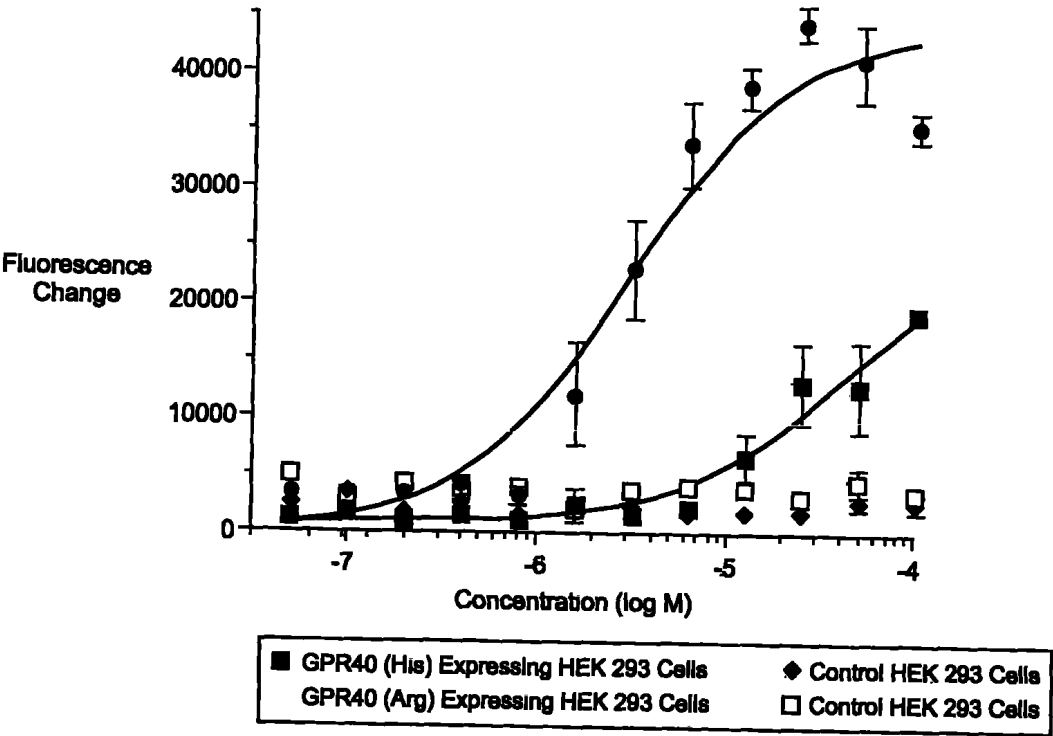
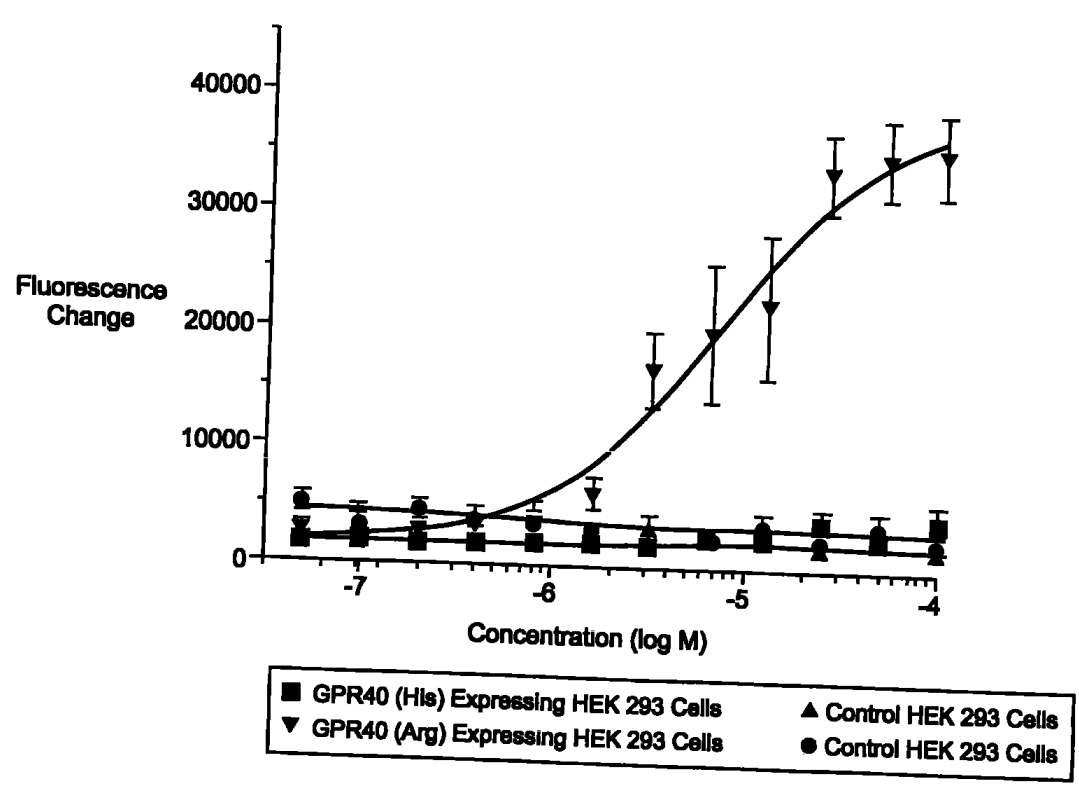


FIG. 2B



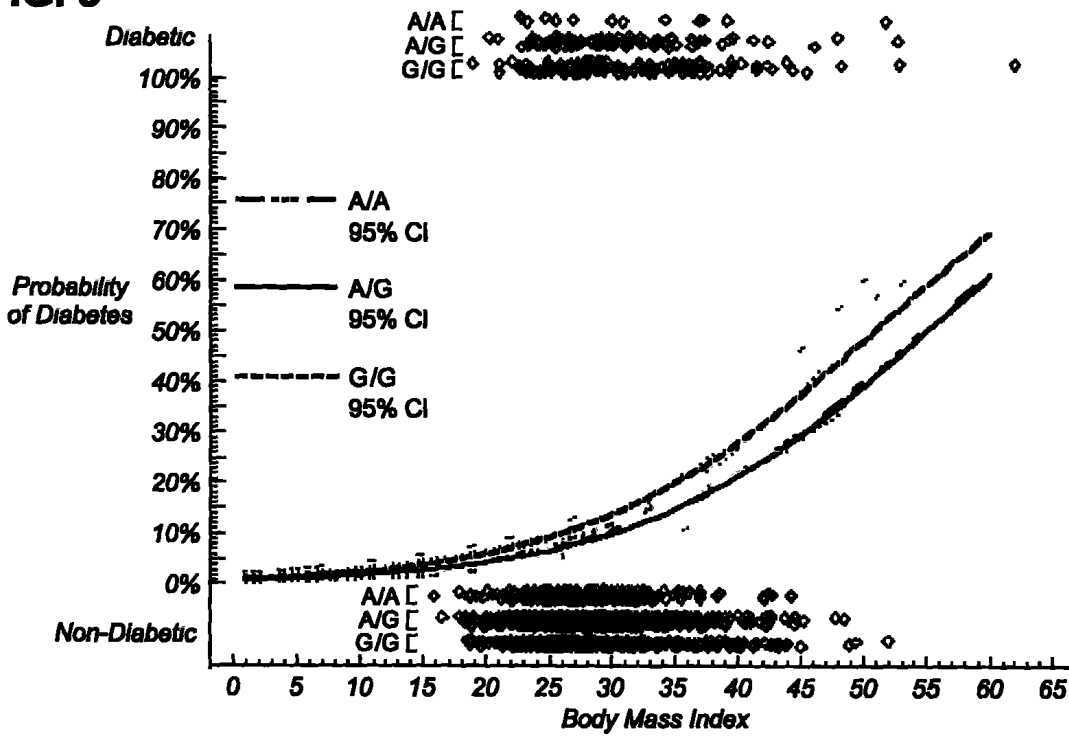
W/O 2006/000462

PCT/JP2005/011962

4/13

57

FIG. 3



5/13
FIG. 4

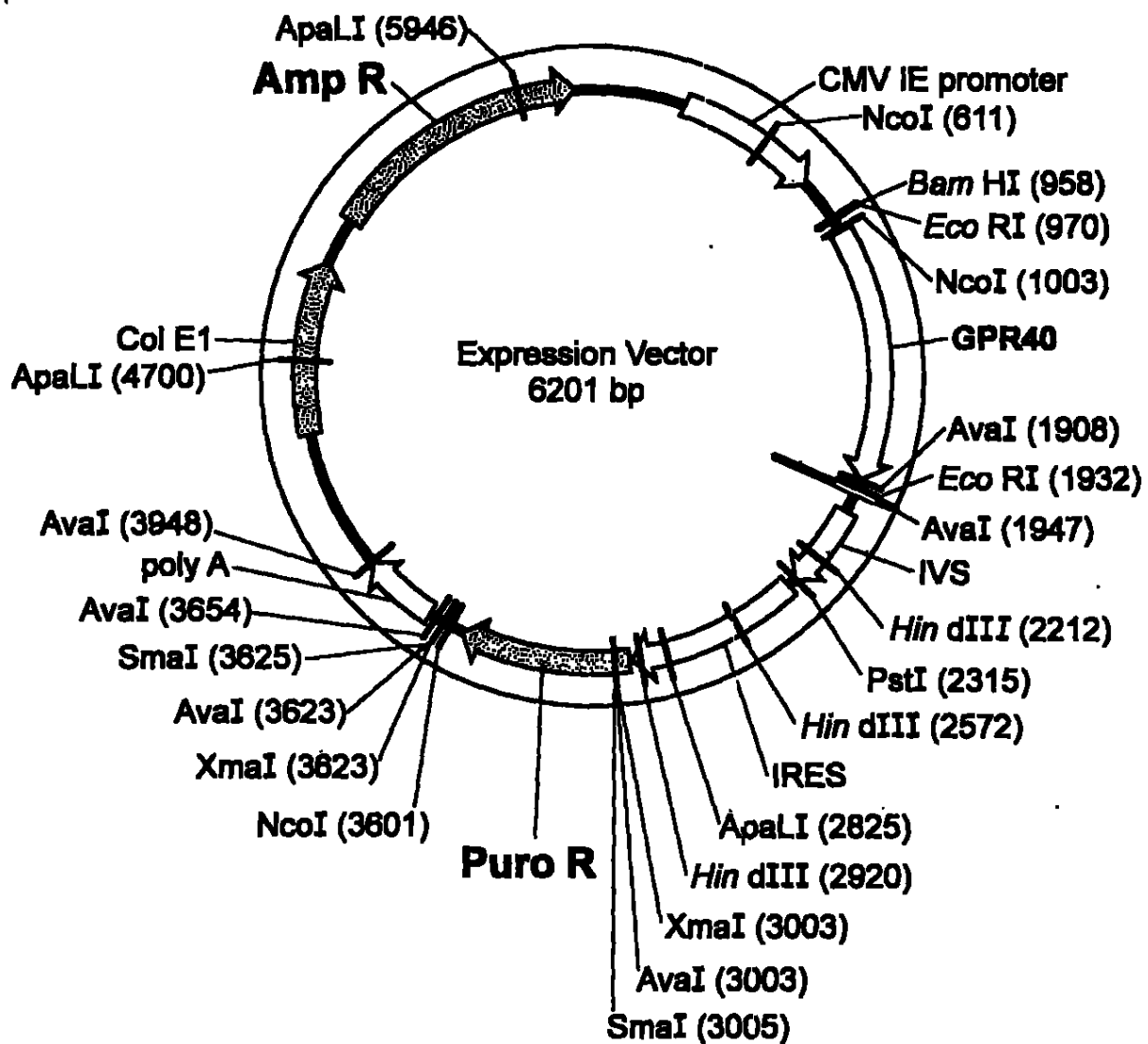


FIG 5A

5

SEQ ID NO 1

Human GPR40 nucleotide sequence

10

ATGGACCTGCCCCGCGAGCTCTCCTTCGGCCTCTATGTGGCCGCCCTTTCGCTGGGCTTCCCGCTCAAC
GTCCTGGCCATCCGAGGCGCGACGGCCCCACGCCGGCTCCGTCTCACCCTAGCCTGGTCTACGCCCTG
AACCTGGGCTGCTCCGACCTGCTGCTGACAGTCTCTCTGCCCTGAAGGCGGTGGAGGCGCTAGCCTCC
GGGGCTGGCCTCTGCCGGCCTCGCTGTGCCCGCTCTTCGCGGTGGCCACTTCTTCCACTCTATGCC
GGCGGGGCTTCTGCGCCGCCCTGAGTGCAGGCCGCTACCTGGGAGCAGCCTTCCCCTTGGGCTACCAA
GCCTTCCGGAGGCCGTGCTATTCTGGGGGGTGTGCGCGGCCATCTGGGCCCTCGTCTGTGTACCTG

15

GGTCTGGTCTTTGGGTTGGAGGCTCCAGGAGGCTGGCTGGACCACAGCAACACCTCCCTGGGCATCAAC
ACACCGGTCAACGGCTCTCCGGTCTGCCTGGAGGCCTGGGACCCGGCCTCTGCCGGCCCGGCCGCTTC
AGCCTCTCTCTCCTGCTCTTTTTTCTGCCCTTGGCCATCACAGCCTTCTGCTACGTGGGCTGCCTCCGG
GCACTGGCCCCGCTCCGGCCTGACGCACAGGCGGAAGCTGCGGGCCGCCTGGGTGGCCGGCGGGGCCCTC
CTCACGCTGCTGCTCTGCGTAGGACCTACAACGCCTCCAACGTGGCCAGCTTCCTGTACCCCAATCTA
GGAGGCTCCTGGCGGAAGCTGGGGCTCATCACGGGTGCCTGGAGTGTGGTGCTTAATCCGCTGGTGACC
GGTTACTTGGGAAGGGGTCTTGGCCTGAAGACAGTGTGTGCGGCAAGAACGCAAGGGGGCAAGTCCCAG
AAG

20

* Nucleotides encoding amino acid number 211 are highlighted

6/13

5

FIG 5B

25 SEQ ID NO 2
Human GPR40 amino acid sequence
MDLPPQLSFGLYVAAFALGFPLNVLAIRGATAHARLRLTPSLVYALNLGCSDLLLTVSLPLKAVEALAS
GAWFLPASLCPVFAVAHFFFLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFPPLGYQAFRRPCYSWGVCAAIWALVLCHL
30 GLVFGLEAPGGWLDHSNTSLGINTPVNGSPVCLEAWDPASAGPARFSLSLLLFFLPLAITAFICYVGCLR
ALARSGLTHRRKLRAAWVAGGALLTLLLCVGPYNASNVASFLYPNLGGSWRKLGLITGAWSVVLNPLVT
GYLGRGPGLKTVCAARTQGGKSQK
* Amino acid number 211 is highlighted

7/13

52

WO 2006/006062

PCT/JP2005/001962

8/13

52

FIG 6A

5 SEQ ID NO 3
Human GPR40 nucleotide sequence
ATGGACCTGCCCCCGCAGCTCTCCTTCGGCCTCTATGTGGCCGCCTTTGCGCTGGGCTTCCCGCTCAAC
GTCCTGGCCATCCGAGGCGCGACGGCCACGCCCCGGCTCCGTCTCACCCTAGCCTGGTCTACGCCCTG
AACCTGGGCTGCTCCGACCTGCTGCTGACAGTCTCTCTGCCCCGAAGGCGGTGGAGGCGTAGCCTCC
10 GGGCCTGGCCTCTGCCGGCCTCGCTGTGCCCGTCTTCGCGGTGGCCACTTCTTCCCACTCTATGCC
GGCGGGGGCTTCCTGGCCGCCCTGAGTGCAGGCCGCTACCTGGGAGCAGCCTTCCCCTTGGGCTACCAA
GCCTTCCGGAGGCGGTGCTATTCTCTGGGGGTGTGCGCGGCCATCTGGGCCCTCGTCTGTGTACCTG
GGTCTGGTCTTTGGGTGGAGGCTCCAGGAGGCTGGCTGGACCACAGCAACACCTCCCTGGGCATCAAC
ACACCGGTCAACGGCTCTCCGGTCTGCCTGGAGGCTGGGACCCGGCCTCTGCCGGCCCGGCCGCTTC
15 AGCCTCTCTCTCCTGCTCTTTTTCTGCCCTTGGCCATCACAGCCTTCTGCTACGTGGGCTGCCTCCGG
GCACTGGCCCACTCCGGCCTGACGCACAGGCGGAAGCTGCGGGCCGCCTGGGTGGCCGGCGGGGCCCTC
CTCACGCTGCTGCTCTGCGTAGGACCCTACAACGCCTCCAACGTGGCCAGCTTCCGTACCCCAATCTA
GGAGGCTCCTGGCGGAAGCTGGGGCTCATCACGGGTGCCTGGAGTGTGGTGCTTAATCCGCTGGTGACC
20 GGTACTTGGGAAGGGTCTTGGCCTGAAGACAGTGTGTGCGGCAAGAACGCAAGGGGGCAAGTCCCAG
AAG

* Nucleotides encoding amino acid number 211 are highlighted

59

WO 2006/006062

FIG. 6B

SEQ ID NO 4

Human GPR40 amino acid sequence

25

MDLPPQLSFGLYVAAFALGFPLNVLAIRGATAHARLRITPSLVYALNLGCSDLLLTVSLPLKAVEALAS
GAWPLPASLCPVFAVAHFFPLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFPGLGYQAFRRPCYSWGVCAAIWALVLC
GLVFGLEAPGGWLDHSNTSLGINTPVNGSPVCLEAWDPASAGPARFSLSLLLFFLPLAITAFCYVGCLR
ALAHSGLTTHRRKLRAAWVAGGALLTLLLCVGPYNASNVASFLYPNLGGSWRKLGLITGAWSVVLNPLVT
GYLGRGPGLKTVCAARTQGGKSQK

9/13

30

* Amino acid number 211 is highlighted

PCT/IB2005/001962

58

10/13

FIG. 7A

5

SEQ ID NO 5

Human GPR40 PCR forward primer sequence

CTTGCCATCACAGCCTTCT

10

SEQ ID NO 6

Human GPR40 PCR reverse primer sequence

CCACGTTGGAGGCGTTGT

15

SEQ ID NO 7

Human GPR40 PCR probe sequence

CACTGGCCCACTCT

20

SEQ ID NO 8

Human GPR40 PCR probe sequence

CACTGGCCCGCTC

FIG. 7B

SEQ ID NO 9

Human GPR40 nucleotide sequence

25 CTTCTGCTACGTGGGCTGCCTCCGGGCACTGGCCCGCTCCGGCCTGACGCACAGGCGGAAGCTGCGGGC
CG

* Nucleotides encoding amino acid number 211 are highlighted

SEQ ID NO 10

Human GPR40 nucleotide sequence

30 CTTCTGCTACGTGGGCTGCCTCCGGGCACTGGCCCACTCCGGCCTGACGCACAGGCGGAAGCTGCGGGC
CG

* Nucleotides encoding amino acid number 211 are highlighted

12/13

[illegible]

FIG. 8B

13/13

[illegible]

63

WO 2006/006062

PCT/IB2005/001962

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc.
Houseknecht, Karen L.
Banerjee, Poulabi

