

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5774264号
(P5774264)

(45) 発行日 平成27年9月9日(2015.9.9)

(24) 登録日 平成27年7月10日(2015.7.10)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/15 (2006.01)
 A 6 1 P 3/04 (2006.01)
 A 6 1 P 5/50 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
 GO 1 N 33/50 (2006.01)

GO 1 N 33/15 Z
 A 6 1 P 3/04
 A 6 1 P 5/50
 C 1 2 Q 1/02 Z N A
 GO 1 N 33/50 Z

請求項の数 17 (全 73 頁)

(21) 出願番号 特願2008-509119 (P2008-509119)
 (86) (22) 出願日 平成18年4月26日(2006.4.26)
 (65) 公表番号 特表2008-540336 (P2008-540336A)
 (43) 公表日 平成20年11月20日(2008.11.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/016024
 (87) 国際公開番号 W02007/027225
 (87) 国際公開日 平成19年3月8日(2007.3.8)
 審査請求日 平成21年4月21日(2009.4.21)
 審判番号 不服2013-25254 (P2013-25254/J1)
 審判請求日 平成25年12月24日(2013.12.24)
 (31) 優先権主張番号 60/675,730
 (32) 優先日 平成17年4月27日(2005.4.27)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500478097
 アリーナ ファーマシューティカルズ、
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21, サンディエゴ, ナンシー リッ
 ジ ドライブ 6154
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 チュー, チーリヤン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 28, サン ディエゴ, クリークスト
 ーン レーン 11489

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肥満および糖尿病、ならびにそれらに関連する病態の処置のため、ならびに血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態の処置のための、併用療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ボディマスを減少させるのに有用なGLP-1分泌促進物質又は化合物、或いは血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法であって、

(a) Gタンパク質共役受容体を発現する宿主細胞又は該宿主細胞の膜と、試験化合物とを接触させる手順であって、該Gタンパク質共役受容体が、

(i) 配列番号2のアミノ酸1～335；

(ii) 配列番号2のアミノ酸1～399；

(iii) 配列番号2のアミノ酸2～335；

(iv) 配列番号2のアミノ酸2～399；

(v) 配列番号2のアミノ酸2～335（但し、該受容体が配列番号2のアミノ酸位置1においてメチオニン残基を含まないことを条件とする）；

(vi) 配列番号2のアミノ酸2～399（但し、該受容体が配列番号2のアミノ酸位置1においてメチオニン残基を含まないことを条件とする）；

(vii) 特異的プライマーである配列番号3及び配列番号4を使用してヒトDNAサンプルにおいてポリメラーゼ鎖反応(PCR)を実施することを含むプロセスによって得ることができるヌクレオチド配列によってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(viii) 配列番号1の相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

10

20

ヌクレオチド配列によってコードされる G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；及び

(i x) (i) ~ (v i i i) の何れか 1 つの生物学的活性フラグメント、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、手順；

(b) 該受容体の機能性を刺激する該試験化合物の能力を判定する手順、

(c) 手順 (b) において該受容体の機能性を刺激する化合物を、哺乳動物の腸内分泌細胞と *i n v i t r o* で接触させる手順；並びに、

(d) 該化合物が該哺乳動物の腸内分泌細胞による G L P - 1 の分泌を刺激するか否かを判定する手順、を含み；

該哺乳動物の腸内分泌細胞からの G L P - 1 の分泌を刺激する該試験化合物の能力は、該試験化合物が、ボディマスを減少させるに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物であるか、或いは血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物であることを表す、方法。

10

【請求項 2】

前記方法が、G L P - 1 分泌促進物質を同定するためのものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記宿主細胞が発現ベクターを含み、該発現ベクターが、G タンパク質共役受容体をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 2 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記判定が、セカンドメッセンジャーのレベルを測定することにより行われる、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記セカンドメッセンジャーが、イノシトール 1, 4, 5 - 三リン酸塩 (I P 3)、ジアシルグリセロール (D A G)、M A P キナーゼ活性、M A P K / E R K キナーゼキナーゼ 1 (M E K K 1) 活性、及び C a ²⁺ からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記判定が、メラニン保有細胞検定を使用することにより、又は前記 G P C R を含む膜への G T P γ S の結合を測定することにより行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

30

ボディマスを減少させるのに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物、或いは血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法であって、

(a) 試験化合物の存在下又は非存在下において、G タンパク質共役受容体を、該受容体に対する必要に応じて標識された既知のリガンドと接触させる手順であって、該 G タンパク質共役受容体が、

(i) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 3 3 5 ；

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 3 9 9 ；

(i i i) 配列番号 2 のアミノ酸 2 ~ 3 3 5 ；

(i v) 配列番号 2 のアミノ酸 2 ~ 3 9 9 ；

40

(v) 配列番号 2 のアミノ酸 2 ~ 3 3 5 (但し、該受容体が配列番号 2 のアミノ酸位置 1 においてメチオニン残基を含まないことを条件とする) ；

(v i) 配列番号 2 のアミノ酸 2 ~ 3 9 9 (但し、該受容体が配列番号 2 のアミノ酸位置 1 においてメチオニン残基を含まないことを条件とする) ；

(v i i) 特異的プライマーである配列番号 3 及び配列番号 4 を使用してヒト D N A サンプルにおいてポリメラーゼ鎖反応 (P C R) を実施することを包含するプロセスによって得ることができるヌクレオチド配列によってコードされる G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(v i i i) 配列番号 1 の相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズされるヌクレオチド配列によってコードされる G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；及び

50

(ix) (i) ~ (viii) の何れか 1 つの生物学的活性フラグメント、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、手順；

(b) 該既知のリガンドと該受容体との間の複合体を検出する手順；

(c) 該試験化合物の存在下で形成される該複合体が、該試験化合物の非存在下で形成されるよりも少ないか否かを判定する手順、

(d) その存在下の方が (c) において形成される該複合体が少ない化合物を、哺乳動物の腸内分泌細胞と *in vitro* で接触させる手順；並びに、

(e) 該化合物が該哺乳動物の腸内分泌細胞による GLP-1 の分泌を刺激するか否かを判定する手順、を含み；

該哺乳動物の腸内分泌細胞からの GLP-1 の分泌を刺激する能力は、該試験化合物が、ボディマスを増加させるのに有用な GLP-1 分泌促進物質又は化合物であるか、或いは血中 GLP-1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有効な化合物であることを表す、方法。

10

【請求項 8】

前記方法が、GLP-1 分泌促進物質を同定するためのものである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記受容体が組換え体である、請求項 7 ~ 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

血中 GLP-1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置または予防するのに有用な GLP-1 分泌促進物質又は化合物を同定する方法であって、

20

(a) BRS-3 作動薬を、哺乳動物の腸内分泌細胞と *in vitro* で接触させる手順；及び

(b) 該 BRS-3 作動薬が、該哺乳動物の腸内分泌細胞からの GLP-1 の分泌を刺激するか否かを判定する手順、

を含み、該 BRS-3 作動薬の、該哺乳動物の腸内分泌細胞からの GLP-1 の分泌を刺激する能力は、該作動薬が、血中 GLP-1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有効な GLP-1 分泌促進物質又は化合物であることを表す、方法。

【請求項 11】

30

血中 GLP-1 レベルを増大させることによって緩和される前記病態が、糖尿病、糖尿病に関連する病態、心筋梗塞、学習障害、記憶障害、及び神経変性障害からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記方法が GLP-1 分泌促進物質を同定するためのものである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 BRS-3 作動薬が、ヒト BRS-3 の作動薬である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 BRS-3 作動薬が低分子であり、該低分子が、モル当たり約 10,000 グラム未満の分子量を有し、ペプチド、ペプチドミメティック、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機化合物、又は無機化合物（ヘテロ有機化合物、又は有機金属化合物を含む）、並びに、その塩、エステル、及び他の薬学的に許容される形態からなる群から選択される化合物である、請求項 10 ~ 13 の何れか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記 BRS-3 作動薬が、経口活性である、請求項 10 ~ 14 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 BRS-3 作動薬が、選択的 BRS-3 作動薬である、請求項 10 ~ 15 の何れか

50

1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 BRS-3 作動薬が、 $10\ \mu\text{M}$ 未満の EC₅₀を有する、請求項 10～16 の何れか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、肥満症及び糖尿病並びにそれらに関連する病態を処置又は予防する組成物及び方法に関する。本発明は更に、哺乳動物の血中 GLP-1 レベルを増大させる組成物及び方法にも関する。本発明は又、GLP-1 分泌促進物質を遮蔽するために G タンパク質共役受容体を使用する方法にも関する。

10

【背景技術】

【0002】

発明の背景

以下の考察は、本発明の理解を容易にすることを意図するものであるが、本発明の従来の技術であることを意図するものでも、認めるものでもない。

【0003】

A. 肥満症及び糖尿病

肥満症は、先進国で最も多く見られる代謝性疾患である。国民の間で健康への教育や取り組みが行われているにもかかわらず、肥満症の罹患率は上昇を続けており、米国では 30 %を超える成人が肥満であり、60 %を超える成人が過体重又は肥満である。世界保健機構は、世界中で 10 億人を超える成人が過体重であり、その内の少なくとも 3 億人が肥満であると推定している。肥満症は、高血圧症、うっ血性心筋症、冠状性心疾患、脳卒中、脂肪異常症、代謝症候群、及び 2 型糖尿病 [Bays, Obesity Research (2004) 12:1197-1211]、並びに早期死亡を含むがこれらに限定されない広範な共存症に罹患する危険性をもたらすか、又はそれを著しく増大させる。従って、世界的な肥満症の流行を減少させる治療選択肢となる安全且つ有効な抗肥満薬に対する医学的な需要は未だに満たされていない。

20

【0004】

米国における 2 型糖尿病の発症率は約 7 %であり、全医療費の約 10 %を占めている。更に、世界における 2 型糖尿病の発症率は増大しており、今や 2 型糖尿病は世界的な流行であると考えられている。2 型糖尿病は、絶食及び食後の高血糖並びに相対的なインスリン不全を特徴とする。高血糖症は、腎症、神経障害、網膜症、及び抹消血管性疾患等の長期的な微小血管及び巨大血管合併症を生じる場合がある。更に、2 型糖尿病は、高脂血症、アテローム性粥状硬化症、及び高血圧症をしばしば複合する共存症である。高脂血症は、アテローム性粥状硬化症による心臓血管疾患の主要な危険因子である。2 型糖尿病は、著しい罹患率及び死亡率をもたらす、患者、その家族、及び社会に大きな代償を生む。

30

【0005】

B. グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)

グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は、プログルカゴンの翻訳後修飾から誘導され、腸管内内分泌細胞により分泌されるインクレチンホルモンである。GLP-1 は、特異的 G タンパク質共役受容体 (GPCR)、即ち GLP-1 R を介してその作用を媒介する。GLP-1 は、グルコースホメオスタシスを調節するホルモンとして特徴付けられるのが最も良い。GLP-1 は、グルコース依存インスリン分泌を刺激し、膵臓 β 細胞の質量を増大させることが示されている。GLP-1 は又、胃内容排出率を減少させ、満腹を促進することも示されている。2 型糖尿病において血液グルコースを制御する GLP-1 ペプチド作動薬の効能は、体重を減少させるのに効能を有するのと同じく [非特許文献 1]、幾つかの臨床研究において実証されている [例えば、非特許文献 2 を参照]。

40

【0006】

50

GLP-1受容体作動薬は更に、心筋梗塞、並びに認知症及び神経変性障害に対する保護においても有用である。GLP-1は、心筋梗塞のラットモデルにおいて心臓を保護することが示されており〔非特許文献3〕、GLP-1Rは、学習及び神経保護に関わることが齧歯モデルにおいて示されている〔非特許文献4；及び非特許文献5〕。

【0007】

2型糖尿病等の特定の疾患は、GLP-1の欠損によって特徴付けられる〔例えば、Naucek, et al., Diabetes (2004) 53 Suppl 3: S190-196を参照〕。

【0008】

現在のGLP-1ペプチド作動薬は、経口生物学的利用能の欠如による悪影響を受けており、患者のコンプライアンスに悪影響を与える。GLP-1Rの経口生物学的利用可能な非ペプチド作用性の低分子作動薬を開発する取組みは、これまでのところ成功に至っていない〔非特許文献6〕。有力な代替手法としては、血液におけるGLP-1の内因性レベルを増大させる経口活性組成物を開発する方法がある。

【0009】

C. BPS-3

ボンベシンは、カエルの皮膚から単離された14アミノ酸ペプチドである。ボンベシン受容体サブタイプ3 BRS-3 Gタンパク質共役受容体(BRS-3；例えば、ヒトBRS-3、ジェンバンク(登録商標)受入番号受入番号AAA35604及びそのアレル；例えば、マウスBRS-3、ジェンバンク受入番号AY288423及びそのアレル)は、胃放出ペプチド受容体(GPR-R)及びニューロメディンB受容体(NMB-R)に対して約50%の相同性を示し、共にボンベシン様受容体グループを形成する。BRS-3は、視床下部及び子宮を含めた組織において選択的に発現される。BRS-3の活性化により、BRS-3がGqに結合するのと一貫して、細胞内イノシトール-1, 4, 5-三リン酸塩(IP3)の蓄積が増大する。最近の研究では、BRS-3ノックアウトマウスは、肥満症、糖尿病、及び高血圧を発症している〔非特許文献7〕。

【0010】

D. ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV)

ジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-IV、EC3.4.14.5)は、ペプチドホルモン、ニューロペプチド、及びケモカインを含む広範なペプチド基質に対して触媒作用を示す。グルコース依存インスリン分泌を刺激し、血液グルコースホメオスタシスを促進するインクレチングルカゴン様ペプチドI (GLP-1)及びグルコース依存インスリン分泌性ポリペプチド(GIP)は、位置2のアラニンにおいてDPP-IVにより迅速に開裂され、その生物学的活性は非活性化される。DPP-IV活性の薬理的減衰及び遺伝的減衰の両方とも、*in vivo*でのインクレチン作用の増大、インスリンの増大、及び血液グルコースの低下に関連する。DPP-IV活性の遺伝的減衰は、肥満症への耐性を提供し、インスリン感度を向上させることが示されている。第2世代DPP-IV阻害剤、LAF237(それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Ahren, et al., J Clin Endocrinol Metab (2004) 89: 2078-2084；及びVillhauer, et al., T Med Chem (2003) 46: 2774-2789)が、現在、2型糖尿病について段階3の臨床試行にあり、追加のDPP-IV阻害剤が、臨床的に開発されている。

【0011】

インクレチンホルモンは、DPP-IVの唯一の基質ではないため、その他の内因性DPP-IV基質の開裂を阻害することにより、望ましくない副作用が生じる可能性があることが懸念されている〔例えば、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Chen, et al., J Biol Regul Homeost Agents (2004) 18: 47-54を参照〕。従って、実質的に低い濃度のDPP-IV阻害剤に伴う血液グルコースホメオスタシスを促進する活性を同定することが有利

である。

【0012】

E. Gタンパク質共役受容体

GPCRは、共通の構造モチーフを共有し、それぞれが膜をスパンする（各スパンは数字によって識別される；即ち、膜貫通－1（TM－1）、膜貫通－2（TM－2）等）7つの α らせん体を形成する22～24の疎水性アミノ酸の7つの配列を有する。膜貫通らせん体は、細胞膜の外側又は「細胞外」面の上において膜貫通－2と膜貫通－3の間、膜貫通－4と膜貫通－5の間、及び膜貫通－6と膜貫通－7の間のアミノ酸の鎖によって接合される（これらはそれぞれ「細胞外」領域1、2及び3（EC－1、EC－2、及びEC－3）と呼ばれる）。膜貫通らせん体は又、細胞膜の内側又は「細胞内」面の上において、膜貫通－1と膜貫通－2の間、膜貫通－3と膜貫通－4の間、及び膜貫通－5と膜貫通－6の間においてアミノ酸の鎖によって接合される（これらはそれぞれ「細胞内」領域1、2及び3と呼ばれる）。受容体の「カルボキシ」（「C」）末端は、細胞内の細胞内空間にあり、受容体の「アミノ」（「N」）末端は、細胞の外部の細胞外空間にある。

【0013】

一般的に、作動薬がGタンパク質共役受容体に結合する時（しばしば受容体の「活性化」と呼ばれる）、細胞内領域と細胞内「Gタンパク質」の間の結合を容易にする受容体のコンフォメーションの変化が起きる。GPCRは、Gタンパク質に関して「乱交雑」である、即ち、GPCRは、複数のGタンパク質と相互作用することができることが報告されている。Kenaldn, T., 43 Life Sciences 1095 (1988) を参照されたい。他のGタンパク質が存在することが可能であるが、現在、Gq、Gs、Gi、Gz、及びGoが、特定されているGタンパク質である。リガンド活性化GPCRがGタンパク質と結合することにより、シグナリングカスケードプロセスが開始される（「信号導入」と呼ばれる）。通常の条件下では、信号導入は、最終的に、細胞を活性化させる、又は細胞を阻害することになる。

【0014】

Gsは、酵素アデニルシクラーゼを刺激する。一方、Gi（並びにGz及びGo）は、アデニルシクラーゼを阻害する。アデニルシクラーゼは、ATPからcAMPへの転換に触媒作用を及ぼす。従って、Gsタンパク質を結合する活性化GPCRは、cAMPの細胞レベルの増大に関連する。一方、Gi（又はGz、Go）タンパク質を結合する活性化GPCRは、cAMPの細胞レベルの減少に関連する。一般的には、“Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission,” Chpt. 8, From Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J. G., et al., eds. Sinauer Associates, Inc. (1992) を参照されたい。従って、cAMPを検出する検定を使用して、候補化合物が、例えばGs－関連受容体に対する作動薬であるか（即ち、このような化合物は、cAMPのレベルを増大させる）を判定することができる。Gq及びGoは、酵素ホスホリパーゼCの活性化に関連し、酵素ホスホリパーゼCは、リン脂質PIP₂を加水分解し、2つの細胞内メッセンジャー：ジアシルグリセロール（DAG）及びイノシトール1，4，5－三リン酸塩（P3）を放出する。IP3の蓄積の増大は、Gq関連受容体及びGo関連受容体の活性化に関連する。一般的には、“Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission,” Chpt. 8, From Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J. G., et al., eds., Sinauer Associates, Inc. (1992) を参照されたい。IP3の蓄積を検出する検定を使用して、候補化合物が、例えば、Gq関連受容体又はGo関連受容体に対する作動薬であるか（即ち、このような化合物は、IP3のレベルを増大させる）を判定することができる。細胞内遊離カルシウムのレベルを検出する検定を使用して、候補化合物が、例えばGq関連受容体又はGo関連受容体に対する作動薬であるか（即ち、このような化合物は、細胞内遊離カルシウムのレベルを増大させる）を判定することができる。

【0015】

例えば、表Aを参照されたい（「N/A」：「該当なし」）。

【0016】

【表1】

表A

Gタンパク質	GPCRの活性化時におけるcAMP生成に対する影響（即ち、成分活性化又は作動薬結合）	GPCRの活性化時におけるIP3蓄積に対する影響（即ち、成分活性化又は作動薬結合）	逆作動薬との接触時におけるcAMP生成に対する影響	逆作動薬との接触時におけるIP3蓄積に対する影響
Gs	増大	N/A	減少	N/A
Gi	増大	N/A	増大	N/A
Gz	減少	N/A	増大	N/A
Go	減少	増大	増大	減少
Gq	N/A	増大	N/A	減少

10

又、幾つかのクラスのGPCRをホスホリパーゼC経路に結合するとされる乱交雑Gタンパク質（例えば、Gα15又はGα16）[Offenranns & Simon, J Biol Chem (1995) 270:15175-80]、又は多くの異なるGPCRを同じ経路に結合するように設計されたキメラGタンパク質（例えば、ホスホリパーゼC）[Milligan & Rees, Trends in Pharmaceutical Sciences (1999) 20:118-24]も存在する。細胞内遊離カルシウムのレベルを検出する検定を使用して、候補化合物が、例えばホスホリパーゼC経路に結合されたGPCRに対する作動薬であるか（即ち、このような化合物は、細胞内遊離カルシウムのレベルを増大させる）を判定することができる。

20

【0017】

生理学的条件下において、GPCRは、「非活性」状態と「活性」状態の2つの異なるコンフォメーションの間において均衡して細胞膜に存在する。非活性状態の受容体は、生物学的応答をもたらす信号導入を開始するように細胞内シグナリング導入経路に連結することができない。受容体コンフォメーションを活性状態に変化させることにより、導入経路に連結することが可能になり（Gタンパク質を介して）、生物学的応答を生成する。

30

【0018】

受容体は、リガンド又は医薬品等の化合物によって活性状態において安定させることが可能である。受容体のアミノ酸配列の修飾を含むがこれに限定されない最近の発見は、活性状態のコンフォメーションにおいて受容体を促進する及び安定させるリガンド又は薬剤以外の手段を提供する。これらの手段は、リガンドが受容体に結合する効果を刺激することによって、活性状態において受容体を有効に安定させる。このようなりガンド非依存手段による安定化は、「構成的受容体活性化」と呼ばれる。内因性受容体リガンドの非存在下で活性を示す内因性受容体は、構成的活性内因性受容体と呼ばれる。

40

【非特許文献1】Zander, et al., Lancet (2002) 359:824-830

【非特許文献2】Nauck, et al., Drug News Perspect (2003) 16:413-422

【非特許文献3】Bose, et al., Diabetes (2005) 54:146-151

【非特許文献4】During, et al., Nat Med (2003) 9

50

: 1173-1179

【非特許文献5】Greig, et al., Ann N Y Acad Sci (2004) 1035:290-315

【非特許文献6】Mentlein, Expert Opin Investig Drugs (2005) 14:57-64

【非特許文献7】Ohki-Hamazaki, et al., Nature (1997) 390:165-169

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0019】

10

発明の要旨

本発明は、一定量のBRS-3作動薬と一定量のジペプチジルペプチダーゼ(DPP-IV)阻害剤との組み合わせに関し、それにより、組み合わせは、その量のBRS-3作動薬単独又はその量のDPP-IV阻害剤単独によって提供される場合より対象における血中グルコースレベルを低下させる効果を提供し、又糖尿病及びそれに関連する病態を処置又は予防するためのこのような組み合わせの使用に関する。本発明は、一定量のBRS-3作動薬と一定量のジペプチジルペプチダーゼIV(DPP-IV)阻害剤の組み合わせに関し、それにより、組み合わせは、その量のBRS-3作動薬単独又はその量のDPP-IV阻害剤単独によって提供される場合より対象における血中GLP-1レベルを増大させる効果を提供し、又、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防し、或いはGLP-1が欠損している対象における血中GLP-1レベルを増大させるためのこのような組み合わせの使用に関する。本発明は又、GLP-1分泌促進物質を遮蔽するためにBRS-3 Gタンパク質共役受容体を使用する方法にも関する。

20

【0020】

第1態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中グルコースレベルを低下させるのに十分な量で投与される。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

30

【0021】

本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、ボディマスを減少させる方法を更に特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量で投与される。特定の実施形態において、必要とする対象は、27以上のBMIを有する。特定の実施形態において、必要とする対象は、過体重である。特定の実施形態において、必要とする対象は、肥満である。

【0022】

40

本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、肥満症又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量で投与される。

【0023】

本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における

50

血中G L P－1 レベルを増大させるのに十分な量で投与される。

【0024】

本発明は、B R S－3 作動薬及びD P P－I V阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、G L P－1 が欠損している対象に投与することを含む、血中G L P－1 レベルを増大させる方法を更に特徴とする。特定の実施形態において、B R S－3 作動薬及びD P P－I V阻害剤は、対象における血中G L P－1 レベルを増大させるのに十分な量で投与される。

【0025】

特定の実施形態において、糖尿病は、2型糖尿病である。

【0026】

特定の実施形態において、糖尿病に関連する病態は、高血糖症、耐糖能異常、インスリン抵抗性、膵臓β細胞不全、腸内分泌細胞不全、糖尿、代謝性アシドーシス、白内障、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿性網膜症、糖尿性冠状動脈疾患、糖尿性心臓血管疾患、糖尿性抹消血管性疾患、代謝症候群、高脂血症、アテローム性粥状硬化症、脳卒中、高血圧症、及び肥満症からなる群から選択される。

【0027】

特定の実施形態において、肥満症に関連する病態は、高血圧症、うっ血性心筋症、静脈瘤、肺塞栓、冠状性心疾患、脳卒中、突発性頭蓋内高血圧症、知覚異常性大腿神経痛、呼吸困難、閉塞性睡眠無呼吸、低換気症候群、ピックウィック症候群、喘息、不動症、変性骨関節炎、腰痛、皮膚裂線又は「伸展裂創」、下肢の静脈うっ血、リンパ浮腫、細胞菌肉炎、間擦疹、カンブネル、黒色表皮腫、懸垂線維腫、胃食道逆流疾患、非アルコール性脂肪肝／脂肪肝炎、胆石症、ヘルニア、大腸がん、ストレス失禁、肥満症に係る糸球体症、乳がん及び子宮がん、抑うつ及び低自己評価、生活の質の低下、代謝症候群、2型糖尿病、脂肪異常症、女性のハイパーアンドロゲネミア、多嚢胞卵巣症候群、月経困難症、不妊症、妊娠合併症、及び男性性機能低下症からなる群から選択される。特定の実施形態において、肥満症に関連する病態は、高血圧症、うっ血性心筋症、冠状性心疾患、脳卒中、脂肪異常症、代謝症候群、及び2型糖尿病からなる群から選択される。

【0028】

特定の実施形態において、血中G L P－1 レベルを増大させることによって緩和される病態は、糖尿病、糖尿病に関連する病態、心筋梗塞、学習障害、記憶障害、及び神経変性障害からなる群から選択される。