<120> RNA BIOASSAY

<130> PC26139A

<150> US 60/584,686

<151> 2004-06-30

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atggacctgc ccccgagct ctcttcggc ctctatgtgg cggcctttgc gctgggcttc      60
ccgctcaacg tcttggccat cggaggcgg acggcccaac cgggctccg tctacacct      120
agcctggtct acgacctgaa cctgggctgc tccgacctgc tgcctacagt ctctctgccc      180
ctgaaggcgg tggaggcgt agcctccggg gcctggcctc tgcgggcctc gctgtgcccc      240
gtcttcggcg tggccactt cttccactc tatgcggcg ggggttctt ggcggccctg      300
agtgcaggcc gctacctggg agcagccttc ccttgggct accaagcctt ccggaggcgg      360
tgctattcct ggggggtgtg cgcggccatc tgggacctcg tctgtgtca cctgggtctg      420
gtctttgggt tggaggctcc aggaggctgg ctggaccaca gcaaacctc cctgggcata      480
aacacaccgg tcaacggctc tccggtctgc ctggaggcct gggacccggc ctctgcggc      540
cgggccgct tcagccttc tctctgtc tttttctgc ccttggccat caccgcttc      600
tgctacgtgg gctgctccg ggcactggc cgtccggc tgacgacag gcggaagctg      660
cgggcggcct ggggtggcgg cggggcctc ctacgctgc tgccttgcgt aggacctac      720
aacgcctcca acgtggccag cttcctgtac cccaatctag gaggctcctg gcggaagctg      780
gggctcatca cgggtgctg gagtgtgtg cttaatccgc tggtgaccg ttacttggga      840
aggggtcctg gcctgaagac agtgtgtg gcaagaacgc aagggggcna gtcccagaag      900

```

<210> 2

<211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

CA

WO 2006/006062

PCT/IB2005/001962

Met Asp Leu Pro Pro Gln Leu Ser Phe Gly Leu Tyr Val Ala Ala Phe
1 5 10 15

Ala Leu Gly Phe Pro Leu Asn Val Leu Ala Ile Arg Gly Ala Thr Ala
20 25 30

His Ala Arg Leu Arg Leu Thr Pro Ser Leu Val Tyr Ala Leu Asn Leu
35 40 45

Gly Cys Ser Asp Leu Leu Leu Thr Val Ser Leu Pro Leu Lys Ala Val
50 55 60

Glu Ala Leu Ala Ser Gly Ala Trp Pro Leu Pro Ala Ser Leu Cys Pro
65 70 75 80

Val Phe Ala Val Ala His Phe Phe Pro Leu Tyr Ala Gly Gly Gly Phe
85 90 95

Leu Ala Ala Leu Ser Ala Gly Arg Tyr Leu Gly Ala Ala Phe Pro Leu
100 105 110

Gly Tyr Gln Ala Phe Arg Arg Pro Cys Tyr Ser Trp Gly Val Cys Ala
115 120 125

Ala Ile Trp Ala Leu Val Leu Cys His Leu Gly Leu Val Phe Gly Leu
130 135 140

Glu Ala Pro Gly Gly Trp Leu Asp His Ser Asn Thr Ser Leu Gly Ile
145 150 155 160

Asn Thr Pro Val Asn Gly Ser Pro Val Cys Leu Glu Ala Trp Asp Pro
165 170 175

Ala Ser Ala Gly Pro Ala Arg Phe Ser Leu Ser Leu Leu Leu Phe Phe
180 185 190

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

Leu Ala Arg Ser Gly Leu Thr His Arg Arg Lys Leu Arg Ala Ala Trp
210 215 220

Val Ala Gly Gly Ala Leu Leu Thr Leu Leu Leu Cys Val Gly Pro Tyr
225 230 235 240

Asn Ala Ser Asn Val Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Asn Leu Gly Gly Ser

WO 2006/006061

PCT/IB2005/001962 . . .

245

250

255

Trp Arg Lys Leu Gly Leu Ile Thr Gly Ala Trp Ser Val Val Leu Asn
260 265 270

Pro Leu Val Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Gly Pro Gly Leu Lys Thr Val
275 280 285

Cys Ala Ala Arg Thr Gln Gly Gly Lys Ser Gln Lys
290 295 300

<210> 3
<211> 900
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atggacctgc ccccgagct ctcttcggc ctctatgtg cgcctttgc gctgggcttc 60
cgcctcaacg tcctggccat cggaggcgc agggccacg ccggtctcg tctcaccct 120
agcctggtct acgcctgaa cctgggctgc tccgacctgc tgcgtacagt ctctctgccc 180
ctgaaggcgg tggaggcgt agcctccggg gcttggtctc tgcgggctc gctgtgcccc 240
gtcttcggcg tggccactt ctccacctc tatgcccggg ggggttctt ggcgccttg 300
agtgcaggcc gctacctggg agcagcttc ccttgggct accaagcctt ccggaggcgc 360
tgcatttctt ggggggtgtg cgcggccatc tgggcccctg tctgtgtca cctgggtctg 420
gtctttgggt tggaggctcc aggaggctgg ctggaccaca gcaacacctc cctgggcctc 480
aacacaccgg tcaacggctc tccggtctgc ctggaggcct gggaccggc ctctgcgggc 540
ccggcccgtt tcagctctc tctctgtc ttttttctg ccttgjccat cacagccttc 600
tgcacgtgg gctgctccg ggcactggc cactccggc tgaagcacag gcggaagctg 660
cgggcgcctt ggggtggcgg cggggccctc ctacgctgc tgcctcggtt aggacctac 720
aacgctcca acgtggccag ctctctgtac cccaatctg gaggctcctg gcggaagctg 780
gggtcatca cgggtgcctg gagtgtgtg cttaatccg tggtagcgg ttacttggga 840
aggggtcttg gcctgaagac agtgtgtgag gcaagaacgc aagggggcaa gtcccagaag 900

<210> 4
<211> 300
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asp Leu Pro Pro Gln Leu Ser Phe Gly Leu Tyr Val Ala Ala Phe
1 5 10 15

WO 2006/006062

PCT/IB2005/001962

Ala Leu Gly Phe Pro Leu Asn Val Leu Ala Ile Arg Gly Ala Thr Ala
 20 25 30

His Ala Arg Leu Arg Leu Thr Pro Ser Leu Val Tyr Ala Leu Asn Leu
 35 40 45

Gly Cys Ser Asp Leu Leu Leu Thr Val Ser Leu Pro Leu Lys Ala Val
 50 55 60

Glu Ala Leu Ala Ser Gly Ala Trp Pro Leu Pro Ala Ser Leu Cys Pro
 65 70 75 80

Val Phe Ala Val Ala His Phe Phe Pro Leu Tyr Ala Gly Gly Gly Phe
 85 90 95

Leu Ala Ala Leu Ser Ala Gly Arg Tyr Leu Gly Ala Ala Phe Pro Leu
 100 105 110

Gly Tyr Gln Ala Phe Arg Arg Pro Cys Tyr Ser Trp Gly Val Cys Ala
 115 120 125

Ala Ile Trp Ala Leu Val Leu Cys His Leu Gly Leu Val Phe Gly Leu
 130 135 140

Glu Ala Pro Gly Gly Trp Leu Asp His Ser Asn Thr Ser Leu Gly Ile
 145 150 155 160

Asn Thr Pro Val Asn Gly Ser Pro Val Cys Leu Glu Ala Trp Asp Pro
 165 170 175

Ala Ser Ala Gly Pro Ala Arg Phe Ser Leu Ser Leu Leu Leu Phe Phe
 180 185 190

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

Leu Ala His Ser Gly Leu Thr His Arg Arg Lys Leu Arg Ala Ala Trp
 210 215 220

Val Ala Gly Gly Ala Leu Leu Thr Leu Leu Leu Cys Val Gly Pro Tyr
 225 230 235 240

Asn Ala Ser Asn Val Ala Ser Phe Leu Tyr Pro Asn Leu Gly Gly Ser
 245 250 255

67

WO 2006/006062

PCT/IB2005/001962

Trp Arg Lys Leu Gly Leu Ile Thr Gly Ala Trp Ser Val Val Leu Asn
260 265 270

Pro Leu Val Thr Gly Tyr Leu Gly Arg Gly Pro Gly Leu Lys Thr Val
275 280 285

Cys Ala Ala Arg Thr Gln Gly Gly Lys Ser Gln Lys
290 295 300

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
cttggccatc acagccttct 20

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
ccacgttggg ggcgttgt 18

<210> 7
<211> 14
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
cactggccca ctct 14

<210> 8
<211> 13
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
cactggcccg ctc 13

<210> 9
<211> 71
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
cttctgtctac gtgggtgcc tccgggcact ggcccgtcc ggctgaagc acagggcgaa 60

gctgagggcc g 71

<210> 10

WO 2006/006062

PCT/IB2005/001962

<211> 71
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 cttctgctac gtgggctgcc tccgggcaact ggcccaactcc ggcttgacgc acaggcgga 60
 gctgogggcc g 71

<210> 11
 <211> 6201
 <212> DNA
 <213> Expression Vector

<400> 11
 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gaggtagtgcg 120
 cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 ccogcccatt gaogtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccanta gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttaagggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taantggccc gcctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacacctac gtattagtca 600
 tcgtattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaatcaacg ggaactttcca aaatgtcgta acaactccg cccattgacg caaatgggog 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatcga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 900
 gtttatcaca agtttgtaaa aaaaagcagc tggcgccgga accaattcag tcgactggat 960
 ccggtaccga attcgttaga gccttgctgg ccggcgcccc accatggacc tgcctccgca 1020
 gctctccttc ggctctatg tggccgctt tgcgctgggc ttcccgctca acgtcctggc 1080
 catccgaggc ggcacggccc acgcccggct cgtctcacc cctagctggg tctacgccct 1140
 gaacctgggc tgctcogacc tgctgctgac agtctctctg cccctgaagg cggtaggagc 1200
 gctagccctc ggggcctggc ctctgccggc ctcgctgtgc cccgtcttcg cggtaggccc 1260
 cttcttccca ctctatgccg ggggggctt cctggccgac ctgagtgcag gccgtacct 1320
 gggagcagcc ttccctctgg gctaccaagc ctccggagg ccgtgctatt cctggggggg 1380

gtgtgaggcc atctggggcc tgcctcctgtg tcacctgggt ctggctcttg ggttggaggc 1440
 tccaggaggc tggctggacc acagcaacac ctccctgggc atcaacacac cggctcaacgg 1500
 ctctccggtc tgcctggagg cctgggaccc ggcctctgac gggccggccc gcttcagcct 1560
 ctctctcctg ctcttttttc tgccttggc catcacagcc ttctgctaog tgggtgcct 1620
 cggggcactg gcccactccg gcttgacgca caggcggaaag ctgcgggccc cctgggtggc 1680
 cggcggggcc ctctcaccg tgcctgctctg cgtaggaccc tacaa.cgcct ccaacgtggc 1740
 cagcttctg taccceaatc taggaggctc ctggcggaaag ctggggctca tcacgggtgc 1800
 ctggagtgtg gtgcttaatc cgtcgtgac cggttacttg ggaagggtc ctggcctgaa 1860
 gacagtgtgt gcggcaagaa cgcagggggg caagtcccag aagtaactcg agggccaaact 1920
 aggcctagcc gaattcgcgg cgcactcga gatattctga ccaggtttc ttgtacaaag 1980
 tggtaagatc cggggccgca tagataactg atccagtgtg ctgganttaa ttcgctgtct 2040
 gcgaggggca gctgttgggg tgagtactcc ctctcaaaag cgggcctgac ttctgcgcta 2100
 agattgtcag tttccaaaa caggagggtat ttgatattca cctggcccgcc ggtgatgcct 2160
 ttgagggtgg ccgcgtccat ctggtcagaa aagacaatct ttttgttgc aagcttgagg 2220
 tgtggcaggc ttgagatctg gccatacact tgagtgacaa tgacatccac tttgcctttc 2280
 tctccacagg tgtccactcc caggtcacac tgcaggtcga goatgcctct agggcggcca 2340
 attccgcccc tctccctccc cccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggantaagg 2400
 cgggtgtgag tttgtctata tgtgattttc caccatattg ccgtctcttg gcaatgtgag 2460
 gggccggaaa cctggccctg tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc 2520
 caaagggaatg caaggctctg tgaatgtcgt gaaggaaagca gttcctcttg aagcttcttg 2580
 aagacaaaca acgtctgtag cgaacctttg caggcagcgg aacccccac ctggcgacag 2640
 gtgcctctgc ggcacaaagc cagctgtata agatacacct gcaaggcgg cacaaaccca 2700
 gtgccacgtt gtgagttgga tagttgtgga aagagtcaaa tggctctcct caagcgtatt 2760
 caacaagggg ctgaaggatg ccagaaaggc acccattgt atgggatctg atctggggcc 2820
 tcggtgcaca tgctttacat gtgtttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gcccccgaa 2880
 ccacggggag gtggttttcc tttgaaaaac acgatgataa gcttgccaca accacaaag 2940
 agacgacctt ccatgacoga gtacaagccc acggtgcgcc tcgccaccgg cgacgacgtc 3000
 ccccgggcgg tacgcacct cgcgcgcgg ttgcgcgact acccgcacac gcgcacacac 3060
 gtcgaccogg accgccacat cgagcgggtc accgagctgc aagaactctt cctcacgcgc 3120
 gtcgggtctg acatcggcaa ggtgtgggtc gcggacgacg gcgcgcgggt ggcgggtctg 3180

WO 2006/006062

PCT/IB2005/001962

accacgcggg agagcgtcga agcggggggcg gtgttcgccc agatcggccc ggcgatggcc 3240
 gagttgagcg gttcccggtc ggccgcgacg caacagatgg aaggcctcct ggccgcgcac 3300
 cggcccaagg agcccgcgts gttcctggcc accgtcggcg tctcgccga ccaccagggc 3360
 aagggctctgg gcagcgccgt cgtgctcccc ggaagtggagg cggccgagcg cgcgggggtg 3420
 ccgcctctcc tggagacctc cgcgccccgc aacctccct tctaxgagcg gctcggcttc 3480
 accgtcaccg ccgacgtcga gtgcccgaag gacccgcgga cctggtgcat gaccgcgaag 3540
 cccggtgcct gacgccccgc ccacgacccg cagcgcccgga ccgaaaggag cgcacgaccc 3600
 catgggtccg accgaagcog acccggggcg ccccgccgac ccgcaccccg ccccgaggcg 3660
 ccaccgactc tagagctcgc tgatcagcct cgaactgtgc ttctagtgc cagccatctg 3720
 ttgtttgccc ctcccccgts ccttcttga cctgggaagg tgccactccc actgtccttt 3780
 cctaataaaa tgaggaaatt gcacgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 3840
 gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg 3900
 atgoggtggg ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag ctggggtctg agtgcatctc 3960
 agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tottatcatg tctgtatacc gtgcacctct 4020
 agctagagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaattg ttatccgctc 4080
 acaattccac acaacatacg agccggaaag ataaagtga aagcctgggg tgcctaata 4140
 gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg 4200
 tgcgtccagc tgcattaatg aatcgcccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg 4260
 cgtctctccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tgcgtcggct gcggcgagcg 4320
 gtatcagcto actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga 4380
 aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccagggaac gtaaaaaggc cgcgttgctg 4440
 gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaatctgac ctcaagtacg 4500
 aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc 4560
 gtgcgctctc ctgttccgac cctgcgcgtt accggatacc tgcgcgctt tctcccttcg 4620
 ggaagcgtgg cgttttctca atgtcacgc tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt 4680
 cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgacgcgtg cgccttatcc 4740
 ggtactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc 4800
 actggtaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcgggt ctacagagt cttgaagtgg 4860
 tggcctaact accgctacac tagaaggaca gtatttggtt tctgcgctct gctgaagcca 4920
 gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgcgtgtagc 4980
 ggtgggtttt ttgtttgcac gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 5040

```

cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaag aaaaactcag ttaagggatt 5100
ttggtcatga gattatcama aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaatgaagt 5160
tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg acagttaacca atgcttaato 5220
agtgaaggcac ctatctcagc gatctgtcta ttogtctoat ccatagttgc ctgactcccc 5280
gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttacctctg gccccagtgc tgcaatgata 5340
cgcgagagcc caogctcaco ggctccagat ttatcagcaa taanccagcc agocggaagg 5400
gccgagcgca gaagtgggcc tgcaacttta tccgctcca tccagtctat taattgttgc 5460
cgggaagcta gagtaagtag ttgcacagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct 5520
acagycatcg tgggtgcacg ctogtctttt ggtatggctt cattcagctc oggttcccaa 5580
cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctctcttggg 5640
cctcogatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca 5700
ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac 5760
tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgacoga gttgctcttg ccggcgctca 5820
atacgggata ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt 5880
tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc 5940
actcgtgcac ccaactgatc ttacagatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca 6000
aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata 6060
ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttacc agggttattg tctcatgagc 6120
ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaatatg gggttccgag cacatttccc 6180
cgaaaagtgc cacctgacgt c 6201

```

72

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2005/001962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base used, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAGA H. ET AL.: "Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: Identification of 190562 genetic variations in the human genome" JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 47, no. 11, 2002, pages 605-610, XP002278549 cited in the application	1-10,14
Y	abstract page 606 ----- -/-	11-13,15
☒ Further documents are listed in the continuation of text C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 October 2005		Date of mailing of the international search report 08/11/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 16 Patentamt 2 NL - 2200 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-2018		Authorized officer Barz, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB2005/001962

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ITOH Y. ET AL.: "Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40" NATURE, LONDON, GB, vol. 422, no. 6928, 13 March 2003 (2003-03-13), pages 173-176, XP002903889 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	1-15
A	KOTARSKY K. ET AL.: "A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 301, no. 2, 7 February 2003 (2003-02-07), pages 406-410, XP002349382 ISSN: 0006-291X cited in the application abstract	1-15
P,X	OGAWA T. ET AL.: "GPR40 gene Arg211His polymorphism may contribute to the variation of insulin secretory capacity in Japanese men" METABOLISM, CLINICAL AND EXPERIMENTAL, W.B. SAUNDERS CO., PHILADELPHIA, PA, US, vol. 54, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 296-299, XP004757296 ISSN: 0026-0495 the whole document	1-15
P,X	HAMID Y.H. ET AL.: "Studies of relationships between variation of the human G protein-coupled receptor 40 Gene and Type 2 diabetes and insulin release." DIABETIC MEDICINE: A JOURNAL OF THE BRITISH DIABETIC ASSOCIATION, vol. 22, no. 1, January 2005 (2005-01), pages 74-80, XP002349383 ISSN: 0742-3071 the whole document	1-15

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2005/001962

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-13 (industrial applicability)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International Application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 1-10 are directed to a diagnostic method encompassing a potential surgical step or potentially practised on the human body, the search has been carried out for the corresponding methods lacking such surgical and in vivo diagnostic steps. Furthermore, although claims 11-13 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

77

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/IB2005/001962

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 02057783	A	25-07-2002	EP	1354200 A2	22-10-2003

**MÉTODOS RELACIONADOS CON UN ÚNICO POLIMORFISMO NUCLEOTÍDICO
DEL RECEPTOR ACOPLADO A LA PROTEÍNA G, GPR40**

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a métodos de genotipado, métodos de tratamiento, pruebas de diagnóstico y kits y métodos de caracterización de un agente, relacionado con un único polimorfismo nucleotídico del gen GPR40.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La diabetes es una enfermedad grave y a veces mortal que afecta a más de 17 millones de americanos y a 151 millones de personas en todo el mundo. Gadsby (2002). La diabetes procede de la insuficiencia de cuerpo para producir insulina o responder apropiadamente a la misma. La glucosa es el principal sustrato que regula la secreción de la insulina, pero otros nutrientes tales como los ácidos grasos libres (FFA) y los aminoácidos pueden modificar la secreción de insulina. Haber *et al.* (2002).

15 Existen dos tipos principales de diabetes. En la diabetes de tipo I, las células R pancreáticas productoras de insulina son destruidas por el propio sistema inmunitario del cuerpo, lo que conduce a una insuficiencia de insulina. La diabetes de tipo II procede de la pérdida de sensibilidad por las células del cuerpo a la acción de la insulina y de la incapacidad del páncreas para liberar la insulina de manera apropiada. La frecuencia de la diabetes de tipo II está aumentando, y, en los Estados Unidos, ha llegado a ser especialmente frecuente en determinadas poblaciones en situación de riesgo. Gadsby (2002).

25 El síndrome metabólico es un conjunto de condiciones metabólicas que aumenta el riesgo de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares. Park *et al.* (2003). Se han descrito procesos incluyendo la obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión que son componentes clave del síndrome metabólico. Reilly y Rader (2003); Park *et al.* (2003); Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001)

30 La obesidad se ha identificado como un factor central que contribuye al síndrome metabólico. Se ha propuesto que una reducción del exceso de peso corporal minimizaría los riesgos asociados al síndrome metabólico. Shirai (2004).

35 Los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) son una superfamilia de las proteínas de la membrana caracterizados por la presencia de siete segmentos de la hélice a de la transmembrana (denominados TM1 a TM7) que conectan bucles

intracelulares y extracelulares alternos. Gether (2000). Los GPCR median la señalización entre las moléculas con señal, tales como las hormonas, neurotransmisores y mediadores locales, y enzimas intracelulares, canales y transportadores iónicos. Véase Johnson y Dhanasekaran (1989).

5 Sawzdargo *et al.* (1997) dan a conocer la identificación del gen del GPCR, GPR40, localizado en el cromosoma 19g13.1, que codifica una proteína de 300 aminoácidos e identificado con el número de registro AF024687 del GenBank®.

 Haga *et al.* (2002) dan a conocer 190.562 variaciones genéticas del genoma humano, incluyendo un único polimorfismo nucleotídico del gen GPR40 en el que el
10 nucleótido 632 de la secuencia de codificación (correspondiente al nucleótido 642 en la secuencia con el número de registro AF024687 del GenBank) puede ser guanina (G) o adenosina (A), de manera que el aminoácido 211 es arginina o histidina. Este único polimorfismo nucleotídico está identificado en la base de datos dbSNP del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con el número de registro
15 rs2301151.

 La publicación de la solicitud de patente internacional nº WO 02/057783 y Briscoe *et al.* (2003) dan a conocer que GPR40 se expresa de manera específica en las células β pancreáticas así como en el cerebro humano, del ratón y de la rata. Además, el documento WO 02/057783 y Briscoe *et al.* identifican ligandos de GPR40
20 con ácidos grasos saturados e insaturados de cadena media y larga procedentes de experimentos de medición de la concentración del ion calcio.

 Kotarsky *et al.* (2003) dan a conocer que GPR40, no solamente es activado por una gama de ácidos grasos, sino también por fármacos antidiabéticos de tiazolidindiona, medidos con un sistema indicador ligado al receptor GPR40.

25 Itoh *et al.* (2003) dan a conocer que la fijación y activación de GPR40 por ácidos grasos libres aumenta la secreción de insulina.

 La publicación de la solicitud de patente internacional nº WO 04/072650 da a conocer secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos de GPR40 humano y su regulación para el tratamiento de enfermedades hematológicas, trastornos del sistema nervioso periférico y central, enfermedades gastrointestinales,
30 enfermedades respiratorias, enfermedades metabólicas, cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades urológicas en mamíferos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en parte, a métodos de genotipado, que comprenden la determinación del aminoácido que es codificado por el gen GPR40 de un paciente humano en el aminoácido número 211. En una realización preferida, se
5 determina el aminoácido codificado en el aminoácido número 211 de ambos alelos del gen GPR40. En otra realización preferida, dichos métodos de genotipado conllevan determinar si dicho aminoácido número 211 es otro distinto de histidina. En otra realización preferida, dichos métodos de genotipado conllevan determinar si dicho aminoácido número 211 es arginina. En una realización preferida adicional, dichos
10 métodos de genotipado conllevan determinar si dicho aminoácido número 211 es histidina. En una realización aún más preferida, dichos métodos de genotipado comprenden, el aislar un ácido nucleico de un paciente humano, ampliando una secuencia contigua de dicho ácido nucleico, en la que dicha secuencia contigua comprende los nucleótidos de GPR40 que codifican el aminoácido número 211, o sus
15 secuencias complementarias, tratar dicha secuencia contigua con una sonda nucleotídica que permite la determinación del aminoácido codificado en el aminoácido número 211 del gen GPR40 de dicho paciente; y determinar si dicha sonda hibrida dicha secuencia contigua en condiciones de alta severidad. En una realización preferida, dicha sonda consiste en un fragmento contiguo de una secuencia
20 nucleotídica de la SEQ. ID. n°: 9 o de la SEQ. ID. n°: 10 que tiene una longitud de aproximadamente 13 a aproximadamente 35 nucleótidos, unidos a un marcador detectable, e incluyendo los nucleótidos que codifican el aminoácido 211, o su secuencia nucleotídica complementaria.

Un aspecto adicional de la invención proporciona métodos de tratamiento, que
25 comprenden, determinar el aminoácido que es codificado por el gen GPR40 de un paciente humano en el aminoácido número 211 y tratar a dicho paciente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un proceso patológico mediado por tener al menos un alelo, y preferentemente ambos alelos, del gen GPR40 en los que el aminoácido codificado
30 número 211 es otro distinto de la histidina, preferentemente arginina. En una realización preferida, dicho agente se selecciona entre insulina, un compuesto de sulfonilurea que estimula la secreción de insulina, un inhibidor de glucógeno fosforilasa, un inhibidor de la producción de biguanida glucosa hepática, un inhibidor de alfa-glucosidasa, un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa-1B, un inhibidor de
35 dipeptidil peptidasa IV, un inhibidor de glucógeno sintetasa cinasa-3 beta, un agonista

- del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma, un antagonista del receptor de glucagón, un inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina, un inhibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, un agonista del ácido gamma-aminobutírico, un inhibidor de la enzima convertidora en angiotensina, un antagonista receptor de angiotensina-II, un inhibidor de fosfodiesterasa de tipo 5, un inhibidor de sorbitol deshidrogenasa y un inhibidor de aldosa reductasa, uno de sus profármacos farmacéuticamente aceptables o de sus sales farmacéuticamente aceptables. En otra realización preferida, dicho agente es un agente contra la obesidad, preferentemente seleccionado de un inhibidor de la proteína de transferencia de la secreción de apolipoproteína B/triglicérido de microsomas, un inhibidor de 11 β -hidroxi esteroide deshidrogenasa-1, un péptido YY₃₋₃₆, un análogo del péptido YY₃₋₃₆, un agonista canabinoide, un agonista de MCR-4, un agonista de colecistoquinina-A, un inhibidor de reabsorción de monoamina, un agente simpatomimético, un agonista de receptor adrenérgico β 3, un agonista de dopamina, un análogo del receptor de hormona estimulante de melanocitos, un agonista de 5HT2c, un antagonista de la hormona concentradora de melanina, leptina, un análogo de leptina, un agonista de receptor de leptina, un antagonista de galanina, un inhibidor de lipasa, un agente anorexígeno, un antagonista de receptor de neuropéptido-Y, un agente tiromimético, deshidroepiandrosterona, un análogo de deshidroepiandrosterona, un agonista de receptor glucocorticoide, un antagonista de receptor de orexina, un agonista de receptor de péptido-1 tipo glucagón, un factor neurótrofo ciliar, una proteína humana relacionada con el agutí, un antagonista de receptor de ghrelin, un antagonista de receptor de histamina 3, un agonista inverso de receptor de histamina 3 y un agonista de receptor U de neuromedina.
- Otro aspecto de la invención se refiere a kits, que comprenden una sonda nucleotídica que permite la determinación del aminoácido codificado en el aminoácido número 211 del gen GPR40 de un paciente humano. En una realización preferida, dicha sonda permite la determinación si el aminoácido número 211 de dicho gen GPR40 es histidina. En otra realización, dicha sonda permite la determinación si el aminoácido número 211 de dicho gen GPR40 es otro distinto de histidina, preferiblemente arginina. En una realización preferida adicional, dicha sonda consiste en un fragmento contiguo de una secuencia nucleotídica de la SEQ. ID. n°: 9 o de la SEQ. ID. n°: 10 que tiene una longitud de aproximadamente 13 a aproximadamente 35 nucleótidos, unidos a un marcador detectable, e incluyendo los nucleótidos que codifican el aminoácido 211, o su secuencia nucleotídica complementaria. En una

realización preferida adicional, dichos kits comprenden además: un primer cebador nucleotídico de la reacción en cadena de la polimerasa que es complementario con una secuencia nucleotídica que está aguas abajo de los nucleótidos que codifican el aminoácido 211 de dicho gen GPR40 y un segundo cebador de la reacción en cadena de la polimerasa que es complementario de una secuencia nucleotídica que está aguas arriba de los nucleótidos que codifican dicho aminoácido 211; o un primer cebador que es complementario con una secuencia nucleotídica que está aguas arriba de los nucleótidos que codifican el aminoácido 211 y un segundo cebador de la reacción en cadena de la polimerasa que es complementario de una secuencia nucleotídica que está aguas abajo de los nucleótidos que codifican dicho aminoácido 211. En otra realización preferida, dichos kits comprenden además un recipiente.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a los métodos de caracterización de un agente, que comprende medir la inhibición competitiva mediante un agente de ensayo de la fijación de un ligando GPR40 a un primer receptor GPR40 humano en el que el aminoácido número 211 es la histidina y medir la inhibición competitiva mediante dicho compuesto de fijación de un ligando de GPR40 a un segundo receptor GPR40 humano en el que el aminoácido número 211 es otro distinto de histidina. En una realización preferida, el aminoácido número 211 de dicho segundo receptor es la arginina. En una realización más preferida, los métodos comprenden además comparar la inhibición competitiva de la fijación con dicho compuesto de dicho primer receptor y de dicho segundo receptor.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a los métodos de caracterización de un agente, que comprenden, medir la activación mediante un agente de ensayo de un primer receptor GPR40 humano en el que el aminoácido número 211 es la histidina y medir la activación mediante un agente de ensayo de un segundo receptor GPR40 humano en el que el aminoácido número 211 es otro distinto de la histidina. En una realización preferida, el aminoácido número 211 de dicho segundo receptor es la arginina. En una realización más preferida, dichos métodos comprenden además comparar la activación mediante dicho compuesto de dicho primer receptor y de dicho segundo receptor.

Otro aspecto de la invención proporciona métodos de caracterización de un agente, que comprende medir la inhibición mediante un agente de ensayo de la activación de un primer receptor GPR40 humano mediante un activador de GPR40, en el que el aminoácido número 211 de dicho primer receptor es la histidina y medir la inhibición mediante un agente de ensayo de la activación de un segundo receptor

GPR40 humano por un activador de GPR40, en el que el aminoácido número 211 de dicho segundo receptor es otro distinto de la histidina, preferentemente, la arginina. En una realización más preferida, dichos métodos comprenden además comparar la inhibición de la activación mediante dicho compuesto de dicho primer receptor y de dicho segundo receptor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra la activación de GPR40 por los compuestos de tiazolidindiona medida por liberación del ion calcio intracelular en células HEK 293 que expresan a GPR40 comparadas con células HEK 293 que no expresan a GPR40.

La Figura 2 presenta una comparación entre la activación por los compuestos de tiazolidindiona de GPR40 con histidina frente a arginina en el aminoácido 211 medida por liberación del ion calcio intracelular en las células HEK 293 que expresan a GPR40.

La Figura 3 presenta las curvas de regresión logística (líneas llenas) con límites de confianza del 95% (líneas de puntos) y los puntos de datos individuales para cada genotipo de GPR40 en una población de 2465 pacientes (1332 masculinos y 857 femeninos) comparando el índice de masa corporal con la probabilidad de padecer diabetes. Los puntos de datos en la parte superior del gráfico indican el índice de masa corporal de pacientes con diabetes. Los puntos de datos en la parte inferior del gráfico indican el índice de masa corporal de pacientes que no padecen diabetes.

La Figura 4 presenta una cartografía de restricción del vector de expresión utilizado para preparar las células HEK 293 que expresan a GPR40.

La Figura 5 presenta las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos (SEQ. ID. nº:1 y 2 respectivamente) que codifican el GPR40 humano en la que los nucleótidos que codifican el aminoácido número 211 y el aminoácido número 211 como arginina están subrayados.

La Figura 6 presenta las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos (SEQ. ID. nº:3 y 4 respectivamente) que codifican el GPR40 humano en la que los nucleótidos que codifican el aminoácido número 211 y el aminoácido número 211 como histidina están subrayados.

La Figura 7 presenta las secuencias de cebadores de PCR y de sondas de PCR que pueden utilizarse para ampliar y detectar las secuencias que contienen los alelos de GPR40. La Figura 7 asimismo presenta las secuencias nucleotídicas que codifican el aminoácido número 211 ya sea como histidina (SEQ. ID. nº: 9) o arginina

(SEQ. ID. nº: 10).

La Figura 8 presenta la secuencia de un montaje del vector de expresión que contiene un alelo de GPR40 que codifica a histidina en el aminoácido número 211.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos y expresiones utilizados en la presente memoria tienen su significado habitual en la técnica. Sin embargo, para aclarar aún más la presente invención y por conveniencia, a continuación se proporciona el significado de ciertos términos y frases empleados en la memoria descriptiva, incluyendo los ejemplos y reivindicaciones adjuntas.

El/los término(s) "agente(s)" significa(n) sustancias, incluyendo péptidos, y compuestos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o proceso patológico que está mediado por tener al menos un alelo, preferentemente ambos alelos, del gen GPR40 en el que el aminoácido codificado número 211 es otro distinto de histidina, preferentemente arginina, tal como se describe con más detalle en la presente memoria descriptiva.

La expresión "aminoácido número 211" con respecto al gen GPR40 se refiere a un resto del aminoácido número 211 en la secuencia con número de registro AF024687 de GenBank, también mostrada en las SEQ. ID. nº 2 y nº 4.

La expresión "condiciones de alta severidad" significa condiciones de lavado a 68°C en presencia de aproximadamente 0,2 x SSC y aproximadamente 0,1 % de SDS, durante 1 hora. Variaciones útiles de estas condiciones de lavado serán obvias para los expertos en la materia. Generalmente, la severidad de la hibridación se expresa, en parte, con referencia a la temperatura a la que se realiza la etapa de lavado. Generalmente, dichas temperaturas de lavado se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C a 20°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. El T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Una ecuación para calcular T_m y las condiciones de hibridación del ácido nucleico son bien conocidas y pueden encontrarse en Sambrook (1989), véase el volumen 2, capítulo 9.

El término "diabetes" significa diabetes mellitus tal como lo interpretan los expertos en la materia. El término incluye diabetes mellitus de tipo 1, también conocida como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), y diabetes mellitus de tipo II, también conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM). La

Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) ha sugerido criterios para diagnosticar la diabetes mellitus (O.M.S. 1980/85 Technical Report Series n° 646/727). La diabetes ha sido caracterizada asimismo por el National Diabetes Data Group (véase National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance, Diabetes, 28:103E-1044, 1979). Sin embargo, más recientemente, por ejemplo la American Diabetes Association, ha publicado directrices para facilitar el diagnóstico de la diabetes de tipo I y de tipo II (véase, por ejemplo, ADA (2004)).

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente que (i) trata o previene una enfermedad, proceso o trastorno determinado; (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de una enfermedad, proceso o trastorno determinado; o (iii) evita o retarda el comienzo de uno o más síntomas de una enfermedad, proceso o trastorno determinado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por cualquier experto en la materia, basándose en la presente descripción, sobre una base individual y se basará, al menos en parte, en consideraciones de la especie del paciente, el tamaño del paciente, el tipo de sistema de administración utilizado y el tipo de administración con relación a la evolución de la enfermedad.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" incluye tanto las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables como las sales catiónicas farmacéuticamente aceptables, en cada caso. Las "sales catiónicas farmacéuticamente aceptables" incluyen, pero no se limitan a, sales tales como las sales de metales alcalinos (p. ej., sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., calcio y magnesio), sales de aluminio, sales de amonio y sales con aminas orgánicas tales como: benztatina (N,N'-dibenciletilendiamina), colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), benetamina (N-bencilfenetilamina), dietilamina, piperazina, trometamina (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) y procalna. La expresión "sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables" se desea que defina, pero no se limita a incluir, sales tales como las sales de hidrocloruro, besilato, hidrobromuro, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, fosfato dibásico, acetato, succinato, citrato, metansulfonato (mesilato) y p-toluensulfonato (tosilato). Una sal particularmente preferida es la sal sódica. Las descripciones de los compuestos que aparecen en la presente memoria que incluyen la frase "sus profármacos o sus sales farmacéuticamente aceptables" o una frase sustancialmente similar significan que incluyen tanto las sales farmacéuticamente aceptables de los

compuestos aplicables así como las sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos.

La terminología "profármaco" quiere decir un compuesto que se transforma *in vivo* para producir un compuesto de la presente invención. La transformación puede tener lugar por varios mecanismos, como por hidrólisis en la sangre. Higuchi y Stella (1987) proporcionan una exposición del uso de profármacos. Por ejemplo, cuando un compuesto de la presente invención contiene un grupo funcional de ácido carboxílico, un profármaco puede comprender un éster formado por la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo ácido con un grupo tal como alquilo (C1-C8), alcanoiloximetilo (C2-C12), 1-(alcanoiloxi)etilo que tiene de 4 a 9 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcanoiloxi)-etilo que tiene de 5 a 10 átomos de carbono, alcóxicarboniloximetilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, 1-(alcóxicarboniloxi)etilo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcóxicarboniloxi)etilo que tiene de 5 a 8 átomos de carbono, N-(alcóxicarbonil)aminometilo que tiene de 3 a 9 átomos de carbono, 1-(N-(alcóxicarbonil)amino)etilo que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, 3-ftalidilo, 4-crotonolactonilo, gamma-butirolacton-4-ilo, di-N,N-alquil (C1-C2)amino-alquilo (C2-C3) (tal como b-dimetilaminoetilo), carbamoil-alquilo (C1-C2), N,N-di-alquilcarbamoil (C1-C2)-alquilo (C1-C2) y piperidino-, pirrolidino- o morfolino-alquilo (C2-C3). Así mismo, cuando un compuesto de la presente invención comprende grupo funcional alcohólico, puede formarse un profármaco mediante la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo alcohólico por un grupo tal como: alcanoil (C1-C6)-oximetilo, 1-(alcanoil (C1-C6)oxi)etilo, 1-metil-1-(alcanoil (C1-C6)oxi)etilo, alcóxi (C1-C6)carboniloximetilo, N-alcóxi (C1-C6)carbonilaminometilo, succinillo, alcanollo (C1-C6), α -aminoalcanollo (C1-C4), arilacilo y α -aminoacilo o α -aminoacil- α -aminoacilo, donde cada grupo α -aminoacilo se selecciona independientemente de los L-aminoácidos que se encuentran en la naturaleza, $P(O)(OH)_2$, $-P(O)(Oalquilo(C1-C6))_2$ o glicosilo (radical resultante de la eliminación de un grupo hidroxilo de la forma hemiacetálica de un carbohidrato). Cuando un compuesto de la presente invención comprende un grupo funcional amino, puede formarse un profármaco mediante la sustitución de un átomo de hidrógeno en el grupo amino con un grupo tal como RX-carbonilo, RXO-carbonilo, NRXR'-carbonilo donde RX y RX' son cada uno independientemente alquilo (C1-C10), cicloalquilo (C3-C7), bencilo o RX-carbonilo es un α -aminoacilo natural o un α -aminoacilo natural α -aminoacilo natural, $-C(OH)C(O)OYX$ en la que YX es H, (alquilo o bencilo (C1-C6)), $-C(OYXO)YX1$ en la que YXO es alquilo (C1-C4) e YX1 es alquilo (C1-C6), carboxi alquilo (C1-C6), amino

alquilo (C1-C4) o mono-N- o di-N,N-(C1-C6)alquilaminoalquilo, -C(YX2) YX3 en la que YX2 es H o metilo e YX3 es mono-N- o di-N,N-(C1-C6)alquilamino, morfolino, piperidin-1-ilo o pirrolidin-1-ilo.

5 "Secuencia nucleotídica" y "polinucleótido" significa ADN o ARN, si está en forma de una sola cadena o de doble cadena. La expresión "secuencia nucleotídica complementaria" significa una secuencia nucleotídica que se hibrida (se une) con otra secuencia nucleotídica según el emparejamiento de un nucleótido de guanidina (G) con un nucleótido de citidina (C) y un nucleótido de adenosina (A) con un nucleótido de timidina (T), excepto en el ARN en que una T se sustituye con un nucleótido de uridina (U) de manera que U se une con A.

10 Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria tienen su significado habitual en la técnica. Sin embargo, para aclarar aún más la presente invención, por conveniencia, a continuación se proporciona el significado de ciertas abreviaturas: "°C" significa grados centígrados; "CO₂" significa dióxido de carbono; "DMEM" significa Medio Eagle modificado por Dulbecco; "ADN" significa ácido desoxirribonucleico; "FBS" significa suero bovino fetal; "g" significa gramo; "HEPES" significa ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico; "kg" significa kilogramo; "mg" significa miligramo; "ml" significa mililitro; "mM" significa milimolar; "μl" significa microlitro; "μM" significa micromolar; "ng" significa nanogramo; "nm" significa nanómetro; "nM" significa nanomolar; "PCR" significa reacción en cadena de la polimerasa; "Pen/Strep" significa una mezcla que contiene penicilina y estreptomicina; "ARN" significa ácido ribonucleico; "RPM" significa revoluciones por minuto; y "x g" significa número de veces la aceleración de la gravedad.

25 En esta descripción se utilizan las siguientes abreviaturas de aminoácidos:

A -	Alanina	T -	Treonina
V -	Valina	C -	Cisteína
L -	Leucina	Y -	Tirosina
I -	Isoleucina	N -	Asparagina
P -	Prolina	Q -	Glutamina
F -	Fenilalanina	D -	Ácido aspártico
W -	Triptófano	E -	Ácido glutámico
M -	Metionina	K -	Lisina
G -	Glicina	R -	Arginina
S -	Serina	H -	Histidina



El gen del GPCR, GPR40, identificado con el número de registro AF024687 del GenBank, codifica una proteína de 300 aminoácidos. Sawzdargo *et al.* (1997). GPR40, que es muy expresada en las células pancreáticas de los islotes ha estado ligado a la regulación de la secreción de insulina y, por lo tanto, se ha propuesto como diana para el tratamiento de la diabetes. Briscoe *et al.* (2003); Itoh *et al.* (2003). Kotarsky *et al.* (2003) proponen que GPR40 media las respuestas a los fármacos para la diabetes de tipo tiazolidindiona.

Como con otros GPCR, GPR40 está implicado en la transmisión de las señales extracelulares en la célula. La activación de GPR40 produce la liberación, a través de la serie de reacciones que implican la proteína G_q , del calcio intracelular. Briscoe *et al.* (2003). El flujo de calcio resultante es útil para detectar la activación de GPR40 por los métodos conocidos por los expertos en la materia basados en la presente descripción (véanse, por ejemplo: Kotarsky *et al.* (2003); Briscoe *et al.* (2003)).

La tiazolidindiona y determinados ácidos grasos son conocidos por activar el GPR40.

Kotarsky *et al.* (2003) y Briscoe *et al.* (2003). Como se ilustra en la Figura 1, en la presente memoria, los compuestos de tiazolidindiona estimulan la liberación del ion calcio intracelular en las células que expresan a GPR40 en comparación con las células que no expresan a GPR40.

Esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que un solo polimorfismo nucleotídico influye en la activación de GPR40, por ejemplo, mediante los fármacos de tipo tiazolidindiona. Este polimorfismo, que tiene lugar en el nucleótido 632 de la secuencia de codificación de GPR40 (correspondiente al nucleótido 642 en la secuencia de número de registro AF024687 del GenBank), implica una sustitución de A por otro nucleótido distinto de G, y preferiblemente éste, resultante de una sustitución del aminoácido en el resto 211 desde la histidina hasta otro aminoácido distinto de la histidina, preferentemente arginina. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de GPR40 en las que el aminoácido 211 es arginina aparecen en la SEQ. ID. n° 1 y n° 2 respectivamente. Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de GPR40 en las que el aminoácido 211 es histidina aparecen en la SEQ. ID. n° 3 y n° 4 respectivamente.

Tal como se ilustra en la Figura 2, las células en las que el nucleótido 632 de GPR40 es G presentan una respuesta mayor a, por ejemplo, la activación de tiazolidindiona, en comparación con las células con el A nucleótido en la posición 632. La Figura 2 presenta los resultados de un ensayo celular que mide el ion calcio

intracelular en células con el nucleótido G frente al A en la posición 632.

Además, esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que individuos que tienen G en el nucleótido 642, particularmente aquellos que tienen G en ambos alelos, presentan un riesgo mayor de diabetes en comparación con los individuos en los que el nucleótido es A. Tal como se ilustra en la Figura 3, para un índice de masa corporal dado los pacientes que sean heterocigóticos u homocigóticos A en el nucleótido 642 tienen una probabilidad significativamente inferior de padecer diabetes de tipo II que un paciente que sea homocigótico G.

La presente invención comprende la caracterización de métodos y los métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o procesos patológicos que están relacionados con los que tienen al menos un alelo, preferentemente ambos alelos, de GPR40 en los que el aminoácido codificado número 211 es otro distinto de histidina, preferentemente arginina. El genotipado de pacientes por los métodos de la invención puede realizarse por los métodos conocidos por los expertos en la materia basándose en la presente descripción. Ejemplos de métodos se describen, por ejemplo, en el capítulo 2 de Dracopoli *et al.* (2004).

El genotipado puede realizarse utilizando tejido apropiado de un paciente tal como es conocido por los expertos en la materia basándose en la presente descripción. En una realización preferida, se aísla ADN para genotipado procedente de una muestra de sangre completa por procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia basándose en la presente descripción. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo utilizando una variedad de kits disponibles en el mercado, tales como, el kit Puregene® para aislamiento de ADN (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN), el kit para aislamiento de ADN en la sangre (nº de catálogo 2-032-805, Roche Diagnostics Corporation), el kit GenomicPrep™ para aislamiento del ADN en la sangre (nº de catálogo 27-5236-01, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ), el kit PAXgene para ADN en la sangre (nº de catálogo 761133, QIAGEN Inc., Valencia, CA), el kit GNOME® para aislamiento de ADN en la sangre completa (nº de catálogo 2011-600, Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA) y el Kit Wizard® para purificación del ADN genómico (nº de catálogo A1120, Promega U.S., Madison, WI).

La zona de ácido nucleico que contiene el único polimorfismo nucleotídico puede ampliarse, por ejemplo, mediante técnicas de PCR utilizando un cebador transcrito y uno complementario y una sonda de detección. Sin embargo, pueden utilizarse asimismo otros de métodos de ampliación de ácido nucleico, incluyendo la reacción en cadena de la ligasa (véase, por ejemplo, Abravaya, K. *et al.* (1995), la

ampliación de la señal del ADN ramificado (véase, por ejemplo, Jrdea, M.S. *et al.* (1993)), secuencia isotérmica de ácido nucleico basada en la ampliación (NASBA) (véase, por ejemplo, Kievits, T. *et al.* (1991)), y otros ensayos independientes de replicación de la secuencia.

5 Los métodos para la preparación de cebadores y sondas de PCR son bien conocidos en la técnica, y están descritos, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1994) e Innis *et al.* (1990). Pares cebadores de PCR pueden proceder de secuencias, conocidas por ejemplo, utilizando programas informáticos pensados con esta finalidad tal como Primer (Versión 0.5, 1991, Whitehead Institute for
10 Biomedical Research, Cambridge MA).

Pueden seleccionarse oligonucleótidos para su utilización como cebadores utilizando programas informáticos conocidos en la materia para tales fines. Por ejemplo, la versión 6 del programa informático OLIGO® (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, www.oligo.net) sirve para la selección de pares cebadores PCR de
15 hasta 100 nucleótidos cada uno. Programas similares de selección de cebador han incorporado características adicionales para capacidades ampliadas. Por ejemplo, el programa para la selección de cebador PrimOU (disponible al público en el Genome Center de la Universidad de Texas, South West Medical Center, Dallas TX, [ftp://ftp.genome.ou.edu/pub/programs/primou_src.tar](http://ftp.genome.ou.edu/pub/programs/primou_src.tar)) es capaz de seleccionar
20 cebadores específicos a partir de secuencias de la megabase y sirve por tanto para diseñar cebadores en un ámbito amplio del genoma. El Primera, versión 0.9 del programa para la selección de cebador (disponible al público en el Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MA, http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) permite al usuario introducir
25 un "mispriming library" en el que las secuencias impiden que los puntos de unión del cebador sean específicos para el usuario. Primer3 sirve, en particular, para la selección de oligonucleótidos para chips. (El código original para los dos últimos programas de selección de cebador puede obtenerse también a partir de sus respectivas fuentes y modificarse para satisfacer las necesidades específicas del
30 usuario). El programa PrimeGen (disponible al público en el UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK, <http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/primegen.html>) diseña cebadores basados en alineaciones de secuencia múltiples, permitiendo de este modo la selección de cebadores que se hibridan con las zonas más conservadas o menos
35 conservadas de las secuencias alineadas de ácido nucleico. Por consiguiente, este

programa sirve para la identificación de fragmentos de oligonucleótidos y polinucleótidos tanto únicos como conservados. Otros métodos de selección serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente memoria descriptiva.

5 Preferentemente, la longitud de la secuencia utilizada para las sondas se minimiza utilizando un aglutinante menor con surco (MGB) unido a la secuencia de la sonda para discriminar entre las dos SNP. Los MGB son conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, tal como se da a conocer en las Patentes U.S. nº 5.801.155; nº 6.084.102; nº 6.426.408; nº 6.312.894; y nº 6.683.173.

10 En una realización preferida, se utiliza la versión 1.5 del programa informático Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA) para diseñar cebadores y sondas de PCR para la puesta en práctica de la invención. Ejemplos de cebadores incluyen CTTGGCCATCACAGCCTTCT para el cebador transcrito (SEQ. ID. nº: 5) y CCACGTTGGAGGCGTTGT para el cebador complementario (SEQ. ID. nº: 6). Las
15 sondas pueden ser sondas TagMan® MGB marcadas con colorantes FAM™ y VIC® (Applied Biosystems) que tienen las secuencias 6FAM-CACTGGCCCACTCT y VIC-CACTGGCCCGCTC (SEQ. ID. nº 7 y nº 8 respectivamente). El ADN aislado de un paciente se trata con reactivos de PCR, incluyendo los cebadores y sondas, y se expone a un ciclo térmico repetido para desarrollar la reacción PCR. La detección de
20 la SNP puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando una fluorescencia basada en el sistema de detección de secuencias tal como el ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (AME Bioscience, Torood, Noruega).

La invención también comprende kits de ensayo de diagnóstico para determinar si un paciente posee otro nucleótido distinto de A, preferentemente G, en el
25 nucleótido 632 de la secuencia de codificación de GPR40. Por ejemplo, el kit puede comprender un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico marcada o que se puede marcar capaz de detectar si un paciente tiene A o G en el nucleótido 632 de la secuencia de codificación de GPR40. Dicha sonda tiene preferentemente menos de 35 nucleótidos de longitud, más preferentemente, menos de 25 nucleótidos y, aún más
30 preferentemente, entre 13 y 25 nucleótidos. El kit puede comprender además reactivos, tales como cebadores de PCR, para ampliar la zona de ácido nucleico que contiene el nucleótido 632. Los reactivos pueden envasarse en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para utilizar el kit para detectar si un paciente tiene A o G en el nucleótido 632 de la secuencia de
35 codificación de GPR40.

La presente invención proporciona métodos para identificar agentes de ensayo que activan GPR40 comparando la activación mediante un agente de ensayo de un primer receptor de GPR40 humano en el que el aminoácido 211 es otro distinto de histidina, preferentemente arginina, para la activación mediante un agente de ensayo de un segundo receptor humano de GPR40 en el que el aminoácido 211 es la histidina. En la puesta en práctica de esta invención puede utilizarse cualquier método apropiado que mida la activación de GPR40. Tales métodos son conocidos o serán evidentes para los expertos en la materia basándose en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, en una realización preferida, dichos métodos implican la utilización de colorantes sensibles al calcio en un sistema lector de placas de diagnóstico por imagen fluorométrica (Le., FLIPR®) que mide el flujo de calcio tras la activación de los receptores acoplados a la proteína G mediada por la proteína G_q (véase, por ejemplo, Chambers *et al.* (2003). Otros métodos conocidos en la técnica incluyen la utilización de proteínas de fijación de calcio (Miyawaki *et al.* (1997), Kain (1999)) y de luciferasa sensible al calcio (Button y Brownstein (1997), Stables *et al.* (1997)).

La invención proporciona además métodos para identificar agentes de ensayo que inhiben la activación de GPR40 comparando la inhibición de la activación mediante un agente de ensayo de un primer receptor de GPR40 humano en el que el aminoácido 211 es la histidina, con la inhibición de un segundo receptor humano de GPR40 en el que el aminoácido 211 es otro distinto de histidina, preferentemente arginina. Dichos métodos pueden utilizar los ensayos de activación descritos anteriormente que utilizan un activador conocido de GPR40 en combinación con un agente de ensayo. La señal detectable producida se compara con la señal que sería de esperar si se utilizase el activador conocido por sí mismo. Varios activadores de GPR40 son conocidos en la materia y pueden utilizarse para dichos métodos, incluyendo los descritos en Kotarsky *et al.* (2003), Briscoe *et al.* (2003) y en la publicación de la solicitud de patente internacional n° WO 02/057783.

Esta invención también comprende los métodos para identificar los agentes de ensayo que se fijan a GPR40, comparando la inhibición competitiva mediante un agente de ensayo de fijación de un ligando conocido de GPR40 a un primer receptor GPR40 humano en el que el aminoácido número 211 es la histidina con la inhibición competitiva mediante el compuesto de fijación del ligando conocido a un segundo receptor GPR40 humano en el que el aminoácido número 211 es otro distinto de histidina, preferentemente arginina. El ligando puede estar marcado con un marcador

detectable como es bien conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, radioisótopos, colorantes fluorescentes y enzimas. Varios ligandos de GPR40 son conocidos en la materia y pueden utilizarse para dichos métodos, incluyendo los descritos en Kotarsky *et al.* (2003), Briscoe *et al.* (2003) y en la publicación de la solicitud de patente internacional nº WO 02/057783.

Los expertos en la materia apreciarán, basándose en la presente descripción, que la comparación de la activación, inhibición o activación e inhibición de la fijación de los métodos para identificar los agentes de ensayo de esta invención puede realizarse por cualquiera de numerosas formas. Por ejemplo, la medida de la activación y la inhibición de la activación de GPR40 puede realizarse utilizando métodos fluorométricos o colorimétricos que miden el flujo de calcio (p. ej., FLIPR). Por consiguiente, la activación de GPR40 puede cuantificarse exactamente por dichos métodos, por ejemplo, utilizando un instrumento detector de luz que genera un valor numérico. Los valores resultantes de dichas mediciones pueden compararse por medios automáticos o manuales. Por ejemplo, un método práctico, particularmente donde se han generado numerosos valores, implicaría comparar los valores utilizando un sistema informático por los métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