【0029】

特定の実施形態において、血中G L P－1 レベルを増大させることによって緩和される病態は、重度のてんかん性発作によって生じる興奮毒性脳障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン関連疾患、脳卒中、運動ニューロン疾患、学習障害又は記憶障害、外傷性脳傷害、脊髄損傷、及び抹消神経障害からなる群から選択される神経変性障害である。

【0030】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0031】

第2態様において、本発明は、B R S－3 作動薬及びD P P－I V阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物を特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、B R S－3 作動薬及びD P P－I V阻害剤が対象における血中グルコースレベルを低下させるのに十分な量である、組成物の投与形態に関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。特定の実施形態において、本発明は、B R S－3 作動薬及びD P P－I V阻害剤が対象における血中G L P－1 レベルを増大させるのに十分な量である。組成物の投与形態に関する。

【0032】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0033】

第3態様において、本発明は、治療によってヒト又は動物の身体を処置する方法で使用する、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物を特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中グルコースレベルを低下させるのに十分な量である組成物の投与形態に関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である組成物の投与形態に関する。

【0034】

本発明は、治療によってヒト又は動物の身体の糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法で使用する、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物を特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中グルコースレベルを低下させるのに十分な量である組成物の投与形態に関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

10

【0035】

本発明は、治療によってヒト又は動物の身体のパフォーマンスを減少させる方法で使用する、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である組成物の投与形態に関する。

20

【0036】

本発明は、治療によってヒト又は動物の身体の糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法で使用する、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である組成物の投与形態に関する。

【0037】

本発明は、治療によってヒト又は動物の血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法で使用する、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である組成物の投与形態に関する。

30

【0038】

本発明は、治療によってヒト又は動物の身体のパフォーマンスの欠損を処置又は予防する方法で使用する、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である組成物の投与形態に関する。

【0039】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

40

【0040】

第4態様において、本発明は、薬学的組成物を調製する方法を特徴とし、前記方法は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を少なくとも1つの薬学的に許容される担体と混和することを本質的に含むか、又はそれからなる。特定の実施形態において、この方法は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中グルコースレベルを低下させるのに十分な量である、薬学的組成物の投与形態を調製する手順を更に含む。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。特定の実施形態において、この方法は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である、薬学的組成物の投与形

50

態を調製する手順を更に含む。

【0041】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0042】

第5態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤と、少なくとも1つの薬学的に許容される担体とを本質的に含むか、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中グルコースレベルを低下させるのに十分な量である、薬学的組成物の投与形態に関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である、薬学的組成物の投与形態に関する。

10

【0043】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0044】

第6態様において、本発明は、第5態様による治療上有効量の薬学的組成物を、必要とする対象に投与することを含む、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中グルコースレベルを低下させるのに十分な量で投与される。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量で投与される。

20

【0045】

本発明は、第5態様による治療上有効量の薬学的組成物を、必要とする対象に投与することを含む、ボディマスを減少させる方法を更に特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量で投与される。特定の実施形態において、必要とする対象は、27以上のBMIを有する。特定の実施形態において、必要とする対象は、過体重である。特定の実施形態において、必要とする対象は、肥満である。

【0046】

本発明は、第5態様による治療上有効量の薬学的組成物を、必要とする対象に投与することを含む、肥満症又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量で投与される。

30

【0047】

本発明は、第5態様による治療上有効量の薬学的組成物を、必要とする対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量で投与される。

40

【0048】

本発明は、第5態様による治療上有効量の薬学的組成物を、血液GLP-1が欠損している対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させる方法を更に特徴とする。特定の実施形態において、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量で投与される。

【0049】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

【0050】

第7態様において、本発明は、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する薬物を製造するための、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそ

50

れからなる化合物の使用を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中グルコースレベルを低下させるのに十分な量である薬物の投与形態に関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である薬物の投与形態に関する。

【0051】

本発明は、ボディマスを減少させる薬物を製造するための、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に含むか、又はそれからなる組成物の使用を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である薬物の投与形態に関する。

10

【0052】

本発明は、肥満症又はそれに関連する病態を処置又は予防する薬物を製造するための、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に含むか、又はそれからなる組成物の使用を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である薬物の投与形態に関する。

【0053】

本発明は、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する薬物を製造するための、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に含むか、又はそれからなる組成物の使用を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である薬物の投与形態に関する。

20

【0054】

本発明は、GLP-1の欠損を処置又は予防する薬物を製造するための、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に含むか、又はそれからなる組成物の使用を更に特徴とする。特定の実施形態において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに十分な量である薬物の投与形態に関する。

【0055】

特定の実施形態において、対象はヒトである。

30

【0056】

第8態様において、本発明は、ボディマスを減少させるのに有用なGLP-1分泌促進物質又は化合物、或いは血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法を特徴とし、

(a) Gタンパク質共役受容体を発現する宿主細胞又は宿主細胞の膜と試験化合物を接触させ、Gタンパク質共役受容体が、

(i) 配列番号2のアミノ酸1～335と、

(ii) 配列番号2のアミノ酸1～399と、

(iii) 配列番号2のアミノ酸2～335と、

(iv) 配列番号2のアミノ酸2～399と、

(v) 受容体が配列番号2のアミノ酸位置1においてメチオニン残基を備えないことを条件とする配列番号2のアミノ酸2～335と、

(vi) 受容体が配列番号2のアミノ酸位置1においてメチオニン残基を備えないことを条件とする配列番号2のアミノ酸2～399と、

(vii) ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列であって、前記ヌクレオチド配列が、特有のプライマー配列番号3及び配列番号4を使用して、ヒトDNAサンプルに対しポリメラーゼ鎖反応(PCR)を実施することからなるプロセスによって得ることが可能な配列である、アミノ酸配列と、

40

50

(v i i i)ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列であって、前記ヌクレオチド配列が、配列番号1の相補体に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズされる配列であるアミノ酸配列と、

(i x) (i) ~ (v i i i)の何れか1つの生物学的活性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、手順；並びに

(b) 受容体の機能性を刺激する試験化合物の能力を判定する手順、を含み、

受容体の機能性を刺激する試験化合物の能力によって、試験化合物が、ボディマスを減少させるのに有用なG L P - 1分泌促進物質又は化合物であるか、或いは血中G L P - 1レベルを増大させることによって緩和される病態を予防又は処置するのに有用な化合物であることが表される。

【0057】

特定の実施形態において、この方法は、G L P - 1分泌促進物質を同定する方法である。

【0058】

特定の実施形態において、この方法は、ボディマスを減少させるのに有用な化合物を同定する方法である。

【0059】

特定の実施形態において、この方法は、血中G L P - 1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法である。

【0060】

本発明は、ボディマスを減少させるのに有用なG L P - 1分泌促進物質又は化合物、或いは血中G L P - 1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法を更に特徴とし、この第8態様の手順(a)及び(b)からなり、更に：

(c) 手順(b)において該受容体の機能性を刺激する化合物を、哺乳動物の腸内分泌細胞と*i n v i t r o*で接触させる手順；及び

(d) 化合物が哺乳動物の腸内分泌細胞からのG L P - 1の分泌を刺激するかを判定する手順、を含み、

哺乳動物の腸内分泌細胞からのG L P - 1の分泌を刺激する試験化合物の能力によって、試験化合物が、ボディマスを減少させるのに有用な試験化合物がG L P - 1分泌促進物質又は化合物であるか、或いは血中G L P - 1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物であることが表される。特定の実施形態において、哺乳動物の腸内分泌細胞は、G L U T a g腸内分泌L細胞系統である。

【0061】

本発明は、ボディマスを減少させるのに有用な試験化合物がG L P - 1分泌促進物質又は化合物、或いは血中G L P - 1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法を更に特徴とし、この第8態様の手順(a)及び(b)からなり、更に

(c) 手順(b)において受容体の機能性を刺激する化合物を哺乳動物に投与する手順；及び

(d) 化合物が哺乳動物の血中G L P - 1レベルを増大させるかを判定する手順、を含み、

化合物が哺乳動物の血中G L P - 1レベルを増大させる試験化合物の能力によって、試験化合物が、ボディマスを減少させるのに有用なG L P - 1分泌促進物質又は化合物であるか、或いは血中G L P - 1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物であることが表される。特定の実施形態において、哺乳動物は、非ヒト哺乳動物である。

【0062】

特定の実施形態において、ボディマスを減少させるのに有用な特定されたG L P - 1分泌促進物質又は特定された化合物、或いは血中G L P - 1レベルを増大させることによ

10

20

30

40

50

て緩和される病態を処置又は予防するのに有用な特定された化合物は、受容体の作動薬である。幾つかの実施形態において、作動薬は、部分作動薬である。

【0063】

特定の実施形態において、受容体は、Gタンパク質に結合する。特定の実施形態において、タンパク質はGqである。

【0064】

特定の実施形態において、プロセスは、RT-PCR（逆転写ポリメラーゼ鎖反応）である。RT-PCR技法は、当業者に周知である。

【0065】

特定の実施形態において、ヒトDNAサンプルは、ヒトcDNAである。特定の実施形態において、cDNAは、BRS-3を発現するヒト組織からである。幾つかの実施形態において、BRS-3を発現するヒト組織は、視床下部又は子宮である。

10

【0066】

特定の実施形態において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC（150mMのNaCl、15mMのクエン酸3ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハート液、10%硫酸デキストラン、及び20µg/ml変性剪断鮭精子DNAを備える溶液において42℃でハイブリダイズし、続いて0.1×SSCを備える溶液において65℃で洗浄することからなる。ハイブリダイゼーション法は、当業者に周知である。

【0067】

20

特定の実施形態において、ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされ、前記ヌクレオチド配列が配列番号1の相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズされるGタンパク質受容体は、細胞内IP3のレベルを増大させることと、BRS-3の既知のリガンドを結合することとからなる群から選択される生物学的活性を示す。特定の実施形態において、コードされるGタンパク質共役受容体は、細胞内IP3のレベルを上げ、BRS-3の既知のリガンドを結合する。

【0068】

幾つかの実施形態において、Gタンパク質共役受容体は、Gタンパク質を備える融合タンパク質の一部である。GPCR：G融合構造体を作成する技法は、当業者に周知である（例えば、国際出願WO02/42461を参照）。

30

【0069】

幾つかの実施形態において、Gタンパク質共役受容体は組換え体である。

【0070】

特定の実施形態において、宿主細胞は、発現ベクターを備え、前記発現ベクターは、Gタンパク質共役受容体をコードするポリヌクレオチドを備える。幾つかの実施形態において、発現ベクターはpCMVである。このベクターは、Budapest Treaty for the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedureの規定により、1998年10月13日にAmerican Type Culture Collection (ATCC) (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) に寄託された。DNAはATCCによって試験され、生存可能であると判定された。ATCCは、以下の寄託番号をpCMVに割り当てた：ATCC #203351。その他の適切な発現ベクターも当業者には容易に明らかとなり、広範な発現ベクターが市販されている（例えば、Clontech [米国カリフォルニア州パロ・アルト]；Stratagene [米国カリフォルニア州ラ・ホーヤ]；及びInvitrogen [米国カリフォルニア州カールズバッド]）。

40

【0071】

本発明の適切な宿主細胞には、本発明のタンパク質結合受容体を発現することができる任意の真核細胞が含まれる。真核細胞は、動物細胞（例えば、昆虫、哺乳動物、魚類、両

50

生類、鳥類、又は爬虫類の細胞)、植物細胞(例えば、トウモロコシ又はシロイヌナズナの細胞)、或いは真菌細胞(例えば、S. セレビシアエ細胞)であってもよい。幾つかの実施形態において、宿主細胞は哺乳動物である。例示的な哺乳動物宿主細胞には、猿腎臓細胞(COS細胞)、SV40によって形質転換された猿の腎臓CVI細胞(COS-7; ATCC CRL 1651); ヒト胎児腎臓細胞(HEK-293 [“293”]; Graham, et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); ヒト胎児腎臓細胞(HEK-293T [“293T”]; 当初は293tsA1609neoと呼ばれた; DuBridge, et al., Mol Cell Biol 7:379-387 (1987)); ベビーハムスターの腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10); チャイニーズハムスターの卵巣細胞(CHO; Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216 (1980)); シリアンゴールデンハムスター細胞MCB3901(ATCC CRL-9595); マウスセルトリ細胞(TM4; Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 猿腎臓細胞(CVI ATCC CCL 70); アフリカンミドリザルの腎臓細胞(VERO-76; ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸がん細胞(HELA; ATCC CCL 2); イヌ腎臓細胞(MDCK; ATCC CCL 34); バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A; ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞(W138; ATCC CCL 75); ヒト肝臓細胞(hep G2; HB 8065); マウス乳腺腫瘍(MMT 060562; ATCC CCL 51); TRI細胞(Mather, et al., Annals N. Y. Acad. Sci 383:44-68 (1982)); NIH/3T3細胞(ATCC CRL-1658)、及びマウスL細胞(ATCC CCL-1)が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、哺乳動物宿主細胞は、293、293T、CHO、MCB3901、及びCOS-7からなる群から選択される。特定の実施形態において、メラニン保有細胞細胞が使用される。幾つかの実施形態において、宿主細胞は、昆虫細胞である(例えば、Spodoptera frugiperda昆虫Sf9細胞(ATCC CRL-1711))。幾つかの実施形態において、宿主細胞は真菌細胞である(例えばS. セレビシアエ細胞)。幾つかの実施形態において、宿主細胞は腸内分泌細胞である。幾つかの実施形態において、腸内分泌細胞は、GLUTag腸内分泌L細胞系統である。その他の好適な宿主細胞も当業者には容易に明らかとなり、広範な細胞系統がAmerican Type Culture Collection(10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209)から市販されている。

【0072】

特定の実施形態において、前記判定は、Gタンパク質共役受容体がGqに結合することと一貫する。

【0073】

幾つかの実施形態において、前記判定は、Gタンパク質共役受容体が、Gα15又はGα16等の乱交雑Gタンパク質を介して、ホスホリパーゼC経路に結合することと一貫する。乱交雑Gタンパク質は、当業者に周知である[例えば、Offermanns, et al., J Biol Chem (1995) 270:15175-15180を参照]。幾つかの実施形態において、前記判定は、Gタンパク質結合が、キメラGタンパク質を介して、例えばホスホリパーゼC経路に結合することと一貫する。キメラGタンパク質は、当業者に周知である[例えば、Milligan, et al., Trends in Pharmaceutical Sciences (1999) 20:118-124; 及びWO 02/42461を参照]。

【0074】

幾つかの実施形態において、前記判定は、第2メッセンジャーのレベルを測定することによる。

【0075】

幾つかの実施形態において、前記判定は、サイクリックAMP (cAMP)、サイクリックGMP (cGMP)、イノシトール1, 4, 5-三リン酸塩 (IP3)、ジアシルグリセロール (DAG)、MAPキナーゼ活性、MAPK/ERKキナーゼキナーゼ1 (MEKK1) 活性、及びCa²⁺からなる群から選択される、第2メッセンジャーのレベルを測定することによる。幾つかの好ましい実施形態において、第2メッセンジャーはIP3である。特定の好ましい実施形態において、細胞内Ca²⁺のレベルは増大する。幾つかの好ましい実施形態において、第2メッセンジャーはCa²⁺である。特定の好ましい実施形態において、細胞内Ca²⁺のレベルは増大する。幾つかの実施形態において、前記Ca²⁺の測定は、FLIPRによって実施される。

【0076】

10

特定の実施形態において、前記判定は、Gタンパク質共役受容体を含む膜で実施される。

【0077】

特定の実施形態において、前記判定は、メラニン保有細胞検定を使用することによる。特定の好ましい実施形態において、染料分散レベルは増大する。

【0078】

幾つかの実施形態において、前記判定は、細胞内IP3レベルが増大することによって媒介される活性の測定による。幾つかの実施形態において、前記活性は、GLP-1の分泌の刺激である。

【0079】

20

幾つかの実施形態において、前記判定は、API-レポーター検定による。幾つかの実施形態において、前記判定は、SRF-レポーター検定による。幾つかの実施形態において、前記レポーターは、 β -ルシフェラーゼである。幾つかの実施形態において、前記レポーターは、 β -ガラクトシダーゼである。特定の実施形態において、ルシフェラーゼ活性又は β -ガラクトシダーゼ活性のレベルは上昇する。

【0080】

幾つかの実施形態において、前記判定は、Gタンパク質共役受容体を含む膜に結合するGTPTSの測定による。幾つかの好ましい実施形態において、前記GTP γ Sは、[³S]で標識される。幾つかの好ましい実施形態において、前記Gタンパク質共役受容体を含む膜に結合するGTPTSは増大する。

30

【0081】

幾つかの実施形態において、候補化合物は低分子である。幾つかの実施形態において、候補化合物は、低分子がポリペプチドではないことを条件とする低分子である。幾つかの実施形態において、候補化合物は、低分子が抗体又はその抗原結合フラグメントではないことを条件とする低分子である。幾つかの実施形態において、候補化合物は、低分子が脂質ではないことを条件とする低分子である。幾つかの実施形態において、候補化合物は、低分子がポリペプチド又は脂質ではないことを条件とする低分子である。幾つかの実施形態において、候補化合物は、ポリペプチドである。幾つかの実施形態において、候補化合物は、ポリペプチドが抗体又はその抗原結合フラグメントではないことを条件とするポリペプチドである。幾つかの実施形態において、候補化合物は脂質である。幾つかの実施形態において、候補化合物は、抗体又はその抗原結合フラグメントではない。幾つかの実施形態において、候補化合物は、抗体又はその抗原結合フラグメントである。

40

【0082】

幾つかの実施形態において、この方法は、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用なGLP-1分泌促進物質又はその化合物を合成することを更に含む。

【0083】

幾つかの実施形態において、この方法は、必要に応じて、ボディマスを減少させるのに有用なGLP-1分泌促進物質又は化合物、或いは血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物の構造を決定すること、

50

並びに、ボディマスを減少させるのに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物、或いは血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を提供し、或いはボディマスを減少させるのに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物、又は血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物の名称又は構造を提供することを更に備える。

【0084】

幾つかの実施形態において、前記方法は更に、必要に応じて、ボディマスを減少させるのに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物、或いは血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物の構造を決定すること、必要に応じて、ボディマスを減少させるのに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物、或いは血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を提供すること、並びに、ボディマスを減少させるのに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物、或いは血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を生成又は合成することからなる。

10

【0085】

第9態様において、本発明は、ボディマスを減少させるのに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物、或いは血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法を特徴とし、

(a) 試験化合物の存在下又は非存在下において、Gタンパク質共役受容体を、この受容体に対する必要に応じて標識された既知のリガンドに接触させ、Gタンパク質共役受容体が、

20

(i) 配列番号2のアミノ酸1～335；

(ii) 配列番号2のアミノ酸1～399；

(iii) 配列番号2のアミノ酸2～395；

(iv) 配列番号2のアミノ酸2～399；

(v) 受容体が配列番号2のアミノ酸位置1においてメチオニン残基を備えないことを条件とする配列番号2のアミノ酸2～335；

(vi) 受容体が配列番号2のアミノ酸位置1においてメチオニン残基を備えないことを条件とする配列番号2のアミノ酸2～399；

30

(vii) ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列であって、前記ヌクレオチド配列が、特有のプライマー配列番号3及び配列番号4を使用して、ヒトDNAサンプルに対しポリメラーゼ鎖反応(PCR)を実施することからなるプロセスによって得られる配列である、アミノ酸配列；

(viii) ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列であって、このヌクレオチド配列は、配列番号1の相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズされる配列である、アミノ酸配列；及び

(ix) (i)～(viii)の何れか1つの生物学的活性フラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、手順；

(b) 前記既知のリガンドと前記受容体の間の複合体を検出する手順；並びに

40

(c) 前記複合体が、試験化合物が存在しない場合より、試験化合物が存在する状態において少ないかを判定する手順、を含み、

前記判定によって、試験化合物が、ボディマスを減少させるのに有用な G L P - 1 分泌促進物質又は化合物である、或いは血中 G L P - 1 レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物であることが表される。

【0086】

特定の実施形態において、この方法は、G L P - 1 分泌促進物質を同定する方法である。

【0087】

特定の実施形態において、この方法は、ボディマスを減少させるのに有用な化合物を同

50

定する方法である。

【0088】

特定の実施形態において、この方法は、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法である。

【0089】

特定の実施形態において、既知のリガンドは、化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物8、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15、化合物16、化合物17、化合物18、化合物19、化合物20、化合物21、化合物22、化合物23、化合物24、化合物25、化合物26、化合物27、化合物28、化合物29、化合物30、化合物31、化合物32、化合物33、及び化合物34からなる群から選択される。

10

【0090】

特定の実施形態において、必要に応じて標識されるリガンドは、標識された既知のリガンドである。特定の実施形態において、必要に応じて標識されるリガンドは、放射性標識リガンドである。本発明のGタンパク質共役受容体の既知のリガンドを標識する等、化合物を放射性標識する技法は、当業者に周知である。例えば、国際出願WO 04/065380を参照されたい。

【0091】

Gタンパク質共役受容体とGタンパク質共役受容体のリガンドであることが既知である化合物の間の複合体を検出する技法が、当業者に周知である。例えば、国際出願WO 04/065380を参照されたい。

20

【0092】

本発明は、ボディマスを減少させるのに有用なGLP-1分泌促進物質又は化合物、或いは血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法を更に特徴とし、この第9態様の手順(a)～(c)からなり、更に

(d) 存在する状態においてより少ない前記複合体が手順(c)において形成される化合物を哺乳動物の腸内分泌細胞と*in vitro*で接触させる手順；並びに

(e) 化合物が哺乳動物の腸内分泌細胞からのGLP-1の分泌を刺激するかを判定する手順、を含み、

30

化合物が哺乳動物の腸内分泌細胞からのGLP-1の分泌を刺激する能力によって、試験化合物が、ボディマスを減少させるのに有用なGLP-1分泌促進物質又は化合物である、或いは血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有効な化合物であることが表される。特定の実施形態において、哺乳動物の腸内分泌細胞は、GLUTag腸内分泌L細胞系統である。

【0093】

本発明は、ボディマスを減少させるのに有用なGLP-1分泌促進物質又は化合物、或いは血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用な化合物を同定する方法を更に特徴とし、この第9態様の手順(a)～(c)からなり、更に：

40

(d) 存在する状態においてより少ない前記複合体が手順(c)において形成される化合物を哺乳動物に投与する手順；及び

(e) 化合物が哺乳動物の血中GLP-1レベルを増大させるかを判定する手順、からなり；

化合物が哺乳動物の腸内分泌細胞からのGLP-1の分泌を刺激する能力によって、試験化合物が、ボディマスを減少させるのに有用なGLP-1分泌促進物質又は化合物、或いは血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有効な化合物であることが表される。特定の実施形態において、哺乳動物は、非ヒト哺乳動物である。

【0094】

50

特定の実施形態において、受容体は組換え体である。

【0095】

本出願は、記載の日付に米国郵便を介して米国特許商標庁に出願された以下の仮出願の優先権を主張する：米国仮出願番号60／675, 730（2005年4月27日出願）。上記の出願の開示内容は、全体が参考として本明細書に組み入れられている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0096】

発明の詳細な説明

本発明は、糖尿病及びそれに関連する病態を処置又は予防するためのある化合物又はその薬学的に許容される塩の組み合わせに関する。本発明は、ボディマスを減少させるためのある化合物又はその薬学的に許容される塩の組み合わせに更に関する。本発明は、肥満症及びそれに関連する病態を処置又は予防するためのある化合物又はその薬学的に許容される塩の組み合わせに更に関する。本発明は、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するためのある化合物又はその薬学的に許容される塩の組み合わせに更に関する。本発明は、試験化合物をGLP-1分泌促進物質として遮蔽するために本発明のGタンパク質共役受容体を使用する方法に更に関する。出願人は、BRS-3が、腸内分泌L細胞を生成する哺乳動物GLP-1によって発現されることを発見した。BRS-3は、GLP-1分泌促進物質受容体である。BRS-3の作動薬は、GLP-1分泌促進物質である。

【0097】

本発明によるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせを使用することで、糖尿病及びそれに関連する病態の治療に使用されることが現在考慮されているよりも実質的に少ないDPP-IV阻害剤の投与量で、糖尿病及びそれに関連する病態を処置又は予防し、それによって活性の阻害に関連する望ましくない副作用の可能性を低減することが可能である。本発明によるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせを使用することで、ボディマスを減少させるために現在考慮されているよりも実質的に少ないDPP-IV阻害剤の投与量で、ボディマスを減少させ、それによってDPP-IV活性の阻害に関連する望ましくない副作用の可能性を低減することが可能である。本発明によるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせを使用することで、肥満症及びそれに関連する病態の治療に使用されることが現在考慮されているよりも実質的に少ないDPP-IV阻害剤の投与量で、肥満症及びそれに関連する病態を処置又は予防し、それによってDPP-IV活性の阻害に関連する望ましくない副作用の可能性を低減することが可能である。本発明によるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせを使用することで、前記病態の治療に使用されることが現在考慮されているよりも実質的に少ないDPP-IV阻害剤の投与量で、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防し、それによってDPP-IV活性の阻害に関連する望ましくない副作用の可能性を低減することが可能である。更に、本発明によるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせを使用することで、肥満症及びそれに関連する病態の治療に使用されることが現在考慮されているよりも実質的に少ないDPP-IV阻害剤の投与量で、肥満症及びそれに関連する病態を処置又は予防し、それによって、望ましくない副作用がBRS-3受容体の活性化に関連することが判明している場合に、望ましくない副作用の可能性を低減することが可能である。本発明は更に、対象における血中グルコースレベルを低下させる新規で予想外の有利な手法も提供する。本発明は更に、対象における血中GLP-1レベルを増大させる新規で予想外の有利な手法も提供する。本発明は更に、試験化合物をGLP-1分泌促進物質として遮蔽する新規で予想外の有利な手法も提供する。