Además, la presente invención comprende métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o procesos patológicos que están relacionados con los que tienen al menos un alelo, preferentemente ambos alelos, de GPR40 en los que el aminoácido codificado número 211 es otro distinto de histidina, preferentemente arginina. Los métodos para identificar dichas enfermedades o procesos son bien conocidos por los expertos en la materia o serán evidentes basándose en la presente descripción. Por ejemplo, la Figura 3 ilustra los resultados de un estudio que compara el genotipo de pacientes con diabetes de tipo II con pacientes que no padecen diabetes. Para los expertos en la materia será evidente que pueden emplearse métodos similares a los descritos en la Figura 3 y en el Ejemplo 5 para identificar otras enfermedades o procesos que están relacionados con las que tienen al menos un alelo, preferentemente ambos alelos, de GPR40 en los que el aminoácido codificado número 211 es distinto de histidina, preferentemente arginina.

En una realización de la presente invención, una enfermedad o proceso patológico mediado por tener al menos un alelo, preferentemente ambos alelos, de GPR40 en la que el aminoácido codificado número 211 es distinto de histidina, preferentemente arginina es la diabetes, preferentemente la diabetes de tipo II. En otra realización, las enfermedades o procesos son complicaciones asociadas a la diabetes.

Dichas complicaciones comprenden la arteriosclerosis, cardiomiopatía diabética, cataratas, úlceras de los pies, macroangiopatía diabética, microangiopatía diabética, nefropatía diabética, retinopatía diabética y neuropatía diabética. En una realización adicional, dichas enfermedades o procesos son alguno de los factores de riesgo asociados al síndrome metabólico, incluyendo la obesidad, hipertensión, resistencia a la insulina, diabetes de tipo II y dislipidemia.

La presente invención proporciona métodos de tratamiento relacionados con la administración de un agente para el tratamiento o prevención de una enfermedad o proceso patológico mediada por tener al menos un alelo, preferentemente ambos alelos, del gen GPR40 en el que el aminoácido codificado número 211 es distinto de histidina, preferentemente arginina (definidos anteriormente como "agentes"). Los agentes serán evidentes para los expertos en la materia basándose en esta descripción o pueden ser fácilmente identificados por los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los agentes pueden comprender insulina, compuestos de sulfonilurea que estimulan la secreción de insulina, inhibidores de glucógeno fosforilasa (GPI), inhibidores de producción de glucosa hepática biguanida, compuesto antidiabético tiazolidindiona, inhibidores de alfa-glucosidasa, inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa-1B (PTP-1B), inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), inhibidores de glucógeno sintetasa cinasa-3 beta (GSK-3 β), agonistas del receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ), antagonistas de receptor de glucagón, inhibidores selectivos de reabsorción de serotonina (SSRI), inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (estatinas), agonistas del ácido γ -aminobutírico (GABA), inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), antagonistas del receptor de angiotensina-II (A-II), inhibidores de la fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE-5), inhibidores de sorbitol deshidrogenasa (SDI) e inhibidores de aldosa reductasa (ARI).

Los agentes pueden incluir cualquier inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa-1 B (PTP-1B). La expresión inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa-1B se refiere a cualquier compuesto que inhiba la enzima proteína tirosina fosfatasa-1 B. PTP-1B se cree que inhibe la capacidad de la insulina para reducir las concentraciones de azúcar en sangre.

Ejemplos de inhibidores de PTP-1B, análisis para identificar dichos inhibidores y dosis y métodos preferidos de administración se dan a conocer en las siguientes patentes de Estados Unidos, publicaciones de solicitud de patente internacional y otras publicaciones: U.S. nº 6.251.936, nº U.S. 6.221.902, nº U.S. 6.057.316, nº U.S.

6.001.887, nº U.S. 5.753.887, WO 01/46203, WO 01/46204, WO 01/46206, WO 01/17516, WO 00/53583, WO 99/58518, WO 99/61435, WO 99/58521, WO 99/58522, WO 99/58514, WO 99/58520, WO 99/58519, WO 99/58511, WO 99/61410, WO 99/15529, Malamas *et al.* (2000A), Bleasdale *et al.* (2001), Wrobel *et al.* (1999),
5 Malamas *et al.* (2000B), Wang *et al.* (1998), Andersen *et al.* (2000), Iversen *et al.*,
(2000), Wrobel *et al.* (2000) y Kees (1996).

Los agentes pueden incluir cualquier antagonista del receptor de glucagón. La expresión antagonistas del receptor de glucagón se refiere a cualquier compuesto que antagonice el receptor de glucagón, inhibiendo así la liberación de la glucosa inducida por la fijación de glucagón al receptor de glucagón. Dicho antagonismo es determinado
10 fácilmente por los expertos en la materia según ensayos conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplos de antagonistas del receptor de glucagón, análisis para identificar dichos antagonistas y dosis y métodos preferidos de administración se dan a conocer
15 en las siguientes patentes de Estados Unidos, publicaciones de solicitud de patente internacional y otras publicaciones: U.S. nº 6.218.431, U.S. nº 5.138.090, WO 98/04528, WO 99/01423, WO 00/39088, WO 00/69810, WO 98/21957, WO 98/22109, WO 98/22108, WO 97/16442, Livingston *et al.* (1999), Madsen *et al.* (1998), de Laszlo *et al.* (1999), Chang *et al.* (2001), Cascieri *et al.* (1999), Ling *et al.* (2001) y Guillon *et al.* (1998).
20

Los agentes pueden incluir cualesquiera de los antagonistas GSK-3 β a título de ejemplo la glucógeno sintetasa cinasa-3 beta (GSK-3 β), los análisis para la identificación de dichos antagonistas y la dosis y métodos preferidos de la administración se dan a conocer en las siguientes patentes de EEUU, las
25 publicaciones de la solicitud de patente internacional y otras publicaciones: patentes U.S. nº 6.057.286, WO 01/56587, WO 01/109108, WO 01/49708, WO 01/44246, WO 01/44206, WO 01/42224, WO 00/21927, WO 00/38675, WO 99/65897, WO 98/16528, Coghlan *et al.* (200), Smith *et al.* (2001), Cross *et al.* (2001) y Lochhead *et al.* (2001).

Los agentes para la invención pueden incluir los inhibidores de alfa-glucosidasa. Cualquier inhibidor de alfa-glucosidasa puede utilizarse como agente en la invención. A título de ejemplo los inhibidores de alfa-glucosidasa incluyen acarbosa (conocida también como Precose[®]) y miglitol (conocida también como Glyset[®]) y análogos, derivados, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de estos inhibidores de alfa-glucosidasa.
30

Los agentes pueden incluir los compuestos de sulfonilurea que estimulan la secreción de insulina. Cualquier compuesto de sulfonilurea que estimule la secreción de insulina puede utilizarse como agente para la invención. A título de ejemplo los compuestos de sulfonilurea que estimulan la secreción de insulina comprenden
5 glipizida, también conocida como Glucotrol® y Glucotrol XL®, glimepirida (también conocida como Amaryl®), gliburida y clorpropamida (también conocida como Diabinese®); y análogos, derivados, profármacos y sus sales farmacéuticamente aceptables. Un compuesto de sulfonilurea que estimula la secreción de insulina es la glipizida.

10 Los agentes pueden incluir inhibidores de la producción de biguanida glucosa hepática. Cualquier inhibidor de la producción de biguanida glucosa hepática puede utilizarse como agente en la puesta en práctica de la invención. Un ejemplo de biguanida es la metformina, también conocida como Glucophage®.

Los agentes pueden incluir agonistas de PPAR γ , que incluyen compuestos de
15 tiazolidindiona y no de tiazolidindiona. Los agonistas de PPAR γ aumentan la sensibilidad de la insulina en tejidos, importante para la acción de la insulina tales como el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hígado.

Cualquier agonista de PPAR γ puede utilizarse como agente en la puesta en práctica de la invención. A título de ejemplo los agonistas de PPAR γ comprenden los
20 descritos en las siguientes patentes de EEUU: U.S. n° 4.340.605; U.S. n° 4.342.771; U.S. n° 4.367.234; U.S. n° 4.617.312; U.S. n° 4.687.777 y U.S. n° 4.703.052; y análogos, derivados, profármacos y sus sales farmacéuticamente aceptables. Los agonistas de PPAR γ preferidos comprenden darglitazona, ciglitazona, englitazona, pioglitazona, conocida también como Actos®, y rosiglitazona, conocida también como
25 Avandia® y BRL-49653. Los agonistas de PPAR γ se administran preferentemente en cantidades que varían desde aproximadamente 0,1 mg/día a aproximadamente 100 mg/día en dosis individuales o divididas, con preferencia aproximadamente de 0,1 mg/día a aproximadamente 50 mg/día para un paciente medio, dependiendo del compuesto antidiabético tiazolidindiona y de la vía de administración. Sin embargo,
30 será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del sujeto que ha de ser tratado. El responsable de la dosificación determinará, en todo caso, la dosis apropiada para cada paciente.

Los agentes pueden incluir cualquiera de los inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). La expresión inhibidor de DPP IV se refiere a cualquier compuesto que
35 inhiba la enzima dipeptidil peptidasa. Los expertos en la materia determinan fácilmente

dicha inhibición según los ensayos tales como□ los descritos en la publicación de la solicitud de patente internacional número WO 98/19998.

A título de ejemplo los inhibidores de DPP IV incluyen los dados a conocer en las patentes U.S. números U.S. 6.124.305, U.S. 6.110.949 y U.S. 6.124.305, en las
5 publicaciones de solicitudes de patente internacional nº WO 01/34594, nº WO 99/61431, nº WO 98/19998, nº WO 97/40832 y nº WO 95/15309 y en Augustyns *et al.* (1997); y análogos, derivados, profármacos y sus sales farmacéuticamente aceptables.

La dosis y los métodos de administración preferidos son según los
10 proporcionados en los documentos WO 01/34594 y WO 98/19998. Alguna variación en la dosis puede tener lugar necesariamente dependiendo del estado del paciente que se está tratando. El responsable de la dosificación determinará, en todo caso, la dosis apropiada para el cada paciente.

Los agentes pueden también comprender cualquier inhibidor selectivo de
15 reabsorción de serotonina (SSRI). La expresión inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina se refiere a un compuesto que inhibe la reabsorción de serotonina por neuronas aferentes. Los expertos en la materia determinan fácilmente dicha inhibición según ensayos normalizados tales como□ los descritos en la patente U.S. nº 4.536.518 y otras patentes de EEUU citadas en el párrafo siguiente.

Los SSRI preferidos que pueden utilizarse de acuerdo con esta invención
20 incluyen femoxetina, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 3.912.743; la fluoxetina, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.314.081; la fluvoxamina, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.085.225; la indalpina, que puede prepararse como se describe en la patente
25 U.S. nº 4.064.255; la indeloxazina, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.109.088; el milnaciprano, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.478.836; la paroxetina, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 3.912.743 o la patente U.S. nº 4.007.196; la sertralina, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.536.518; la
30 sibutramina, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.929.629; y la zimeldina, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 3.928.369. La fluoxetina es conocida también como Prozac®. El hidrocloreuro de sertralina, también conocido como Zoloft®, puede prepararse como se publica en la patente U.S. nº 4.536.518. La sibutramina es conocida también como Meridia®. Los

SSRI que pueden utilizarse como agentes incluyen análogos, derivados, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los SSRI descritos anteriormente.

Los SSRI se administran preferentemente en cantidades que varían desde aproximadamente 0,01 mg/kg/día 0 a aproximadamente 500 mg/kg/día en dosis
5 individuales o divididas, con preferencia aproximadamente de 10 mg a aproximadamente 300 mg al día para un paciente medio, dependiendo del SSRI y de la vía 0 de administración. Sin embargo, será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del paciente que debe ser tratado. El responsable de la dosificación determinará, en todo caso, la dosis apropiada para el cada paciente.

10 Los agentes pueden comprender además cualquier inhibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (estatina). La expresión inhibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril 5 coenzima A (HMG-CoA) reductasa se refiere a un compuesto farmacéutico que inhibe la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA)
15 reductasa. Esta enzima está implicada en la conversión de HMG-CoA a mevalonato, que es una de las etapas en la biosíntesis del colesterol. Dicha inhibición se determina fácilmente según los ensayos normalizados bien conocidos por los expertos en la materia.

Las estatinas preferidas que pueden utilizarse de acuerdo con esta invención comprenden la atorvastatina, dada a conocer en la patente U.S. nº 4.681.893,
20 atorvastatina de calcio, dada a conocer en la patente U.S. nº 5.273.995, cerivastatina, dada a conocer en la patente U.S. nº 5.502.199, dalvastatina, dada a conocer en la publicación de la solicitud de patente europea nº 738.510 A2, fluindostatina, dada a conocer en la publicación de la solicitud de patente europea nº 363.934 A1, fluvastatina, dada a conocer en la patente U.S. nº 4.739.073, lovastatina, dada a
25 conocer en la patente U.S. nº 4.231.938, mevastatina, dada a conocer en la patente U.S. nº 3.983.140, pravastatina, dada a conocer en la patente U.S. nº 4.346.227, simvastatina, dada a conocer en la patente U.S. nº 4.444.784 y velostatina, dada a conocer en la patente U.S. nº 4.448.784 y en la patente U.S. nº 4.450.171. Los inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa especialmente preferidos
30 comprenden atorvastatina, atorvastatina de calcio, también conocida como Lipitor®, lovastatina, también conocida como Mevacor, pravastatina, también conocida como Pravachol®, y simvastatina, también conocida como Zocor®; y análogos, derivados, profármacos y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Las estatinas se administran preferentemente en cantidades que varían desde
35 aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg/día en dosis individuales

o divididas, con preferencia aproximadamente de 1 mg/kg/día a aproximadamente 200 mg/kg/día para un paciente medio, dependiendo de la estatina y de la vía de administración. Sin embargo, será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del paciente que debe ser tratado. El responsable de la dosificación determinará, en todo caso, la dosis apropiada para cada paciente.

Los agentes pueden incluir cualquier inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE). La expresión inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina se refiere a un compuesto farmacéutico que inhibe la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina. ACE está implicado en la conversión de la angiotensina 1 en el vasoconstrictor, angiotensina II. La actividad de los inhibidores de ACE puede determinarse fácilmente por métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo cualquiera de los ensayos normalizados descritos en las patentes citadas a continuación.

Los inhibidores preferidos de ACE comprenden: alacepril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.248.883; benazepril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.410.520; captopril, dado a conocer en las patentes U.S. nº 4.046.889 y nº 4.105.776; ceronapril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.452.790; delapril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.385.051; enalapril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.374.829; fosinopril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.337.201; imadapril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.508.727; lisinopril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.555.502; moexipril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.344.949; moveltopril, dado a conocer en la patente belga nº 893.553; perindopril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.508.729; quinapril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.344.949; ramipril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.587.258; espirapril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.470.972; temocapril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.699.905; y trandolapril, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.933.381; y análogos, derivados, profármacos y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los inhibidores de ACE se administran preferentemente en cantidades que varían desde aproximadamente 0,01 mg/kg/día hasta aproximadamente 500 mg/kg/día en dosis individuales o divididas, con preferencia aproximadamente de 10 mg a aproximadamente 300 mg al día para un paciente medio, dependiendo del inhibidor de ACE y de la vía de administración. Sin embargo, será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del sujeto que debe ser tratado. El responsable de la dosificación determinará, en todo caso, la dosis apropiada para cada paciente.

Los agentes pueden incluir cualquier antagonista del receptor de angiotensina-II (A-II). La expresión antagonista del receptor de angiotensina-II se refiere a un compuesto farmacéutico que bloquea los efectos vasoconstrictores de angiotensina II bloqueando la fijación de angiotensina II al AT₁ receptor encontrado en muchos tejidos, (p. ej., músculo liso vascular, glándula suprarrenal). La actividad de un antagonista de A-II puede determinarse fácilmente por métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo cualquiera de los ensayos normalizados descritos en las patentes citadas a continuación.

Los antagonistas de A-II preferidos incluyen: candesartán, que se puede preparar como se describe en la patente U.S. nº 5.196.444; eprosartán, que se puede preparar como se describe en la patente U.S. nº 5,185,351; irbesartán, que se puede preparar como se describe en la patente U.S. nº 5,270,317; losartán, que se puede preparar como se describe en la patente U.S. nº 5,138,069; y valsartán, que se puede preparar como se describe en la patente U.S. nº 5,399,578; y análogos, derivados, profármacos y sus sales farmacéuticamente aceptables. Los antagonistas de receptor de angiotensina-II más preferidos son losartán, irbesartán y valsartán.

Los antagonistas de A-II se administran preferentemente en cantidades que varían desde aproximadamente 0,01 mg/kg/día hasta aproximadamente 500 mg/kg/día en dosis individuales o divididas, con preferencia aproximadamente de 10 mg a aproximadamente 300 mg al día para un paciente medio, dependiendo del antagonista de A-II y de la vía de administración. Sin embargo, será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del paciente que debe ser tratado. El responsable de la dosificación determinará, en todo caso, la dosis apropiada para cada paciente.

Los agentes pueden incluir cualquier agonista del ácido γ -aminobutírico (GABA). La expresión agonista del ácido γ -aminobutírico se refiere a un compuesto farmacéutico que se fija a los receptores GABA en el sistema nervioso central del mamífero. GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central del mamífero. La actividad de un agonista de GABA puede determinarse fácilmente por métodos conocidos por los expertos en la materia, que incluyendo los procedimientos dados a conocer en Janssens de Verebeke, P. *et al.*, Biochem. Pharmacol., 31, 2257-2261 (1982), Loscher, W., Biochem. Pharmacol., 31, 837-842, (1982) y/o Phillips, N. *et al.*, Biochem. Pharmacol., 31, 2257-2261.

Los agonistas de GABA preferidos incluyen: muscimol, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 3.242.190; progabida, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.094.992; riluzol, que puede prepararse como

se describe en la patente U.S. nº 4.370.338; baclofén, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 3.471.548; gabapentín (Neurontin®), que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.024.175; vigabatrin, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 3.960.927; tiagabina (Gabitril®), que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 5.010.090; lamotrigina (Lamictal®), que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4.602.017; pregabalín, que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 6.028.214; fenitoina (Lamictal®), que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 2.409.754; carbamazepina (Tegretol®), que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 2.948.718; y topiramato (Topamax®), que puede prepararse como se describe en la patente U.S. nº 4,513,006; y análogos, derivados, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de estos agonistas de GABA.

En general, de acuerdo con esta invención, el agonista de GABA utilizado como agente se administrará en una dosis de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal del paciente en tratamiento al día hasta aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal del paciente en tratamiento al día, en dosis individuales o divididas. Sin embargo, se darán necesariamente algunas variaciones en la dosificación dependiendo de la enfermedad del paciente en tratamiento. El responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para cada paciente. En particular, cuando se utilice como agonista de GABA en esta invención, el pregabalín se dosificará desde aproximadamente 300 mg hasta aproximadamente 1200 mg al día; el gabapentín se dosificará desde aproximadamente 600 mg hasta aproximadamente 3.600 mg al día.