【0098】

本明細書で使用される「リガンド」という用語は、GPCRに特異的に結合する分子を意味する。リガンドは、例えば、ポリペプチド、脂質、低分子、抗体とすることが可能である。内因性リガンドは、天然GPCRの内因性自然リガンドであるリガンドである。リ

ガンドは、GPCRの「拮抗薬」、「作動薬」、「部分作動薬」、又は「逆作動薬」等とすることが可能である。

【0099】

本明細書で使用される「作動薬」という用語は、GPCRに結合することによって、GPCRによって媒介される細胞内応答を誘起するようにGPCRを活性化させる剤（例えば、リガンド候補化合物）を意味する。

【0100】

本明細書で使用される「部分作動薬」という用語は、GPCRに結合することによって、完全作動薬よりは劣る程度又は度合いではあるが、GPCRによって媒介される細胞内応答を誘起するようにGPCRを活性化させる剤（例えば、リガンド候補化合物）を意味する。

10

【0101】

本明細書で使用される「拮抗薬」という用語は、作動薬又は部分作動薬とほぼ同じ部位においてGPCRに結合する、及び好ましくは競合的に結合するが、GPCRの活性形態によって開始される細胞内応答を活性化せず、それにより、作動薬又は部分作動薬の細胞内応答を阻害することができる剤（例えば、リガンド候補化合物）を意味する。拮抗薬は、通常、作動薬又は部分作動薬が存在しない場合、基準細胞内応答を減少させない。

【0102】

「逆作動薬」という用語は、作動薬又は部分作動薬の非存在下で認められる通常基準レベル活性よりも低い受容体の活性形態によって開始される基準細胞内応答を阻止する物質（例えば、リガンド候補化合物）を意味する。

20

【0103】

本明細書で使用される「BRS-3作動薬」という用語は、BRS-3受容体に結合し、作動薬として作用する化合物を指す。

【0104】

本明細書で使用される「BRS-3作動薬」という用語は、胃放出ペプチド受容体（GPR-R）又はニューロメディンB受容体（NMB-R）等、1つ以上の密接に関係する受容体に対してBRS-3受容体の選択性を有するBRS-3作動薬を指す。

【0105】

本明細書で使用される「DPP-IV阻害剤」という用語は、DPP-IVに結合し、DPP-IVジペプチジルペプチダーゼ活性を阻害する化合物を指す。

30

【0106】

本明細書で使用される「DPP-IV阻害剤」という用語は、ポストプロリン酵素（PPE）、ジペプチジルペプチダーゼII（DPP-II）、ジペプチジルペプチダーゼ8（DPP-8）、及びジペプチジルペプチダーゼ9（DPP-9）の1つ以上等、密接に関係するペプチダーゼに対してDPP-IVの選択性を有するDPP-IV阻害剤を指す。

【0107】

「血中グルコースレベル」又は「血中GLP-1レベル」という用語は、それぞれ血液グルコース濃度又は血液GLP-1濃度を指す。特定の実施形態において、血中GLP-1レベルは、生物学的活性GLP-1の血液におけるレベルであり、GLP-1Rにおいて作動薬活性を有するGLP-1は、生物学的に活性である。特定の実施形態において、血中グルコースレベル又は血中GLP-1レベルは、血漿グルコースレベル又は血漿GLP-1レベルである。

40

【0108】

「上昇した血中グルコースレベル」という用語は、臨床的に不適切な基礎及び食後高血糖症を示す対象に認められるもの、又は経口グルコース耐性試験（OGTT）で対象に認められるもの等の上昇した血中グルコースレベルを意味するものとする。

【0109】

本明細書で使用される「対象」という用語は、マウス、ラット、ウサギ、豚、犬、猫、

50

非ヒト霊長類、及びヒトを含むがこれらに限定されない哺乳動物、より好ましくはマウス、ラット、最も好ましくはヒトを指すものとする。

【0110】

本明細書で使用される「予防又は処置を必要とする」という用語は、対象が処置を必要とする、又は処置から利益を得るという介護者によって行われる判断を指す（例えば、ヒトの場合は医師、看護師、ナースプラクティショナ、非ヒト哺乳動物の場合は獣医師）。

【0111】

「治療上有効量」又は「治療上有効な投与量」という用語は、所望の生物学的応答又は医療的応答を誘起する薬剤の量を意味することを意図する。特定の実施形態において、治療上有効量は、マウス o G T T 検定において 30 % を超える A U C 阻害を生成する薬剤の量である。

10

【0112】

「治療上無効な量」又は「治療上無効な投与量」という用語は、治療上有効量の薬剤より少ない薬剤の量を意味することを意図する。特定の実施形態において、治療上無効な量は、マウス o G T T 検定において 30 % 以下の A U C 阻害を生成する薬剤の量である。

【0113】

「予防するのに有効な量」という用語は、防止されることが追求される生物学的事実又は医療的事実が出現する危険性を防止又は低下させる薬剤の量を指す。多くの場合、予防するのに有効な量は、治療上有効量と同じである。

【0114】

「組成物」という用語は、少なくとも 1 つの成分を含む物質を意味する。

20

【0115】

「活性成分」という用語は、疾患の診断、治療、軽減、処置、又は予防において薬理的活性又は他の直接的な効果を提供する任意の成分を意味する。

【0116】

「薬学的組成物」という用語は、少なくとも 1 つの活性成分を備える組成物を意味し、それにより、組成物は、哺乳動物において特定された有効な結果を調査するために適用することができる。

【0117】

投与形態という用語は、タブレット、カプセル、又は注射可能物等、薬剤が生成され、分与される物理的な形態を意味する。

30

【0118】

本明細書で使用される「肥満症」という用語は、WHO の体重分類によると、肥満指数 (BMI) が 30 以上と定義される [開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、K o p e l m a n , N a t u r e (2 0 0 0) 4 0 4 : 6 3 5 - 6 4 3] 。

【0119】

肥満症に関連する病態という用語には、高血圧症、うっ血性心筋症、静脈瘤、肺塞栓、冠状性心臓疾患、脳卒中、突発性頭蓋内高血圧症、知覚異常性大腿神経痛、呼吸困難、閉塞性睡眠無呼吸、低換気症候群、ピックウィック症候群、喘息、不動症、変性骨関節炎、腰痛、皮膚裂線又は「伸展裂創」、下肢の静脈うっ血、リンパ浮腫、細胞歯肉炎、間擦疹、カンブンケル、黒色表皮腫、懸垂線維腫、胃食道逆疾患、非アルコール性脂肪肝／脂肪肝炎、胆石症、ヘルニア、大腸ガン、ストレス失禁、肥満症に関係する糸球体症、乳がん及び子宮がん、抑うつおよび低自己評価、生活の質の低下、代謝症候群、2 型糖尿病、脂肪異常症、女性のハイパーアンドロゲネミア、多嚢胞卵巣症候群、月経困難症、不妊症、妊娠合併症、及び男性性機能低下症が含まれるが、これらに限定されず、肥満症に関連する病態は、実施形態に個別に又は任意に組み合わせて含まれてもよいことが理解される。

40

【0120】

「過体重」という用語は、27～29.9 の肥満指数 (BMI) として定義される。

【0121】

50

本明細書で使用される際、「糖尿病」という用語は、インスリン依存型糖尿病（1型糖尿病としても知られる）及び非インスリン依存型糖尿病（2型糖尿病としても知られる）の両方を含む。

【0122】

「糖尿病の関連する病態」という用語には、高血糖症、グルコース耐性障害、インスリン抵抗性、膵臓β細胞不全、腸内分泌細胞不全、糖尿、代謝性アシドーシス、白内障、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性冠状動脈疾患、糖尿病性脳血管疾患、糖尿病性抹消血管性疾患、代謝症候群、高脂血症、アテローム性粥状硬化症、脳卒中、高血圧症、及び肥満症が含まれるが、これらに限定されず、糖尿病に関連する病態は、実施形態に個別に又は任意に組み合わせて含まれてもよいことが理解される。

10

【0123】

「血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態」という用語には、糖尿病、糖尿病に関連する病態、心筋梗塞、学習障害、記憶障害、及び神経変性障害が含まれるが、これらに限定されず、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態は、実施形態に個別に又は任意に組み合わせて含まれてもよいことが理解される。

【0124】

本明細書で使用される「アテローム性粥状硬化症」という用語は、大きなサイズ及び中程度のサイズの動脈の壁の最内層の上にコレステロール及び脂質を含むアテローム斑が付着することを特徴とする血管疾患の形態を指す。

20

【0125】

本明細書にされ、且つAdult Treatment Panel III (ATP III; National Institutes of Health: Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)、Executive Summary; Bethesda, Md. National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, 2001, (NIH pub. No 01-3670)による「代謝症候群」という用語は、肥満症、高トリグリセリド血症、低コレステロール、高血圧、及び高い絶食グルコースに関係する5つの基準の3つ以上を満たす時、生じる。

30

【0126】

「神経変性障害」という用語は、非限定的に、重症のてんかん性発作、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン関連疾患、脳卒中、運動ニューロン疾患、学習又は記憶障害、外傷性脳傷害、脊髄損傷、及び抹消神経障害によって生じる興奮性脳損傷を含むことを意図する。

化学群、成分、又は遊離基

「C₁₋₅アシル」という用語は、カルボニルに結合されたC₁₋₅アルキル遊離基を表し、アルキルの定義は、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。幾つかの例は、非限定的に、アセチル、プロピオニル、n-ブタノイル、イソ-ブタノイル、セク-ブタノイル、t-ブタノイル（即ち、ピバロイル）、ペンタノイル等を含む。

40

【0127】

「C₁₋₅アシロキシ」という用語は、酸素原子に結合されたアシル遊離基を表し、アシルは、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。幾つかの例は、アセチロキシ、プロピオニロキシ、ブタノイロキシ、イソ-ブタノイロキシ、セク-ブタノイロキシ、t-ブタノイロキシ等を含む。

【0128】

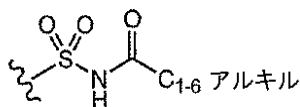
「C₁₋₆アシルスルホンアミド」という用語は、スルホンアミドの窒素に直接結合さ

50

れた C_{1-6} アシルを表し、 C_{1-6} アシル及びスルホンアミドの定義は、本明細書において記述されるものと同じ定義を有し、 C_{1-6} アシルスルホンアミドは、以下の化学式によって表すことができる。

【0129】

【化1】



本発明の幾つかの実施形態は、アシルスルホンアミドが C_{1-4} アシルスルホンアミドの時であり、幾つかの実施形態は、 C_{1-4} アシルスルホンアミドであり、幾つかの実施形態は、 C_{1-3} アシルスルホンアミドであり、幾つかの実施形態は、 C_{1-2} アシルスルホンアミドである。アシルスルホンアミドの例には、非限定的に、アセチルスルファモイル $[-S(=O)_2NHCO(=)Me]$ 、プロピオニルスルファモイル $[-S(=O)_2NHCO(=O)Et]$ 、イソブチルスルファモイル、ブチルスルファモイル、2-メチルブチルスルファモイル、3-メチルブチルスルファモイル、2,2-ジメチルプロピオニルスルファモイル、ペンタノイルスルファモイル、2-メチルペンタノイルスルファモイル、3-メチルペンタノイルスルファモイル、4-メチルペンタノイルスルファモイル等がある。

【0130】

「 C_{2-6} アルケニル」という用語は、2から6の炭素を含む遊離基を表し、少なくとも1つの炭素-炭素2重結合が存在し、幾つかの実施形態は、2から4の炭素であり、幾つかの実施形態は、2から3の炭素であり、幾つかの実施形態は、2の炭素を有する。E同位体及びZ同位体の両方が、「アルケニル」という用語によって包含される。更に、「アルケニル」という用語は、ジアルケニル及びトリアルケニルを含む。従って、複数の2重結合が存在する場合、結合は、全てE又はZ或いはE及びZの混合物である。アルケニルの例には、ビニル、アリール、2-ブテニル、3-ブテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキサニル、2,4-ヘキサジニル等がある。

【0131】

本明細書で使用される「 C_{1-4} アルコキシ」という用語は、本明細書に定義される通り、酸素原子に直接結合された遊離基アルキルを表す。例には、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、t-ブトキシ、イソブトキシ、セクブトキシ等がある。

【0132】

「 C_{1-8} アルキル」という用語は、1~8個の炭素を含む直鎖又は分枝の炭素遊離基を表し、幾つかの実施形態は、1~6個の炭素であり、幾つかの実施形態は、1から3の炭素であり、幾つかの実施形態は、1~2個の炭素である。アルキルの例には、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、セクブチル、イソブチル、t-ブチル、ペンチル、イソペンチル、t-ペンチル、ネオペンチル、1-メチルブチル [即ち、 $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$]、2-メチルブチル [即ち、 $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$]、n-ヘキシル等が含まれるが、これらに限定されない。

【0133】

「 C_{1-4} アルキルカルボキサミド」又は「 C_{1-4} アルキルカルボキサミド」という用語は、アミド基の窒素に結合した単一の C_{1-4} アルキル基を表し、アルキルは、本明細書に記載されるものと同じ定義を有する。 C_{1-5} アルキルカルボキサミドは、以下によって表される場合がある：

【0134】

【化 2】



例には、非限定的に、N-メチルアルキルカルボキサミド、N-エチルカルボキサミド、N-n-プロピルアルキルカルボキサミド、N-イソ-プロピルアルキルカルボキサミド、N-n-ブチルアルキルカルボキサミド、N-セク-ブチルカルボキサミド、N-イソ-ブチルアルキルカルボキサミド、N-t-ブチルアルキルカルボキサミド等がある。

【0135】

「C₁ - C₃ アルキレン」は、C₁ - C₃ 2 価直鎖炭素基を表す。幾つかの実施形態において、C₁ - C₃ アルキレンは、例えば、-CH₂ -, -CH₂ CH₂ -, -CH₂ CH₂ CH₂ -等を指す。幾つかの実施形態において、C₁ - C₃ アルキレンは、-C₁ - C₃ -, -CHCH₂ -, -CHCH₂ CH₂ -等を指し、これらの例は、一般的に「A」を指す。

【0136】

「C₁ - C₄ アルキルスルフィニル」という用語は、化学式-S(O)-のスルホキシド遊離基に結合されたC₁ - C₄ アルキル遊離基を表し、アルキル遊離基は、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。例には、非限定的に、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル、n-プロピルスルフィニル、イソ-プロピルスルフィニル、n-ブチルスルフィニル、セク-ブチルスルフィニル、イソ-ブチルスルフィニル、t-ブチル等がある。

【0137】

「C₁ - C₄ アルキルスルホンアミド」という用語は、以下の基を指し、

【0138】

【化 3】



C₁ - C₄ アルキルは、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。

【0139】

「C₁ - C₄ アルキルスルホニル」という用語は、化学式のスルホン遊離基：-S(O)₂-に結合されたC₁ - C₄ アルキル遊離基を表し、アルキル遊離基は、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。例には、非限定的に、メチルスルホニル、エチルスルホニル、n-プロピルスルホニル、イソ-プロピルスルホニル、n-ブチルスルホニル、セク-ブチルスルホニル、イソ-ブチルスルホニル、t-ブチル等がある。

【0140】

「C₁ - C₄ アルキルチオ」という用語は、化学式-S-の硫化物に結合されたC₁ - C₄ アルキル遊離基を表し、アルキル遊離基は、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。例には、非限定的に、メチルスルファニル（即ち、CH₃S-）、エチルスルファニル、n-プロピルスルファニル、イソ-プロピルスルファニル、n-ブチルスルファニル、セク-ブチルスルファニル、イソ-ブチルスルファニル、t-ブチル等がある。

【0141】

「C₁ - C₄ アルキルチオアルキルカルボキサミド」という用語は、以下の化学式のチオアミドを表し、

【0142】

【化 4】



10

20

30

40

50

C₁ - 4 アルキルは、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。

【0143】

「C₁ - 4 アルキルチオウレイル」という用語は、化学式 -NC(S)N- の基を表し、窒素の一方又は両方は、同じ又は異なる C₁ - 4 アルキル基であり、アルキルは、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。アルキルチオウレイルの例には、非限定的に、CH₃NHC(S)NH-、NH₂C(S)NCH₃-、(CH₃)₂N(S)NH-、(CH₃)₂N(S)NH-、(CH₃)₂N(S)NCH₃-、CH₃CH₂NHC(S)NH-、CH₃CH₂NHC(S)NCH₃- 等がある。

【0144】

「C₁ - 4 アルキルウレイル」という用語は、化学式 -NC(O)N- の基を表し、窒素の一方又は両方は、同じ又は異なる C₁ - 4 アルキル基であり、アルキルは、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。アルキルウレイルの例には、非限定的に、CH₃NHC(O)NH-、NH₂C(O)NCH₃-、(CH₃)₂N(O)NH-、(CH₃)₂N(O)NH-、(CH₃)₂N(O)NCH₃-、CH₃CH₂NHC(O)NH-、CH₃CH₂NHC(O)NCH₃- 等がある。

【0145】

「C₂ - 6 アルキニル」という用語は、2 から 6 の炭素及び少なくとも 1 つの炭素 - 炭素 3 重結合を含む遊離基を表し、幾つかの実施形態は 2 から 4 の炭素であり、幾つかの実施形態は 2 から 3 の炭素であり、幾つかの実施形態は 2 の炭素を有する。アルキニルの例には、非限定的に、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル、1-ペンチニル、2-ペンチニル、3-ペンチニル、4-ペンチニル、1-ヘキシニル、2-ヘキシニル、3-ヘキシニル、4-ヘキシニル、5-ヘキシニル等がある。「アルキニル」は、ジイエン及びトリイエンを含む。

【0146】

「アミノ」という用語は、-NH₂ 基を表す。

【0147】

「C₁ - 4 アルキルアミノ」という用語は、アミノ遊離基に結合された 1 つのアルキル遊離基を表し、アルキル遊離基は、本明細書において記述されるのと同じ意味を有する。幾つかの例は、非限定的に、メチルアミノ、エチルアミノ、n-プロピルアミノ、イソ-プロピルアミノ、n-ブチルアミノ、セク-ブチルアミノ、イソ-ブチルアミノ、t-ブチルアミノ等がある。幾つかの実施形態は、「C₁ - 2 アルキルアミノ」である。

【0148】

「アリール」という用語は、6 から 10 の環式炭素を含む芳香族環式遊離基を表す。例には、フェニル及びナフチルがある。

【0149】

「アリールアルキル」という用語は、アリール基で更に置換される -CH₂-、-CH₂CH₂- 等、C₁ - C₄ アルキレンを表す。アリールアルキルの例には、ベンジル、ベンジル、フェネチレン等がある。

【0150】

「アリールカルボキサミド」という用語は、アミド基の窒素に結合された単一アリール基を表し、アリールは、本明細書に記載されるものと同じ定義を有する。例は、N-フェニルアルキルカルボキサミドである。

【0151】

「アリールウレイル」という用語は、窒素の 1 つがアリールで置換される -NC(O)N- 基を表す。

【0152】

「ベンジル」という用語は、-CH₂C₆H₅ 基を表す。

【0153】

「カルボ- C₁ - 6 - アルコキシ」という用語は、カルボン酸の C₁ - 6 アルキルエステルを指し、アルキル基は、本明細書に定義されるものである。幾つかの実施形態におい

10

20

30

40

50

て、カルボ- C_{1-6} -アルコキシ基は、窒素原子に結合され、共にカルバメート基（例えば、 $N-COO-C_{1-6}$ -アルキル）を形成する。幾つかの実施形態において、カルボ- C_{1-6} -アルコキシ基はエステルである（例えば、 $-COO-C_{1-6}$ -アルキル）。例には、非限定的に、カルボメトキシ、カルボエトキシ、カルボプロポキシ、カルボイソプロポキシ、カルボブトキシ、カルボ-セクブトキシ、カルボ-イソブトキシ、カルボ- t -ブトキシ、カルボ-ペントキシ、カルボ-イソ-ペントキシ、カルボ- t -ペントキシ、カルボ-ペントキシ、カルボ-ヘキシロキシ等がある。

【0154】

「アルキルカルボキサミド」という用語は、 $-CONH_2$ 基を指す。

【0155】

「カルボキシ」又は「カルボキシル」は、カルボン酸基とも呼ばれる $-CO_2H$ 基を表す。

【0156】

「シアノ」という用語は、 $-CN$ 基を表す。

【0157】

「 C_{3-7} シクロアルケニル」という用語は、3から6の環式炭素及び少なくとも1つの2重結合を含む非芳香族環式遊離基を表す。幾つかの実施形態は3から5の炭素を含む。幾つかの実施形態は3から4の炭素を含む。例には、シクロプロペニル、シクロブテニル、シクロペンテニル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル等がある。

【0158】

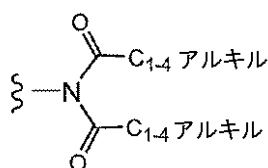
「 C_{3-7} シクロアルキル」という用語は、3から6の炭素を含む飽和環式遊離基を表す。幾つかの実施形態は3から5の炭素を含む。幾つかの実施形態は3から4の炭素を含む。例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロペニル、シクロヘキシル、シクロヘプチル等がある。

【0159】

「 C_{4-8} ジアシルアミノ」という要素は、本明細書に定義された2つのアシル基と結合したアミノ基を表し、アシル基は、以下等、同じ又は異なることが可能である。

【0160】

【化5】



C_{4-8} ジアシルアミノ基の例には、非限定的に、ジアセチルアミノ、ジプロピオニルアミノ、アセチルプロピオニルアミノ等がある。

【0161】

「 C_{2-6} ジアルキルアミノ」という要素は、同じ又は異なるアルキル遊離基の2つで置換されたアミノを表す。幾つかの例には、非限定的に、ジメチルアミノ、メチルエチルアミノ、ジエチルアミノ、メチルプロピルアミノ、メチルイソプロピルアミノ、エチルプロピルアミノ、エチルイソプロピルアミノ、ジプロピルアミノ、プロピルイソプロピルアミノ等がある。幾つかの例は、「 C_{2-4} ジアルキルアミノ」である。

【0162】

「 C_{1-4} アルキルカルボキサミド」又は「 C_{1-4} ジアルキルアルキルカルボキサミド」は、アミド基に結合された同じ又は異なる2つのアルキル遊離基を表し、アルキルは、本明細書に定義されるものと同じ定義を有する。 C_{1-4} ジアルキルカルボキサミドは、以下によって表されることが可能であり、

【0163】

10

20

30

40

【化 6】



C₁ - 4 は、本明細書に定義されるものと同じ定義を有する。ジアルキルアルキルカルボキサミドの例には、非限定的に、N, N-ジメチルアルキルカルボキサミド、N-メチル-N-エチルアルキルカルボキサミド、N, N-ジエチルアルキルカルボキサミド、N-メチル-N-イソプロピルアルキルカルボキサミド等がある。

【0164】

「C₂ - 6 ジアルキルスルホンアミド」という用語は、以下に示された以下の基の1つを指す。

【0165】

【化 7】



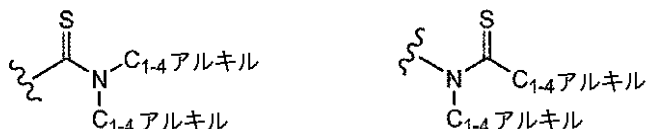
C₁ - 3 は、非限定的にメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル等、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。

【0166】

「C₂ - 6 ジアルキルチオカルボキサミド」又は「C₂ - 6 ジアルキルチオアルキルカルボキサミド」は、チオアミド基に結合された同じ又は異なる2つのアルキル遊離基を表し、アルキルは、本明細書に定義されたものと同じ定義を有する。C₁ - 4 ジアルキルチオカルボキサミドは、以下の基によって表されることが可能である。

【0167】

【化 8】



ジアルキルチオアルキルカルボキサミドの例には、非限定的に、N, N-ジメチルチオアルキルカルボキサミド、N-メチル-N-エチルチオアルキルカルボキサミド等がある。

【0168】

「C₂ - 6 ジアルキルスルホニルアミノ」という用語は、本明細書に定義された2つのC₁ - 3 アルキルスルホニル基と結合したアミノ基を指す。

【0169】

「エチニレン」という用語は、以下のように表される炭素-炭素3重結合を指す。

【0170】

【化 9】



「ホルミル」という用語は、-CHOを指す。

【0171】

「C₁ - 4 ハロアルコキシ」という用語は、酸素原子に直接結合する本明細書に定義されるハロアルキルを表す。例には、非限定的に、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、2, 2, 2-トリフルオロエトキシ、ペンタフルオロエトキシ等がある。

【0172】

10

20

30

40

50

「 C_{1-4} ハロアルキル」という用語は、本明細書に定義される C_{1-4} アルキル基を表し、アルキルは、1つのハロゲンで置換され、又は完全に置換され、完全に置換された C_{1-4} ハロアルキルは、化学式 $C_n L_{2n+1}$ で表すことができ、 L はハロゲンであり、「 n 」は1、2、3又は4である。複数のハロゲンが存在し、それらは、同じ又は異なるとすることができ、 F 、 Cl 、 Br 、及び I からなる群から選択され、好ましくは F とすることが可能である。 C_{1-4} ハロアルキル基の例には、非限定的に、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、クロロジフルオロメチル、2, 2, 2-トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル等がある。

【0173】

「 C_{1-4} ハロアロキルカルボキサミド」は、本明細書に定義されたアルキルアルキルカルボキサミド基を表し、アルキルは、1つのハロゲンで置換され、又は完全に置換され、化学式 $C_n L_{2n+1}$ によって表され、 L はハロゲンであり、「 n 」は1、2、3又は4である。複数のハロゲンが存在し、それらは、同じ又は異なるとすることができ、 F 、 Cl 、 Br 、及び I からなる群から選択され、好ましくは F とすることが可能である。