Los agentes pueden incluir cualquier inhibidor de glucógeno fosforilasa (GPI). La expresión inhibidor de glucógeno fosforilasa se refiere a cualquier sustancia o compuesto o a cualquier combinación de sustancias y/o compuestos que reduzca, retarde o elimine la acción enzimática de la glucógeno fosforilasa. Dichas acciones son determinadas fácilmente por los expertos en la materia según los ensayos normalizados descritos en la patente U.S. nº 5.988.463. La patente U.S. nº 5.988.463, la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 96/39384 y la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 96/39385 ejemplifican los GPI que pueden ser agentes.

Los GPI se administran preferentemente en cantidades que varían desde aproximadamente 0,005 mg/kg/día hasta aproximadamente 50 mg/kg/día en dosis individuales o divididas, con preferencia aproximadamente de 0.1 mg/kg/día a

aproximadamente 15 mg/kg/día para un paciente medio, dependiendo del GPI y de la vía de administración. Sin embargo, será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del paciente en tratamiento. El responsable de la dosificación determinará, en todo caso, la dosis apropiada para cada paciente.

5 Los agentes pueden incluir cualquier inhibidor de sorbitol deshidrogenasa (SDI). La expresión inhibidor de sorbitol fosforilasa se refiere a cualquier sustancia o compuesto o a cualquier combinación de sustancias y/o compuestos que reduzca, retarde o elimine la acción enzimática de la sorbitol fosforilasa. La sorbitol deshidrogenasa cataliza la oxidación de sorbitol a fructosa.

10 A título de ejemplo los SDI incluyen los dados a conocer en la patente U.S. nº 5.728.704, patente U.S. nº 5.866.578 y la publicación de la solicitud de patente internacional nº WO 00/59510 normalmente asignadas; y en los análogos, derivados, profármacos y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los SDI se administran preferentemente en cantidades que varían desde
15 aproximadamente 0,001 mg/kg/día hasta aproximadamente 100 mg/kg/día en dosis individuales o divididas, con preferencia aproximadamente de 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg al día para un paciente medio, dependiendo del SDI y de la vía de administración. Sin embargo, será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del paciente en tratamiento. El responsable de la
20 administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para cada paciente.

Los agentes pueden incluir cualquier inhibidor de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE-5). La expresión inhibidor de fosfodiesterasa de tipo 5 se refiere a cualquier sustancia o compuesto o a cualquier combinación de sustancias y/o compuestos que reduzcan, retarden o eliminen la acción enzimática de PDE-5 específico del
25 monofosfato cíclico de guanosina (c-GMP). Dichas acciones son determinadas fácilmente por los expertos en la materia según los ensayos descritos en la publicación de la solicitud de patente internacional WO 00/24745.

Las siguientes publicaciones de patente ejemplifican los inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 que pueden utilizarse como agentes de esta invención, y se
30 refieren a métodos de preparación de estos inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE-5): publicación de solicitud de patente internacional nº WO 00/24745; publicación de solicitud de patente internacional nº WO 94/28902; publicación de solicitud de patente europea nº 0463758A1; publicación de solicitud de patente europea nº 0528004A1 y publicación de solicitud de patente europea nº 0201188A2. Los
35 inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 preferidos son sildenafil (preferentemente

citrato de sildenafil, también conocido como Viagra®) que puede prepararse como se publica en las patentes U.S. nº 5.250.534 y nº 5.955.611, tadalafil (también conocido como Cialis®) que puede prepararse como se publica en la patente U.S. nº 5.859.006 y vardenafil (también conocido como Levitra®) que puede prepararse como se publica en la patente U.S. nº 6.362.178. A título de ejemplo los inhibidores de PDE-5 también incluyen análogos, derivados, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los inhibidores de PDE-5 citados anteriormente.

Los inhibidores de PDE-5 se administran preferentemente en cantidades que varían desde aproximadamente 5 mg/día hasta aproximadamente 500 mg/día en dosis individuales o divididas, con preferencia aproximadamente de 10 mg a aproximadamente 250 mg/día, para un paciente medio, dependiendo del inhibidor de PDE-5 y de la vía de administración. Sin embargo, será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del paciente en tratamiento. El responsable de la dosificación determinará, en todo caso, la dosis apropiada para cada paciente.

Los agentes pueden incluir cualquier inhibidor de aldosa reductasa. La expresión "inhibidor de la aldosa reductasa" se refiere a compuestos que inhiben la bioconversión de glucosa en sorbitol, catalizada por la enzima aldosa reductasa. A título de ejemplo los inhibidores de aldosa reductasa comprenden ponalrestat, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.251.528, tolrestat, dado a conocer en la patente U.S. nº 4.600.724, epalrestat, dado a conocer en las patentes U.S. nº 4.464.382, nº 4.791.126 y nº 4.831.045, zenarestat, dado a conocer en las patentes U.S. nº 4.734.419 y nº 4.883.800, zopolrestat dado a conocer en la patente U.S. nº 4.939.140 y los inhibidores preferidos de aldosa reductasa dados a conocer en la patente U.S. nº 6.579.879.

A título de ejemplo los inhibidores de aldosa reductasa también incluyen análogos, derivados, profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los inhibidores de aldosa reductasa citados anteriormente.

La cantidad de inhibidor de aldosa reductasa que se administra por dosis y el intervalo entre dosis dependerá del inhibidor de aldosa reductasa que se esté utilizando, del tipo de composiciones farmacéuticas que se estén utilizando, de las características del paciente que está siendo tratado y de la gravedad de los procesos, si los hay, que están siendo tratados. Los inhibidores de aldosa reductasa se administran preferentemente en cantidades que varían desde aproximadamente 0,001 mg/kg/día hasta aproximadamente 1000 mg/kg/día en dosis individuales o divididas, con preferencia aproximadamente de 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg al día

para un paciente medio, dependiendo del inhibidor de aldosa reductasa y de la vía de administración. Sin embargo, será necesaria alguna variación en la dosis dependiendo del estado del paciente en tratamiento. El responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para cada paciente. Un inhibidor de aldosa reductasa preferido es zopolrestat que se administra preferentemente a una

5 dosis de entre 250 mg y 500 mg al día.

Los agentes pueden también incluir agentes contra la obesidad tales como los inhibidores de la secreción de apolipoproteína-B/proteína microsómica de transferencia de triglicérido (apo-B/MTP), inhibidores de 11 β -hidroxil esteroide

10 deshidrogenasa-1 (11 β -HSD de tipo 1), péptido YY₁₋₃₆ o sus análogos, antagonistas de canabinoides (p. ej., antagonistas de CB-1, tales como rimonabant y compuestos de purina descritos en la publicación de patente U.S. nº 2004/0092520), agonistas de MCR-4, agonistas de colecistoquinina-A (CCK-A), inhibidores de reabsorción de monoamina (tal como $\square$ sibutramina), agentes simpatomiméticos, agonistas del

15 receptor β_3 adrenérgico, agonistas de dopamina (tal como bromocriptina), análogos del receptor de la hormona estimulante de melanocitos, agonistas de 5HT_{2c}, antagonistas de la hormona concentradora de melanina, leptina (proteína OB), análogos de leptina, agonistas receptores de leptina, antagonistas de galanina, inhibidores de lipasa (tal como $\square$ tetrahidrolipstatina, es decir orlistat), agentes anoréxicos (tal como un agonista

20 de bombesina), antagonistas de receptor de neuropéptido-Y (p. ej., antagonistas de receptor NPY Y5, tales como los compuestos espiro descritos en las patentes U.S. nº 6.566.367, nº 6.649.624, nº 6.638.942, nº 6.605.720, nº 6.495.559, nº 6.462.053, nº 6.388.077, nº 6.335.345 y nº 6.326.375, las publicaciones de las patentes U.S. nº 2002/0151456 y nº 2003/036652, y las publicaciones PCT nº WO 03/010175, nº WO

25 03/082190 y nº WO 02/048152), agentes tiromiméticos, deshidroepiandrosterona o su análogo, agonistas o antagonistas del receptor glucocorticoide, antagonistas del receptor de orexina, agonistas del receptor del péptido-1 similar a glucagón, factores neurotróficos ciliares (tal como $\square$ AxokineTM disponible en Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY y en Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH), proteínas

30 humanas relacionadas con el agutí (AGRP), antagonistas del receptor de ghrelin, antagonistas de receptor de histamina 3 o agonistas inversos, agonistas del receptor de neuromedina U y similares. Otros agentes contra la obesidad, son bien conocidos, o serán evidentes a la luz de la presente publicación, para cualquier experto en la materia. Los agentes contra la obesidad especialmente preferidos se seleccionan del

35 grupo consistente en orlistat (preparados como se describe en las patentes U.S.

nº 5.274.143, nº 5.420.305 y nº 5.540.917), sibutramina (preparado como se describe en la patente U.S. nº 4.929.629), bromocriptina (patentes U.S. nº 3.752.814 y nº 3.752.888), efedrina, leptina, pseudoefedrina; rimonabant (preparado como se describe en la patente U.S. nº 5.624.941), péptido YY3-36 o uno de sus análogos (preparado como se describe en la publicación de la patente U.S. nº 2002/0141985 y la publicación PCT nº WO 03/027637); y el antagonista de receptor de NPY Y5, 2-oxo-N-(5-fenilpirazinil)espiro[isobenzofuran-1(3H),4'-piperidina]1'-carboxamida. Otros antagonistas de receptor NPY Y5 son los descritos en la Publicación PCT nº WO 03/082190, incluyendo la 3-oxo-N-(5-fenil-2-pirazinil)-espiro[isobenzofuran-1(3H), 4'-piperidina]1'-carboxamida; la 3-oxo-N-(7-trifluorometilpirido[3,2-b]piridin-2-il)-espiro[isobenzofuran-1(3H), 4'-piperidina]1'-carboxamida; la N-[5-(3-fluorofenil)-2-pirimidinil]-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H), [4'-piperidina]1'-carboxamida; la trans-3'-oxo-N-(5-fenil-2-pirimidinil) espiro[ciclohexano-1,1'(3'H)-isobenzofuran]4-carboxamida; la trans-3'-oxo-N-[1-(3-quinolil)-4-imidazolil]espiro[ciclohexano-1, 1'(3'H)-isobenzofuran]4-carboxamida; la trans-3-oxo-N-(5-fenil-2-pirazinil)espiro[4-azaisobenzofuran-1(3H),1'-ciclohexano]4'-carboxamida; la trans-N-[5-(3-fluorofenil)-2-pirimidinil]-3-oxospiro[5-azaisobenzofuran-1(3H), 1'-ciclohexano]4'-carboxamida; la trans-N-[5-(2-fluorofenil)-2-pirimidinil]-3-oxospiro[5-azaisobenzofuran-1(3H), 1'-ciclohexano]4'-carboxamida; la trans-N-[1-(3,5-difluorofenil)-4-imidazolil]-3-oxospiro[7-azaisobenzofuran-1(3H),1'-ciclohexano]4'-carboxamida; la trans-3-oxo-N-(1-fenil-4-pirazolil)espiro[4-azaisobenzofuran-1(3H),1'-ciclohexano]4'-carboxamida; la trans-N-[1-(2-fluorofenil)-3-pirazolil]-3-oxospiro[6-azaisobenzofuran-1(3H),1'-ciclohexano]4'-carboxamida; la trans-3-oxo-N-(1-fenil-3-pirazolil)espiro[6-azaisobenzofuran-1(3H),1'-ciclohexano]4'-carboxamida; la trans-3-oxo-N-(2-fenil-1,2,3-triazol-4-il)espiro[6-azaisobenzofuran-1(3H),1'-ciclohexano]4'-carboxamida y las sales farmacéuticamente aceptables y sus profármacos. Preferiblemente, los compuestos de la presente invención en las terapias de combinación se administran junto con ejercicio y una dieta sensible.

Los agentes se emplean en los métodos de esta invención bien solos o en combinación con uno o otros agentes más. Los agentes pueden administrarse solos o con uno o más excipientes, diluyente o cargas farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas que contienen los agentes pueden administrarse fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como comprimidos, polvos, pastillas, jarabes, soluciones inyectables y así sucesivamente. Si se desea, estas composiciones farmacéuticas pueden contener ingredientes adicionales como

aromatizantes, aglutinantes, excipientes y similares. Para los propósitos de administración oral, pueden utilizarse los comprimidos que contienen varios excipientes como citrato de sodio, carbonato de calcio y difosfato cálcico junto con varios disgregadores como almidón, metilcelulosa, ácido algínico y determinados silicatos complejos, junto con agentes aglutinantes como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina y acacia. Además, a menudo son útiles para la compresión agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina rellenas, blandas y duras. Materiales preferidos para esta utilización incluyen lactosa o azúcar de leche y polietilenglicoles de peso molecular elevado. Cuando se desean suspensiones acuosas o elixires para administración bucal, el agente en las mismas puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o colorantes y si se desea, agentes emulsionantes o de suspensión junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y/o combinaciones de los mismos.

Para administración parenteral, pueden emplearse soluciones de los agentes útiles en esta invención, en aceite de sésamo o aceite de cacahuete, propilenglicol acuoso o en soluciones acuosas estériles. Dichas soluciones acuosas deben estar adecuadamente tamponadas si fuera necesario y el diluyente líquido en primer lugar puesto en forma isotónica con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, los medios acuosos estériles empleados están todos disponibles fácilmente por técnicas clásicas conocidas por los expertos en la materia. Los métodos de preparación de diversas composiciones farmacéuticas con una determinada cantidad de ingrediente activo son conocidos o serán obvios a la luz de esta descripción, para los expertos en la materia. Por ejemplo, los métodos de preparación de composiciones farmacéuticas se describen en Gennaro (2003).

Las descripciones de todas las patentes, solicitudes, publicaciones y documentos, incluyendo los folletos y boletines técnicos, citados en la presente memoria, se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Se considera que un experto en la materia, basándose en la presente descripción, que incluye los ejemplos, dibujos y reivindicaciones adjuntas, puede utilizar la presente invención en todo su alcance.

Se cree que un experto en la materia, utilizando la presente descripción, que incluye los ejemplos, listados de secuencias y reivindicaciones adjuntas, puede utilizar la presente invención en todo su alcance. Los siguientes ejemplos deben considerarse sólo ilustrativos de la práctica de la invención, y no limitativos del resto de la descripción de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Células 293 que expresan a GPR40

Se prepararon montajes del vector de expresión que contiene los alelos del gen GPR40 basándose en el vector, pIRESpuro, (nº de catálogo 6031-1, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Dicho montaje del vector de expresión presenta la secuencia de SEQ. ID. nº: 11 y la cartografía de restricción mostrada en la Figura 4. Células 293 embrionarias de riñón humanas (HEK) que han sido transformadas con adenovirus 5 (disponibles en la ATCC, nº de catálogo CRL-1573) se cultivaron en medio que contiene DMEM (nº de catálogo 11995-065, Invitrogen, Carlsbad, CA), 10% de FBS (nº de catálogo 16140-071, Invitrogen) y 100 unidades Pen/Strep (nº de catálogo 15140-122, Invitrogen). Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se transfectaron con los vectores de expresión que contienen GPR40 utilizando reactivo Eugene-6 (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN). Después de 48 hora de incubación, se aspiró el medio y se añadió medio nuevo que contiene DMEM, FBS al 10%, 100 unidades de Pen/Strep y 1µg/ml de puromicina. A las cuatro semanas, se utilizaron probetas de clonación (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) para seleccionar clones estables con resistencia a la puromicina transportados por el vector pIRESpuro. Estas colonias se dejaron ampliar durante cuatro semanas más y se seleccionaron colonias de crecimiento rápido que producen células HEK 293/GPR40 para su utilización en el ensayo FLIPR del Ejemplo 2.

Ejemplo 2

Ensayo FLIPR con GPR40

El primer día, células HEK 293/GPR40 preparadas según el Ejemplo 1 y células HEK 293 de referencia se colocaron en placas negras con fondo transparente de 384 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (nº de catálogo 354663, BD Biosciences) a

100
107

razón de 10.000 células por pocillo (30 µl por pocillo de $3,3 \times 10^5$ células/ml de solución) en medio de cultivo que contenía DMEM, 10% de FBS y Penn/Strep (100 µg/ml), con adición de 1 µg/ml de puromicina para las células HEK 293/GPR40 únicamente, y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. El segundo día, se eliminó el medio de cada pocillo y se substituyó por 30 µl de medio exento de suero (DMEM y Pen/Strep solamente, y sin FBS), con adición de 1 µg/ml de puromicina para las células HEK 293/GPR40 solamente. El tercer día, viales con colorante del kit de ensayo FLIPR® Calcium 3 (nº de catálogo R8091, Molecular Devices, Sunnyvale CA) se reconstituyeron con 11 ml de solución salina tamponada de Hanks (componente del kit de ensayo FLIPR®) y 225 µl de solución madre de probenecid 250 mM recién preparada que contenía NaOH 5N (1 ml), probenecid (0,74 g) (nº de catálogo P8761, Sigma-Aldrich Co.) y tampón 1x FLIPR (9 ml) (preparado a partir de tampón 10x FLIPR que contiene, por litro, NaCl (84,68 g), D(+) glucosa anhidra (18,02 g), MgSO₄·7H₂O (1,2 g), KCl (3,73 g), HEPES (23,8 g) y CaCl₂ (1,11 g), a pH 7,4). Los ácidos grasos y otros compuestos de ensayo del ligando GPR40 se diluyeron hasta concentraciones de entre 0,05 µM y 100 µM en FLIPR/DMSO (tampón 1x FLIPR que contiene 0,25% de DMSO). Se añadieron 30 microlitros de colorante a cada pocillo de la placa y se incubaron las placas a 37°C y 5% de CO₂ durante una hora. Se midió el flujo de calcio utilizando un lector de placas FLIPR (Molecular Devices). Se inyectaron soluciones del compuesto de ensayo en cada pocillo (15 µl por pocillo) a un ritmo de 10 µl por segundo. Se hicieron exposiciones cada dos segundos para 0,4 segundos por exposición para 90 exposiciones.

Ejemplo 3

Aislamiento y purificación del ADN

Se aísla y purifica ADN de una muestra de sangre completa utilizando el kit Puregene® de aislamiento de ADN (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN) según las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los glóbulos rojos procedentes de muestras congeladas de sangre completa pueden lisarse mezclando sangre completa descongelada (1 ml) con solución de lisis RBC (Gentra Systems, Inc.), por ejemplo, en una proporción 3:1 (es decir, 3 ml de solución de lisis RBC para 1 ml de sangre completa) y se mezclan. La solución se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, la solución se centrifuga a 1.800 x g durante 10 minutos. El sobrenadante del tubo se vierte y el sedimento resultante se vuelve a poner en

suspensión en el sobrenadante residual. Se añade a continuación Solución de lisis celular (1 ml) (Gentra Systems, Inc.), por ejemplo, hasta un volumen equivalente al del volumen de sangre completa inicial. Se añade Solución A de RNasa (5 µl) (Gentra Systems, Inc.) al lisado celular y el tubo se incuba a 37°C durante 15 minutos. La muestra se enfría a continuación a temperatura ambiente, se añade Solución para precipitación de proteínas (333 µl) (Gentra Systems Inc.) al lisado celular y la mezcla se combina agitando a alta velocidad durante al menos 20 segundos. La mezcla se centrifuga a continuación a 1.800 x g durante 10 minutos produciendo un sedimento proteico compacto. El sobrenadante resultante que contiene ADN se vierte en un tubo de centrifugadora limpio de 15 ml que contiene 10 ml de isopropanol al 100% (2-propanol). La muestra se mezcla suavemente invirtiendo el tubo (aproximadamente 40 a 60 veces) hasta que precipite el ADN. Si no aparece el ADN, se añaden siete µl de glucógeno (20 µg/ml) por ml de sangre completa (materia prima original) y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos. La muestra se centrifuga a continuación a 1.800 x g durante tres minutos produciendo un pequeño sedimento blanco de ADN. Se añaden 10 ml de etanol al 70% y el tubo se invierte varias veces para lavar el sedimento de ADN. La muestra se centrifuga durante un minuto a 1.800 x g. El sobrenadante se vierte a continuación, y el tubo se invierte y se seca con aire.

20

Elemplo 4

Discriminación alélica

Se diseñaron cebadores y sondas Tagman® MGB (Applied Biosystems) utilizando el programa informático Primer Express versión 1.5 (Applied Biosystems). La reacción PCR se llevó a cabo en un volumen de 5 µl consistente en: 2,5 µl de 2x TagMan® Universal PCR Master Mix (sin AmpErase), 200 nM de cada sonda, 900 nM de los cebadores transcritos y complementarios y agua hasta 5 µl. Alternativamente, se obtuvieron cebadores y sondas como TaqMan Assays-on Demand™ (Applied Biosystems) y se llevó a cabo la reacción PCR en 5 µl consistente en: 2,5 µl de 2x TagMan® Universal PCR Master Mix (sin AmpErase), 2,25 µl de agua y 0,25 µl de 20 x Assay Mix. Los 5 µl de mezcla de reacción se añadieron a aproximadamente 10 ng de ADN anhidro en el pocillo de una placa de 96 pocillos. Las placas se colocaron en un agitador de placas de valoración y se agitaron intensamente durante 10 minutos y a continuación se centrifugaron brevemente a 1.000 RPM. El ciclo térmico se realizó en un GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) con un módulo del bloque de la muestra doble de 384 pocillos utilizando las condiciones

siguientes de ciclo térmico: 950°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 92°C durante 15 segundos y 60°C durante un minuto. La señal fluorescente se detectó utilizando un detector de secuencia ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron con el programa informático

5 Sequence Detection System (SDS) versión 2.1 (Applied Biosystems).

Ejemplo 5

Investigación de variantes de GPR40 en pacientes diabéticos de tipo II

10 De los 2.465 pacientes analizados, 1.332 eran varones y 857 eran hembras. Las frecuencias alélicas se estimaron haciendo el recuento de las apariciones del alelo completo de GRP40, y a continuación dividiendo por dos el número de individuos a considerar para los dos alelos a los que contribuye cada paciente. Se estimaron las frecuencias en el genotipo haciendo el recuento de las apariciones de un determinado

15 genotipo y a continuación dividiendo por el número de individuos.

Bibliografía

- Abravaya, K. *et al.* (1995), *Nucleic Acids Research*, 23, 675-682;
- 20 ADA (2004), "Standards of medical care in diabetes (Clinical Practice Recommendations 2004)", *Diabetes Care*, 27 (Supl. 1), S15-S35;
- Andersen, HS. *et al.* (2000), "2-(oxalylamino)-benzoic acid is a general, competitive
- 25 inhibitor of protein-tyrosine phosphatases", *J. Biol. Chem.*, 275, 7101-7108;
- Armitage, P. (1955), "Tests for linear trends in proportions and frequencies", *Biometrics*, 11, 375-386;
- 30 Augustyns, KJL. *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, 32, 301-309;
- Ausubel *et al.* (1994), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ;

111
110

Bleasdale, JE, et al. (2001), "Small molecule peptidomimetics containing a novel phosphotyrosine bioisostere inhibit protein tyrosine phosphatase 113 and augment insulin action", *Biochemistry*, 40, 5642-5654;

- 5 Briscoe, C.P. et al. (2003), "The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids", *J. Biol. Chem.*, 278, 11303-11311;

Button, D. y Brownstein, M. (1997), "Aequorin-expressing mammalian cell lines used to report Ca²⁺ mobilization", *Cell Calcium*, 14, 663-671;

10

Cascieri, MA et al. (1999), "Characterization of a novel, non-peptidyl antagonist of the human glucagon receptor", *J. Biol. Chem.*, 274, 8694-8697;

- Chambers, C. et al. (2003), "Measuring Intracellular Calcium Fluxes in High
15 Throughput Mode", *Combinatorial Screening and High Throughput Screening*, 6, 355-362;

Chang, LL. et al. (2001), "Substituted imidazoles as glucagon receptor antagonists", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 11, 2549-2553;

20

Coghlan, MP. et al. (2000), *Chemistry and Biology*, 7, 793-803;

- Cross, DA. et al. (2001), "Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death", *Journal of Neurochemistry*, 77,
25 94-102;

de Laszlo, SE. et al. (1999), "Potent, orally absorbed glucagon receptor antagonists", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 9, 641-646;

- 30 Devlin, B. y Roeder, K. (1999), "Genomic control for association studies", *Biometrics*, 55, 997-1004);

Dracopoli et al. (2004), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ;

Panel de expertos en detección, evaluación y tratamiento de colesterol alto en sangre en adultos (2001), "Executive Summary of the Third Report of the national Cholesterol Education Program (NCEP)," *JAMA* 285, 2486-2497;

- 5 Gadsby, R. (2002), "Epidemiology of diabetes", *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 1165-1172;

Gether, U. (2000), "Uncovering molecular mechanisms involved in activación of G protein coupled receptors", *Endocr. Rev.*, 21, 90-113;

- 10 Guillon, J. *et al.* (1998), *European Journal of Medicinal Chemistry*, 33, 293-308;

Haber, E.P., *et al.* (2002), "Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic β -cells", *J. Cell Physiol.*, 194, 1-12;

- 15 Haga, H., *et al.* (2002), "Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome", *J. Hum. Genet.*, 47, 605-610;

- 20 Higuchi, T. y Stella, W. (1987), "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 de la A.C.S. Symposium Series, y en *Bioreversible Carriers in Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press;

Innis *et al.* (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego CA;

25

Itoh, Y., *et al.* (2003), "Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40", *Nature*, 173-176;

- 30 Iversen, L.F. *et al.*, (2000) "Structure-based design of a low molecular weight, nonphosphorus, nonpeptide, and highly selective inhibitor of protein-tyrosine phosphatase 1 B", *J. Biol. Chem.*, 275, 10300-10307;

Johnson, G.L. y Dhanasekaran, N. (1989), "The G-protein family and their interaction with receptors", *Endocr. Rev.*, 10, 317-331;

35

Jrdea, MS. *et al.* (1993), *AIDS*, 7 (supl. 2), S11-514;

Kain, S.R. (1999), "Green fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery", *Drug Discov. Today*, 4, 304-312;

5

Kievits, T. *et al.* (1991), *J. Virological., Methods* 35, 273-286;

10 Kees, KL., *et al.* (1996), "New potent antihyperglycemic agentes in db/db mice: synthesis and structure-activity relationship studies of (4-substituted benzyl) (trifluoromethyl)pyrazoles and -pyrazolones", *J. Med. Chem.*, 39, 3920-3928;

Kotarsky, K. *et al.* (2003), "A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301, 406-410;

15 Ling, A. *et al.* (2001), "Identification of alkylidene hydrazides as glucagon receptor antagonists", *J. Med. Chem.*, 44, 3141-3149;

Livingston, *et al.* (1999), *Diabetes*, 48 Supl.1, 0862;

20 Lochhead, PA. *et al.* (2001), "Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression", *Diabetes*, 50, 937-946;

25 Madsen, P. *et al.* (1998), "Discovery and structure-activity relationship of the first non-peptide competitive human glucagon receptor antagonists", *J. Med. Chem.*, 41, 5150-5157;

Malamas, MS., *et al.* (2000A), "New azolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1 B with antihyperglycemic properties", *J. Med. Chem.*, 43, 995-1010;

30

Malamas, MS. *et al.* (2000B), "Novel benzofuran and benzothiophene biphenyls as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 113 with antihyperglycemic properties", *J. Med. Chem.*, 43, 1293-1310;

Miyawaki, A. *et al.* (1997), "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin", *Nature*, 388, 882-887;

5 Park, YW. *et al.* (2003), "The Metabolic Syndrome. Prevalence and associated risk factor findings in the U.S. population from the Third National and Nutrition Examination Survey, 1988-1994", *Arch. Intern. Med.*, 163, 427-436;

Gennaro, AR. (2003) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA, 20^a edición;

10

Reilly, MP. y Rader, DJ. (2003), "The Metabolic syndrome. More than the sum of its parts?", *Circulation*, 108, 1546-1551;

15 Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY;

Sawzdargo, M. *et al.* (1997), "A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 543-547;

20

Shirai, K. (2004), "Obesity as the core of the metabolic syndrome and the management of coronary heart disease", *Curr. Med. Res. Opin.*, 20, 295-304;

25 Smith, DG. *et al.* (2001), "3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 11, 635-639;

Stables, J. *et al.* (1997), "A bioluminescent assay for agonist activity at potentially any G-protein-coupled receptor", *Anal. Biochem.*, 252, 115-126

;

30

Wang, Q. *et al.* (1998), "Naphthalenebis[alpha,alpha-difluoromethylene phosphonates] as potent inhibitors of protein tyrosine phosphatases", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 345-350;

35 Weir, BS y Cockerham, CC. (1979), "Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations", *Heredity*, 42, 105-111;

115 14A

Wrobel, J., *et al.* (1999), "PTP1B inhibition and antihyperglycemic activity in the ob/ob mouse model of novel 11-arylbenzo[b]naphtho[2,3-d]furans and 11-arylbenzo[b]naphtho[2,3-d]thiophenes", *J. Med. Chem.*, 42: 3199-3202;

- 5 Wrobel, J. *et al.* (2000), "Synthesis and PTP1B inhibition of novel 4-aryl-1-oxa-8-thiacyclopenta[b]fluorenes", *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 10, 1535-1538.

REIVINDICACIONES

1. Un método de genotipado, que comprende determinar el aminoácido que está codificado por el gen GPR40 de un paciente humano en el aminoácido número 211.

2. Un método de la reivindicación 1 que comprende además determinar el aminoácido que está codificado en el aminoácido número 211 por ambos alelos del gen GPR40 de dicho paciente.

3. Un método de genotipado de la reivindicación 1 que comprende además determinar si el gen GPR40 de dicho paciente codifica el aminoácido número 211 que es distinto de histidina.

4. Un método de genotipado de la reivindicación 1 que comprende además determinar si el gen GPR40 de dicho paciente codifica el aminoácido número 211 que es la arginina.

5. Un método de genotipado de la reivindicación 1 que comprende además determinar si el gen GPR40 de dicho paciente codifica el aminoácido número 211 que es la histidina.

6. Un método de genotipado de la reivindicación 1, que comprende además:

aislar el ácido nucleico procedente de un paciente humano;

ampliar una secuencia contigua de dicho ácido nucleico, en el que dicha secuencia contigua comprende los nucleótidos de GPR40 que codifican el aminoácido número 211, o su secuencia complementaria;

tratar dicha secuencia contigua con una sonda nucleotídica que permite la determinación del aminoácido codificado en el aminoácido número 211 del gen GPR40 de dicho paciente; y

determinar si dicha sonda hibrida dicha secuencia contigua en condiciones de alta severidad.

117 H6

7. Un método de la reivindicación 6, en el que dicha sonda permite la determinación si el aminoácido número 211 de dicho gen GPR40 es la histidina.

5 8. Un método de la reivindicación 6, en el que dicha sonda permite la determinación si el aminoácido número 211 de dicho gen GPR40 es la arginina.

9. Un método de la reivindicación 6, en el que dicha sonda consiste en un fragmento contiguo de una secuencia nucleotídica de la SEQ. ID. nº: 9 que tiene una longitud de aproximadamente 13 a aproximadamente 35 nucleótidos, unidos a un
10 marcador detectable, y que incluye los nucleótidos que codifican el aminoácido 211, o su secuencia nucleotídica complementaria.

10. Un método de la reivindicación 6, en el que dicha sonda consiste en un fragmento contiguo de una secuencia nucleotídica de la SEQ. ID. nº: 10 que tiene una
15 longitud de aproximadamente 13 a aproximadamente 35 nucleótidos, unidos a un marcador detectable, e incluyendo los nucleótidos que codifican el aminoácido 211, o su secuencia nucleotídica complementaria.

11. Un método de tratamiento, que comprende:
20 determinar el aminoácido que está codificado por el gen GPR40 de un paciente humano en el aminoácido número 211; y
tratar a dicho paciente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o proceso patológico mediado por que tiene al menos un alelo del gen GPR40 en el que el aminoácido codificado
25 número 211 es otro distinto de la histidina.

12. Un método de la reivindicación 11, en el que dicho agente es un de compuesto antidiabético de tiazolidindiona, uno de sus profármacos farmacéuticamente aceptables o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
30

13. Un método de la reivindicación 11, en el que dicho agente es un inhibidor de dipeptidil peptidasa IV, uno de sus profármacos farmacéuticamente aceptables o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

14. Un kit, que comprende una sonda nucleotídica que permite la determinación del aminoácido codificado en el aminoácido número 211 del gen GPR40 de dicho paciente humano.

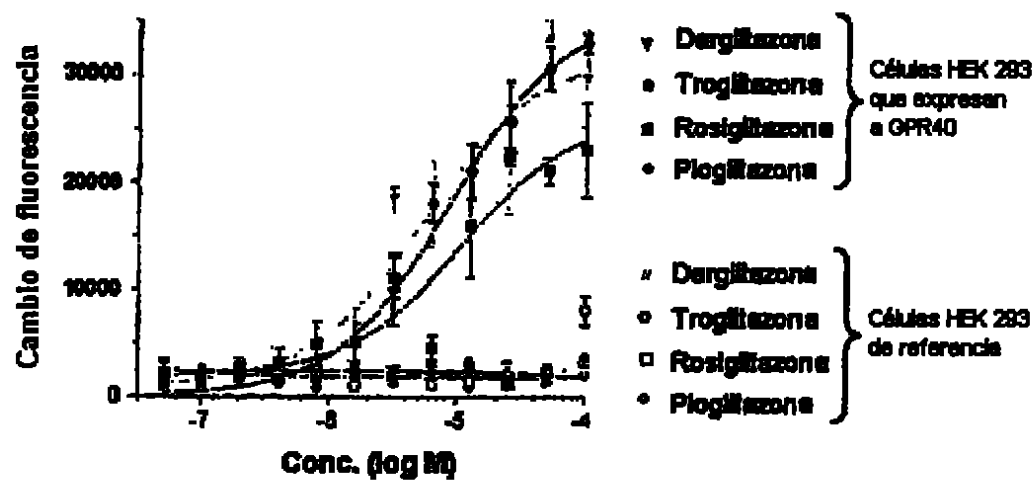
- 5 15. Un método de caracterización de un agente, que comprende:
- medir la inhibición competitiva mediante un agente de ensayo de fijación de un
 ligando de GPR40 a un primer receptor humano de GPR40 en el que el aminoácido
 número 211 es la histidina; y
- medir la inhibición competitiva mediante dicho compuesto de fijación de un
10 ligando de GPR40 a un segundo receptor humano de GPR40 en el que el aminoácido
 número 211 es distinto de la histidina.

RESUMEN

Esta invención se refiere a métodos de genotipado, métodos de tratamiento, pruebas de diagnóstico y kits y métodos de caracterización de un agente, relacionado
5 con un único polimorfismo nucleotídico del gen GPR40.

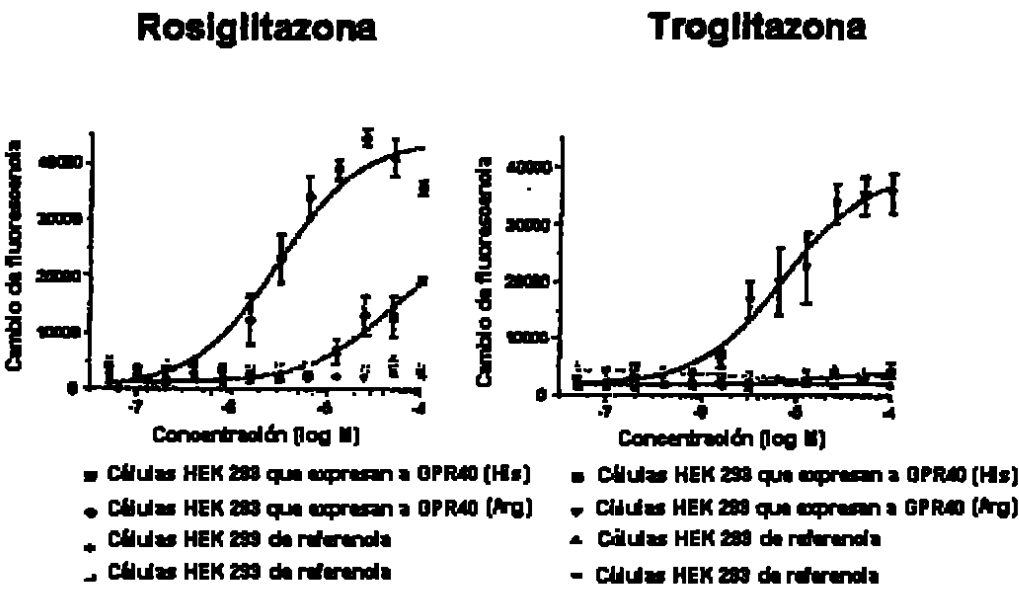
12044

FIGURA 1



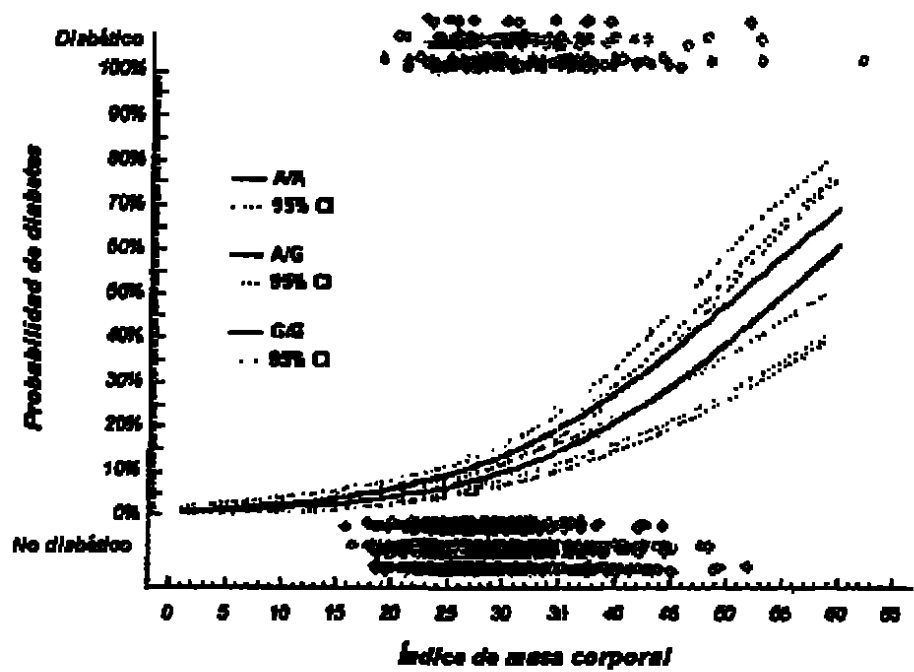
120
721

FIGURA 2



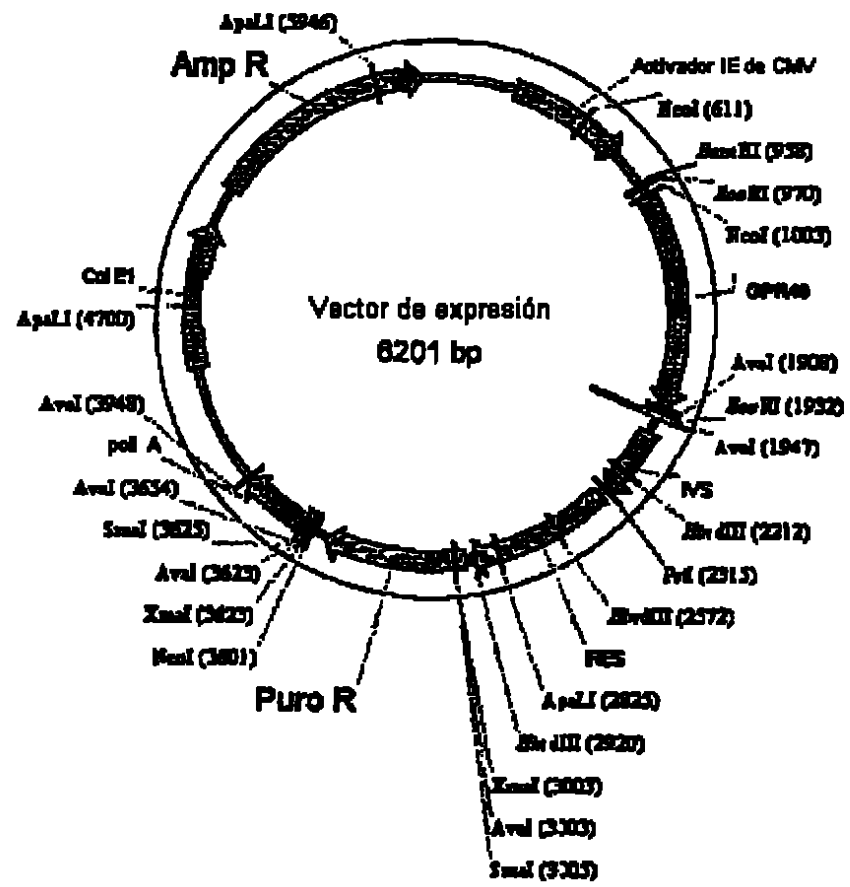
127
122

FIGURA 3



22
123

FIGURA 4



12A
125

FIGURA 6

SEQ. ID. NO: 3

Secuencia nucleotídica de GPR40 humano

ATGGACCTGCCCCCGCAGCTCTCCTTCGGCCTCTATGTGGCCCCCTTTGGCGCTGGGCTTCCCGCTCAAC
GTCTTGCCATCCGAAGCGGACGGCCCCACGCCCGGCTCCGTCTCACCCCTAGCCTGGTCTACGCCCTG
AACCTGGGCTGCTCCGACCTGCTGCTGACAGTCTCTCTGCCCCGTAAGGCGGTGGAGGCGCTAGCCTCC
GGGGCCTGGCCTCTGCCGGCCTCCTGTGCCCCGTCTTCGGCGGTGGCCCACTTCTTCCCACTCTATGCC
GGCGGGGGCTTCTTGCCGGCCTGAGTGCAGGCCGCTACCTGGGAGCAGCCTTCCCTTGGGCTACCAA
GCCTTCCGGAGGCGGTGCTATTCTTGCGGGGTGTGTGCGGGCCCTCTGCGCCCTCTGCTGTGTACCTG
GGTCTGGTCTTTGGGTTGGAGGCTCCAGGAGGCTGGCTGGACACAGCAACACCTCCCTGGGCATCAAC
ACACCGGTCAACGGCTCTCCGGTCTGCCTGGAGGCCTGGGACCCGGCCTCTGCCCGCCCGGCCGCTTC
AGCCTCTCTCTCCTGCTCTTTTTCTGCCCTTGGCCATCACAGCCTTCTGCTACGTGGCTGGCTCCGG
GCACTGGCCCACTCCGGCCTGACGCACAGGCGGAAGCTGCGGGCCGCTGGGTGGCCCGCGGGGCCCTC
CTCAGCTGCTGCTCTGCTAGGACCTTACAAAGCCTCCACGTGGCCAGCTTCCTGTACCCCAATCTA
GGAAGCTCCTGGCGAAGCTGGGGCTCATCACGGGTGCTTGGAGTGTGGTCTTAATCCGCTGGTGACC
GGTTACTTGGGAAGGGTCTTGGCCTGAAGACAGTGTGTGCGGCAAGAACGCAAGGGGCCAAGTCCCA
AAG

* Subrayados los nucleótidos que codifican el aminoácido número 211

SEQ. ID. NO: 4

Secuencia de aminoácidos de GPR40 humano

MDLPFQLSFGLYVAAFALGFPLNVLAIRGATAHARLRITPRLVYALHLGCSDLLLTVSLPLFAVEALAS
GANPLPASLCPVFVAFAEFFPLYAGGGFLAALSAGRYLGAAFFLOTQAFKPCYSWGVCAAIWALVLCIL
GLVFGLFAPGGWLDHENTSLGINTPVNGSPVCLEANDPASAGFARFSLSLILFFLPLATTAPCTVQCLR
ALANSGLTTHRRKLRAANVAGGALLTLLLCVGPYNASNVASFLYFNLGGSWRKLGLITGANSVVLNPLVT
GYLGRGPGLKTVCLANTQGGKSK

* Subrayado el aminoácido número 211

125
126

FIGURA 7

SEQ. ID. NO: 5

Secuencia de cebador transcrito para PCR de GPR40 humano
CTTGGCCATCACAGCCTTCT

SEQ. ID. NO: 6

Secuencia de cebador complementario para PCR de GPR40 humano
CCACGTTGGAAGCGCTTGT

SEQ. ID. NO: 7

Secuencia de sonda para PCR de GPR40 humano
CACTGGCCCACTCT

SEQ. ID. NO: 8

Secuencia de sonda para PCR de GPR40 humano
CACTGGCCCGCTC

SEQ. ID. NO: 9

Secuencia nucleotídica de GPR40 humano

CTTCTGCTACGTGGGCTGCCTCCGGGCACTGGCCCGCTCCGGCCTGACGCACAGGCGGAAGCTGCGGGC
CG

* Subrayados los nucleótidos que codifican el aminoácido número 211

SEQ. ID. NO: 10

Secuencia nucleotídica de GPR40 humano

CTTCTGCTACGTGGGCTGCCTCCGGGCACTGGCCCGCTCCGGCCTGACGCACAGGCGGAAGCTGCGGGC
CG

* Subrayados los nucleótidos que codifican el aminoácido número 211

FIGURA 8

BBQ. ID. NO: 11

Vector de expresión

[illegible]

127
128

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL DE PATENTABILIDAD
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
FULLER, Grover, F., Jr.
c/o LAWRENCE, Jackie
Easter Point Road
Groton, CT 06340
Estados Unidos de America

Sello de Recibido 2 de Junio de 2006, Departamento de patentes Pfizer

Fecha de expedición: 29.05.2006
Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC26139A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/001962
Fecha de presentación internacional: 20.06.2005
Fecha de prioridad: 30.06.2004
Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.
2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.

4. RECORDATORIO

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39 (1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al

solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el Volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 – o Tx:523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Funcionario Autorizado: Cleere, C
Tel: +49 89 2399-7713

129
130

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC26139A

Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/001962

Fecha de presentación internacional: 20.06.2005

Fecha de prioridad: 30.06.2004

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: INV. C12Q1/68

Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. El reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Revisión Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y es transmitido al solicitante según el Artículo 36.
2. Este REPORTE consta de un total de 10 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.
 - a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de ___ hojas, descritas a continuación:
 - ☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).
 - ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.
 - b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s)) _____, que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

130
131

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------|--|
| ☒ | Recuadro I | Base de este informe |
| ☐ | Recuadro II | Prioridad |
| ☒ | Recuadro III | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial |
| ☐ | Recuadro IV | Falta de unidad de Invención |
| ☒ | Recuadro V | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| ☐ | Recuadro VI | Ciertos documentos citados |
| ☐ | Recuadro VII | Defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional |

Fecha de radicación de la demanda: 16.09.2005

Fecha de elaboración de este reporte: 29.05.2006

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 – o Tx:523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Funcionario Autorizado: Barz. W
Tel: +49 89 2399-7713

Recuadro I. Base de este informe

1. Por la respuesta al idioma, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.
- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos*** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:

Descripción, Páginas

1 - 31 **tal como se presentaron inicialmente**

Reivindicaciones, Números

1 - 9 tal como se presentaron inicialmente

Numero de Hojas

1-15 **Tal como se presentaron inicialmente**

Hojas de dibujo

1/13-13/13 **Tal como se presentaron inicialmente**

☒ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) – ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. ☐ Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:
- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

133

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla - 0.2(c)).
- ☐ la descripción, páginas
 - ☐ las reivindicaciones, Nos.
 - ☐ los dibujos, hojas/fig.
 - ☐ la lista de secuencias (especificar):
 - ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

Recuadro No. III. Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial

1. Las preguntas con respecto a si el invento reivindicado parece ser novedoso, implica una actividad inventiva (no ser evidente), o ser susceptible de aplicación industrial, por lo que respecta.

- ☐ al conjunto de la solicitud internacional,
- ☒ a las reivindicaciones Nos. 1-13 (IA), 11-13 parcialmente

debido a que:

- ☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos.1-13 (IA) con respecto la aplicación industrial, en cuestión se refieren al objeto, respecto del cual no requiere examen preliminar internacional (especifique):

Ver hoja sep/rada

- ☐ a descripción, reivindicaciones, o los dibujos (indíquese cuales a continuación) o tales reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa (especifique):
- ☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa.
- ☒ no se ha emitido informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos. 1-13 parcialmente

☐ la lista de secuencias nucleótidas y/o de aminoácidos no cumplen la norma estándar prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas por que:

La lista en papel ☐ **no se presentó**

☐ no cumple con la norma estándar

La lista en formato legible por ordenador

☐ no se presentó☐ no cumple con la norma estándar

☐ las tablas relativas a las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos, si se han presentado únicamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos previstos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ ver Recuadro Suplementario para más detalles.

**Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35
(2) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación
industrial: anterioridades y explicaciones que soportan tal
declaración**

1. Declaración

Novedad (N)

Si:	Reivindicaciones	6-15
No:	Reivindicaciones	1-5

Nivel Inventivo (IS) **Si: Reivindicaciones -**
No: Reivindicaciones 1-15

Aplicación Industrial (IA)

Si:	Reivindicaciones	14-15
No:	Reivindicaciones	

Ver hoja separada

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada.

123
135

Recuadro suplementario relativo a listas de secuencias

Continuación del Recuadro 1, punto 2:

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de:

a. tipo de material

- ☒ una lista de secuencias
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias

b. formato del material

- ☒ por escrito
- ☒ en soporte legible por ordenador

c. fecha de presentación/entrega

- ☒ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
- ☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
- ☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de búsqueda y/o examen
- ☐ recibido como modificación, por esta Administración en fecha _____

2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla(s) relacionada(s) con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales

Ítem III

No formulación de concepto con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial

1. Puesto que las expresiones “determinando el... de aminoácidos del sujeto humano...” en la reivindicación 1 y “aislando ácido nucleico a partir de un sujeto humano” en la reivindicación 6 puede comprender pasos quirúrgicos o pasos diagnósticos realizados sobre el cuerpo humano, las reivindicaciones 1-10 se relacionan con materia considerada cubierta por esta Autoridad por las provisiones establecidas en la Regla 67.1(iv) del PCT. De manera similar, las reivindicaciones 11-13 que se relacionan con el tratamiento de sujetos humanos también son consideradas cubiertas por esta Autoridad por las provisiones establecidas en la Regla 67.1(iv) del PCT. De manera que ningún concepto se formulará con respecto a la aplicación industrial de la materia de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT). Sin embargo, ver a continuación la sección V-3.