【0174】

「 C_{1-4} ハロアルキルスルフィニル」という用語は、化学式 $-S(O)-$ のスルホキシド基に結合されたハロアルキル遊離基を表し、ハロアルキル遊離基は、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。例には、非限定的に、トリフルオロメチルスルフィニル、2, 2, 2-トリフルオロエチルスルフィニル、2, 2-ジフルオロエチルスルフィニル等がある。

【0175】

「 C_{1-4} ハロアルキルスルホニル」という用語は、化学式 $-S(O)_2-$ のスルホン基に結合されたハロアルキル遊離基を表し、ハロアルキルは、本明細書において記述されるものと同じ定義を有する。例には、非限定的に、トリフルオロメチルスルホニル、2, 2, 2-トリフルオロエチルスルホニル、2, 2-ジフルオロエチルスルホニル等がある。

【0176】

「 C_{1-4} ハロアルキルチオ」という用語は、本明細書において記述されるものと同じ意味を有する。例には、非限定的に、ジフルオロメチルチオ（即ち、 CF_3S- ）、1, 1-ジフルオロエチルチオ、2, 2, 2-トリフルオロエチルチオ等がある。

【0177】

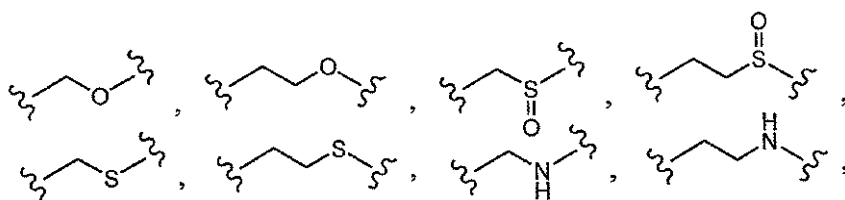
「ハロゲン」又は「ハロ」という用語は、クロロ基、ブロモ基、イオド基を表す。

【0178】

「 C_{1-4} ヘテロアルキレン」という用語は、 O 、 S 、 $S(O)$ 、 $S(O)_2$ 、及び NH から選択されるヘテロ原子に結合した C_{1-2} アルキレンを指す。幾つかの表された例は、非限定的に、以下の化学式の基：

【0179】

【化10】



等を含む。

【0180】

「ヘテロアリール」という用語は、1つの環、2つの融合環、又は3つの融合環である場合がある芳香族環系を表し、この場合、少なくとも1つの環式炭素は、 S 及び N からなる群等から選択されるヘテロ原子で置き換えられ、 N は、必要に応じて H 、 C_{1-4} アルキル、又は C_{1-4} アルキルで置換されてもよい。ヘテロアリール基の例には、ピリジル、

ベンゾフラニル、ピラジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、トリアジニル、キノリン、ベンズオキサゾール、ベンズチアゾール、1H-ベンズイミダゾール、イソキノリン、キナゾリン、キノキサリン等が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、ヘテロアリアル原子は、O、S、NHであり、その例にはピロール、インドール等が含まれるが、これらに限定されない。

【0181】

「複素環式」という用語は、非芳香族炭素環（即ち、本明細書に定義されるシクロアルキル又はシクロアルケニル）を表し、この場合、1つ、2つ又は3つの環式炭素は、O、S、Nからなる群等から選択されるヘテロ原子によって置き換えられ、Nは、必要に応じてH、C₁ - 4 アシル、又はC₁ - 4 アルキルで置換されてもよく、環式炭素原子は、必要に応じてオキソ又はチオオキソで置換され、それによってカルボニル又はチオカルボニル基を形成してもよい。複素環式基は、3員、4員、5員、6員又は7員包含環である。複素環式基の例には、アジリジン-1-イル、アジリジン-2-イル、アゼチジン-1-イル、アゼチジン-2-イル、アゼチジン-3-イル、ピペリジン-1-イル、ピペリジン-4-イル、モルホリン-4-イル、ピペルジン-1-イル、ピペルジン-4-イル、ピロリジン-1-イル、ピロリジン-3-イル、[1, 3]-ジオキサラン-2-イル等が含まれるが、これらに限定されない。

10

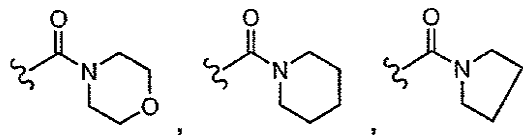
【0182】

「複素環式-カルボニル」という用語は、本明細書に定義される通り、カルボニル基（即ち、C=O）の炭素に直接結合する複素環式基を表す。幾つかの実施形態において、複素環式基の環式窒素は、カルボニル基に結合してアミドを形成する。例としては、

20

【0183】

【化11】



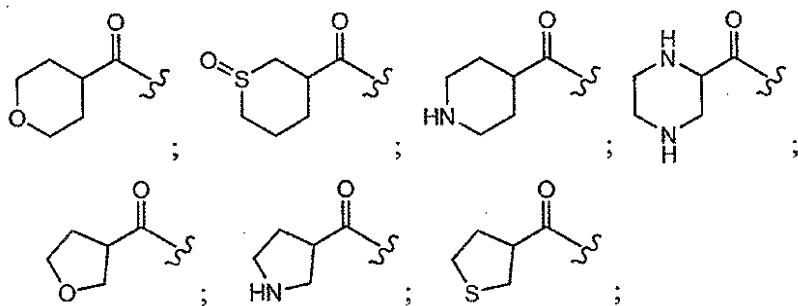
等が含まれるが、これらに限定されない。

幾つかの実施形態において、環式炭素は、カルボニル基に結合し、ケトン基を形成する。例としては、

30

【0184】

【化12】



40

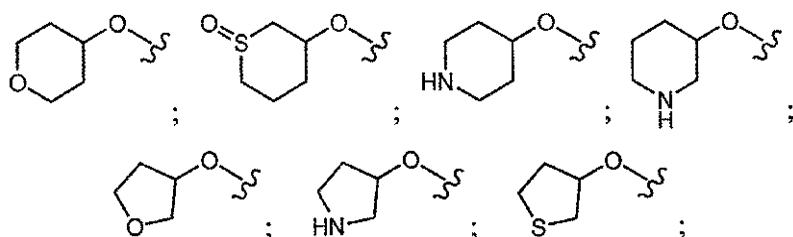
等が含まれるが、これらに限定されない。

【0185】

「複素環式-オキシ」という用語は、本明細書に定義される通り、酸素原子に直接結合する複素環式基を指す。例としては、

【0186】

【化 1 3】



等が含まれるが、これらに限定されない。

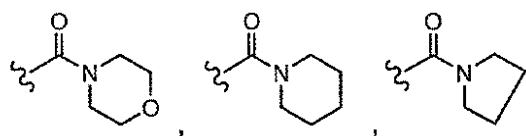
【0187】

10

「複素環式カルボキサミド」という用語は、本明細書に定義される通り、カルボニルに直接結合してアミドを形成する環式窒素を有する複素環式基を表す。例としては、

【0188】

【化 1 4】



等が含まれるが、これらに限定されない。

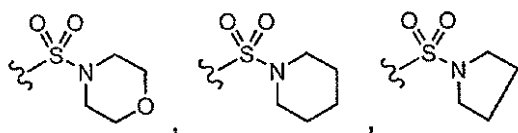
【0189】

20

「複素環式スルホニル」という用語は、本明細書に定義される通り、 SO_2 基に直接結合してスルホンアミドを形成する環式窒素を有する複素環式基を表す。例としては、

【0190】

【化 1 5】



等が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0191】

「ヒドロキシル」という用語は、 $-\text{OH}$ 基を指す。

【0192】

「ヒドロキシルアミノ」という用語は、 $-\text{NHOH}$ 基を表す。

【0193】

「ニトロ」という用語は、 $-\text{NO}_2$ 基を表す。

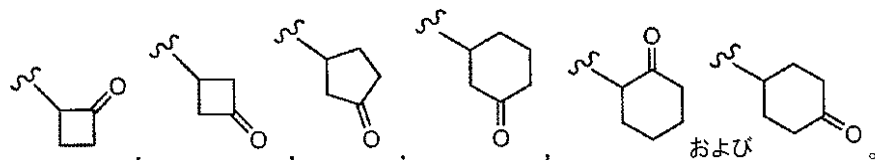
【0194】

「 C_{4-7} オキソシクロアルキル」は、環式炭素の 1 つはカルボニルで置き換えられる本明細書に定義された C_{4-7} シクロアルキルを指す。 C_{4-7} オキソシクロアルキルの例には、2-オキソシクロブチル、3-オキソシクロブチル、3-オキソシクロペンチル、4-オキソシクロヘキシル等が含まれるが、これらに限定されず、これらはそれぞれ以下の構造によって表される：

40

【0195】

【化 1 6】



「ペルフルオロアルキル」という用語は、化学式 $-\text{C}_n\text{F}_{2n+1}$ の基を表す。即ち、

50

ペルフルオロアルキルは、本明細書に定義されるアルキルであり、アルキルがフッ素原子で完全に置換され、従って、ハロアルキルのサブセットと考慮される。ペルフルオロアルキルの例には、 CF_3 、 CF_2CF_3 、 $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CF}(\text{CF}_3)_2$ 、 $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)_2$ 、 $\text{CF}(\text{CF}_3)\text{CF}_2\text{CF}_3$ 等がある。

【0196】

「フェノキシ」という用語は、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$ 基を指す。

【0197】

「フェニル」という用語は、 C_6H_5- 基を指す。

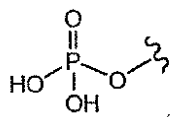
【0198】

「ホスホノオキシ」という用語は、以下の化学構造を有する基を指す：

10

【0199】

【化17】



「スルホンアミド」は、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 基を指す。

【0200】

「スルホン酸」は、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基を指す。

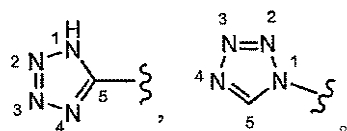
【0201】

20

「テトラゾリル」という用語は、以下の化学式の5員ヘテロアリアルを指す：

【0202】

【化18】



幾つかの実施形態において、テトラゾリル基は、 C_{1-3} アルキル、 C_{1-3} ハロアルキル、及び C_{1-3} アルコキシからなる群から選択される基で、それぞれ1位又は5位において更に置換される。

30

【0203】

「チオール」という用語は、 $-\text{SH}$ 基を表す。

【0204】

「アパ」という用語は、アミノ-3-フェニルプロピオン酸を指す。

【0205】

「GLP-1 分泌促進物質」という用語は、腸内分泌細胞等の細胞からの GLP-1 の分泌を促進する物質（例えば、化合物）を意味する。

【0206】

「内因性」は、哺乳動物が自然に生成する材料を意味する。

【0207】

40

「Gタンパク質共役受容体の生物学的活性フラグメント」は、自然に生じるGPCRの構造及び生化学的機能を有するGPCRのフラグメントを意味する。特定の実施形態において、生物学的活性フラグメントは、Gタンパク質に結合する。特定の実施形態において、生物学的活性フラグメントは、GPCRの既知のリガンドに結合する。

【0208】

「プライマー」は、対象ヌクレオチド配列に対して相補的であり、且つ対象ヌクレオチド配列を交雑するために使用される特定のオリゴヌクレオチド配列を表すために本明細書では使用される。プライマーは、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、又は逆転写酵素によって特徴付けられるヌクレオチド重合の開始点として作用する。

【0209】

50

「発現ベクター」という用語は、発現ベクターの適切な宿主細胞組換え体におけるクローンDNAの転写及びmRNAの転写に必要とされるDNA配列を意味する。適切に構築された発現ベクターは、宿主細胞における自律複製のための複製の起点、選択マーカー、限定数の有用な制限酵素部位、高いコピー数の可能性、及び活性促進剤を含むはずである。転写されるクローンDNAは、発現ベクター内の構成的又は条件的な活性促進剤に動作式に連結される。

【0210】

「候補化合物」又は「試験化合物」は、遮蔽に適している化合物（例えば非限定的に化学化合物）を意味する。

【0211】

「接触」又は「接触している」という用語は、少なくとも2つの成分を共に結合することを意味する。

【0212】

「変調する」又は「修飾する」という用語は、特定の活性、機能、又は分子の量、質、あるい効果の増大又は低減を指すと解釈されるべきである。例として非限定的に、Gタンパク質共役受容体の作動薬、部分作動薬、逆作動薬、及び拮抗薬は、受容体の変調物質である。

【0213】

「低分子」という用語は、モル当たり約10,000グラム未満の分子量を有し、ペプチド、ペプチドミメティック、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機化合物、又は無機化合物（即ち、ヘテロ有機化合物、又は有機金属化合物を含む）、並びにその塩、エステル、及び他の薬学的に許容される形態を含む化合物を意味すると解釈されるべきである。特定の好ましい実施形態において、低分子は、モル当たり約5,000グラム未満の分子量を有する有機化合物又は無機化合物である。特定の好ましい実施形態において、低分子は、モル当たり約1,000グラム未満の分子量を有する有機化合物又は無機化合物である。特定の好ましい実施形態において、低分子は、モル当たり約500グラム未満の分子量を有する有機化合物又は無機化合物である。

【0214】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単鎖又は2重形態の複数のヌクレオチドのRNA、DNA、又はRNA/DNAハイブリッド配列を指す。本発明のポリヌクレオチドは、合成、組換え体、*ex vivo*生成、又はその組み合わせを含む任意の既知の方法によって、並びに当該技術分野で既知の任意の精製方法を使用して調製されることが可能である。

【0215】

「ポリペプチド」は、ポリマーの長さに関係なく、アミノ酸のポリマーを指す。従って、ペプチド、オリゴペプチド、及びタンパク質が、ポリペプチドの定義内に含まれる。この用語は又、ポリペプチドの後発現を規定又は排除しない。例えば、グリコシル基、アセチル基、リン酸塩基、脂質基等の共有結合を含むポリペプチドが、ポリペプチドという用語によって明示的に包含される。

【0216】

「抗体」という用語は、本明細書において、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を包含することが意図される。

【0217】

「第2メッセンジャー」は、受容体活性化の結果として生成された細胞内応答を意味する。第2メッセンジャーは、例えば、イノシトール1,4,5-三リン酸塩（IP3）、ジアシルグリセロール（DAG）、環状AMP（cAMP）、環式GMP（cGMP）、MAPキナーゼ活性、MAP/EPKキナーゼキナーゼ-1（MEKK-1）活性、及びCa²⁺を含んでもよい。第2メッセンジャーの応答は、受容体の活性化を判定するために測定することができる。

10

20

30

40

50

【0218】

「受容体の機能」は、刺激を受信し、非限定的に遺伝子の転写を調節する、イオンの流入若しくは流出を調節する、触媒反応を実施する、及び／又は第2メッセンジャー応答を誘起する等、Gタンパク質により活性を変調することを含めて、細胞における効果を緩徐にする受容体の通常の動作を指す。

【0219】

受容体の「応答」又は「機能」という用語に関する「刺激する」又は「刺激している」という用語は、受容体の応答又は機能が、化合物が存在しない場合とは対照的に、化合物が存在する場合に増大されることを意味する。

【0220】

受容体の「応答」又は「機能」という用語に関する「阻害する」又は「阻害している」という用語は、受容体の応答又は機能が、化合物が存在しない場合とは対照的に、化合物が存在する場合に低減又は防止されることを意味する。

【0221】

ある範囲の値が提供される場合、その範囲の上限と加減の間にある各介在値、及びその指定範囲におけるあらゆる他の指定値又は介在値は、文脈が明瞭に指示しない限り、下限の10分の1まで、本発明の範囲内にあることを理解されたい。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、指定範囲において任意の明確に排除された限界を条件として、より小さい範囲において独立に含まれることが可能であり、本発明の範囲内にも包含される。指定範囲が限界の一方又は両方を含む場合、それらの一方又は両方を排除する範囲も、本発明において含まれる。

【0222】

BRS-3作動薬

BRS-3は、哺乳動物のERS-3であることが好ましい。BRS-3は、齧歯類又は霊長類のBRS-3であることがより好ましい。BRS-3は、ヒトのBRS-3であることが最も好ましい。

【0223】

本発明の新規の治療組み合わせにおいて有用なBRS-3作動薬は、BRS-3受容体について許容可能に高い親和性を示す化合物を含む。BRS-3作動薬又は薬学的に許容される塩は、任意の作動薬、より好ましくは選択的BRS-3作動薬とすることが可能である。

【0224】

BRS-3作動薬の例は、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Weber, et al., J Med Chem (2003) 46:1918-1930に記載されている。

【0225】

BRS-3作動薬の例は、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Mantey, et al., J Pharmacol Exp Ther (2004) 310:1161-1169に記載されている。

【0226】

BRS-3作動薬の例は、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Boyle, et al., J. Peptide Sci (2005) 11:136-141に記載されている。

【0227】

BRS-3作動薬の例は、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Lammerich, et al., Br J Pharmacol (2003) 138:1431-1440に記載されている。

【0228】

一態様において、BRS-3作動薬は、表Bの左列から選択される。

【0229】

一態様において、BRS-3作動薬は、化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物8、化合物9、化合物10、化合物11、化合物12、化合物13、化合物14、化合物15、化合物16、化合物17、化合物18、化合物19、化合物20、化合物21、化合物22、化合物23、化合物24、化合物25、化合物26、及び化合物27から選択され、これらの化合物は、Boyle, et al., J Peptide Sci (2005) 11:136-141において見ることが可能であり、選択的BRS-3作動薬として記載されている。

【0230】

一態様において、BRS-3作動薬は、化合物28、化合物29、及び化合物30から選択され、これらの化合物は、Mantey, et al., J Pharmacol Exp Ther (2004) 310:1161-1169において見ることが可能であり、選択的BRS-3作動薬として記載されている。

10

【0231】

一態様において、BRS-3作動薬は、化合物31、化合物32、及び化合物33から選択され、これらの化合物は、Boyle, et al., Boyle, et al., J Peptide Sci (2005) 11:136-141において見ることが可能であり、選択的BRS-3作動薬として記載されている。

【0232】

一態様において、BRS-3作動薬は、化合物34であり、この化合物は、Mantey, et al., J Pharmacol Exp Ther (2004) 310:1161-1169において見ることが可能であり、GPR-R及びNMB-Rに対してBRS-3について非選択的であると記載されている。

20

【0233】

本発明の一態様において、任意の1つ以上のBRS-3作動薬を本発明の任意の実施形態から排除することができる。

【0234】

本発明の一態様において、BRS-3作動薬は、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、約75 nM未満、約50 nM未満、約25 nM未満、約20 nM未満、約15 nM未満、約10 nM未満、約5 nM、未満、約4 nM未満、約3 nM未満、約2 nM未満、約1 nM未満のEC50を有する。BRS-3作動薬は、約50 nM未満、約25 nM未満、約20 nM未満、約15 nM未満、約10 nM未満、約5 nM未満、約4 nM未満、約3 nM未満、約2 nM、又は約1 nM未満のEC50を有することが好ましい。

30

【0235】

本発明の一態様において、BRS-3作動薬は、選択的BRS-3作動薬が胃放出ペプチド受容体(GPR-R)又はニューロメディンB受容体(NMB-R)に対してBRS-3について、少なくとも10倍、より好ましくは少なくとも約100倍の選択性を有する、選択的BRS-3作動薬である。本発明の一態様において、BRS-3作動薬は、選択的BRS-3作動薬あ、胃放出ペプチド受容体(GPR-R)及びニューロメディンB受容体(NMB-R)に対してBRS-3について、少なくとも10倍、より好ましくは少なくとも約100倍の選択性を有する、選択的BRS-3作動薬である。

40

【0236】

本発明の一態様において、BRS-3作動薬は、経口活性である。

【0237】

本発明の一態様において、BRS-3作動薬は、ヒトBRS-3の作動薬である。

【0238】

DPP-IV阻害剤

本発明の新規の治療組み合わせにおいて有用なDPP-IV阻害剤は、DPP-IVについて許容可能に高い親和性を示す化合物を含む。DPP-IV阻害剤又は薬学的に許容される塩は、任意のDPP-IV阻害剤、より好ましくは選択的ジペプチジルペプチダー

50

ゼ阻害剤、最も好ましくは選択的DPP-IV阻害剤である。

【0239】

DPP-IV阻害剤の例は、それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Villhauer, et al., J Med Chem (2003) 46:2774-2789 (LAF237の例); Ahren, et al., J Clin Endocrinol Metab (2004) 89:2078-2084; Villhauer, et al., J Med Chem (2002) 45:2362-2365 (NVP-DPP728の例); Ahren, et al., Diabetes Care (2002) 25:869-875 (NVP-DPP728の例); Peters, et al., Bioorg Med Chem Lett (2004) 14:1491-1493; Caldwell, et al., Bioorg Med Chem Lett (2004) 14:1265-1268; Edmondson, et al., Bioorg Med Chem Lett (2004) 14:5151-5155; 及びAbe, et al., J Nat Prod (2004) 67:999-1004に記載されている。

10

【0240】

DPP-IV阻害剤の具体的な例には、例えば、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、米国特許第6,303,661号に記載の通り、アラニン-ピロリジド、イソロイシン-チアゾリジド、及び偽基質N-バリルプロリル、O-ベンゾイルヒドロキシルアミン等のジペプチド誘導体又はジペプチド擬似体が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0241】

DPP-IV阻害剤の例は、それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、米国特許第6,812,350号、第6,803,357号、第6,710,040号、第6,617,340号、第6,699,871号、第6,573,287号、第6,432,969号、第6,395,767号、第6,303,661号、第6,242,422号、第6,166,063号に記載されている。DPP-IV阻害剤の例は、それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、米国特許出願番号第2004242898号、第2004180925号、第2004110817号、第2004106656号、第2003232788号、第2003216450号、第2003134802号、第2003125304号、第2003130281号、第2003119738号、第2003-100563号、第2003119750号、第2003130199号、第2002183367号、第2002049164号、第2002006899号に記載されている。

30

【0242】

DPP-IV阻害剤の例は、それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、国際出願第WO 04/103993号、第WO 04/103276号、第WO 04/99134号、第WO 04/87053号、第WO 04/76434号、第WO 04/76433号、第WO 04/69162号、第WO 04/64778号、第WO 04/71454号、第WO 04/69162号、第WO 04/67509号、第WO 04/58266号、第WO 04/52850号、第WO 04/50022号、第WO 04/50658号、第WO 04/32836号、第WO 04/46106号、第WO 04/43940号、第WO 04/41795号、第WO 04/37169号、第WO 04/3781号、第WO 03/01958号、第WO 04/14860号、第WO 04/07468号、第WO 04/04661号、第WO 03/82817号、第WO 03/72528号、第WO 03/57666号、第WO 03/57144号、第WO 03/40174号、第WO 03/37327号、第WO 03/35067号、第WO 03/35057号、第WO 03/22871号、第WO 03/15775号、第WO 03/04498号、第WO 03/02530号、第WO 03/02596号、第WO 03/02595号、第WO

40

50

03/02593号、第WO 03/02553号、第WO 03102531号、第WO 03/00181号、第WO 03/00180号、第WO 03/00250号、第WO 02/83109号、第WO 02/83128号、第WO 02/76450号、第WO 02/51836号、第WO 02/34900号、第WO 01/96295号、第WO 01/81337号、第WO 01/81304号、第WO 01/68603号、第WO 01/34594号、第WO 00/34241号、第WO 00/23421号、第WO 99/67278号、第WO 99/61431号、第WO 98/19998号、第WO 97/40832号、第EP 1480961号、第EP 1469873号、第EP 1465891号、第EP 1450794号、第EP 1446116号、第EP 1412357号、第EP 1399420号、第EP 1399471号、第EP 1399470号、第EP 1399469号、第EP 1399433号、第EP 1406873号、第EP 1406622号、第EP 1406872号、第EP 1399154号、第EP 1377288号、第EP 1385508号、第EP 1354882号、第EP 1304327号、第EP 1296974号、第EP 1280797号、第EP 1282600号、第EP 1261586号、第EP 1215207号、第EP 1228061号、第EP 1137635号、第EP 1123272号、第EP 1082314号、第CA 2433090号、第DE 19828113号、第DE 19823831号、第DE 19616486号、第DE 10256264号、第DE 10143840号、第JP 2004244412号、第JP 2004026820号、第JP 2003300977号、第JP 2004521149号、第JP 2004530729号、第JP 2004525179号、第JP 2004525929号、第JP 2004503531号、第JP 2003535034号、第JP 2003531204号、第JP 2003531191号、第JP 2003531118号、第JP 2003524591号、第JP 2002531547号、第JP 2002527504号、第JP 2002516318号、第JP 2001510442号、第JP 2000511559号、第JP 2000191616号に記載されている。

【0243】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、バリナーピロリジドである [開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Deacon, et al., Diabetes (1998) 47:764-769]。

【0244】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、3-(L-イソロイシル)チアゾリジン(イソロイシン-チアゾリジド)である。イソロイシン-チアゾリジドについては、それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、第JP 2001510442号、第WO 97/40832号、米国第6,303,661号、及び第1E 19616486号に記載されている。イソロイシン-チアゾリジドは、経口活性及び選択的DPP-IV阻害剤として記載されている [開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Pederson, et al., Diabetes (1998) 47:1253-1258]。

【0245】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、1-[2-[5-シアノピリジン-2-イル)アミノ]エチルアミノ]アセチル-2-シアノー(S)-ピロリジン(NVP-DPP728)である。NVP-DPP728については、それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、第WO 98/19998号及び第JP 2000511559号に記載されている。NVP-DPP728は、経口活性及び選択的DPP-IV阻害剤として記載されている [Villhauer, et al., J Med Chem (2002) 45:2362-2365]。

【0246】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、3(R)-アミノ-1-[3-(ト

10

20

30

40

50

リフルオロメチル) - 5, 6, 7, 8-テトラヒドロ [1, 2, 4] トリアゾロ [4, 3-アルピラジーン-7-イル] - 4- (2, 4, 5-トリフルオロフェニル) ブタン-1-オン (MX-0431) である。MX-0431については、それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、第EP 1412357号、第WO 03/04498号、米国第6699871号、及び米国特許第2003100563号に記載されている。MK-0431は、経口活性及び選択的DPP-IV阻害剤として記載されている [開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Weber, et al., Diabetes (2004) 53 (Suppl. 2): A151, 633-P (Abstract)]。

【0247】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、(1- [[3-ヒドロキシ-1-アダマンチルアミノ] アセチル] - 2-シアノー (S) -ピロリジン (LAF237) である。LAF237については、それぞれの開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、米国第6, 166, 063号、第WO 00/34241号、第EP 1137635号、及び第JP 2002531547号に記載されている。LAF237は、経口活性及び選択的DPP-IV阻害剤として記載されている [Villhauer, et al., J Med Chem (2003) 46: 2774-2789]。

【0248】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、(1S, 3S, 5S) - 2- [2 (S) -アミノ-2- (3-ヒドロキシアダマンタン-1-イル) アセチル] - 2-アザビシクロ [3. 1. 0] ヘキサン-3-カルボニトリル (BMS-477118) である。

【0249】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、表Bの右列から選択される。

【0250】

本発明の一態様において、任意の1つ以上のDPP-IV阻害剤は、本発明の任意の実施形から排除することができる。

【0251】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、約10 µM未満、約1 µM未満、約100 nM未満、約75 nM未満、約50 nM未満、約25 nM、未満、約20 nM未満、約15 nM未満、約10 nM未満、約5 nM未満、約4 nM未満、約3 nM未満、約2 nM未満、約1 nMのIC50である。DPP-IV阻害剤は約50 nM未満、約25 nM未満、約20 nM未満、約15 nM未満、約10 nM未満、約5 nM未満、約4 nM未満、約3 nM未満、約2 nM、又は約1 nM未満のCI50を有することが好ましい。

【0252】

本発明の一態様において、DDP-IV阻害剤は、選択的DPP-IV阻害剤が、PPCE、DPP-II、DPP-8、及びDPP-9の1つ以上に対して、ヒトの血漿について少なくとも約10倍、より好ましくは少なくとも約100倍、及び最も好ましくは少なくとも約100倍の選択性を有する、選択的DPP-IV阻害剤である。

【0253】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、経口活性である。

【0254】

本発明の一態様において、DPP-IV阻害剤は、ヒトDPP-IVの阻害剤である。

【0255】

BRS-3作動薬とDPP-IV阻害剤の組み合わせ

例示及び非限定として、本発明によるBRS-3作動薬とDPP-IV阻害剤の例示的な組み合わせが、表Bの左列からBRS-3作動薬を選択し、表Bの右列からDPP-IV阻害剤を選択することによって提供される。表Bの左列からBRS-3作動薬を選択し、表Bの右列からDPP-IV阻害剤を選択することによって提供されるBRS-3作動薬とDPP-IV阻害剤の各個々の組み合わせが本発明の範囲内の別の実施形態であるこ

10

20

30

40

50

とが、明らかに考慮される。

【0256】

【表2-1】

表B

BRS-3 作動薬	DPP-IV 阻害剤
N1-[(1R)-2-(1H-3-インドリル-1)-1-[1-(2-フェニルエチル)カルボアモイル]エチル-1)-(2S)-2-[1-(2-(4-クロロフェニル)エチル)カルボキサミド]ペンタンジアミド(化合物1)	バリナーピロリジド
N1-[(1R)-2-(1H-3-インドリル-1)-1-[1-(2-フェニルエチル)カルボアモイル]エチル-1)-(2S)-2-[(1H-2-インドリルメチル)カルボキサミド]ペンタンジアミド(化合物2)	3-(L-イソロイシル)チアゾリジン(イソロイシン-チアゾリジド)
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[(1S)-1-(ベンジルカルボキサミド)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物3)	1-[2-[5-シアノピリジン-2-イル]アミノ]エチルアミノ]アセチル-2-シアノー(S)-ピロリジン (NVP-DPP728)
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[(1S)-1-(4-クロロベンジル)-カルボキサミド]エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物4)	3(R)-アミノ-1-[-(トリフルオロメチル)-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ[1, 2, 4]トリアゾロ[4, 3-a]ピラジン-7-イル]-4-(2, 4, 5-トリフルオロフェニル)ブタン-1-オン (MK-0431)
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[(1S)-1-((1, 3-ベンゾジオキソール-5-イルメチル)カルボキサミド)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物5)	(1-[[3-ヒドロキシ-1-アダマンチル]アミノ]アセチル)2-シアノー(S)-ピロリジン (LAF237)
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[(1S)-1-((3-ピリジル)メチルカルボキ)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物6)	(1S, 3S, 5S)-2-[2(S)-アミノ-2-(3-ヒドロキシアダマンタン-1-イル)アセチル]-2-アザビシクロ[3. 1. 0]ヘキサン-3-カルボニトリル (BMS-477118)
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[(1S)-1-((1,2,3,4-	[1-[2(S)-アミノ-3-

【0257】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

テトラヒドロ-1-イソキノリル)メチルカルボキ)エチル]カルボキサミド}-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物7)	メチルブチリル]ピロリジン-2(R)-イル)ホウ酸 (PT-100)
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[(1S)-1-((1H2-インドリル)メチルカルボキサミド)エチル]カルボキサミド}-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物8)	GSK-823093
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[(ベンジル)アミノ]メチルカルボキサミド}-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物9)	PSN-9301
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[(4-クロロベンジル)アミノ]メチルカルボキ}-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物10)	T-6666
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[(3-ピリジル)メチルアミノ]メチルカルボキ}-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物11)	SYR-322
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1-(2-フェニルエチル)アミノ]メチルカルボキサミド}-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物12)	SYR-619
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1-(ベンジルアミノ)エチル]カルボキサミド}-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物13)	CR-14023
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1-((4-クロロベンジル)アミノ)エチル]カルボキサミド}-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物14)	CR-14025
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1-(1-(2-フェニルエチル)アミノ)エチル]カルボキサミド}-3-(1H-3-	CR-14240

【 0 2 5 8 】

10

20

30

40

【表 2 - 3】

インドリル)プロパンアミド(化合物15)	
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(ベンゾイル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物16)	CR-13651
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(4-クロロベンゾイル)-ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物17)	TS-021
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(2-(3-ピリジル)エタノイル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物18)	GRC-8200
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-イソキノリニル)エタノイル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物19)	GRC-8116
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(2-(1H-2-インドリル)エタノイル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物20)	FE107542
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(フェニルメチレン)-ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物21)	4(S)-フルオロ-1-[2-[1-(2-ヒドロキシアセチル)-4-メチルピペリジン-4-イルアミノ]アセチル]ピロリジン-2(S)-カルボニトリルフマレート
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(フラン-2-イルメチレン)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物22)	6-[2-[2-[2(S)-シアノアゼチジン-1-イル]2-オキソエチルアミノ]エチルアミノ]ピリジン-3-カルボニトリルジヒドロクロリド
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-[[N'-(ベンジル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド	N-(5-クロロピリジン-2-イル)-2-[4-[1-[2-(4-シアノチアゾリジン-3-イル)-2-オキソエチル]ヒドラジノ]ピペリジン-1-

【 0 2 5 9 】

【表 2 - 4】

(化合物23)	イル]アセトアミドトリス(トリフルオロアセテート)
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(4-クロロベンジル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物24)	トランス-4-[2-[4(R)-シアノチアゾリジン-3-イル]2-オキソエチルアミノ]-N,N-ジメチルシクロヘキサナルキルカルボキサミドヒドロクロリド
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(2-フリルメチル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物25)	トランス-1-[2-[4-(1,3-ジオキソ-2,3-ジヒドロ-1H-イソインドール-2-イル)シクロヘキシルアミノ]アセチル]ピロリジン-2(S)-カルボニトリルヒドロクロリド
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[4-ベンジルピペラジノ]メチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物26)	4,4-ジフルオロ-1-[2-(エキソ-8-(2-ピリミジニル)-8-アザビシクロ[3.2.1]オクト-3-イルアミノ]アセチル]ピロリジン-2(S)-カルボニトリル
N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[4-ベンジルピペラジノ]メチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド(化合物27)	エキソ-3-[2-[8-(2-ピリミジニル)-8-アザビシクロ[3.2.1]オクト-3-イルアミノ]アセチル]チアゾリジン-4(R)-カルボニトリル
[D-Tyr ⁶ ,(R)-Apa ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]ボンベシン(6-14) (化合物28)	3(R)-アミノ-1-(8-クロロ-1,2,3,4-テトラヒドロピラジノ[1,2-a]ベンズイミダゾール-2-イル)-4-(2,5-ジフルオロフェニル)ブタン-1-オントリフルオロアセテート
[D-Tyr ⁶ ,(S)-Apa ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]ボンベシン(6-14) (化合物29)	3(R)-アミノ-4-(2,5-ジフルオロフェニル)-1-[2-(4-フルオロフェニル)-4,5,6,7-テトラヒドロチアゾロ[4,5-c]ピリジン-5-イル]ブタン-1-オン
[D-Tyr ⁶ ,(R)-Apa ¹¹ -4Cl,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]ボンベシン(6-14) (化合物30)	2-[4-[2-[4(R)-アミノ-4-(2-フルオロフェニル)ブチリル]-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-イルカルボキサミドメチル]フェニル酢酸
Ac-Phe-Trp-Ala-His(τBzl)-Nip-Gly-Arg-NH ₂ (化合物31)	1-(2-ベンゾチアゾリル)-1-[1-[(2S,3aS,7aS)-ペリドロインドール-2-

10

20

30

40

【表 2 - 5】

	イルカルボニル]ピロリジン-2(S)-イル]メタンヒドロクロリド
Ac-Phe-Trp-Ala-His(γ Bzl)- β Ala-His-Arg-NH ₂ (化合物32)	トランス-N-[4-[1(S)-アミノ-2-[3(S)-フルオロピロリジン-1-イル]-2-オキソエチル]シクロヘキシル]-2,4-ジフルオロベンゼンスルホンアミド
Ac-Phe-Trp-Ala-Val- β Ala-His-Arg-Trp-NH ₂ (化合物33)	(1S, 3S, 5S)-2-[2(S)-アミノ-4,4-ジメチルペンタノイル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3(S)-カルボニトリルトリフルオロアセテート
[D-Tyr ⁶ , β Ala ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]ボンベシン (6-14) (化合物34)	2-[7-(2-ブチニル)-1-(2-フェニルエチル)-8-(1-ピペラジニル)キサンチン-3-イル]-N-(2-プロピニル)アセトアミドヒドロクロリド

更に、本発明の化合物は、表Bに示すものも含め、その薬学的に許容される塩、溶媒化合物、及び水和物を包含する。例えば、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Berge, et al., (1977), Journal of Pharmaceutical Sciences 66:1-19; 及び Polymorphism in Pharmaceutical Solids (1999) Brittain, ed., Marcel Dekker, Inc. を参照されたい。

【0261】

上述の組み合わせ治療に関して、本発明による化合物は、任意の適切な方式で投与することができる。適切な投与経路は、当該技術分野で既知の方法を使用する経口、鼻、直腸、経粘膜、経皮、又は腸投与、筋肉内射、皮下射、髄内注射を含む非経口的送達、並びに鞘内注射、直接心室内注射、静脈内注射、腹膜内注射、鼻腔内注射、肺内（吸入）注射、又は眼球内注射がある。他の適切な投与経路は、エアロゾル及びデポー調合物である。発明された医薬品の徐放性調合物、特にデポーが、明確に考慮される。特定の好ましい実施形態において、本発明による化合物は、経口投与される。本発明による化合物は、タブレット、カプセル、粉末、シロップ、エリキシル等、エアロゾル、無菌溶液、懸濁液、エマルジョン等の固体又は液体の形態で作成することができる。特定の実施形態において、BRS-3 作動薬及び DPP-IV 阻害剤の一方又は両方が、経口投与される。

【0262】

経口投与される調合物は、固体のタブレット及びカプセルの調合物の他に、水溶液及び水性懸濁液の形態とすることが可能である。水溶液及び水性懸濁液は、無菌の粉末又は顆粒から調製されることが可能である。化合物は、水、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノール、コーン油、綿実油、ピーナツ油、ゴマ油、ベンジルアルコール、塩化ナトリウム、及び／又は種々の緩衝剤に溶解することが可能である。他の補助剤が、当該技術分野で周知である。

【0263】

BRS-3 作動薬及び DPP-IV 阻害剤は、糖尿病又はそれに関連する病態の処置又は予防のために同時、別個又は順番に使用される混合製剤である場合があることが理解されるであろう。このような混合製剤は、例えば、2重パックの形態である場合がある。

【0264】

従って、本発明は、糖尿病又はそれに関連する病態の予防又は処置において、同時に、

別々に、又は順番に使用される混合製剤としてBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる産物を考慮することが更に理解されるであろう。

【0265】

BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる本発明の組み合わせは、本明細書において記述される薬学的に許容される担体、賦形剤、結合剤、希釈液等と共に、又は独立にBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤を混合し、1つ以上の混合物を薬学的組成物として経口的又は非経口的に投与することによって調製することができる。

【0266】

従って、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤又は薬学的組成物は、別々の投与形態又は単一の投与形態において投与することができることが更に理解されるであろう。

10

【0267】

BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が別々の投与形態にある時、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、異なる経路によって投与することができる。

【0268】

個々の又は組み合わせられたBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、従来の混合、溶解、顆粒化、糖剤作成、研和、エマルジョン化、カプセル化、飛沫同伴、凍結乾燥のプロセス、又は噴霧乾燥等、当該技術分野で周知の方法によって調製されることが可能である。

【0269】

20

本発明により使用される薬学的組成物は、薬剤として使用することができる調剤に活性化化合物を処理するのを容易にする賦形剤及び補助剤を備える1つ以上の薬学的に許容される担体を使用する従来の方式で、調合することが可能である。適切な薬学的に許容される担体は、当業者に入手可能である〔例えば、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, et al., eds.), 20th Edition, 2000, Lippincott Williams & Wilkins; 及びHandbook of Pharmaceutical Excipients (Rowe, et al., eds.), 4th Edition, 2003, Pharmaceutical Pressを参照〕。適切な調合物は、選択される投与経路に依存する。本明細書の「担体」材料又は「賦形剤」材料という用語は、取扱い又は貯蔵の特性を向上させるために、或いは経口投与に適切なカプセル又はタブレット等の離散物品に組成物の投与単位を形成するのを可能する又は容易にするために、それ自体は治療剤ではないが、治療剤を対象に送達するために担体及び／若しくは希釈液及び／若しくは補助剤又はビヒクルとして使用される、或いは薬学的組成物に追加された任意の物質を意味する。補助剤には、例えば、希釈液、崩壊剤、結合剤、接着剤、湿潤剤、ポリマー、潤滑剤、滑剤、不快な味又は匂いを遮断又は相殺するために追加される物質、香料、染料、芳香剤、組成物の外見を改善するために追加される物質が含まれてもよいが、これらに限定されない。許容される賦形剤には、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸及び硫酸のナトリウム塩及びカルシウム塩、炭酸マグネシウム、ゲラチン、アカシア、アルギン酸ナトリウム、ペクチン、デキストリン、マニトール、ソルビトール、ラクトース、スクロース、スターチ、ゲラチン、セルロース材料、アルカノイック酸のセルロースエステル及びセルロースアルカリエステル等のセルロース材料、低融点ワックスココアバター又は粉末、ビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、及びポリエチレングリコール等のポリマー、並びに他の薬学的に許容される材料が含まれる。薬学的組成物の成分は、投与に好都合であるようにカプセル化又はタブレット化することができる。

30

40

【0270】

「薬学的に許容される」とは、組成物、調合物、安定性、患者許容性、及び生物学的利用能について、薬理学的／毒物学的観点から患者にとって、及び物理／化学的観点から薬

50

剤製造化学者にとって許容される特性及び／又は物質を指す。

【0271】

BRS-3 作動薬及び DPP-IV 阻害剤が別々の投与形態にある時、BRS-3 作動薬調合物に使用される薬学的に許容される担体は、DPP-IV 阻害剤調合物に使用される薬学的に許容される担体と同一である必要はないことを理解されたい。

【0272】

糖剤のコアは、コーティングを備える。このために、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボルゲル、ポリエチレングリコール、及び／又は二酸化チタン、ラッカー溶液、並びに適切な有機溶媒又は溶媒混合物を必要に応じて含むことが可能である濃縮糖溶液が使用されることが可能である。染料又は色素が、活性化化合物投与の異なる組

10

【0273】

経口的に使用することができる薬学的組成物には、グリセロール又はソルビトール等、ゲラチンで作成された押込みばめカプセル、並びにゲラチン及び可塑剤で作成された柔軟封止カプセルがある。押込みばめカプセルは、ラクトース等の充填剤、スターチ等の結合剤、及び／又はタルク若しくはステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤、必要に応じて安定剤と混和した活性成分を含んでもよい。柔軟カプセルでは、活性化化合物は、脂肪油、液体パラフィン、液体ポリエチレングリコール、クレモフォア、カプムル、中鎖又は長鎖のモノグリセリド、ジグリセリド、又はトリグリセリド等、適切な液体において溶解する又は懸濁することが可能である。

20

【0274】

更に、BRS-3 作動薬及び DPP-IV 阻害剤は、徐放性システムを使用して送達することが可能である。種々の徐放性材料が確立されており、当業者に周知である。徐放性タブレット又はカプセルが、特に好ましい。例えば、モノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリル等の時間遅延材料が使用されることが可能である。投与形態は又、制御された放出のために浸透性治療タブレットを形成するように、米国特許第 4256108 号、第 4166452 号、及び第 4265874 号に記載されている技法によってコーティングされることも可能である。

【0275】

30

本発明の組み合わせ治療は、単独で、或いは 1 つ以上の他の薬学的又は生理学的に許容される化合物と組み合わせ、投与又は提供されることが可能である。本発明の一態様において、他の薬学的又は生理学的に許容される化合物は、BRS-3 作動薬ではなく、DPP-IV 阻害剤ではない。

【0276】

本発明の一態様において、他の薬学的又は生理学的に許容される化合物は、スルホニル尿素（例えば、グリベンクラミド、グリピジド、グリクラジド、グリメピリド）、メグリチニド（例えば、レパグリニド、ナテグリニド）、ビグアナイド（例えば、メタホルミン）、 α グリコシダーゼ阻害剤（例えば、アカルボース、エパルレスタット、ミグリトール、ボグリボース）、チザオリジンジオン（例えば、ロシグリタゾン、ピオグリタゾン）、インスリン類似体（例えば、インスリンリスプロ、インスリンアスパルト、インスリングルルギン）、ピコリン酸クロム／ピオチン、及び生物学的剤（例えば、アジポネクチン、又はその C 末端球状ドメインを備えるフラグメント、或いはアジポネクチン又はその前記フラグメントのマルチマ、或いはアジポネクチン受容体 Adipor1 又は Adipor2 の作動薬、前記作動薬は経口活性であることが好ましい）。本発明の一態様において、薬剤はメトホルミンである。本発明の一態様において、薬剤は、アジポネクチン受容体 Adipor1 又は Adipor2 に対する作動薬であり、前記作動薬は経口活性であることが好ましい。

40

【0277】

本発明の一態様において、他の薬学的又は生理学的に許容される化合物はアポリポタン

50

パク質-B分泌／ミクロソマルトリグリセリド伝達タンパク質（a p o - B / M T P）阻害剤、M C R - 4 作動薬、コレシストキニン-A（C C K - A）作動薬、セロトニン、及びノルエピネフリン再取込み阻害剤（例えば、シブトラミン）、交感神経様作用剤、 β 3 アドレナリン受容体作動薬、ドーパミン作動薬（例えば、プロモクリプチン）、メラニン細胞刺激ホルモン受容体類似体、カンナビノイド I 受容体拮抗薬 [例えば、S R 1 4 1 7 1 6 : N - (ピペリジン-1-イル) - 5 - (4-クロロフェニル) - 1 - (2, 4-ジクロロフェニル) - 4-メチル-1H-ピラゾール-3-アルキルカルボキサミド]、メラニン濃縮ホルモン拮抗薬、レプトン（O B タンパク質）、レプチン類似体、レプチン受容体作動薬、ガラニン拮抗薬、リパーゼ阻害剤（テトラヒドロリプスタリン、即ちオルリスタット）、食欲抑制剤（ボンベシン作動薬等）、ニューロペプチドー Y 拮抗薬、チロミ
10
メティック剤、デヒドロエピアンドロステロン又はその類似体、グルココルチコイド受容体作動薬又は拮抗薬、オレキシン受容体拮抗薬、ウルコルチン結合タンパク質拮抗薬、グルカゴン様ペプチド-1 受容体作動薬、毛様神経栄養因子（R e g e n e r o n P h a r m a c e u t i c a l s , I n c . [米国ニューヨーク州テリータウン] 及び P r o c t e r & G a m b l e C o m p a n y [米国オハイオ州シンシナティ] から入手可能なアキソイン^{T M}）、ヒトアグーチ関係タンパク質（A G R P）、グレリン受容体拮抗薬、ヒスタミン 3 受容体拮抗薬又は逆作動薬、ニューロメディン U 受容体作動薬、ノルアドレナリン食欲抑制剤（例えば、フェンテルミン、マジンドール等）、及び食欲抑制剤（例えば、ブプロピン）等、抗肥満症剤である。幾つかの実施形態において、抗肥満症剤は、オルリスタット、シブトラミン、プロモクリプチン、エフェドリン、レプチン、及びブ
20
ソイドエフェドリンからなる群から選択される。

【0278】

本発明による組み合わせ治療では、本発明による B R S - 3 作動薬及び本発明による D P P - I V 阻害剤は、同時に又は別々の間隔で投与することができる。同時に投与される時、B R S - 3 作動薬及び D P P - I V 阻害剤は、単一の薬学的組成物に組み込むことができ、又は一方の組成物において B R S - 3 作動薬及び他の組成物において D P P - I V 阻害剤等、別々の組成物に組み込むことができる。これらの組成物のそれぞれは、共通の賦形剤、希釈液、又は担体と共に調合し、タブレット、或いは処方されたエリキシル又は溶液に圧縮することが可能であり、及び徐放性投与形態等として処方することが可能である。B R S - 3 作動薬及び D P P - I V 阻害剤は、異なる経路を介して投与することが可能
30
である。例えば、B R S - 3 作動薬は、タブレットを介して経口的に投与することが可能であり、D P P - I V 阻害剤は、吸入を介して投与することが可能である。

【0279】

別々に投与される時、本発明による B R S - 3 作動薬及び D P P - I V 阻害剤の治療上有効量は、異なるスケジュールで投与される。一方は、2つの投与間の時間が治療に有効な間隔の範囲内にある限り、他方の前に投与されることが可能である。治療に有効な間隔は、(a) B R S - 3 作動薬又は (b) D P P - I V 阻害剤の一方が哺乳動物に投与される時に開始し、(a) 及び (b) の組み合わせの処置において有益な効果の限界において終了する時間期間である。

【0280】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明による B R S - 3 作動薬及び一定量の本発明による D P P - I V 阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。

【0281】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明による B R S - 3 作動薬及び一定量の本発明による D P P - I V 阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。本発明は又、B R S - 3 作動薬及び D P P - I V 阻害剤が対象における血中グルコースレベルを低下させる効果を与えるのに十分な量である、薬学的組成物の投与形態にも関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

10

20

30

40

50

【0282】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が対象における血中グルコースレベルを低下させる効果を与えるのに十分な量であり、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中グルコースレベルを低下させるには治療に無効である、薬学的組成物の投与形態にも関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

【0283】

10

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中グルコースレベルを低下させる効果を与えるのに十分な量であり、効果が相乗効果である、薬学的組成物の投与形態にも関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

【0284】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物に関する。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中グルコースレベルを低下させる効果を与えるのに十分な量であり、効果が相乗効果であり、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中グルコースレベルを低下させるには治療として無効である、薬学的組成物の投与形態にも関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは血中グルコースレベルである。

20

【0285】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物に関する。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中グルコースレベルを低下させる効果を与えるのに十分な量であり、その量のBRS-3作動薬及びその量のDPP-IV阻害剤の組み合わせによって与えられる効果が、その量のBRS-3作動薬単独によって与えられる効果、及びその量のDPP-IV阻害剤単独によって与えられる効果より優れている、薬学的組成物の投与形態にも関する。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは血中グルコースレベルである。

30

【0286】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるように十分な量である、薬学的組成物の投与形態にも関する。

40

【0287】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるように十分な量であり、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させるに

50

は治療として無効である、薬学的組成物の投与形態にも関する。

【0288】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるように十分な量であり、効果が相乗効果である、薬学的組成物の投与形態にも関する。

【0289】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるように十分な量であり、効果が相乗効果であり、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させるには治療として無効である、薬学的組成物の投与形態にも関する。

10

【0290】

一態様において、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と共に、一定量の本発明によるBRS-3作動薬及び一定量の本発明によるDPP-IV阻害剤の組み合わせを本質的に備える、又はそれからなる薬学的組成物を特徴とする。本発明は又、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるように十分な量であり、その量のBRS-3作動薬及びその量のDPP-IV阻害剤の組み合わせによって与えられる効果が、その量のBRS-3作動薬単独によって与えられる効果、及びその量のDPP-IV阻害剤単独によって与えられる効果より優れている、薬学的組成物の投与形態にも関する。

20

【0291】

本発明において使用するのに適切な薬学的組成物にはその意図した目的を達成する量で、活性成分が含まれる組成物がある。幾つかの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、糖尿病及びそれに関連する病態を処置又は予防するのに有用であることが理解される。肥満症及びそれに関連する病態は、本発明による。幾つかの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用であることが理解される。血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態は、本発明による。

30

【0292】

本発明の組み合わせ治療の特定の実施形態において、本発明によるBRS-3作動薬の量及び本発明によるDPP-IV阻害剤の量は、対象における血中グルコースレベルを低下させるのに相乗効果を与える量で提供される。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。対象における血中グルコースレベルを低下させるのに相乗効果を与えるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の量の決定は、特に本明細書において提供される詳細な開示を考慮すると、十分に当業者の能力の範囲内にある。本発明の組み合わせ治療の一実施形態において、本発明によるBRS-3作動薬の量及び本発明によるDPP-IV阻害剤の量は、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中グルコースレベルを低下させるには治療として無効である、対象における血中グルコースレベルを低下させるのに相乗効果を与える量で提供される。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中グルコースレベルを低下させるには治療として無効である、対象における血中グルコースレベルを低下させることについて相乗効果を提供するBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の量の決定は、特に本明細書において提供され

40

50

る詳細な開示を考慮すると、十分に当業者の能力の範囲内にある。

【0293】

本発明の組み合わせ治療の特定の実施形態において、本発明によるBRS-3作動薬の量及び本発明によるDPP-IV阻害剤の量は、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて相乗効果を与えるような量で提供される。対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに相乗効果を与えるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の量の決定は、特に本明細書において提供される詳細な開示を考慮すると、十分に当業者の能力の範囲内にある。本発明の組み合わせ治療の一実施形態において、本発明によるBRS-3作動薬の量及び本発明によるDPP-IV阻害剤の量は、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させるには治療として無効である、対象における血中GLP-1レベルを増大させるのに相乗効果を与える量で提供される。その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させるには治療として無効である、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて相乗効果を提供するBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の量の決定は、特に本明細書において提供される詳細な開示を考慮すると、十分に当業者の能力の範囲内にある。

10

【0294】

非限定的にマウス、ラット、ウサギ、豚、及び非ヒト霊長類を使用する研究を含めて、動物研究から得られたデータは、ヒトに使用されるある範囲の投与量を処方する際に使用することができる。一般的に、当業者は、動物モデルにおいて得られた*in vivo*データをヒト等のその他にどのように外挿するかを理解している。幾つかの環境では、これらの外挿は、ヒト等のその他と比較して動物モデルの重量にのみ基づくことが可能である。他の環境では、これらの外挿は、単に重量に基づくだけでなく、種々の因子を組み込む。代表的な因子には、患者のタイプ、年齢、体重、性別、食餌、及び医療条件、疾患の深刻さ、投与経路、使用される特定の化合物の活性、効能、薬物動態学的及び毒物学的プロファイル等の医療条件、薬剤送達システムが使用されるか、急性若しくは慢性の疾患状態が処置されているか、又は予防が実施されるか、或いは、本発明の化合物の他に、及び薬剤組み合わせの一部として他の活性化合物が投与されるか、がある。本発明の化合物及び／又は組成物で疾患条件を処置する投与体系は、上述された種々の因子により選択される。それゆえ、使用される実際の投与体系は、広範に変化する可能性があり、従って、好ましい投与量体系から逸脱する可能性があり、当業者であれば、これらの通常範囲外の投与量及び投与体系は試験することができ、適切であれば、本発明の方法において使用することが可能であることを理解するであろう。

20

30

【0295】

例示的で好ましい動物モデル系は、マウスにおける経口グルコース耐性試験(OGTT)である(実施例1を参照)。このモデルでは、例示として非限定的に、治療には無効であるBRS-3作動薬単独の量又はDPP-IV阻害剤単独の量は、約30%以下、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、又は約5%未満、より好ましくは約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、又は約5%未満の糖血可動域の曲線下面積(AUC)障害を生成するBRS-3作動薬単独の量又はDPP-IV阻害剤単独の量である。このモデルでは、例示として非限定的に、治療には無効であるBRS-3作動薬単独の量又はDPP-IV阻害剤単独の量は、約0~30%、約0~25%、約0~20%、約0~15%、約0~10%、又は約0~5%、より好ましくは約0~25%、約0~20%、約0~15%、約0~10%、又は約0~5%の糖血可動域の曲線下面積(AUC)障害を生成するBRS-3作動薬単独の量又はDPP-IV阻害剤単独の量である。このモデルでは、例示として非限定的に、本発明によるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせの治療上有効量は、約30%を超える、約35%を超える、約40%を超える、約45%を超える、約50%を超える、約55%を超える、約60%を超える、約65%を超える、約70%を超える、約75%を超える、約80%を超える、約85%を超える、約90%を超える、又は約95%を超える、より好まし

40

50

くは約35%を超える、約40%を超える、約45%を超える、約50%を超える、約55%を超える、約60%を超える、約65%を超える、約70%を超える、又は約75%を超える、約80%を超える、約85%を超える、約90%を超える、又は約95%を超える糖血可動域の曲線下面積（AUC）障害を生成するBRS-3作動薬単独の量又はDPP-IV阻害剤単独の量である。

【0296】

投与量及び間隔は、本発明による対象における血中グルコースレベルを低下させることにおいて相乗効果を提供するように、又は本発明による対象における血中GLP-1レベル上げることにおいて相乗効果を提供するように、調節することが可能である。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。本発明によるBRS-3作動薬又はDPP-IV阻害剤の正確な投与量は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせ、その効力、投与モード、患者の年齢及び体重、処置される条件の深刻さに応じて変化することが理解されるであろう。正確な調合物、投与形態、及び投与量は、患者の条件を考慮して、個々の医師によって選択することができる。例示として非限定的に、本発明による対象における血中グルコースレベルを低下させることにおいて相乗効果を提供する、又は本発明による対象における血中GLP-1レベルを増大させることにおいて相乗効果を提供するBRS-3作動薬又はDPP-IV阻害剤の量は、約0.001mg/kg体重未満、約0.005mg/kg体重未満、約0.01mg/kg体重未満、約0.05mg/kg体重未満、約0.1mg/kg体重未満、約0.5mg/kg体重未満、約1mg/kg体重未満、約5mg/kg体重未満、約10mg/kg体重未満、約50mg/kg体重未満、又は約100mg/kg体重未満である。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。幾つかの実施形態において、本発明による対象における血中グルコースレベルを低下させることにおいて相乗効果を提供する、又は本発明による対象における血中GLP-1レベルを増大させることにおいて相乗効果を提供するBRS-3作動薬又はDPP-IV阻害剤の量は、約0.001~100mg/kg体重未満、約0.001~約50mg/kg体重未満、約0.001~10mg/kg体重未満、約0.001~5mg/kg体重未満、約0.001~1mg/kg体重未満、約0.001から0.5mg/kg体重未満、約0.001~0.1mg/kg体重未満、約0.001~0.05mg/kg体重未満、約0.001~0.01mg/kg体重未満、又は約0.001~0.005mg/kg体重未満である。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。幾つかの実施形態において、本発明による対象における血中グルコースレベルを低下させることにおいて相乗効果を提供する、或いは本発明による対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて相乗効果を提供BRS-3作動薬又はDPP-IV阻害剤の量は、約0.001~100mg/kg体重、約0.001~50mg/kg体重、約0.001~10mg/kg体重、約0.001~5mg/kg体重、約0.001から1mg/kg体重、約0.001~0.5mg/kg体重、約0.01~0.1mg/kg体重、約0.001~0.05mg/kg体重、約0.001~0.01mg/kg体重、又は約0.001~0.005mg/kg体重である。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

【0297】

追加の例示的で好ましい動物モデル系は、マウスにおけるグルコースチャレンジ試験後の血中GLP-1レベルの上昇である（実施例15を参照）。

【0298】

投与量及び間隔は、本発明による対象における血中グルコースレベルを低下させることについて相乗効果を提供する、又は本発明による対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて相乗効果を提供する本発明によるBRS作動薬及び本発明によるDPP-IV阻害剤の血漿レベルを提供するように、個々に調節されることが可能である。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルであ

る。投与間隔も、本発明による対象における血中グルコースレベルを低下させることについて相乗効果を提供する、又は本発明による対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて相乗効果を提供するBRS作動薬濃度の選択範囲の値及びDPP-IV阻害剤濃度の選択範囲の値を使用して決定することもできる。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤は、時間の10%~90%、好ましくは時間の30%~99%の間、最も好ましくは時間の50%~90%の間について、血漿レベルをそれぞれBRS-3作動薬濃度及びDPP-IV阻害剤濃度の選択範囲内に維持する体系を使用して投与されるべきである。局所投与又は選択的摂取の場合、本発明による対象における血中グルコースレベルを低下させることについて相乗効果を提供する、又は本発明による対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて相乗効果を提供するBRS-3作動薬濃度の範囲又はDPP-IV阻害剤濃度の範囲は、血漿濃度に関係しない可能性がある。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

10

【0299】

投与される組成物の量は、当然、処置される対象、対象の体重、苦痛の深刻さ、投与方式、及び処方医師の判断に依存する。

【0300】

従って、一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。

20

【0301】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中グルコースレベルを低下させることについて効果を与えるのに十分な量で投与される、前記方法を特徴とする。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

【0302】

30

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中グルコースレベルを低下させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中グルコースレベルを低下させることについて治療として無効である、前記方法を特徴とする。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

【0303】

40

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中グルコースレベルを低下させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、効果が相乗効果である、前記方法を特徴とする。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

【0304】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による

50

一定量のDPP-I V阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-I V阻害剤が、対象における血中グルコースレベルを低下させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、効果が相乗効果であり、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-I V阻害剤単独が、対象における血中グルコースレベルを低下させることについて治療として無効である、前記方法を特徴とする。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

【0305】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-I V阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防する方法を更に特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-I V阻害剤が、対象における血中グルコースレベルを低下させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、その量のBRS-3作動薬及びその量のDPP-I V阻害剤の組み合わせによって与えられる効果が、その量のBRS-3作動薬単独及びその量のDPP-I V阻害剤単独によって与えられる効果より優れている、前記方法を特徴とする。特定の実施形態において、血中グルコースレベルは、上昇した血中グルコースレベルである。

【0306】

本発明の組み合わせ治療は、ヒトを含む哺乳動物において、最も好ましくはヒトにおいて、糖尿病又はそれに関連する病態を処置又は予防するのに有用である。幾つかの実施形態において、糖尿病は、1型糖尿病である。幾つかの実施形態において、2型糖尿病である。糖尿病に関連する病態には、高血糖症、グルコース耐性障害、インスリン抵抗性、膵臓β細胞不全、腸内分泌細胞不全、糖尿、代謝性アシドーシス、白内障、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿性網膜症、糖尿病性冠状動脈疾患、糖尿病性脳血管性疾患、糖尿性抹消血管性疾患、代謝症候群、高脂血症、アテローム性粥状硬化症、脳卒中、高血圧症、及び肥満症が含まれるが、これらに限定されない。糖尿病に関連する病態は、実施形態に個別に又は任意に組み合わせて含まれてもよいことが理解される。

【0307】

相応して、一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-I V阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、ボディマスを減少させる方法を特徴とする。

【0308】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-I V阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、ボディマスを減少させる方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-I V阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与される、前記方法を特徴とする。

【0309】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-I V阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、ボディマスを減少させる方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-I V阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、その量のBRS-3作動薬単独及びDPP-I V阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて治療として無効である、前記方法を特徴とする。

【0310】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、ボディマスを減少させる方法の特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、効果が相乗効果である、前記方法の特徴とする。

【0311】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、ボディマスを減少させる方法の特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、効果が相乗効果であり、その量のBRS-3作動薬単独及びDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて治療として無効である、前記方法の特徴とする。

10

【0312】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、ボディマスを減少させる方法の特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、その量のBRS-3作動薬及びその量のDPP-IV阻害剤の組み合わせによって与えられる効果が、その量のBRS-3作動薬単独によって与えられる効果、又はその量のDPP-IV阻害剤単独によって与えられる効果より優れている、前記方法の特徴とする。

20

【0313】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、肥満症又はそれに関連する病態を予防又は処置する方法を相応して特徴とする。

30

【0314】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、肥満症又はそれに関連する病態を予防又は処置する方法の特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与される、前記方法の特徴とする。

【0315】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、肥満症又はそれに関連する病態を予防又は処置する方法の特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、その量のBRS-3作動薬単独及びDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて治療として無効である、前記方法の特徴とする。

40

【0316】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を

50

を、必要とする対象に投与することを含む、肥満症又はそれに関連する病態を予防又はh措置する方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、効果が相乗効果である、前記方法を特徴とする。

【0317】

一態様において、一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、肥満症又はそれに関連する病態を予防又はh措置する方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、効果が相乗効果であり、その量のBRS-3作動薬単独及びDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて治療として無効である、前記方法を特徴とする。

10

【0318】

一態様において、一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、肥満症又はそれに関連する病態を予防又はh措置する方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、その量のBRS-3作動薬及びその量のDPP-IV阻害剤の組み合わせによって与えられる効果が、その量のBRS-3作動薬単独によって与えられる効果、又はその量のDPP-IV阻害剤単独によって与えられる効果より優れている、前記方法を特徴とする。

20

【0319】

本発明の組み合わせ治療は、ヒトを含む哺乳動物において、最も好ましくはヒトにおいて、肥満症又はそれに関連する病態を処置又は予防するのに有用である。肥満症に関連する病態には、高血圧症、うっ血性心筋症、静脈瘤、肺塞栓、冠状性心疾患、脳卒中、突発性頭蓋内高血圧症、知覚異常性大腿神経痛、呼吸困難、閉塞性睡眠無呼吸、低換気症候群、ピックウィック症候群、喘息、不動症、変性骨関節炎、腰痛、皮膚裂線又は「伸展裂創」、下肢の静脈うっ血、リンパ浮腫、細胞歯肉炎、間擦疹、カンブレンケル、黒色表皮腫、懸垂線維腫、胃食道逆流疾患、非アルコール性脂肪肝／脂肪肝炎、胆石症、ヘルニア、大腸がん、ストレス失禁、肥満症に関連する糸球体症、乳がん及び子宮がん、抑うつ及び低自己評価、生活の質の低下、代謝症候群、2型糖尿病、脂肪異常症、女性のハイパーアンドロゲネミア、多嚢胞卵巣症候群、月経困難症、不妊症、妊娠合併症、及び男性性機能低下症が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、肥満症に関連する病態は、高血圧症、うっ血性心筋症、冠状性心疾患、脳卒中、脂肪異常症、代謝症候群、及び2型糖尿病からなる群から選択される。肥満症に関連する病態は、実施形態に個別に又は任意に組み合わせられて含まれてもよいことが理解される。

30

【0320】

相応して、一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法を特徴とする。

40

【0321】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与される、前記方法を特徴とす

50

る。

【0322】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、その量のBRS-3作動薬単独及びDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて治療として無効である、前記方法を特徴とする。

10

【0323】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、治療が相乗効果である、前記方法を特徴とする。

【0324】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、治療が相乗効果であり、その量のBRS-3作動薬単独及びDPP-IV阻害剤単独が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて治療として無効である、前記方法を特徴とする。

20

【0325】

一態様において、本発明は、本発明による一定量のBRS-3作動薬及び本発明による一定量のDPP-IV阻害剤を本質的に備える、又はそれからなる組成物の治療上有効量を、必要とする対象に投与することを含む、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防する方法を特徴とする。関係する態様において、本発明は、BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤が、対象における血中GLP-1レベルを増大させることについて効果を与えるのに十分な量で投与され、その量のBRS-3作動薬及びその量のDPP-IV阻害剤の組み合わせによって与えられる効果が、その量のBRS-3作動薬単独の量によって与えられる効果、及びその量のDPP-IV阻害剤単独の量によって与えられる効果より優れている、前記方法を特徴とする。

30

【0326】

発明の組み合わせ治療は、ヒトを含む哺乳動物において、最も好ましくはヒトにおいて、血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態を処置又は予防するのに有用である。肥満症に関連する病態には、非限定的に、糖尿病、糖尿病に関連する病態、心筋梗塞、学習障害、記憶障害、及び神経変性障害あり、糖尿病に関連する病態には、非限定的に、高血糖症、耐糖能異常、インスリン抵抗性、膵臓β細胞不全、腸内分泌細胞不全、糖尿、代謝性アシドーシス、白内障、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿性網膜症、糖尿性冠状動脈疾患、糖尿性心臓血管疾患、糖尿性抹消血管性疾患、代謝症候群、高脂血症、アテローム性粥状硬化症、脳卒中、高血圧症、及び肥満症があり、神経変性障害には、重度のてんかん性発作によって生じる興奮毒性脳障害、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン関連疾患、脳卒中、運動ニューロン疾患、学習障害又は記憶障害、外傷性脳傷害、脊髄損傷、及び抹消神経障害が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、糖尿病は、1型糖尿病である。幾つかの実施形

40

50

態において、糖尿病は、2型糖尿病である。血中GLP-1レベルを増大させることによって緩和される病態は、実施形態に個別に又は任意に組み合わせて含まれてもよいことが理解される。

【0327】

当業者であれば上の説明を利用して本発明を完全に実践できることが、容易に考えられる。以上の詳細な説明は、理解を明瞭にするためにのみ示されており、本発明の適用範囲に含まれる改変が当業者には明らかであることから、不必要な限定を目的としたものではないことがこれらの説明から理解されるはずである。

【0328】

本発明の主題に関連し、当業者に周知である組換え体DNA技法については、例えば、
開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001) Cold Spring Harbor Laboratoryに記載されている。

10

【0329】

本出願を通して、種々の刊行物、特許、及び特許出願が引用されている。本明細書で参照されているこれらの刊行物、特許、及び特許出願の開示内容は、参考として全体が本開示内容に組み入れられている。本明細書における出願人による刊行物、特許、又は特許出願の引用は、前記刊行物、特許、及び特許出願を従来技術として本出願人が承認するものではない。

20

【実施例】

【0330】

当業者であれば上の説明を利用して本発明を完全に実践できることが、容易に考えられる。以下の詳細な実施例は、単に例示を目的としたものであり、先行する開示内容を何ら限定するものではないと解釈されなければならない。当業者であれば、手順からの適切な変更を即座に理解するであろう。

【0331】

実施例1

内因性ヒトBRS-3の完全長クローニング

BRS-3特異プライマー5'-ACAGAAATTCAGAGAAATGGCTCA
AAGGCA-3' (配列番号3; EcoRI部位でのセンス、開始コドンとしてのATG)、及び、

30

5'-CATGGATCCTTGAAAAGCTAGAAATCTGTCC-3' (配列番号4; BamHI部位でのアンチセンス、停止コドンのアンチセンスとしてのCTA)、及び、

テンプレートとしてヒト子宮cDNA (Clontech) を使用して、ポリヌクレオチドコード内因性ヒトBRS-3をクローニングした。Taqlus Precision DNAポリメラーゼ (Stratagene) を、手順2から手順4を25回繰り返して以下のサイクルによって増幅するために使用した：

94℃、3分；94℃、1分；56℃、1分；72℃、1分20秒；72℃、10分。

40

【0332】

予測されたサイズの1.23Kb PCRフラグメントを単離し、EcoRI及びBamHIで消化し、pCMV発現ベクターにクローニングし、T7 DNA配列キット (Amersham) を使用して配列した。核酸配列について配列番号1及び推定アミノ酸配列について配列番号2を参照されたい。

【0333】

実施例2

受容体の発現

種々の細胞が、Gタンパク質共役受容体の発現のための分野に利用可能であるが、哺乳動物細胞又はメラニン保有細胞が使用されることが最も好ましい。以下がその例であり；

50

当業者は、技術者の要求に対して優先的に有益である技法を特定する能力を持つ。例えば、メラニン保有細胞に関する以下の実施例6を参照されたい。

【0334】

a. 過渡的なトランスフェクション

1日目、293細胞の 6×10^6 / 10 cm皿をプレートアウトした。2日目、2つの反応管を用意する（各管についての以下の割合はプレート当たりである）：0.5 ml 血清なしDMEM（Gibco BRL）において4 μ g DNA（例えば、pCMVベクター；受容体cDNAを有するpCMVベクター等）を混合することによって管Aを準備する；0.5 ml 血清なしDMEMにおいて24 μ L リポフェクタミン（Gibco BRL）を混合することによって管Bを準備する。管A及びBを倒置によって混和し（数回）、続いて室温にて30分～45分間培養する。混和物は、「トランスフェクション混合物」と呼ばれる。プレートアウトした293細胞を1 $\times$ PBSで洗浄し、続いて5 ml 血清なしDMEMを追加する。1 ml のトランスフェクション混合物を細胞に追加し、続いて37°C / 5% CO₂において4時間培養する。トランスフェクション混合物を吸引によって除去し、続いて、10 ml のDMEM / 10% ウシ胎仔血清を追加する。細胞を37°C / 5% CO₂において培養する。48時間培養した後、細胞を回収し、分析に使用する。

10

【0335】

b. 安定細胞系統

約 1.2×10^6 の293細胞を15 cm組織培養プレートの上にプレート（実施例アウトする。10パーセントのウシ胎仔血清及び1パーセントのピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、及び抗生物質を含むDME高グルコース培地で成長させる。293細胞のプレートアウト（又は～80%までの細胞密度）を24時間続け、12 μ gのDNAを使用して（例えば、受容体cDNAを有するpCMVベクター）細胞をトランスフェクトする。12 μ gのDNAを60 μ Lのリポフェクタミン及び血清のない2 mlのDME高グルコース培地と組み合わせる。培地をプレートから吸引し、血清を有さない培地で細胞を1回洗浄した。DNA、リポフェクタミン、及び培地混合物を、血清のない10 mlの培地と共にプレートに追加する。37°Cで4時間～5時間培養した後、培地を吸引し、25 mlの血清含有培地を追加する。トランスフェクションから24時間後、培地を再び吸引し、血清を有する新規の培地を追加する。トランスフェクションから48時間後、培地を吸引し、約 1.2×10^6 の293細胞の最終濃度においてゲネチシン（G418薬剤）を含む血清を有する培地を追加し、15 cm組織培養プレート上でプレートアウトする。10パーセントのウシ胎仔血清及び1パーセントのピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、及び抗生物質を含むDME高グルコース培地で成長させる。293細胞のプレートアウト（又は～80%までの細胞密度）の24時間、12 μ gのDNAを使用して（例えば、受容体cDNAを有するpCMVベクター）細胞をトランスフェクトする。12 μ gのDNAを60 μ Lのリポフェクタミン及び血清のない12 mlのDME高グルコース培地と組み合わせる。培地をプレートから吸引し、血清を有さない培地で1回洗浄した。DNA、リポフェクタミン、及び培地混合物を、血清のない10 mlの培地と共にプレートに追加する。37°Cで4時間から5時間培養した後、培地を吸引し、25 mlの血清含有培地を追加する。トランスフェクションから24時間後、培地を再び吸引し、血清を有する新規の培地を追加する。トランスフェクションから48時間後、培地を吸引し、500 μ g / mlの最終濃度においてゲネチシン（G418薬剤）を含む血清を有する培地を追加する。この段階で、トランスフェクション細胞は、G418抵抗性遺伝子を含む陽性トランスフェクション細胞の選択を受ける。選択が行われる4日から5日ごとに培地を交換する。選択中、細胞は成長して、安定したプールを生成する、又は安定したクローン選択のために分割する。

20

30

40

【0336】

実施例3

BRS3作動薬として候補化合物を遮蔽するための検定

BRS3作動薬として候補化合物を遮蔽する手法は、種々のものが利用可能である。以

50

下がその例であり；当業者は、技術者の要求に対して優先的に有益である技法を特定する能力を持つ。Gタンパク質共役受容体の作動薬として化合物を遮蔽する検定は、当業者に周知である（例えば、国際出願第WO 02/42461号を参照）。

【0337】

1. 膜結合検定：[³⁵S] GTPγS検定

Gタンパク質共役受容体がリガンド結合又は構成活性化の結果として活性状態にある時、受容体は、Gタンパク質に結合し、GDPの放出及びその後のGタンパク質へのGTPの結合を刺激する。Gタンパク質受容体複合体のαサブユニットは、GTPaseとして作用し、GTPをGDPにゆっくり加水分解し、この時点で受容体は通常不活性化される。活性化受容体は、GDPをGTPと交換し続ける。非加水分解可能GTP類似体[³⁵S] GTPγSを使用して、活性化受容体を発現する膜への[³⁵S] GTPγSの結合の向上を実証することができる。活性化を測定するために[³⁵S] GTPγS結合を使用する利点は、(a) 一般に全てのGタンパク質共役受容体に適用可能である、(b) 膜表面の近傍において、細胞内カスケードに影響を与える分子を拾い上げる可能性を低くすることである。

10

【0338】

検定は、関係受容体を発現する膜に[³⁵S] GTPγSが結合するのを刺激するGタンパク質共役受容体の能力を使用する。検定は包括的であり、全てのGタンパク質共役受容体における薬剤送達に適用される。

【0339】

膜の調製

幾つかの実施形態において、本発明のGタンパク質共役受容体を備え、且つ受容体の作動薬等の候補化合物の特定に使用される膜は、以下のように調製されることが好ましい。

20

【0340】

a. 材料

「膜搔取り緩衝液」は、20mMのHEPES及び10mMのFDTA、pH7.4からなる；「膜洗浄緩衝液」は、20mMのHEPES及び0.1mMEDTA、pH7.4からなる；「結合緩衝液」は、20mMのHEPES、100mMのNaCl及び10mMのMgCl₂、pH7.4からなる。

【0341】

b. 手順

手順を通して全材料を氷の上において維持する。まず、培地を細胞のコンフルエントな単層から吸引し、続いて、10mlの冷PBSで濯ぎ、続いて吸引する。その後、細胞を掻き取るために、5mlの膜搔取り緩衝液を追加する；これに続いて、細胞抽出物を50mlの遠心分離管に移す（4℃で17分間20,000rpmにおいて遠心分離する）。その後、上澄み液を吸引し、ペレットを30mlの膜洗浄緩衝液に再懸濁させ、続いて4℃で17分間20,000rpmにおいて遠心分離する。次いで、上澄み液を吸引し、ペレットを結合緩衝液に再懸濁させる。ついで、これをBrinkman PolytroTMnホモジナイザーを使用して均質化する（全ての材料が懸濁するまでの15秒～20秒のバースト）。本明細書では、これを「膜タンパク質」と呼ぶ。

30

40

【0342】

ブラッドフォードタンパク質検定

均質化に続いて、ブラッドフォードタンパク質検定を使用して膜のタンパク質濃度を決定する（タンパク質は、約1.5mg/mlに希釈し、後の使用のために小分けし、凍結する（-80℃）ことができる。凍結している時、使用するプロトコルは以下のとおりである：検定の日に、凍結膜タンパク質を室温にて解凍し、続いて攪拌し、次いで約12×1,000rpmにおいて約5秒～10秒間ポリトロンで均質化する。複数の製剤の場合、ホモジナイザーは、均質化の異なる準備間において完全に清浄されるべきであることに留意されたい）。

【0343】

50

a. 材料

結合緩衝液（上記の通り）；ブラッドフォード染料試薬；製造業者の指示（Bio-rad, カタログ番号500-0006）に従って、ブラッドフォードタンパク質標準を使用する。

【0344】

b. 手順

2重管を準備し、一方は膜を含み、一方は制御「ブランク」としてである。それぞれ、800 μ Lの結合緩衝液を含んでいた。その後、10 μ Lのブラッドフォードタンパク質標準（1mg/ml）を各管に追加し、次いで10 μ Lの膜タンパク質を1つの管にのみ追加する（ブランクには追加しない）。その後、200 μ Lのブラッドフォード染料試薬を各管に追加し、続いてそれぞれを攪拌する。5分後、管を再び攪拌し、内部の材料をキュベットに移す。次いで、波長595において、CECIL 3041分光光度計を使用して、キュベットを読み取る。

10

【0345】

特定検定

a. 材料

GDP緩衝液は、37.5mlの結合緩衝液及び2mgのGDP（Sigma, cat. no. G-7127）からなっており、続いて結合緩衝液において一連の希釈を行い、0.2 μ M GDP（各ウェルのGDPの最終濃度は、0.1 μ MのGDPであった）を得た。候補化合物を備える各ウェルは、200 μ Lの最終容積を有し、100 μ LのGDP緩衝液（最終濃度、0.1 μ MのGDP）、結合緩衝液における50 μ Lの膜タンパク質、及び結合緩衝液における50 μ Lの[³⁵S]GTP γ S（0.6 nM）（10ml結合緩衝液当たり2.5 μ L [³⁵S]GTP γ S）からなる。

20

【0346】

b. 手順

96ウェルプレート（実施例フォーマット（これらは、-80℃で凍結することができる））を使用して候補化合物を遮蔽することが好ましい。膜タンパク質（又は、制御として、対象GPCRを除く発現ベクターを有する膜）を懸濁するまで短時間均質化する。次いで、上述されたブラッドフォードタンパク質検定を使用して、タンパク質濃度を決定する。次いで、膜タンパク質（及び制御）を結合緩衝液において0.25mg/mlに希釈する（最終検定濃度、12.5 μ g/ウェル）。その後、100 μ LのGDP緩衝液をWallac ScintistripTM（Wallac）の各ウェルに追加した。次いで、5 μ Lのピンツールを使用して、5 μ Lの候補化合物をこのようなウェルに移す（即ち、200 μ Lの全検定容積における5 μ Lは、候補化合物の最終遮蔽濃度が10 μ Mであるように、1:40の比率である）。再び、汚染を避けるために、各移動手順後、ピンツールを、水（1×）、エタノール（1×）、及び水（2×）を備える3つのリザーバにおいて濯がなければならない一過剰な液体は、各濯ぎ後、ツールからふり落とされ、紙及びキムワイプで乾燥されるべきである。その後、50 μ Lの膜タンパク質を各ウェルに追加し（対象GPCRを有さない膜を備える制御ウェルも使用した）、室温にて5分~10分間事前培養した。その後、結合緩衝液における50 μ Lの[³⁵S]GTP γ S（0.6 nM）を各ウェルに追加し、続いて、室温にて60分間シェーカー上において培養する（再び、この例では、プレートをフォイルで覆った）。次いで、22℃で15分間400 RPMでプレートをスピンさせることによって、検定を停止する。次いで、プレートを8チャンネルマニホールドで吸引し、プレートカバーで封止する。次いで、設定条件「Prot. #37」を使用してWallac 1450の上において、プレートを読み取る（製造業者の指示通り）。

30

40

【0347】

2. アデニリルシクラーゼ検定

粗血漿膜と共に使用するように、細胞に基づく検定用に設計されたFlash PlateTM アデニリルシクラーゼキット（New England Nuclear；カタロ

50

グ番号SMP004A)を修正することができる。Flash Plateウェルは、cAMPを認識する特定の抗体をも含むシンチラントコーティングを含んでもよい。ウェルにおいて生成されたcAMP遺伝子は、放射性cAMPトレーサをcAMP抗体に結合するための直接的な競合によって定量化することができる。以下は、受容体を発現する全細胞においてcAMPレベルの変化を測定する簡潔なプロトコルとして作用する。

【0348】

特定の実施形態において、修正されたFlash PlateTM アデニリルシクラーゼキット(New England Nuclear; カタログ番号SMP004A)が、以下のプロトコルに従って、BRS-3作動薬等の候補化合物を同定するために使用される。

10

【0349】

本発明のGタンパク質共役受容体がトランスフェクトされた細胞をトランスフェクションの約3日後に回収する。20mMのHEPES、pH7.4及び10mMのMgCl₂を含む緩衝液において懸濁細胞を均質化することによって、膜を調製する。均質化をBrinkman PolytronTMを使用して約10秒間氷の上において実施する。結果として得られたホモジネートを4℃で15分間49,000Xgで遠心分離する。次いで、結果として得られたペレットを20mMのHEPES、pH7.4及び0.1mMのEDTAを含む緩衝液において再懸濁させ、10秒間均質化し、続いて4℃で15分間49,000Xgにおいて遠心分離する。次いで、結果として得られたペレットを使用まで-80℃で貯蔵する。直接特定遮蔽の当日、膜ペレットを室温でゆっくり解凍し、20mMのHEPES、pH7.4及び10mMのMgCl₂を含む緩衝液において再懸濁させ、0.60mg/mlの最終的なタンパク質濃度を得る(再懸濁膜を使用まで氷の上に置く)。

20

【0350】

cAMP標準及び検出緩衝液(11mlの検出緩衝液に対して2µCiのトレーサ{[¹²⁵I]cAMP(100µL)を備える}を調製し、製造業者の命令に従って維持する。検定緩衝液を遮蔽のために新たに調製し、20mMのHEPES、pH7.4、10mMのMgCl₂、20mMのホスホクレアチン(Sigma)、0.1units/mlのクレアチンホスホキナーゼ(Sigma)、50µMのGTP(Sigma)、及び0.2mMのATP(Sigma)を含んでいた;次いで、検定緩衝液を使用まで氷の上で貯蔵する。

30

【0351】

候補化合物を、40µLの膜タンパク質(30µg/ウェル)及び50µLの検定緩衝液と共に、例えば96ウェルプレートウェル(3µL/ウェル;12µMの最終検定濃度)に追加することが好ましい。次いで、この混和物を緩徐に振りながら室温で30分間培養した。

【0352】

培養に続いて、100µLの検出緩衝液を各ウェルに追加し、続いて、2時間~24時間培養した。次いで、プレートを「Prot.#31」を使用してWallac MicroBetaTMプレートリーダーにおいて計数した(製造業者の指示通り)。

40

【0353】

3. レポーター検定

a. CRE-Lucレポーター検定

製造業者の指示に従って、293及び293T細胞をウェル当たり2×10⁴細胞の密度で96ウェルプレートの上にプレートアウトし、次の日、リポフェクタミン試薬(BRL)を使用してトランスフェクトした。以下のようにDNA/脂質混合物を各6ウェルのトランスフェクションのために調製した:100µLのDMEDにおける260ngのプラスミドDNAを100µLのDMEMにおける20µLの脂質と共に緩徐に混合する(260ngのプラスミドDNAは、200ngの8xCRE-Lucレポータープラスミド、本発明のGタンパク質共役受容体を含む50ngのpCMV又はpCMV単独、及び

50

10 ngのGPRS発現プラスミド [p cDNA 3におけるGPRS (Invitrogen) からなる]。8xCRE-Lucレポータープラスミドを以下のように調製した：p β gal-ベクター (Clontech) のBglV-HindIII部位においてラットソマトスタチン促進剤 (-71/+51) をクリーニングすることによって、ベクターSRIF- β -ガルを得た。cAMP応答要素の8のコピーを、アデノウィルステンプレートAdpCF126CCRE8からPCRによって獲得し (例えば、開示内容全体が参考として本明細書に組み入れられている、Suzuki, et al., Hum Gene Ther (1996) 7:1883-1893を参照)、Kpn-BglV部位においてSRIF- β 3-ガルベクターにクリーニングし、8xCRE- β -ガルレポーターベクターを得た。8xCRE- β -ガルレポーターベクターの β -ガラクトシダーゼ遺伝子をpGL3-ベクター (Promega) から得たルシフェラーゼ遺伝子とHirDIII-BamHI部において置き換えることによって、8xCRE-Lucレポータープラスミドを生成した。30分間室温にて培養した後、DNA/脂質混合物を400 μ LのDMEMで希釈し、100 μ Lの希釈混合物を各ウェルに追加する。細胞培養物培養器において4時間培養した後、10% FCSを有する100 μ LのDMEMを各ウェルに追加する。次の日、トランスフェクション細胞を100のDMEMを、10% FCSを有する200 μ L/ウェルのDMEMで変化させる。8時間後、PBSで1回洗浄した後、ウェルを、フェノールレッドを有さない100 μ L/ウェルのDMEMに変化させる。次の日、製造業者の指示に従って、LucLiteTMレポーター遺伝子検定キット (Packard) を使用してルシフェラーゼ活性を測定し、1450 MicroBetaTMシンチレーション及びルミネセンスカウンター (Wallac) の上で読み取る。

【0354】

b. AP1レポーター検定 (Gq関連受容体)

Gq刺激を検出する方法は、プロモーターにおいてAP1要素を含む遺伝子を活性化させるGq依存ホスホリパーゼCの既知の特性に依存する。CREBレポーター検定に関して上述されたプロトコルに従って、PathdetectTM AP-1シス-Reporting System (Stratagene、カタログ番号2-19073) を使用することができるが、リン酸カルシウム沈殿物の成分が、410 ngのpAP1-Luc、80 ngのpCMV受容体発現プラスミド、及び20 ngのCMV-SEAPであったことは除く。

【0355】

c. SRF-LUCレポーター検定 (Gq関連受容体)

Gq刺激を検出する方法は、プロモーターにおいて血清応答因子を含む遺伝子を活性化させるGq依存ホスホリパーゼCの既知の特性に依存する。PathdetectTM SRF-Luc-Reporting System (Stratagene) を使用して、例えばCOS7細胞におけるGq結合活性を検定することができる。即ち、製造業者の指示に従って、Mammalian TransfectionTM キット (Stratagene、カタログ番号200285) を使用して、細胞にシステムのプラスミド成分及び指示された発現プラスミドコード内因性又は非内因性GPCRをトランスフェクションする。製造業者の指示に従って、410 ngのSRF-Luc、80 ngのpCMV受容体発現プラスミド、及び20 ngのCMV-SEAP (分泌されたアルカリホスファターゼ発現プラスミド；アルカリホスファターゼ活性は、サンプル間のトランスフェクション効率のばらつきを制御するために、トランスフェクション細胞の培地において測定される) をリン酸カルシウム沈殿物において組み合わせる。沈殿物の半分を96ウェルプレートの3つのウェルに均等に分配し、血清のない培地において24時間細胞の上に維持する。最後の5時間、細胞を例えば1 μ Mの試験化合物で培養する。次いで、製造業者の指示に従って細胞を濯ぎ、ルシフェラーゼ活性について、LucLiteTM キット (Packard、カタログ番号6016911) 及び「Trilux 1450 Microbeta」液体シンチレーション及びルミネセンスカウンター (Wallac) を

使用して検定する。GraphPad PrismTM 2.0a (GraphPad Software Inc.) を使用して、データを分析することができる。

【0356】

4. 細胞内IP3蓄積検定 (Gq関連受容体)

1日目、本発明のGタンパク質共役受容体をトランスフェクトされる細胞を、24ウェルプレートの上に、通常は 1×10^5 細胞/ウェル (しかしこの数は最適化することができる) で培養することができる。2日目、50 μ L 血清なしDMEM/ウェルにおける0.25 μ gのDNA (例えば、pCMVベクター; 受容体cDNAを有するpCMVベクター等) 及び50 μ L 血清なしDMEM/ウェルにおける2 μ Lのリポフェクタミンとまぜ混合することによって、細胞をトランスフェクトすることができる。溶液を緩徐に混合し、室温にて15分~30分間培養する。細胞を0.5 mlのPBSで洗浄し、400 μ Lの血清なし培地をトランスフェクション培地と混合し、細胞に追加する。次いで、細胞を37°C/5%CO₂において3~4時間培養し、次いでトランスフェクション培地を除去し、1 ml/ウェルの正規成長培地と置き換える。3日目、細胞に³H-ミオーイノシトールで標識する。即ち、培地を除去し、細胞を0.5 mlのPBSで洗浄する。次いで、0.5 mlのイノシトールなし/血清なし培地 (GIBCO BRL) を0.25 μ Ciの³H-ミオーイノシトール/ウェルと共に追加し/ウェル、細胞を37°C/%CO₂で16時間~18時間培養する。4日目、細胞を0.5 mlのPBSで洗浄し、イノシトールなし/血清なし培地10 μ Mパルギリン10 mM塩化リチウム又は0.4 mlの検定培地を含む0.45 mlの検定培地及び50 m μ Lの10 $\times$ 試験化合物を10 μ Mの最終濃度に追加する。次いで、細胞を37°Cで30分間培養する。次いで、細胞を0.5 mlのPBSで洗浄し、200 μ Lの新規/氷停止溶液 (1 MのKOH; 18 mMのホウ酸ナトリウム; 3.8 mMのEDTA) を追加する/ウェル。溶液を氷の上において5分~10分間、又は細胞を溶解するまで維持し、次いで200の新規/氷停止中和ゾル (7.5% HCL) によって中和する。溶解産物を1.5 ml エッペンドルフ管に移し、1 mlのクロロホルム/メタノール (1:2) を追加する/管。溶液を15秒間攪拌し、上相をBio-rad AG1-X8TM 陰イオン交換樹脂 (100~200メッシュ) に追加する。まず、樹脂を1:1.25 W/Vにおいて水で洗浄し、0.9 mlの上相をカラムに装填する。カラムを10 mlの5 mMミオーイノシトール及び10 mlの5 mMホウ酸ナトリウム/60 mMギ酸ナトリウムで洗浄する。イノシトール三リン酸塩を2 mlの0.1 Mギ酸/1 Mギ酸アンモニウムを有する10 mlのシンチレーションカクテルを含むシンチレーションバイアルの中に溶出する。10 mlの0.1 Mギ酸/3 Mギ酸アンモニウムで洗浄することによって、カラムを再生し ddH₂Oで2回濯ぎ、水において4°Cで貯蔵する。

【0357】

実施例4

細胞内カルシウム濃度を測定するための蛍光イメージングプレートリーダー (FLIPR) 検定 (例えば、G1関連受容体)

翌日の検定のために、対象受容体 (実験) 及びそれぞれのクローン系統からのpCMV (負の制御) 安定トランスフェクション細胞を、完全培養培地 (10% FBS、2 mMのL-グルタミン、1 mMのピルビン酸ナトリウムを有するDMEM) と共に 5.5×10^4 細胞/ウェルで、ポリ-D-リシン前処置96ウェルプレート (Becton-Dickinson、#356640) の中に接種する。Fluo4-AM (Molecular Probe、#F14202) 培養緩衝液ストックを調製するために、1 mgのFluo4-AMを467 μ LのDMSO及び467 μ Lのプオロニック酸 (Molecular Probe、#P3000) に溶解し、20°Cで1月貯蔵することができる1 mMmp貯蔵溶液を得る。Fluo4-AMは、蛍光カルシウムインジケータ染料である。

【0358】

候補化合物を洗浄緩衝液において調製する (pH 7.4における1 $\times$ HBSS/2.5

mMプロベニシド／20mMのHEPES)。

【0359】

検定時、培養培地をウェルから除去し、細胞に、100 μ Lの4 μ Mフルオロ4-AM／2.5mMプロベニシド (Sigma、#P8761)／20mMのHEPES／完全培地をpH7.4において装填する37℃／5%CO₂における培養を60分間進行させることが可能である。

【0360】

1時間培養した後、Fluo4-AM培養緩衝液を除去し、細胞を100 μ L洗浄緩衝液で2回洗浄する。各ウェルに100 μ Lの洗浄緩衝液を残す。プレートを37℃／5%CO₂において60分間培養基に戻す。

10

【0361】

50 μ Lの候補化合物を30秒後に追加し、候補化合物によって誘起された細胞内カルシウム濃度 ([Ca²⁺]) の過渡的变化を更に150秒間記録するように、FLIER (Fluorometric Imaging Plate Reader; Molecular Device) をプログラムする。FLIPRソフトウェアを使用して作動薬の活性を決定するために、全蛍光変化計数を使用する。計測器ソフトウェアは、ゼロにおいて等しい初期読取りを与えるように、蛍光読取りを正規化する。

【0362】

幾つかの実施形態において、対象受容体を含む細胞は更に、G α 15、G α 16、又はキメラGq／Gi α 単位も備える。

20

【0363】

以上は、安定トランスフェクション細胞を使用する作動薬活性のFLTPR分析を提供するが、当業者であれば、作動薬活性を特徴付けるために、検定を容易に修正することができる。或いは、当業者であれば又、過渡的にトランスフェクトされた細胞を使用することができることも容易に理解するであろう。

【0364】

実施例5

MAPキナーゼ検定

MAPキナーゼ (ミトゲン活性化キナーゼ) を監視して、受容体活性化を評価することが可能である。MAPキナーゼは、幾つかの手法によって検出することができる。1つの手法は、非リン酸化 (不活性) 又はリン酸化 (活性) のリン酸エステル化状態の評価に基づく。リン酸化タンパク質は、SDS-PAGEにおいてより緩慢な可動性を有し、従って、ウェスタンブロット法を使用して、非刺激タンパク質と比較することができる。或いは、リン酸化キナーゼの増大を検出するために使用できるリン酸タンパク質に特有な抗体が利用可能である (New England Biolabs)。何れも方法でも、細胞を試験化合物で刺激し、次いで、Laemmli緩衝液で抽出する。可溶性断片をSDS-PAGEゲルに加え、タンパク質をニトロセルロース又はイモビリンに電気泳動により移動させる。免疫活性帯を標準的なウェスタンブロット法によって検出する。可視信号又は化学ルミネセンス信号を膜上において記録し、濃度測定によって定量化することが可能である。

30

40

【0365】

別の手法は、リン酸化検定によるMAPキナーゼ活性の評価に基づく。細胞を試験化合物で刺激し、可溶性抽出物を調製する。抽出物を、 γ -³²P-ATP、ATP再生システム、並びにインスリン又はPHAS-Lによって調節されるリン酸化熱及び酸安定タンパク質等MAPキナーゼに特有の基板と共に、30℃で10分間培養する。H₃PO₄を追加することによって反応を停止し、サンプルを氷に移す。リン酸化タンパク質を保持するWhatman P81クロマトグラフィーペーパーの上にアリコットをたらす。クロマトグラフィーペーパーを洗浄し、液体シンチレーションカウンターで³²Pについて計数する。或いは、細胞抽出物を、 γ -³²P-ATP、ATP再生システム、及びストレプトアビジンによってフィルター支持に結合されたビオチン化ミエリン塩基性タンパク質

50

と共に培養する。ミエリン塩基性タンパク質は、活性化MAPキナーゼの基板である。リン酸化反応を30℃で10分間実施する。次いで、リン酸化ミエリン塩基性タンパク質を保持するフィルターを経て、抽出物を吸引することができる。フィルターを洗浄し、液体シンチレーション計数によって32Pについて計数する。

【0366】

実施例6

メラニン保有細胞技術

メラニン保有細胞は、下級脊椎動物に存在する皮膚細胞である。メラニン保有細胞は、メラノソームと呼ばれる色素細胞器官を含む。メラニン保有細胞は、Gタンパク質共役受容体（GPCR）活性化の際に微小管網に沿ってこれらのメラノソームを再分配することができる。この色素移動により、細胞の外見は明るくなるか、又は暗くなる。メラニン保有細胞では、Gi結合受容体の活性化の結果である細胞内cAMPのレベルの低下により、メラノソームは細胞の中心に泳動し、その結果、色は劇的に明るくなる。次いで、Gs結合受容体の活性化に続いてcAMPレベルが上昇する場合、メラノソームは再分配され、細胞は、再び暗くなる。Gq結合受容体の活性化の結果であるジアシルグリセロールのレベルの上昇も、この再分配を誘起することができる。更に、この技術は又、ある受容体チロシンキナーゼの研究にも適している。メラニン保有細胞の応答は、受容体活性化の数分以内に行われ、簡単且つ堅調な色の変化が起きる。応答は、従来の吸収マイクロプレートリーダー又は適度なビデオイメージングシステムを使用して容易に検出することができる。他の皮膚細胞とは異なり、メラニン保有細胞は、神経堤から誘導され、シグナリングタンパク質の完全な相補体を発現すると思われる。特に、細胞は、極めて広範囲のGタンパク質を発現し、従ってほぼ全てのGPCRを機能的に発現することができる。

【0367】

メラニン保有細胞を使用して、GPCRに対して、自然リガンドを含む化合物を同定することができる。この方法は、特定の刺激に応答して色素を分散又は集合させることができる色素細胞系統の試験細胞を導入し、GPCRについて外因性クローンコーディングを発現することによって実施することができる。メラノトニン等の刺激剤が、色素配置の初期状態を設定し、色素は、GPCRの活性化が色素の分散を誘起する場合、試験細胞内で集合する。しかし、GPCRの活性化が色素凝集を誘起する場合、細胞を刺激剤で刺激することにより、色素配置の初期状態が設定される。次いで、試験細胞は化学化合物と接触し、細胞における色素配置が、色素配置の初期状態から変化したかが決定される。リガンドに限定しないが、候補化合物がGPCRに結合することによる色素細胞の配置は、ペトリ皿の上で暗く見え、一方、色素細胞の集合により、明るく見える。

【0368】

材料及び方法は、米国特許第5462856号及び米国特許第6051386号の開示内容に従う。これらの特許の開示内容は、全体が参考として本明細書に組み入れられている。

【0369】

細胞を例えば96ウェルプレートにおいて培養する（プレート当たり1つの受容体）。トランスフェクションから48時間後、各プレート上の細胞の半分を、10nMメラトニンで処置する。メラトニンは、メラニン保有細胞の内因性Gi結合受容体を活性化し、それらに色素を集合させる。細胞の残りの半分を血清なし培地0.7×L-15（Gibco）に移す。1時間後、血清なし培地の細胞は、色素分散状態にあり、一方、メラノトニン処置細胞は、色素集合状態にある。この時点で、細胞を試験／候補化合物の投与応答で処置する。プレートアウトされたGPCRが試験／候補化合物に結合する場合、メラニン保有細胞は、化合物に応答して色の変化を受けることが予期される。受容体がGs結合受容又はGq結合受容体である場合、メラノトニン集合メラニン保有細胞は、色素分散を受ける。対照的に、受容体がGi結合受容体である場合、色素分散細胞は、投与量に依存する色素集合を受けることが予測される。

【0370】

実施例 7

放射性標識化合物

特定の実施形態において、本発明のGタンパク質共役受容体のリガンドとして既知の化合物は、放射性標識される。本明細書において記述される放射性標識化合物は、化合物を特定／評価するために、遮蔽検定において使用することができる。一般的に、新たに合成又は特定された化合物（即ち、試験化合物）は、既知の放射性標識リガンドと受容体の間の複合体の形成を低減する能力によって、既知の放射性標識リガンドが受容体に結合するのを低減する能力について評価することができる。本発明の化合物において組み込むことができる適切な放射性核種には、 ^3H （Tとも書かれる）、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{125}I 、 ^{82}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{35}S 、及び ^{77}Br が含まれるが、これらに限定されない。 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{82}Br を組み込む化合物が、一般的には最も有用である。

10

【0371】

「放射性標識」化合物は、少なくとも1つの放射性核種を組み込んでいる化合物であることを理解されたい。幾つかの実施形態において、放射性核種は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、及び ^{82}Br からなる群から選択される。幾つかの実施形態において、放射性核種は、 ^3H 又は ^{14}C である。更に、本発明のGタンパク質共役受容体のリガンドであることが既知の化合物において表される全ての原子は、このような原子の最も一般的に生じる同位体、或いはよりまれな放射性同位体又は非放射性同位体とすることができることを理解されたい。

20

【0372】

本発明のGタンパク質共役受容体のリガンドであることが既知の化合物に適用可能であるものを含めて、放射性同位体を有機化合物に組み込む合成方法は、当該技術分野で周知であり、トリチウムの活性レベルを対象分子に組み込むことを含み、以下を含む：A. トリチウム気体での触媒還元—この手順は、通常、高特異活性産物をもたらす、ハロゲン化又は不飽和先駆物質を必要とする。B. ホウ化水素ナトリウム [^3H] での還元—この手順はかなり安価であり、アルデヒド、ケトン、ラクトン、エステル等、還元可能官能基を含む先駆物質を必要とする。C. アルミニウム水素リチウム [^3H] の還元—この手順は、せいぜい理論的な比放射能において産物を生成する。これは又、アルデヒド、ケトン、ラクトン、エステル等、還元可能官能基を含む先駆物質を必要とする。D. トリチウム気体暴露標識—この手順は、適切な触媒の存在下で、交換性タンパク質を含む先駆物質をトリチウム気体に暴露することを含む。E. ヨウ化メチル [^3H] を使用するN-メチル化—この手順は、適切な先駆物質を高比放射能ヨウ化メチルで処置することによって、Oメチル又はNメチルを調製するために通常使用される。この方法は一般的に、約80～87 Ci/mmole等、高い比放射能が可能である。

30

【0373】

^{125}I の活性レベルを対象分子に組み込む合成方法は、以下を含む：A. ザンドマイヤ及び同様の反応—この手順は、アリール又はヘテロアリールアミンをテトラフルオロボレート塩等のジアゾニウム塩に変換し、その後 Na^{125}I を使用して ^{125}I 標識付き化合物に変換する。代表的な手順は、Zhu, D., et al., J. Org. Chem. 2002, 67, 943-948に報告されている。B. フェノールのオルソ ^{125}I ヨウ素化—この手順は、Collier, T. L., et al., J. Labelled Compd Radiopharm. 1999, 42, S264-S266に報告されているように、フェノールのオルソ位置において ^{125}I を組み込むことが可能である。C. ^{125}I とのアリール及びヘテロアリール臭化物の交換—この方法は一般的に、2段階プロセスである。第1段階は、トリアルキル錫ハロゲン化物又はヘキサアルキルジチンが存在する状態で、例えばPd触媒反応〔即ち、 $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ 〕を使用して、或いはアリール又はヘテロアリールリチウムを経て、アリール又はヘテロアリール臭化物の対応するトリアルキル錫中間物に変換することである。

40

50

代表的な手順は、Bas, M. -D., et al., J. Labelled Compd Radiopharm. 2001, 44, S280-S282に報告されている。

【0374】

以上の技法は、例示を目的としたものであり、限定を目的としたものではないことが意図される。本発明のGタンパク質共役受容体のリガンドとして既知の化合物を放射性標識するその他の技法も、当業者に周知である。

【0375】

実施例8

受容体結合検定

試験化合物は、本発明のGタンパク質共役受容体のリガンドとして既知の化合物と受容体の間の複合体の形成を低減する能力について評価することができる。特定の実施形態において、既知のリガンドは放射性標識されている。既知の放射性標識リガンドは、化合物を特定／評価するために、遮蔽検定において使用することができる。一般的に、新たに合成又は特定された化合物（即ち試験化合物）は、既知の放射性標識リガンドと受容体の間の複合体の形成を低減する能力によって、既知の放射性標識リガンドを受容体に結合するのを低減する能力について評価することができる。

【0376】

本発明のタンパク質結合受容体のリガンドであることが既知である化合物と受容体の間の複合体を検出する検定プロトコル

A. 受容体の調製

293個の細胞に、60 μ lのリポフェクタミン（15 cm皿当たり）を使用して本発明のGタンパク質共役受容体をコードするポリスクレオチドを備える10 μ g発現ベクターを過渡的にトランスフェクトする。過渡的にトランスフェクトされた細胞を皿において培地変化と共に24時間培養し（75%コンフルエンス）、10 ml／皿のHepes-EDTA緩衝液（20 mM Hepes + 10 mMのEDTA、pH 7.4）と共に除去する。次いで、細胞をBeckman Coulter遠心分離器において、17,000 rpmで20分間遠心分離する（JA-25.50ローター）。その後、ペレットを20 mM Hepes + 1 mMのEDTA、pH 7.4に再懸濁し、50 mlダウンスホモジナイザーで均質化し、再び遠心分離する。上澄み液を除去した後、結合検定において使用するまで、ペレットを-80℃で貯蔵する。検定に使用する時、膜を氷の上で20分間解凍し、次いで10 mLの培養緩衝液（20 mM Hepes、1 mMのMgCl₂、100 mMのNaCl、pH 7.4）を追加する。次いで、膜を攪拌して粗膜ペレットを再懸濁させ、Brinkmann PT-3100ポリトロンホモジナイザーで設定条件6において15秒間均質化する。BRLブラッドフォードタンパク質検定を使用して膜タンパク質の濃度を決定する。

【0377】

B. 結合検定

完全に結合するために、適切に希釈した50 μ Lの全容積（50 mM トリスHCl（pH 7.4）、10 mMのMgCl₂、及び1 mMのEDTA；5-50 μ gのタンパク質を含む検定緩衝液において希釈）を96ウェルポリプロピレンマイクロタイタープレートに追加し、続いて、100 μ Lの検定緩衝液及び50 μ Lの既知の放射性標識リガンドを追加する。非特異的結合では、100 μ Lの代わりに50 μ Lの検定緩衝液を追加し、50 μ Lの前記放射能標識付きの既知のリガンドを追加する前に、放射性標識されていない10 μ Mの前記既知のリガンドの追加の50 μ Lを追加する。次いで、プレートを室温にて60分～120分培養する。ブランデル96ウェルプレートハーベスターでMicroplate Devices GF/Cユニフィルター（Unifilter）ろ過プレートを経て検定プレートをろ過することによって結合反応を終了し、続いて、0.9% NaClを含む50 mM トリスHCl、pH 7.4で洗浄した。次いで、ろ過プレートの底部を封止し、50 μ LのOptiPhase Supermixを各ウェルに追加し、プ

10

20

30

40

50

レートの上部を封止し、プレートをTrilux MicroBetaシンチレーションカウンターにおいて計数する。前記既知の放射性標識リガンドと前記受容体の間で形成される複合体がより少ないかを判定するために、100 u lの検定緩衝液を追加する代わりに、100 u lの適切に希釈した前記試験化合物を適切なウェルに追加し、次いで、50 u lの前記既知の放射性標識リガンドを追加する。

【0378】

試験化合物の非存在下における既知の放射性標識リガンドの特異的結合のレベルより比べて、試験化合物の存在下における既知の放射性標識リガンドの特異的結合のレベルの方が低いことは、試験化合物の非存在下よりも試験化合物の存在下において、前記既知の放射性標識リガンドと前記受容体の間の複合体が形成される量が少ないことを示す。

10

【0379】

実施例9

BRS-3が細胞内のIP3の蓄積を増大

COS-7細胞に、cDNAコード内因性ヒトBRS-3を含むpCMV発現ベクター又はpCMVベクターのみを過渡的にトランスフェクトする。細胞内IP3蓄積を全リン酸イノシトールの蓄積として読み取った。

【0380】

COS-7細胞を96ウェルプレートにおいてウェル当たり10,000細胞でプレートアウトし、一晚結合することを可能にした。次いで、リポフェクタミンTM 2000 (Invitrogen #1-1668-027)を使用して、COS-7細胞に0.5又は1.3 ng/ウェルのBRS-3/pCMV又は13 ng/ウェルの空pCMVを3回トランスフェクトした。約15時間後、トランスフェクトされたCOS-7細胞を完全培地に戻し(10% PBS、1% Lグルタミン、及び1.5 g/L重炭酸ナトリウムを含むDMEM)、細胞の培養を37℃で約8時間続行した。

20

【0381】

本明細書において記述されるように、トランスフェクションから約24時間後、COS-7細胞をIP3検定において使用した。完全培地を、1.5 g/L重炭酸ナトリウム及び4 Ci/ml [³H] ミオ-イノシトールが補足された100 µLイノシトールなし培地 (Invitrogen/Gibco処方02-5092EA; D-グルコース、L-グルタミン、フェノールレッド、及びピリドキシンHClを含み、イノシトール、重炭酸ナトリウム、ピルビン酸ナトリウムを有さないDMEM)と置き換え、細胞を37℃で約15時間培養することを可能にした。次いで、培地を吸引によって除去し、IP3培地(10 µMパルギリン及び10 mM塩化リチウムを補足したイノシトールなし培地)と置き換え、細胞を7℃で約15時間培養することを可能にした(試験化合物をBRS-3作動薬として遮蔽するため、試験化合物は、この3時間の培養に含まれる)。培養に続いて、培地を吸引によって除去し、氷冷0.1 Mギ酸を含む緩衝液と置き換えた。次いで、ドライアイスの上でまず30分培養し、完全細胞溶解を達成するために、プレートを-80℃で一晩凍結した。

30

【0382】

完全細胞溶解に続いて、検定プレートを37℃のオープンにおいて解凍した。次いで、解凍した内容物を、樹脂(Biorad、AG1-X8 100~200メッシュ、ホルメート形態)を事前に装填した96ウェルろ過プレート(Millipore、Multiscreen)に移した。真空マニホールドを使用してプレートをろ過し、樹脂を水で複数回洗浄した。次いで、溶出緩衝液を追加し(200 µL、1.0 Mギ酸アンモニウム/0.1 Mギ酸)、結果として得られる溶出物を真空下で96ウェル収集プレートにおいて収集した。溶出物の一部(200 µL)を、4 mlのシンチレーション流体を含むシンチレーションバイアルに移し、シンチレーションカウンターで計数した(Perkin Elmer Life Sciences、Optiphase Supermix又はHi-Safe3)。

40

【0383】

50

BRS-3は、検出可能なレベルの成分活性を示し、COS-7細胞におけるIP3蓄積のレベルを増大させることが判明した。図1を参照されたい。293細胞を使用して同様の結果を得た（図示せず）。

【0384】

実施例10

細胞におけるBRS-3発現のRT-PCR分析

細胞におけるBRS-3発現を判定するために、RT-PCRを使用した。GLUTagは、GLP-1生成マウス腸内分泌細胞L細胞系統である[Brubaker, et al., Endocrinology (1998) 139:4108-4114]

10

GLUTag細胞におけるBRS-3発現を以下のプライマーを使用してRT-PCRによって評価した：

5'-TCCCGCTCTCGATTATCTCTGTCT-3'（配列番号5；センス）、及び、

5'-TCCTCTCCCTTCTTGGCACCTACTG-3'（配列番号6；アンチセンス）

PCRプライマー配列番号5及び配列番号6は、イントロンにわたってBRS-3を増幅するように選択され、それにより、cDNA（508bp）の増幅産物は、ゲノムDNAから容易に区別可能である。

【0385】

20

Invitrogenから購入したトリゾール試薬を使用して、全RNAをGLUTag細胞から単離した。Bio-Rad (iScriptTM)からのcDNA合成キットを使用して、cDNA合成を実施した。2µLのcDNA及び100ngの各プライマーを含む50µLの反応混合物において、Taq Supermix (Invitrogen)を使用してPCRを実施した。制御反応は、テンプレートなし制御及びマウスゲノムDNAテンプレート制御を含んでいた。サンプルを熱サイクラに配置し、94℃で5分間培養し、30サイクル続け[94℃で30秒、57.5℃で30秒、及び72℃で1分]、最後に72℃で10分培養した。次いで、5µLの各PCR反応産物を1% / TAE アガロースゲル上で分析した。

【0386】

30

GLUTag細胞は、BRS-3を発現することが判明した。図2を参照されたい。

【0387】

実施例11

GLUTAG細胞における細胞内IPE蓄積に対するBRS-3作動薬の効果

GLUTagは、GLP-1生成マウス腸内分泌細胞L細胞系統[Brubaker, et al., Endocrinology (1998) 139:4108-4114]である。GLUTag細胞における細胞内IP3蓄積レベルに対するBRS-3作動薬の効果を判定する。

【0388】

GLUTag細胞におけるIP3検定を上述の実施例9において記述されたように実施する。GLUTag細胞を、IP3培地において3時間の培養中、BRS-3作動薬を有して又は有さずに、培養する。特定の実施形態において、BRS-3作動薬は、表Bの左列から選択される。

40

【0389】

BRS-3作動薬は、GLUTag細胞において細胞内IP3蓄積を増大させることが判明している。

【0390】

実施例12

GLUTAG細胞におけるGLP-1の分泌の刺激に対するBRS-3作動薬の効果

GLUTagは、GLP-1生成マウス腸内分泌細胞L細胞系統[Brubaker,

50

et al., Endocrinology (1998) 139:4108-4114]である。GLUTag細胞におけるGLP-1の分泌の刺激に対するBRS-3作動薬の効果を判定する。

【0391】

1日目、GLUTag細胞を完全培養培地(DMEM/10%FBS)において24ウェルプレート上でプレートアウトする。2日目、培養培地を低グルコース培地と置き換える(DMEM/3mMのグルコース/10%FBS)。3日目、細胞を1×PBSで2回洗浄する。組織培養培養器において37℃及び5%CO₂において1時間、15mMグルコースを有する血清なしDMEMにおける正の制御として、洗浄したGLUTag細胞を種々の濃度(約1nM~約10μM、例示として非限定的)においてBRS-3作動薬で、又はフォルスコリン(1μM)で刺激する。次いで、上澄み液を収集し、500g及び4℃で5分間遠心分離によって浄化する。LINCO Research Laboratory [Glucagon-Like Peptide-1 (Active) ELISA Kit, カタログ番号DGLP-35K] から購入した試薬を使用して、ELISAによって上澄み液の中に放出されたGLP-1を決定する。

10

【0392】

GLUTag細胞は、BRS-3作動薬で刺激される時、GLP-1を分泌することが判明している。

【0393】

実施例13

マウスの経口グルコース耐性試験(oGTT)において上昇した血中グルコースレベルを低下させることにおけるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の効果

マウスの経口グルコース耐性試験(oGTT)を本明細書において記述されるように実施する。

20

【0394】

oGTT検定において、治療上有効量は、通常、30%を超えるAUC阻害を生成する薬剤の量であり、一方、治療に無効な量は、通常、30%以下のAUC阻害を生成する薬剤の量である。

【0395】

一晩断食したマウス(処置当たりn=6マウス)に経口強制栄養により、BRS-3作動薬[例えば、単独で使用される時治療に有効な約0.1mg~約1mgの間の投与量において(体重のキログラム当たりミリグラム化合物)]、DPP-IV阻害剤[例えば、単独で使用される治療に無効な約0.1mg~約1mgの投与量において]、又はBRS-3作動薬とDPP-IV阻害剤の組み合わせ(例えば、以上の治療上無効な投与量において)をヒビクル(PET)と共に投与する。30分後、グルコースの塊(3g/k g)を経口により送達する。尾の切れ目から収集した血液(~5μL)及びグルコースメーターを使用して、血漿グルコースレベルを2時間の期間にわたり約20分間隔で決定する。6匹のマウスからのデータに基づいて糖血可動域曲線をグラフにし、平均値+/-SEMで与える。糖血可動域の曲線下面積(AUC)を各マウスについて計算し、AUC阻害(%)を決定する。

30

40

【0396】

BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせは、BRS-3作動薬単独又はDPP-IV阻害剤単独と比較して、相乗AUC阻害を生成することが判明している。

【0397】

BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の一定量の組み合わせは、BRS-3作動薬単独の量又はDPP-IV阻害剤単独の量と比較して、相乗AUC阻害を生成することが判明している。

【0398】

実施例14

糖尿病及びそれに関連する病態を処置又は予防するBRS-3作動薬及びDPP-IV

50

阻害剤の組み合わせ

本発明によるBRS-3作動薬を選択する。本発明によるDPP-IV阻害剤を選択する。

【0399】

マウス経口グルコース耐性試験(oGTT)における曲線下面積(AUC)のパーセント阻害に関するBRS-3作動薬の滴定を、約0.01mg(体重のキログラム当たりミリグラム化合物)～約100mgの投与量範囲にわたって決定する。上記の実施例13を参照されたい。約15～20%の糖血可動域のAUC阻害を生成するBRS-3作動薬の投与量を選択する。通常、30%以下の糖血可動域のAUC阻害を生成するBRS-3作動薬の投与量は、このマウスモデルでは治療上無効である。

10

【0400】

マウス経口グルコース耐性試験(oGTT)における曲線下面積(AUC)のパーセント阻害に関するDPP-IV阻害剤の滴定を、約0.01mg(体重のキログラム当たりミリグラム化合物)～約100mgの投与量範囲にわたって決定する。上記の実施例13を参照されたい。約15～20%の糖血可動域のAUC阻害を生成するDPP-IV阻害剤の投与量を選択する。通常、30%以下の糖血可動域のAUC阻害を生成するDPP-IV阻害剤の投与量は、このマウスモデルにおいて治療上無効である。

【0401】

BRS-3作動薬の選択投与量及びDPP-IV阻害剤の選択投与量の組み合わせによって生成される糖血のAUC阻害を、マウスoGTT検定において決定する。BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせの治療効率を決定する。通常、約30%を超えるAUC阻害を生成する組み合わせの量は、このマウスモデルにおいて治療上有効である。BRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の間の相乗作用を決定する。

20

【0402】

このマウスモデルから得たデータを使用して、ヒトに使用される投与量の範囲を処方することができる。一般的に、当業者であれば、動物モデル系において得たin vivoデータをヒト等のその他にどのように外挿するかを理解している。本発明によるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせは、糖尿病及びそれに関連する病態を処置又は予防するのに有用である。

【0403】

以上は、例示であり、限定ではないことを理解されたい。

30

【0404】

実施例15

マウスにおけるグルコースチャレンジ試験後に血中GLP-1レベルを増大させることにおけるBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の効果

C57b1k/6の雄マウス(8週齢)を18時間断食させ、各群についてn=6で12群に無作為に割り当てる。BRS-3作動薬[例えば、単独で使用される時治療上有効な約0.01mg～約1mg(体重のキログラム当たりミリグラム化合物)の間の投与量における]、DPP-IV阻害剤[例えば、単独で使用される時治療上無効な約0.01mg～約1mg(体重のキログラム当たりミリグラム化合物)の間の投与量における]、又はBRS-3作動薬及びDPP-IV阻害剤の組み合わせ(例えば、上記の治療上無効な量において)をマウスに経口でビヒクル(PET)と共に投与する。処置の30分後、3g/kgのグルコースの塊を経口で投与し、血漿を0分(グルコースの塊なし)、並びにグルコースの塊の2分後及び5分後に収集する。Linco Research Laboratory [Glucagon-Like Peptide-1 (Active) ELISAキット、カタログ番号DGLP-35K] から購入したGLP-1 ELISAキットを使用することによって、血漿GLP-1レベルを決定する。

40

【0405】

BRS-3作動薬をDPP-IV阻害剤と共に投与することにより、GLP-1レベルを増大させることにおいて相乗効果を生成することが判明している。

50

【0406】

一定量のBRS-3作動薬を一定量のDPP-IV阻害剤と組み合わせて投与することにより、その量のBRS-3作動薬単独の量によって与えられる効果及びその量のDPP-IV阻害剤単独の量によって与えられる効果より大きく血中GLP-1レベルを増大させる効果が生成されることが判明している。

【0407】

実施例16

BRS-3作動薬活性の酵母受容体

酵母細胞に基づくレポーター検定は、文献において以前に記載されている（例えば、Miret, et al., J Biol Chem (2002) 277:6881-6887; Campbell, et al., Bioorg Med Chem Lett (1999) 9:2413-2418; King, et al., Science (1990) 250:121-123; WO 99/14344; WO 00/12704; 及び米国第6100042号を参照されたい）。簡潔には、酵母細胞は、内因性酵母G- α (GPA-1) が排除され、複数の技法を使用して構築されたGタンパク質キメラと置き換えられるように加工された。更に、内因性酵母 α 細胞GPCR、Ste3が、選択される哺乳動物GPCRが均質に発現することを見込むために、排除された。酵母では、真核細胞（例えば、ミトゲン活性化タンパク質キナーゼ経路）において保存されるフェロモンシグナリング導入経路の要素が、Fus1の発現を駆動する。 β -ガラクトシダーゼ (LacZ) をFus1促進剤の (Fus1p) 制御下に置くことによって、システムは発展し、それにより、受容体活性化が酵素の読出しをもたらす。

【0408】

酵母細胞をAgatepらによって記載された酢酸リチウム適合法することによって変換する (Agatep, et al., 1998, Transformation of Saccharomyces cerevisiae by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online, Trends Journals, Elsevier)。簡潔には、酵母トリプトンプレート (YT) 上において酵母細胞を一晩成長させる。担体単鎖DNA (10 μ g)、2つのFus1p-LacZレポータープラスミドのそれぞれの2 μ g (1つがURA選択マーカーを有し、1つがTRPを有する)、酵母発現ベクター (2 μ gの複製の元) における2 μ gのBRS-3 (例えばヒト受容体)、及び酢酸リチウム/ポリエチレングリコール/TE緩衝液をエッペンドルフ管にピペットで移す。受容体制御/受容体制御なしを含む酵母発現プラスミドは、LEUマーカーを有する。酵母細胞をこの混合物に接種し、反応を30°Cで60分間進行させる。次いで酵母細胞に42°Cで15分熱ショックを与える。次いで、細胞を洗浄し、選択プレートの上に広げる。選択プレートは、LEU、URA、及びTRP (SD-LUT) を除いた合成確定酵母培地である。30°Cで2日~3日培養した後、選択プレート上に成長したコロニーをLacZ調製において試験する。

【0409】

β -ガラクトシダーゼについて蛍光酵素検定を実施するために、対象BRS-3受容体を搬送する酵母細胞を液体SD-LUT培地において不飽和濃度まで一晩成長させる（即ち、細胞は、依然として分割しており、まだ静止状態に到達していない）。これを新規の培地で最適検定濃度まで希釈し、90 μ Lの酵母細胞を96ウェルブラックポリスチレンプレート (Costar) に追加する。DMSOに溶解し、10% DMSO溶液において10 $\times$ 濃度まで希釈された試験化合物をプレートに追加することができ、プレートを30°Cで4時間置く。4時間後、 β -ガラクトシダーゼの基質を各ウェルに追加する。これらの実験では、フルオレセインを放出し、蛍光読取りを可能にする酵素基質であるフルオレセインジ (β -D-ガラクトピラノシド) を使用する (FDG)。500 μ MのFDG/2.5%トリトンX100のウェル当たり20 μ Lを追加する（洗浄剤は、細胞を浸透性にす

るために必要である)。細胞を基質と共に60分間培養した後、反応を終了させ蛍光信号を促進するために、ウェル当たり20 μ Lの1M炭酸ナトリウムを追加する。次いで、プレート485/535nmにおいて蛍光計で読み取る

空のベクターで変換された酵母細胞の場合に対するBRS-3変換酵母細胞における蛍光信号色素分散の増大は、試験化合物がBRS-3受容体の機能性を刺激する化合物であることを示す。

【0410】

以上の明細書では、例示の目的で示した実施例と共に本発明の原理を教示しているが、本発明の実施は、以下の特許請求の範囲及びその等価物の範囲内に含まれるように、通常の変更、適応又は改変の全てを包含することが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

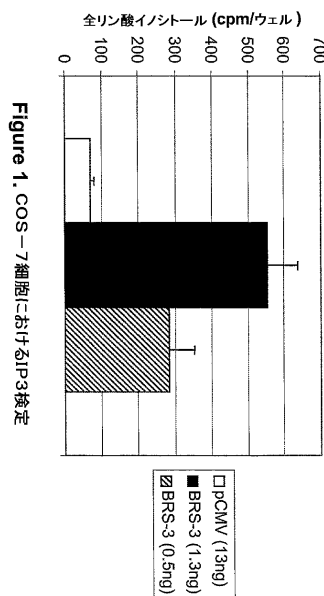
【0411】

本発明は、本明細書に添付する以下の図面と関連させて例示する。

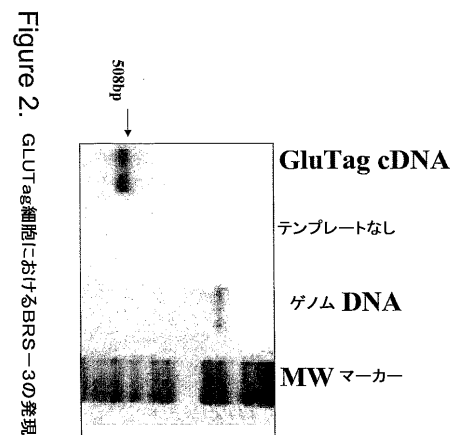
【図1】BRS-3による細胞内IP3蓄積の増大を示す。実施例9を参照。

【図2】GLUTag細胞におけるBRS-3の発現を示す。実施例10を参照。

【図1】



【図2】



【配列表】

0005774264000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 レオナード, ジェームス エヌ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92124, サン ディエゴ, ビアチャ 11326

合議体

審判長 内藤 伸一

審判官 田村 明照

審判官 大久保 元浩

(56)参考文献 Journal of Biological Chemistry, 1998年, Vol. 273, No. 22, p13613-13624
Journal of Peptide Science, 2005年 3月, Vol. 11, No. 3, p136-141
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2004年, Vol. 310, No. 3, p1161-1170
Journal of Biological Chemistry, 2001年, Vol. 276, No. 12, p9219-9229
Frontiers in Gastroenterology, 2000年, Vol. 5, No. 3, p324-330
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004年, Vol. 318, No. 3, p698-703
Endocrinology, 1998年, Vol. 139, No. 10, p4108-4114

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K31/00-45/08

CA (STN)、Biosis (STN)、Medline (STN)、Embase (STN)、JSTplus、JMEDplus、JST7580