2. La reivindicación 11 se relaciona con el tratamiento de sujetos humanos con un agente para el tratamiento o prevención de una “enfermedad o condición patológica mediada por el hecho de tener al menos un alelo del gen GPR40 en donde el número aminoácido codificado 211 no sea histidina”. Sin embargo, puesto que la presente solicitud solamente proporciona evidencia convincente para diabetes tipo II por ser de hecho tal condición (ver la página 10, líneas 22-27; ejemplo 5; figura 3), la reivindicación 11 no es ni clara ni está soportada de manera suficiente por la memoria descriptiva (Artículo 6 del PCT) ni tampoco la presente invención está divulgada de manera suficiente para ser llevada a cabo por aquella persona capacitada (Artículo 5 del PCT). De manera que la Búsqueda Internacional no fue realizada sobre todo el alcance de la reivindicación 11. Por lo tanto, la búsqueda solo se limitó al tratamiento con agente para el tratar o prevenir diabetes tipo II. Así, la Evaluación Preliminar Internacional solo se basará en aquellas partes de la presente solicitud que hayan sido sometidas a búsqueda (Regla 66.1(e) del PCT).

Ítem V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial; citas y explicaciones sustentando dicha declaración

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 47, no. 11, 2002, páginas 605-610, (HAGA H. ET AL.);
D2: BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC., US, vol. 239, 1997, páginas 543-547, (SAWZDARGO M. ET AL.), ISSN: 0006-291X;
D3: DIABETES, NEW YORK, US, vol. 45, diciembre 1996, páginas 1661-1669, (SALTIEL A.R. ET AL.), ISSN: 0012-1797;
D4: CLINICAL AND EXPERIMENTAL HYPERTENSION, MARCEL DEKKER, NEW YORK, US, vol. 21, 1999, páginas 121-136, (SUBRAMANIAM S.);

D5: ARZNEIMITTEL FORSCHUNG, ECV EDITIO CANTOR VERLAG, DE, vol. 48, no. 2, 1998, páginas 97-119, (BETHGE H ET AL), ISSN: 0004-4172;
D6: WO 02/057783 A (GLAXO GROUP LTD; SMITHKLINE BEECHAM P.L.C.), 25 de julio de 2002.

135
137

1. NOVEDAD – Artículo 33(2) del PCT

Las reivindicaciones 1-5 no cumplen con los requisitos establecidos en el Artículo 33(2) del PCT por las siguientes razones:

1.1 Un método de genotipificación el cual comprende la determinación del aminoácido 211 del gen GPR40 es conocido a partir del documento D1 (ver el resumen, la sección de Métodos en la página 606, como también el sitio en Internet citado en el resumen). Por lo tanto, la materia de la presente reivindicación 1 no es novedosa.

1.2 Las reivindicaciones dependientes 2-5 también no son novedosas (Artículo 33(2) del PCT), puesto que las características adicionales de dichas reivindicaciones también se conocen a partir de D1 (ver los pasajes citados anteriormente).

1.3 Las restantes reivindicaciones 6-15 parecen ser novedosas, puesto que ninguno de los antecedentes disponibles divulga la misma combinación de características como en dichas reivindicaciones.

2. NIVEL INVENTIVO – Artículo 33(3) del PCT

Sin embargo, las reivindicaciones 6-15 parecen no cumplir con los requisitos del Artículo 33(3) del PCT por las siguientes razones:

2.1 En comparación con la divulgación de D1, considerado el estado de la técnica más cercano a las reivindicaciones 1-10, la materia de las presentes reivindicaciones 6-8 difiere solamente en que el genotipo es determinado mediante hibridización de una sonda nucleótida bajo condiciones estrictas (en lugar de secuenciamiento tal como se usa en D1). Sin embargo, dicha diferencia no puede considerarse en hacer de dichas reivindicaciones inventivas, puesto que la hibridización por sonda es solo una entre varias posibilidades directas para la genotipificación. Por consiguiente, aquella persona capacitada podría seleccionar hibridización por sonda, según las circunstancias, sin el ejercicio de habilidades inventivas.

2.2 De manera similar, los métodos de genotipificación de las presentes reivindicaciones 9-10 también no pueden ser reconocidos en tener nivel inventivo (Artículo 33(3) del PCT), puesto que la escogencia de una selección de 13-35 nucleótidos a partir de la secuencia genómica conocida cercana a codificación por tripletas para el residuo 211 del gen GPR40 (representado por la DEQ ID Nos 9-10), sería un procedimiento de rutina obvio para aquella persona capacitada.

2.3 La reivindicación 11 se relaciona con un método de tratamiento, el cual comprende la determinación del residuo 211 del gen GPR40 y el tratamiento con un agente para tratar o prevenir la diabetes tipo II (ver la sección III-2. arriba). Sin embargo, dichos dos pasos no están conectados mediante alguna relación funcional y

136
138

por lo tanto se considera como una yuxtaposición de procesos funcionando en su manera normal y no produciendo alguna interrelación de trabajo no obvia (ver las Directrices PCT IV-8.3a y IV-8.8(B1)). Por consiguiente, sería obvio combinar los métodos conocidos para la determinación del residuo 211 del gen GPR40 (ver la sección V-1.1 arriba) con algún tratamiento conocido para tratar la diabetes tipo II (usando por ejemplo, la tiazolidindiona, ver los documentos D3-D5).

2.4 Objeciones análogas aplican para los métodos de tratamiento de las presentes reivindicaciones 12-13.

2.5 La reivindicación 14 se relaciona con un kit el cual comprende una sonda de nucleótidos el cual permite la determinación del aminoácido 211 del gen GPR40. Sin embargo, puesto que cada sonda de nucleótidos que coincide con la codificación de tripleta para el aminoácido 211 del gen GPR40 debe considerarse en poder permitir la determinación de dicho residuo, dicha sonda es obvia a partir de todos los antecedentes que divulgan la secuencia genómica para el gen GPR40 (por ejemplo, ver el documento D2). Adicionalmente, puesto que la inclusión de sondas conocidas dentro de un kit yace sobre el alcance de la práctica normal realizada por expertos en el estado de la técnica, sería entonces una posibilidad obvia para aquel experto incluir dicha sonda en un kit. De manera que la materia de la reivindicación 14 parece carecer de nivel inventivo.

2.6 La reivindicación 15 se relaciona con la caracterización de un agente de prueba uniéndose al gen GPR40 (ver la sección 5.1 a continuación), que comprende la medición de la inhibición competitiva de la unión de un ligando GPR40 al gen GPR40 por medio de dicho agente de prueba. Sin embargo, de manera análoga a la objeción trazada en la anterior sección 2.3, parece no haber ninguna relación funcional entre el polimorfismo de GPR40 y la caracterización de un agente uniéndose a GPR40. Sin embargo, puesto que la identificación de un compuesto de prueba como ligandos GPR40, mediante la detección de dicho compuesto de prueba inhibe de manera competitiva la unión de un ácido graso al gen GR40, se conoce a partir del antecedente D6, no puede reconocerse un nivel inventivo para la reivindicación 15.

3. APLICACIÓN INDUSTRIAL – Artículo 33(4) del PCT

3.1 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 1-13 sobre si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados entre los Estados pertenecientes al PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La Oficina de Patentes Europea, EPO, por ejemplo, no reconoce como cumplimiento del requisito de la aplicación industrial, un contenido de reivindicaciones con respecto al uso de un compuesto en un tratamiento médico (ver la sección III-1, arriba), pero si permite sin embargo, reivindicaciones con respecto a un compuesto para primer uso en un tratamiento médico y el uso de tal compuesto para la producción de un medicamento para un tratamiento médico nuevo.

3.2 Las restantes reivindicaciones 14-15 cumplen con los requisitos del Artículo 33(4) del EPC.

4. DOCUMENTOS P, X

Los dos documentos citados en el Reporte de Búsqueda Internacional como documentos P, X fueron publicados después de la fecha de prioridad, pero antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Por lo tanto, solo son relevantes para aquellas partes de la presente solicitud, si las hay, que no tengan una reivindicación de prioridad válida. Puesto que el documento de prioridad no estuvo disponible para la evaluación preliminar internacional, se asumió que la prioridad de la presente solicitud era válida. Sin embargo, el anterior documento de patente podría convertirse en un antecedente relevante en la fase Regional de la presente solicitud.

5. COMENTARIOS ADICIONALES

5.1 La reivindicación 15 no es clara (Artículo 6 del PCT) puesto que no es aparente cómo la medición de la inhibición competitiva por el agente de prueba del ligando GPR40 uniéndose a las dos formas diferentes de GPR40 (llevando histidina u otro aminoácido sobre la posición 211) podría permitir la caracterización de dicho agente. En otras palabras, la reivindicación 15 parece carecer las dos características esenciales "método de caracterizar un agente de prueba que se une a GPR40" (según se expone en la página 13, líneas 26-27, de la especificación) y "por comparación de la inhibición competitiva de (...) " (página 13, líneas 26-27, de la especificación).

5.2 Adicionalmente, la expresión "dicho compuesto" en la mitad posterior de la reivindicación 15 no es clara (Artículo 6 del PCT), puesto que la primera mitad de dicha reivindicación no menciona ningún "compuesto". Por consiguiente, la expresión "dicho compuesto" debería probablemente ser reemplazado por "agente de prueba".

5.3 La figura 2 no es clara, puesto que no es aparente cómo la Fig. 2A es diferente de la Fig. 2B (debido a la rotulación idéntica de dichos paneles y debido a la ausencia de cualquier comentario en la memoria descriptiva).

5.4 La figura 3 no es clara, puesto que no es aparente cuáles datos corresponden a cual genotipo. Esta objeción aplica especialmente a las seis líneas discontinuas por encima y por debajo de las líneas continuas/discontinuas. Adicionalmente, ni el significado de los numerosos puntos de datos expresados en la parte superior e inferior de la figura 3 ni el significado de la expresión "95% CI" son claros.

PATENT COOPERATION TREATY

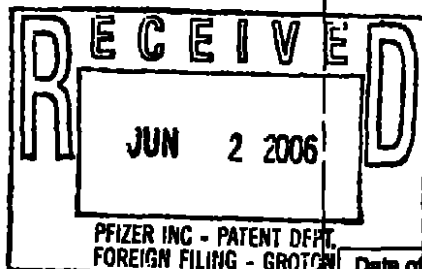
138
K. K. K. K.
N 140

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

FULLER, Grover, F., Jr.
c/o LAWRENCE, Jackie
Pfizer Inc. MS8280-1815
Easter Point Road
Groton, CT 06340
ETATS-UNIS D'AMERIQUE



NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year) 29.05.2006

Applicant's or agent's file reference
PC26139A

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2005/001962

International filing date (day/month/year)
20.06.2005

Priority date (day/month/year)
30.06.2004

Applicant
PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the International preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the International application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the International application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the International
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80289 Munich
Tel. +49 89 2339 - 0 Tlx 523656 epmu d
Fax: +49 89 2339 - 4465

Authorized Officer

Cleere, C
Tel. +49 89 2339-7713



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

129
141

Applicant's or agent's file reference PC26138A	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/16
International application No. PCT/IB2005/001962	International filing date (day/month/year) 20.06.2005	Priority date (day/month/year) 30.06.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12Q1/88		
Applicant PFIZER PRODUCTS INC. et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 16.09.2005	Date of completion of this report 29.05.2006	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523888 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Barz, W Telephone No. +49 89 2399- 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

142 140
International application No.
PCT/IB2005/001962

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-31 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-9 as originally filed

Claims, Numbers

1-15 as originally filed

Drawings, Sheets

1/13-13/13 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

143 141
International application No.
PCT/IB2005/001982

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1-13 (IA), 11-13 (partially)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-13 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 11-13 (partially)

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

144 102
International application No.
PCT/IB2005/001962

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	6-15
	No: Claims	1-5
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-15
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	14-15
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

145 743
International application No.
PCT/B2005/001962

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☐ received by this Authority as an amendment on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional observations, if necessary:

146 ~~144~~

ITEM III:

1. Since the expressions "determining the amino acid [...]" of human subject [...]" in claim 1 "isolating nucleic acid from a human subject" in claim 6 may comprise surgical steps or diagnostic steps performed on the human body, claims 1-10 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Similarly, claims 11-13 relating to the treatment of human subjects are also considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT). See, however, item V-3. below.
2. Claim 11 relates to the treatment of human subjects with an agent for treatment or prevention of a "disease or pathological condition mediated by having at least one allele of the GPR40 gene wherein the encoded amino acid number 211 is other than histidine". Since, however, the present application only provides convincing evidence for type II diabetes as being such a condition (see page 10, lines 22-27; example 5; figure 3), claim 11 is neither clear and sufficiently supported by the description (Article 6 PCT) nor is the present invention sufficiently disclosed to be carried out by the skilled person (Article 5 PCT). Consequently, the International Search was not performed over the whole scope of claim 11. Instead, the search has only been limited to the treatment with agent for treating or preventing type II diabetes. Consequently, the International Preliminary Examination will only be based on those parts of the present application which have been searched (Rule 66.1(e) PCT).

ITEM V:

Reference is made to the following documents:

- D1: JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 47, no. 11, 2002, pages 605-610, (HAGA H. ET AL.);
- D2: BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC., US, vol. 239, 1997, pages 543-547, (SAWZDARGO M. ET AL.), ISSN: 0006-291X;
- D3: DIABETES, NEW YORK, US, vol. 45, December 1996, pages 1661-1669,

(SALTIEL A.R. ET AL.), ISSN: 0012-1797;

D4: CLINICAL AND EXPERIMENTAL HYPERTENSION, MARCEL DEKKER,
NEW YORK, US, vol. 21, 1999, pages 121-136, (SUBRAMANIAM S.);

D5: ARZNEIMITTEL FORSCHUNG, ECV EDITIO CANTOR VERLAG, DE,
vol. 48, no. 2, 1998, pages 97-119, (BETHGE H ET AL), ISSN: 0004-4172;

D6: WO 02/057783 A (GLAXO GROUP LTD; SMITHKLINE BEECHAM P.L.C.),
25 July 2002.

1. NOVELTY

Claims 1-5 do not meet the requirements of Article 33(2) PCT for the following reasons:

1.1 A genotyping method comprising the determination of amino acid 211 of GPR40 is known from document D1 (see abstract, the Methods section on page 606, as well as the web site cited in the abstract). Therefore, the subject-matter of present claim 1 is not novel.

1.2 The dependent claims 2-5 are also not novel (Article 33(2) PCT), because the additional features of said claims are also known from D1 (see the passages cited above).

1.3 The remaining claims 6-15 appear to be novel, because none of the available prior art documents discloses the same combination of features as in said claims.

2. INVENTIVE STEP

However, claims 6-15 do not appear to meet the requirements of Article 33(3) PCT for the following reasons:

2.1 Compared to the disclosure D1, which is regarded as being the closest prior art to claims 1-10, the subject-matter of present claims 6-8 differs only the fact that the genotype is determined by hybridization of a nucleotide probe under stringent conditions (instead of sequencing as used in D1). However, said difference cannot be regarded as making said claims inventive, because probe hybridization is

merely one of several straightforward possibilities for genotyping. Therefore, the skilled person would select probe hybridization, in accordance with circumstances, without the exercise of inventive skill.

- 2.2** Similarly, the genotyping methods of present claims 9-10 also cannot be acknowledged as involving an inventive step (Article 33(3) PCT), because the selection of a 13-35 nucleotide sequence from the known genomic sequence close to triplet coding for residue 211 of GPR40 (represented by SEQ ID NO:s 9-10) would be an obvious routine procedure for the skilled person.
- 2.3** Claim 11 relates to a method of treatment, comprising the determination of residue 211 of GPR40 and the treatment with an agent for treating or preventing type II diabetes (see item III-2. above). However, said two steps are not connected by any functional relationship and are therefore considered as a juxtaposition of processes functioning in their normal way and not producing any non-obvious working interrelationship (see PCT Guidelines IV-8.3a and IV-8.8(B1)). Therefore, it would be obvious to combine the known methods of determining GPR40 residue 211 (see item V-1.1 above) with known treatment of treating type II diabetes (using e.g. thiazolidinedione, see documents D3-D5).
- 2.4** Analogous objections apply to the treatment methods of present claims 12-13.
- 2.5** Claim 14 relates to a kit comprising a nucleotide probe that enables determination of amino acid 211 of GPR40. Since, however, every nucleotide probe overlapping the triplet coding for amino acid 211 of GPR40 must be regarded as enabling the determination of said residue, said probe is obvious from all prior art documents disclosing the genomic sequence of GPR40 (e.g. document D2). Since, furthermore, the inclusion of known probes into a kit falls within the scope of the customary practice followed by persons skilled in the art, it would therefore be an obvious possibility for the skilled person to include said probe into a kit. Consequently, the subject-matter of claim 14 appears to lack an inventive step.
- 2.6** Claim 15 relates to the characterization of an test agent binding to GPR40 (see item 5.1 below), comprising the measurement of competitive inhibition of binding of a known GPR40 ligand to GPR40 by said test agent. However, analogous to the objection outlined in item 2.3 above, there appear to be no functional relationship between the GPR40 polymorphism and the characterization of an

144 1A7

agent binding to GPR40. Since, however, the identification of test compound as GPR40 ligands by detecting whether said test compound competitively inhibits the binding of a fatty acid to GPR40 is known from document D6, the involvement of an inventive step cannot be acknowledged for claim 15.

3. INDUSTRIAL APPLICABILITY

3.1 For the assessment of the present claims 1-13 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the treatment of the human or animal body by surgery or to the use of a compound in medical treatment (see item III-1. above), but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

3.2 The remaining claims 14-15 fulfill the requirements of Article 33(4) EPC.

4. P,X DOCUMENTS

The two documents cited in the International Search Report as P,X documents were published after the priority date, but before the filing date of the present application. Therefore, they are only relevant for those parts of the present application, if any, which do not have a valid claim to priority. Since the priority document was not available for the international preliminary examination, the priority of the present application was assumed to be valid. However, the above patent document may become relevant prior art in the Regional phase of the present application.

5. FURTHER COMMENTS

5.1 Claim 15 is not clear (Article 6 PCT), because it is not apparent how the measurement of the competitive inhibition by the test agent of GPR40 ligand

150 148

binding to the two different GPR40 forms (carrying histidine or another amino acid at position 211) might possibly allow the characterization of said agent. In other words, claim 15 appears to lack the two essential features "method of characterizing an test agent that binds to GPR40" (as outlined on page 13, lines 26-27, of the specification) and "by comparing the competitive inhibition of [...]" (page 13, lines 26-27, of the specification).

5.2 Furthermore, the expression "said compound" in the lower half of claim 15 is not clear, (Article 6 PCT), because the upper half of said claim does not mention any "compound". Therefore, the expression "said compound" should probably be replaced by "test agent".

5.3 Figure 2 is not clear, because it is not apparent how Fig. 2A is different from Fig. 2B (due to the identical labelling of said panels and due to the absence of any comments in the specification).

5.4 Figure 3 is not clear, because it is not apparent which data correspond to which genotype. This objections applies especially to the six dotted lines above and below the solid/dashed lines. Furthermore, neither the meaning of the numerous data points at the very top and the very bottom of figure 3 nor the meaning of the expression "95% CI" are clear.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

[]

MODELO DE UTILIDAD

[]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención [X]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Edgar Navarro
Firma Responsable

Fecha 27-12-2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

752

Folio 150

2020
Bogotá D.C.,

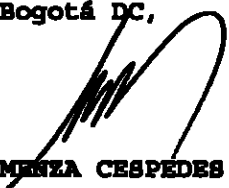
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS, INC.

REFERENCIA	Radicación No.	06 129578
	Solicitud internacional	PCT/IB2005/001962
	Fecha inicio fase nacional	30/01/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	2506
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

13 FEB 2007


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa10