

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：9411961 9411561

※申請日期：94 4 1

※IPC 分類：A61K ^{31/381, 31/41, 31/435}
^{G01N 33/50}
^{A61P 3/00}

一、發明名稱：(中文/英文)

用於治療高血糖症及相關疾病之人類 G 蛋白偶合受體及其調節物
 HUMAN G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR AND MODULATORS
 THEREOF FOR THE TREATMENT OF HYPERGLYCEMIA AND
 RELATED DISORDERS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商艾尼納製藥公司
 ARENA PHARMACEUTICALS, INC.

代表人：(中文/英文)

大衛 L 布萊福
 BRADFUTE, DAVID L.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加利福尼亞州聖地牙哥市南西脊道 6166 號
 6166 NANCY RIDGE DRIVE SAN DIEGO CALIFORNIA 92121, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 強邱
QIU, JUN
2. 羅伯特 R 偉伯
WEBB, ROBERT R.
3. 大衛 J 烏尼特
UNETT, DAVID J.
4. 喬爾 E 蓋林
GATLIN, JOEL E.
5. 丹尼爾 T 坎勒里
CONNOLLY, DANIEL T.

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 U.S.A.
2. 美國 U.S.A.
3. 英國 U.K.
4. 美國 U.S.A.
5. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2004年04月13日；60/561,954

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

本申請案係請求來自下列臨時申請案之優先權益，該申請案係經由具有美國專利商標局之美國快遞郵件，於所指示之日期提出申請：2004年4月13日提出申請之美國臨時案號60/561,954。前述臨時申請案之揭示內容係以其全文併於本文供參考。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於確認一或多種候選化合物是否為G蛋白偶合受體(GPCR)調節物或血糖濃度調節物之方法。在某些具體實施例中，GPCR係為人類。本發明亦關於使用GPCR調節物之方法。較佳調節物為催動劑。本發明之催動劑可作為治療劑使用，以降低血糖濃度，預防或治療某些代謝病症，譬如胰島素抗藥性、減弱之葡萄糖容許度及糖尿病，及預防或治療高血糖濃度之併發症，譬如動脈粥瘤硬化、心臟疾病、中風、高血壓及末梢血管疾病。

【先前技術】

下文討論係意欲幫助本發明之瞭解，但並不意欲亦不承認其成為本發明之先前技藝。

A. 高血糖

血糖濃度典型上係被保持在狹窄範圍內。於血糖濃度上之升高通常會導致增加胰島素之釋出，然後其係作用於標的細胞以增加葡萄糖吸收。血糖等穩性之調節功能障礙可能會導致持久高血糖濃度或高血糖。一些具有高血糖之個人可進行以發展第2型糖尿病。組織之慢性曝露至高血糖可

能會造成各種不同併發症，包括神經病、視網膜病及腎病之微血管問題，以及中風、冠狀心臟疾病及末梢血管疾病之巨血管併發症。高血糖為主要且成長中之醫療問題，需要更良好管理選擇 [Nesto, 於心血管醫藥上之回顧 (2003) 4: S11-S18; 其揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。

B. G 蛋白偶合受體

雖然有許多受體種類存在於人類中，但顯然最豐富且治療上有關聯者係以 G 蛋白偶合受體 (GPCR) 種類為代表。據估計有大約 30,000-40,000 基因在人類基因組內，且估計其中大約 2% 係使 GPCR 編碼。

GPCR 係代表醫藥產物發展之一個重要領域：從 100 種已知 GPCR 之大約 20 種，已發展出所有處方醫藥之大約 60%。例如，在 1999 年，於前 100 種品牌名稱處方藥物中，下列藥物係與 GPCR 交互作用 (相關於該藥物經治療之主要疾病及 / 或病症係指示於括弧中)：

Claritin® (過敏反應)	Prozac® (抑鬱)	Vasotec® (高血壓)
Paxil® (抑鬱)	Zoloft® (抑鬱)	Zyprexa® (精神病症)
Cozaar® (高血壓)	Imitrex® (偏頭痛)	Zantac® (回流)
Propulsid® (回流疾病)	Risperdal® (精神分裂症)	Serevent® (氣喘)
Pepcid® (回流)	Gaster® (潰瘍)	Atrovent® (枝氣管痙攣)
Effexor® (抑鬱)	Depakote® (癲癇)	Cardura® (前列腺肥大)
Allegra® (過敏反應)	Lupron® (前列腺癌)	Zoladex® (前列腺癌)
Diprivan® (麻木)	BuSpar® (焦慮)	Ventolin® (枝氣管痙攣)
Hytrin® (高血壓)	Wellbutrin® (抑鬱)	Zyrtec® (鼻炎)

Plavix[®] (MI/ 中風) Toprol-XL[®] (高血壓) Tenormin[®] (絞痛)
 Xalatan[®] (青光眼) Singulair[®] (氣喘) Diovan[®] (高血壓)
 Harnal[®] (前列腺增生)

(Med Ad 新聞 1999 資料)。

GPCR 係共用一個共同結構主體，具有介於 22 至 24 個疏水性胺基酸間之七種順序，其係形成七種 α 螺旋結構，其每一個係跨越細胞膜 (各跨距係藉由數目確認，意即跨膜 -1 (TM-1)、跨膜 -2 (TM-2) 等)。跨膜螺旋結構係藉由跨膜 -2 與跨膜 -3、跨膜 -4 與跨膜 -5 及跨膜 -6 與跨膜 -7 間之胺基酸股鏈，在細胞膜之外部或 "胞外" 側面上接合 (此等係個別被稱為 "胞外" 區域 1、2 及 3 (EC-1、EC-2 及 EC-3))。跨膜螺旋結構亦藉由跨膜 -1 與跨膜 -2、跨膜 -3 與跨膜 -4 及跨膜 -5 與跨膜 -6 間之胺基酸股鏈，在細胞膜之內部或 "胞內" 側面接合 (此等係個別被稱為 "胞內" 區域 1、2 及 3 (IC-1、IC-2 及 IC-3))。受體之 "羧基" ("C") 末端係位於細胞內之胞內空間中，而受體之 "胺基" ("N") 末端係位於細胞外部之胞外空間中。

一般而言，當配位體與受體結合時 (經常被稱為受體之 "活化作用")，於受體構形上有變化，這有助於在胞內區域與胞內 "G-蛋白質" 間之偶合。已報告 GPCR 關於 G 蛋白質係為 "混雜"，意即 GPCR 可與超過一種 G 蛋白質交互作用。參閱 Kenakin, T., 43 生命科學期刊 1095 (1988)。雖然有其他 G 蛋白質存在，但目前 Gq、Gs、Gi、Gz 及 Go 係為已被確認之 G 蛋白質。與 G-蛋白質偶合之配位體活化 GPCR 會引發一種發出訊息級聯反應過程 (被稱為 "訊息轉導")。在正常條件下，訊

息轉導最後會造成細胞活化或細胞抑制。雖然不希望被理論所束縛，但一般認為 IC-3 圈環以及受體之羧基末端會與 G 蛋白質交互作用。

亦有混雜 G 蛋白質，其顯示會使數種 GPCR 類別偶合至磷脂酶 C 途徑，譬如 $G\alpha_{15}$ 或 $G\alpha_{16}$ [Offermanns & Simon, J Biol Chem (1995) 270: 15175-80]，或經設計之嵌合 G 蛋白質，以使極大數目之不同 GPCR 偶合至相同途徑，例如磷脂酶 C [Milligan & Rees, 醫藥科學上之趨勢 (1999) 20: 118-24]。

在生理學條件下，GPCR 係存在於細胞膜中，在兩種不同構形之間呈平衡："不活性"狀態與"活性"狀態。呈不活性狀態之受體不能夠連結至胞內發出訊息轉導途徑以引發導致生物回應之訊息轉導。改變受體構形至活化態，允許連結至轉導途徑(經由 G-蛋白質)並產生生物回應。

受體可藉由配位體或化合物譬如藥物，被安定化呈活性狀態。最近之發現，包括但並非唯一限制於修正成受體之胺基酸順序，其係提供配位體或藥物以外之方式，以促進並使受體安定化呈活性狀態構形。此等方式係藉由模擬配位體結合至受體之作用，有效地使受體安定化呈活性狀態。藉由此種與配位體無關方式之安定化作用，係被稱為"構成受體活化作用"。

D. RUP43

最近已報告 RUP43 (其中應明瞭的是，內源 RUP43 可為 GPR131，例如 GenBank® 收受號碼 NM_170699) 係充作膽汁酸之受體 [歐洲專利申請案號 02717114.9，以 EP1378749 於 2004 年 1

月7日公告；及Kawamata等人, J Biol Chem (2003) 278: 9435-9440；其中每一案之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。據報告RUP43在白血球內之表現對單細胞係為專一，且據報告作用於單細胞RUP43之膽汁酸係抑制腫瘤壞死因子 α (TNF α)之表現。經揭示於EP1378749中之化合物可使用於本發明方法中。

【發明內容】

申請人已意外地發現RUP43之催動劑會增加葡萄糖在脂肪細胞與骨骼肌細胞中之吸收。申請人揭示RUP43之催動劑具有令人意外之利用性，用以降低哺乳動物中之血糖濃度。申請人進一步揭示對於RUP43具有催動劑活性之新穎化合物，及供其使用之用途。

在**第一**方面，本發明之特徵為一種確認一或多種候選化合物作為RUP43 GPCR調節物之方法，該受體包含GPR131胺基酸順序，其中受體係偶合至G蛋白質；其包括以下步驟：

- (a) 使候選化合物與受體接觸；與
- (b) 測定受體功能性是否經調節；

其中於受體功能性上之變化係為候選化合物為RUP43 GPCR調節物之指標。

在某些具體實施例中，GPR131胺基酸順序係選自包括：

- (a) 順序識別碼：2之胺基酸順序；
- (b) 順序識別碼：2之胺基酸2-330；
- (c) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其附帶條件是RUP43 G蛋白質偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2之

胺基酸位置1上；

- (d) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類DNA試樣上，使用引物順序識別碼：3與順序識別碼：4進行PCR；
- (e) 順序識別碼：6之胺基酸順序；
- (f) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類DNA試樣上，使用引物順序識別碼：7與順序識別碼：8進行PCR；
- (g) 順序識別碼：2之胺基酸順序，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (h) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (i) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代，其附帶條件是RUP43 G蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2之胺基酸位置1上；及
- (j) 被多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至順序識別碼：1之補體。

在某些具體實施例中，該RUP43 GPCR係為重組。在某些具體實施例中，該接觸包括與表現GPCR之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜接觸，其中該宿主細胞包含表現載體，此載體包含使該受體編碼之多核苷酸。

在一些具體實施例中，該接觸係於GPCR之已知配位體存在下進行。在一些具體實施例中，該接觸係於GPCR之已知調節物存在下進行。在一些具體實施例中，該接觸係於GPCR之已知催動劑存在下進行。在一些具體實施例中，該GPCR之已知催動劑為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該GPCR之已知催動劑為化合物1。在一些具體實施例中，該GPCR之已知催動劑為化合物2。在一些具體實施例中，該GPCR之已知催動劑為化合物3。在一些具體實施例中，該已知催動劑對該測定方式係於約EC50至約EC75下存在。

本發明亦關於一種在哺乳動物中確認一或多種候選化合物作為血糖濃度調節物之方法，其包括以下步驟：

(a) 使候選化合物與包含GPR131胺基酸順序之GPCR接觸，其中受體係偶合至G蛋白質；與

(b) 測定受體功能性是否被調節；

其中於受體功能性上之變化係為候選化合物為在哺乳動物中血糖濃度調節物之指標。

在某些具體實施例中，GPR131胺基酸順序係選自包括：

(a) 順序識別碼：2之胺基酸順序；

(b) 順序識別碼：2之胺基酸2-330；

(c) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其附帶條件是RUP43 G蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2之胺基酸位置1上；

(d) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之

胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類DNA試樣上，使用引物順序識別碼：3與順序識別碼：4進行PCR；

- (e) 順序識別碼：6之胺基酸順序；
- (f) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，包括在人類DNA試樣上，使用引物順序識別碼：7與順序識別碼：8進行PCR；
- (g) 順序識別碼：2之胺基酸順序，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (h) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (i) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代，其附帶條件是RUP43 G蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2之胺基酸位置1上；及
- (j) 被多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至順序識別碼：1之補體。

在某些具體實施例中，於受體功能性上之增加係為候選化合物為會降低哺乳動物中血糖濃度之化合物之指標。

在某些具體實施例中，該GPCR係為重組。在某些具體實施例中，該接觸包括與表現GPCR之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜接觸，其中該宿主細胞包含表現載體，此載體包含使該受體編碼之多核苷酸。

在一些具體實施例中，該接觸係於GPCR之已知配位體存在下進行。在一些具體實施例中，該接觸係於GPCR之已知調節物存在下進行。在一些具體實施例中，該接觸係於GPCR之已知催動劑存在下進行。在一些具體實施例中，該GPCR之已知催動劑為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該GPCR之已知催動劑為化合物1。在一些具體實施例中，該GPCR之已知催動劑為化合物2。在一些具體實施例中，該GPCR之已知催動劑為化合物3。在一些具體實施例中，該已知催動劑對該測定方式係於約EC50至約EC75下存在。

在某些具體實施例中，該一或多種候選化合物不為抗體或其抗原結合衍生物。

在某些具體實施例中，該一或多種候選化合物不為肽。

在某些具體實施例中，該一或多種候選化合物不為膽汁酸。

在一些具體實施例中，GPR131胺基酸順序係為順序識別碼：2之胺基酸順序。在一些具體實施例中，GPR131胺基酸順序係為順序識別碼：2胺基酸順序之變種。在一些具體實施例中，該順序識別碼：2胺基酸順序之變種係為該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物。在一些具體實施例中，該順序識別碼：2之胺基酸順序之變種係為該胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之非內源構成上活化突變種。在某些具體實施例中，該順序識別碼：2之胺基酸順序之變種係為該胺基酸

順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之生物活性片段。在某些具體實施例中，該順序識別碼：2之胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之生物活性片段，係為順序識別碼：2之胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物，不存在N-末端甲硫胺酸。在某些具體實施例中，該順序識別碼：2之胺基酸順序之變種係為至少約75%，至少約80%，至少約85%，至少約90%，至少約91%，至少約92%，至少約93%，至少約94%，至少約95%，至少約96%，至少約97%，至少約98%或至少約99%，相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。

在一些具體實施例中，該順序識別碼：2胺基酸順序之變種係為至少約90%，至少約91%，至少約92%，至少約93%，至少約94%，至少約95%，至少約96%，至少約97%，至少約98%或至少約99%相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。

在某些具體實施例中，該包含GPR131胺基酸順序之RUP43 GPCR係為進一步包含一或多種抗原決定部位標記之融合蛋白質。在一些具體實施例中，該包含一或多種抗原決定部位標記之融合蛋白質為順序識別碼：6之胺基酸順序。

在某些具體實施例中，該G蛋白質會導致胞內cAMP含量上之增加。在一些較佳具體實施例中，該G蛋白質為Gs。

在某些具體實施例中，該G蛋白質為百日咳毒素敏感性。在某些具體實施例中，該G蛋白質為Gi或Go。在某些具體

實施例中，該G蛋白質為Gi。在某些具體實施例中，該G蛋白質為Go。

在某些具體實施例中，該G蛋白質為G α 15或G α 16。在某些具體實施例中，該G蛋白質為G α 15。在某些具體實施例中，該G蛋白質為G α 16。

在某些具體實施例中，該G蛋白質為Gq。

在某些具體實施例中，該方法進一步包括將藉由候選化合物所造成之受體調節，和經由使受體與受體之已知調節物接觸所造成之受體第二種調節作比較之步驟。在某些具體實施例中，該已知調節物為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為化合物1、化合物2或化合物3。在某些具體實施例中，該催動劑為化合物1。在某些具體實施例中，該催動劑為化合物2。在某些具體實施例中，該催動劑為化合物3。

在一些較佳具體實施例中，該測定或該比較係經過GTP γ S結合至包含該GPCR之細胞膜之度量。在某些具體實施例中，該GTP γ S係以 $[^{35}\text{S}]$ 標識。

在某些具體實施例中，該測定或該比較係經過第二信使含量之度量，該第二信使係選自包括環AMP(cAMP)、環GMP(cGMP)、肌醇三磷酸鹽(IP₃)、二醯基甘油(DAG)、MAP激酶活性及Ca²⁺。在某些較佳具體實施例中，該第二信使為cAMP。在某些較佳具體實施例中，cAMP之含量係被增加。在某些具體實施例中，該cAMP之度量係使用全細胞腺苷基環化酶檢測進行。在某些具體實施例中，該cAMP之度量係

使用包含該 GPCR 之細胞膜進行。在某些具體實施例中，該第二信使為 MAP 激酶活性。在某些具體實施例中，MAP 激酶活性之含量係被增加。

在一些較佳具體實施例中，該測定或該比較係經過 CRE-報告子檢測。在某些具體實施例中，該報告子為蟲螢光素酶。在一些具體實施例中，該報告子為 β -半乳糖苷酶。

在某些具體實施例中，該測定或該比較係經過胞內 IP_3 之度量。

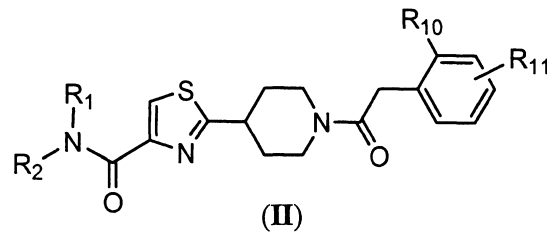
在某些具體實施例中，該測定或該比較係經過胞內 Ca^{2+} 之度量。

在某些具體實施例中，該測定或該比較係經過得自哺乳動物之脂肪細胞之葡萄糖吸收之度量。

在某些具體實施例中，該測定或該比較係經過得自哺乳動物之骨骼肌細胞之葡萄糖吸收之度量。

在某些較佳具體實施例中，該測定或該比較係經由利用黑色素細胞檢測。

於第二方面，本發明之特徵為式 (II) 化合物：



或其藥學上可接受之鹽，

其中：

R_1 為 H 或 C_{1-6} 烷基；

R_2 為 2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡啶-3-基；或

R_1 與 R_2 和 彼等所結合之氮一起形成 3,4-二氫-2H-喹啉-1-基；及

R_{10} 與 R_{11} 各獨立為 H 或鹵素。

於**第三**方面，本發明之特徵為根據第一方面之方法所確認之 GPCR 調節物。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物不為膽汁酸。在某些具體實施例中，調節物為會增加得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會增加得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。

本發明之特徵亦為可根據第一方面之方法確認之 GPCR 調節物。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會增加得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會增加得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。

在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些具體實施例中，該調節物為催動劑。在某些具體實施例中，該調節物為部份催動劑。在某些具體實施例中，該調節物為逆催動劑。在某些具體實施例中，該調節物為拮抗劑。

在某些具體實施例中，該調節物較佳為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞cAMP檢測，使用經轉染HEK293細胞進行，該細胞會表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞會表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ ，在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $900\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $800\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $700\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $600\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $500\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $400\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $300\ \text{nM}$ 在該檢測中，

低於 200 nM 在該檢測中，低於 100 nM 在該檢測中，低於 90 nM 在該檢測中，低於 80 nM 在該檢測中，低於 70 nM 在該檢測中，低於 60 nM 在該檢測中，低於 50 nM 在該檢測中，低於 40 nM 在該檢測中，低於 30 nM 在該檢測中，低於 20 nM 在該檢測中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 10 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 1 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

在一些具體實施例中，該調節物係對 GPCR 具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物 1 ("化合物 #1"，參閱表 1)、化合物 2 ("化合物 #2"，參閱表 1) 或化合物 3 ("化合物 #3"，參閱表 1)。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 3。

在一些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率為至少 1%，至少 5%，至少 10%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在一些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進

一步能夠越過血液-腦部障壁。

於**第四**方面，本發明之特徵為一種製備藥學或生理學上可接受組合物之方法，其包括將載劑與RUP43 GPCR之調節物混合，該受體包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物係為會增加得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物係為會增加得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，調節物為部份催動劑。在某些具體實施例中，調節物為逆催動劑。在某些具體實施例中，調節物為拮抗劑。在某些具體實施例中，調節物較佳為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

本發明之特徵亦為一種製備醫藥或生理學上可接受組合物之方法，其包括確認RUP43 GPCR之調節物，其中該受體包含GPR131胺基酸順序，然後將載劑與調節物混合，其中調節物係可藉由根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物較佳為催動劑。在某些具體實施例中，調節物係為會

增加得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物係為會增加得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，調節物為部份催動劑。在某些具體實施例中，調節物為逆催動劑。在某些具體實施例中，調節物為拮抗劑。在某些具體實施例中，調節物較佳為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在某些具體實施例中，該組合物係為醫藥。在某些具體實施例中，該組合物為生理學上可接受。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞cAMP檢測，使用經轉染HEK293細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測

中具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $900\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $800\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $700\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $600\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $500\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $400\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $300\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $200\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $100\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $90\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $80\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $70\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $60\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $50\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $40\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $30\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $20\ \text{nM}$ 在該檢測中或低於 $10\ \text{nM}$ 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。

在一些具體實施例中，該調節物係對 GPCR 具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 3。

在一些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在一些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

於**第五**方面，本發明之特徵為調節RUP43 GPCR活性之方法，該受體包含GPR131胺基酸順序，其包括使受體與受體之調節物接觸之步驟。在某些具體實施例中，調節物係可藉由根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，調節物為部份催動劑。在某些具體實施例中，調節物為逆催動劑。在某些具體實施例中，調節物為拮抗劑。在某些具體實施例中，調節物較佳為催動劑。在某些具體實施例中，調節物係為會增加得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物係為會增加得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某

些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

本發明之特徵亦為調節 RUP43 GPCR 活性之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其包括使受體與該受體之調節物接觸之步驟，其中調節物係可藉由第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，調節物為部份催動劑。在某些具體實施例中，調節物為逆催動劑。在某些具體實施例中，調節物為拮抗劑。在某些具體實施例中，調節物較佳為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50}

係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞 cAMP 檢測，使用經轉染 HEK293 細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 10 μM ，低於 1 μM ，低於 100 nM 或低於 10 nM。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 10 μM 在該檢測中，低於 9 μM 在該檢測中，低於 8 μM 在該檢測中，低於 7 μM 在該檢測中，低於 6 μM 在該檢測中，低於 5 μM 在該檢測中，低於 4 μM 在該檢測中，低於 3 μM 在該檢測中，低於 2 μM 在該檢測中，低於 1 μM 在該檢測中，低於 900 nM 在該檢測中，低於 800 nM 在該檢測中，低於 700 nM 在該檢測中，低於 600 nM 在該檢測中，低於 500 nM 在該檢測中，低於 400 nM 在該檢測中，低於 300 nM 在該檢測中，低於 200 nM 在該檢測中，低於 100 nM 在該檢測中，低於 90 nM 在該檢測中，低於 80 nM 在該檢測中，低於 70 nM 在該檢測中，低於 60 nM 在該檢測中，低於 50 nM 在該檢測中，低於 40 nM 在該檢測中，低於 30 nM 在該檢測中，低於 20 nM 在該檢測中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 10 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 1 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有

EC₅₀ 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

在一些具體實施例中，該調節物係對 GPCR 具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 3。

在一些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 1%，至少 5%，至少 10%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在一些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該接觸包括投予調節物至包含該受體之細胞膜。

在某些具體實施例中，該接觸包括投予調節物至包含該受體之細胞。

在某些具體實施例中，該接觸包括投予調節物至包含該受體之組織。

在某些具體實施例中，該接觸包括投予調節物至包含該受體之個體。在某些具體實施例中，該調節物對包含該受體之個體之投藥係為口服。在某些具體實施例中，該個體

係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於**第六**方面，本發明之特徵為一種調節 RUP43 GPCR 活性之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中該調節係為在需要該調節之個體中降低血糖濃度，其包括使該受體與治療上有效量之受體調節物接觸。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。

本發明之特徵亦為一種調節 RUP43 GPCR 活性之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中該調節係為在需要該調節之個體中預防或治療新陳代謝病症，其包括使該受體與治療上有效量之受體調節物接觸。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第

2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種調節RUP43 GPCR活性之方法，該受體包含GPR131胺基酸順序，其中該調節係為在需要該調節之個體中預防或治療高血糖濃度之併發症，其包括使該受體與治療上有效量之受體調節物接觸。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實

施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，調節物係可藉由根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或

化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞cAMP檢測，使用經轉染HEK293細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽。在一

些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $900\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $800\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $700\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $600\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $500\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $400\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $300\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $200\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $100\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $90\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $80\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $70\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $60\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $50\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $40\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $30\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $20\ \text{nM}$ 在該檢測中或低於 $10\ \text{nM}$ 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。

在某些具體實施例中，該接觸包括該調節物對該個體之口服投藥。在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、

貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。
在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於**第七**方面，本發明之特徵為一種在需要降低之個體中降低血糖濃度之方法，其包括使治療上有效量之RUP43 GPCR調節物與該受體接觸，該GPCR包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。

本發明之另外特徵為一種降低哺乳動物中血糖濃度之方法，其包括對需要該降低之哺乳動物提供或投予RUP43 GPCR之調節物，該GPCR包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，RUP43 GPCR之催動劑為GPR131 GPCR之催動劑，其中應明瞭的是GPR131 GPCR係為內源RUP43 GPCR。

本發明之特徵亦為一種在需要預防或治療之個體中預防或治療新陳代謝病症之方法，其包括使治療上有效量之RUP43 GPCR調節物與該受體接觸，該受體包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

本發明另外之特徵為一種預防或治療新陳代謝病症之方法，其包括對需要該預防或治療之哺乳動物投予RUP43

GPCR之調節物，該受體包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，RUP43 GPCR之催動劑係為GPR131 GPCR之催動劑，其中應明瞭的是GPR131 GPCR係為內源RUP43 GPCR。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種在需要預防或治療之個體中預防或治療高血糖濃度併發症之方法，其包括使治療上有效量之RUP43 GPCR調節物與該受體接觸，該受體包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；

- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

本發明另外之特徵為一種預防或治療高血糖濃度併發症之方法，其包括對需要該預防或治療之哺乳動物提供或投

予 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，RUP43 GPCR 之催動劑係為 GPR131 GPCR 之催動劑，其中應明瞭的是 GPR131 GPCR 係為內源 RUP43 GPCR。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇 X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為

中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，調節物係可藉由根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%，或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞cAMP檢測，使用經轉染HEK293細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 10

μM 在該檢測中，低於 $9 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 900 nM 在該檢測中，低於 800 nM 在該檢測中，低於 700 nM 在該檢測中，低於 600 nM 在該檢測中，低於 500 nM 在該檢測中，低於 400 nM 在該檢測中，低於 300 nM 在該檢測中，低於 200 nM 在該檢測中，低於 100 nM 在該檢測中，低於 90 nM 在該檢測中，低於 80 nM 在該檢測中，低於 70 nM 在該檢測中，低於 60 nM 在該檢測中，低於 50 nM 在該檢測中，低於 40 nM 在該檢測中，低於 30 nM 在該檢測中，低於 20 nM 在該檢測中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 $10 \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 $1 \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

在某些具體實施例中，該接觸包括該調節物對該個體之口服投藥。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長

動物或人類。最佳為人類。

於第八方面，本發明之特徵為醫藥或生理學上可接受之組合物，其包含、基本上由或由RUP43 GPCR之調節物所組成，該受體包含GPR131胺基酸順序。

在某些具體實施例中，調節物係可藉由根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在某些具體實施例中，該組合物為醫藥。在某些具體實施例中，醫藥組合物包含RUP43 GPCR之調節物。在某些具體實施例中，醫藥組合物基本上由RUP43 GPCR之調節物所組成。在某些具體實施例中，醫藥組合物係由RUP43 GPCR之調節物所組成。

在某些具體實施例中，該組合物係為生理學上可接受。在某些具體實施例中，生理學上可接受之組合物包含RUP43 GPCR之調節物。在某些具體實施例中，生理學上可接受之組合物基本上包含RUP43 GPCR之調節物。在某些具體實施

例中，生理學上可接受之組合物係由RUP43 GPCR之調節物所組成。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞cAMP檢測，

使用經轉染 HEK293 細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $900\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $800\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $700\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $600\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $500\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $400\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $300\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $200\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $100\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $90\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $80\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $70\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $60\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $50\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $40\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $30\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $20\ \text{nM}$ 在該檢測中或低於 $10\ \text{nM}$ 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。

於第九方面，本發明之特徵為一種降低血糖濃度之方法，其包括對需要該降低之個體提供或投予該醫藥或生理學上可接受之第八方面之組合物。

本發明之特徵亦為一種預防或治療代謝病症之方法，其包括對需要該預防或治療之個體提供或投予該醫藥或生理學上可接受之第八方面之組合物。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種預防或治療高血糖濃度併發症之方法，其包括對需要該預防或治療之個體提供或投予該醫藥或生理學上可接受之第八方面之組合物。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇X；

- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，該調節物為催動劑。

在某些具體實施例中，係將治療上有效量之該醫藥或生理學上可接受之組合物提供或投予該個體。

在某些具體實施例中，該醫藥或生理學上可接受組合物之提供或投予係為口服。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於**第十**方面，本發明之特徵為RUP43 GPCR之調節物，該受體包含GPR131胺基酸順序，供使用於藉由療法治療人類動物身體之方法。

在某些具體實施例中，調節物係可藉由根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自人類或動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自人類或動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該

調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50}

係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞 cAMP 檢測，使用經轉染 HEK293 細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $900\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $800\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $700\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $600\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $500\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $400\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $300\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $200\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $100\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $90\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $80\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $70\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $60\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $50\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $40\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $30\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $20\ \text{nM}$ 在該檢測中或低於 $10\ \text{nM}$ 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有

EC₅₀ 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

在某些具體實施例中，該動物係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠或非人類靈長動物。人類或動物之更佳者為人類。

於第十一方面，本發明之特徵為 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於藉由療法降低人類動物身體中之血糖濃度之方法。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。

本發明之特徵亦為 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於人類或動物身體中藉由療法預防或治療新陳代謝病症之方法。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第 1 型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第 2 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第 1 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第 2 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥

性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於人類或動物身體中藉由療法預防或治療高血糖濃度併發症之方法。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇 X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。

在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，調節物係可藉由根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自人類或動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自人類或動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在

一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞cAMP檢測，使用經轉染HEK293細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具

有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $900\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $800\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $700\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $600\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $500\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $400\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $300\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $200\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $100\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $90\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $80\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $70\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $60\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $50\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $40\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $30\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $20\ \text{nM}$ 在該檢測中或低於 $10\ \text{nM}$ 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。

在某些具體實施例中，該動物係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠或非人類靈長動物。人類或動物之更佳者為人類。

於第十二方面，本發明之特徵為一種使用 RUP43 GPCR 之

調節物以製備降低血糖濃度用藥劑之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，RUP43 GPCR 之催動劑為 GPR131 GPCR 之催動劑，其中應明瞭的是 GPR131 GPCR 係為內源 RUP43 GPCR。

本發明之特徵亦為一種使用 RUP43 GPCR 之調節物以製備預防或治療新陳代謝病症用藥劑之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，RUP43 GPCR 之催動劑為 GPR131 GPCR 之催動劑，其中應明瞭的是 GPR131 GPCR 係為內源 RUP43 GPCR。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第 1 型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第 2 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第 1 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第 2 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種使用 RUP43 GPCR 之調節物以製備

預防或治療高血糖濃度併發症用藥劑之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，RUP43 GPCR 之催動劑為 GPR131 GPCR 之催動劑，其中應明瞭的是 GPR131 GPCR 係為內源 RUP43 GPCR。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇 X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施

例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，調節物係可藉由根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物係根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。在某些具體實施例中，該催動劑為根據第二方面之化合物。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利

用率係為至少 1%，至少 5%，至少 10%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞 cAMP 檢測，使用經轉染 HEK293 細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 5

μM 在該檢測中，低於 $4 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1 \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 900 nM 在該檢測中，低於 800 nM 在該檢測中，低於 700 nM 在該檢測中，低於 600 nM 在該檢測中，低於 500 nM 在該檢測中，低於 400 nM 在該檢測中，低於 300 nM 在該檢測中，低於 200 nM 在該檢測中，低於 100 nM 在該檢測中，低於 90 nM 在該檢測中，低於 80 nM 在該檢測中，低於 70 nM 在該檢測中，低於 60 nM 在該檢測中，低於 50 nM 在該檢測中，低於 40 nM 在該檢測中，低於 30 nM 在該檢測中，低於 20 nM 在該檢測中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 $10 \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 $1 \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

於第十三方面，本發明之特徵為一種調節 RUP43 GPCR 活性之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中該調節係在需要該調節之個體中用以降低血糖，其包括使該受體與治療上有效量之受體調節物接觸。在某些具體實施例中，該方法包括首先進行根據第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。

本發明之特徵亦為一種調節 RUP43 GPCR 活性之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中該調節係在需要該調節之個體中預防或治療新陳代謝病症，其包括使該受體與治

療上有效量之受體調節物接觸。在某些具體實施例中，該方法包括首先進行根據第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種調節RUP43 GPCR活性之方法，該受體包含GPR131胺基酸順序，其中該調節係在需要該調節之個體中預防或治療高血糖濃度併發症，其包括使該受體與治療上有效量之受體調節物接觸。在某些具體實施例中，該方法包括首先進行根據第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇 X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，該調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係根據第三方面。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有EC₅₀低

於 10 μM ，低於 1 μM ，低於 100 nM 或低於 10 nM。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 10 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 1 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞 cAMP 檢測，使用經轉染 HEK293 細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 10 μM ，低於 1 μM ，低於 100 nM 或低於 10 nM。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 10 μM 在該檢測中，低於 9 μM 在該檢測中，低於 8 μM 在該檢測中，低於 7 μM 在該檢測中，低於 6 μM 在該檢測中，低於 5 μM 在該檢測中，低於 4 μM 在該檢測中，低於 3 μM 在該檢測中，低於 2 μM 在該檢測中，低於 1 μM 在該檢測中，低於 900 nM 在該檢測中，低於 800 nM 在該檢測中，低於 700 nM 在該檢測中，低於 600 nM 在該檢測中，低於 500 nM 在該檢測中，低於 400 nM 在該檢測中，低於 300 nM 在該檢測中，低於 200 nM 在該檢測中，低於 100 nM 在該檢測中，低於 90 nM 在該檢測中，低於 80 nM 在該檢測中，低於 70 nM 在該檢測中，低於 60 nM 在該檢測中，低於 50 nM 在該檢測中，低於 40 nM

在該檢測中，低於 30 nM 在該檢測中，低於 20 nM 在該檢測中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 10 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 1 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

在某些具體實施例中，該接觸包括該調節物對該個體之口服投藥。在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於**第十四**方面，本發明之特徵為一種在需要降低之個體中降低血糖之方法，其包括使治療上有效量之 RUP43 GPCR 調節物與該受體接觸，該 GPCR 包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，該方法包括首先進行根據第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。

本發明之特徵亦為一種在需要預防或治療之個體中預防或治療新陳代謝病症之方法，其包括使治療上有效量之 RUP43 GPCR 調節物與該受體接觸，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，該方法包括首先進行根據

第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種在需要預防或治療之個體中預防或治療高血糖濃度併發症之方法，其包括使治療上有效量之RUP43 GPCR調節物與該受體接觸，該受體包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，該方法包括首先進行根據第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；

- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，該調節物不為肽。在某些具

體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係根據第三方面。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於10 μM ，低於1 μM ，低於100 nM或低於10 nM。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自10 nM

至 10 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 1 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞 cAMP 檢測，使用經轉染 HEK293 細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 10 μM ，低於 1 μM ，低於 100 nM 或低於 10 nM。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 10 μM 在該檢測中，低於 9 μM 在該檢測中，低於 8 μM 在該檢測中，低於 7 μM 在該檢測中，低於 6 μM 在該檢測中，低於 5 μM 在該檢測中，低於 4 μM 在該檢測中，低於 3 μM 在該檢測中，低於 2 μM 在該檢測中，低於 1 μM 在該檢測中，低於 900 nM 在該檢測中，低於 800 nM 在該檢測中，低於 700 nM 在該檢測中，低於 600 nM 在該檢測中，低於 500 nM 在該檢測中，低於 400 nM 在該檢測中，低於 300 nM 在該檢測中，低於 200 nM 在該檢測中，低於 100 nM 在該檢測中，低於 90 nM 在該檢測中，低於 80 nM 在該檢測中，低於 70 nM 在該檢測中，低於 60 nM 在該檢測中，低於 50 nM 在該檢測中，低於 40 nM 在該檢測中，低於 30 nM 在該檢測中，低於 20 nM 在該檢測中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節

物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自10 nM至10 μ M間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自10 nM至1 μ M間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自10 nM至100 nM間隔之數值。

在某些具體實施例中，該接觸包括該調節物對該個體之口服投藥。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於**第十五**方面，本發明之特徵為醫藥或生理學上可接受之組合物，其包含、基本上由或由RUP43 GPCR之調節物所組成，該受體包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，該調節物係可藉由進行根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，該調節物係藉由進行根據第一方面之方法確認。

在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，該調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合

物。在某些具體實施例中，該調節物係根據第三方面。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。

在某些具體實施例中，該組合物為醫藥。在某些具體實施例中，醫藥組合物包含RUP43 GPCR之調節物。在某些具體實施例中，醫藥組合物基本上由RUP43 GPCR之調節物所組成。在某些具體實施例中，醫藥組合物係由RUP43 GPCR之調節物所組成。

在某些具體實施例中，該組合物係為生理學上可接受。在某些具體實施例中，生理學上可接受之組合物包含RUP43 GPCR之調節物。在某些具體實施例中，生理學上可接受之組合物基本上由RUP43 GPCR之調節物所組成。在某些具體實施例中，生理學上可接受之組合物係由RUP43 GPCR之調節物所組成。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一

些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞 cAMP 檢測，使用經轉染 HEK293 細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於

900 nM 在該檢測中，低於 800 nM 在該檢測中，低於 700 nM 在該檢測中，低於 600 nM 在該檢測中，低於 500 nM 在該檢測中，低於 400 nM 在該檢測中，低於 300 nM 在該檢測中，低於 200 nM 在該檢測中，低於 100 nM 在該檢測中，低於 90 nM 在該檢測中，低於 80 nM 在該檢測中，低於 70 nM 在該檢測中，低於 60 nM 在該檢測中，低於 50 nM 在該檢測中，低於 40 nM 在該檢測中，低於 30 nM 在該檢測中，低於 20 nM 在該檢測中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 10 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 1 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

於第十六方面，本發明之特徵為一種降低血糖濃度之方法，其包括對需要該降低之個體提供或投予該醫藥或生理學上可接受之第十五方面之組合物。

本發明之特徵亦為一種預防或治療新陳代謝病症之方法，其包括對需要該預防或治療之個體提供或投予該醫藥或生理學上可接受之第十五方面之組合物。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種預防或治療高血糖濃度併發症之方法，其包括對需要該預防或治療之個體提供或投予該醫藥或生理學上可接受之第十五方面之組合物。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為

徵候簇 X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，該調節物為催動劑。在某些具體實施例中，係將治療上有效量之該醫藥或生理學上可接受之組合物提供或投予該個體。

在某些具體實施例中，該醫藥或生理學上可接受組合物之提供或投予係為口服。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於第十七方面，本發明之特徵為 RUP43 GPCR 之調節物，

該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於藉由療法以治療人類或動物身體之方法中。在某些具體實施例中，該調節物係可藉由進行根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，該調節物係藉由進行根據第一方面之方法確認。

在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，該調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係根據第三方面。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。

在某些具體實施例中，該調節物係對 GPCR 具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物 3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 1%，至少 5%，至少 10%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40%

或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $10\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $1\ \mu\text{M}$ 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自 $10\ \text{nM}$ 至 $100\ \text{nM}$ 間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞 cAMP 檢測，使用經轉染 HEK293 細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2 或 6 之胺基酸順序之重組 RUP43 GPCR 多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $9\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $8\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $7\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $6\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $5\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $4\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $3\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $2\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $1\ \mu\text{M}$ 在該檢測中，低於 $900\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $800\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $700\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $600\ \text{nM}$ 在該檢測中，低於 $500\ \text{nM}$ 在該檢測中，

低於 400 nM 在該檢測中，低於 300 nM 在該檢測中，低於 200 nM 在該檢測中，低於 100 nM 在該檢測中，低於 90 nM 在該檢測中，低於 80 nM 在該檢測中，低於 70 nM 在該檢測中，低於 60 nM 在該檢測中，低於 50 nM 在該檢測中，低於 40 nM 在該檢測中，低於 30 nM 在該檢測中，低於 20 nM 在該檢測中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 10 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 1 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

在某些具體實施例中，該動物係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠或非人類靈長動物。人類或動物之更佳者為人類。

於第十八方面，本發明之特徵為 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於人類或動物身體中藉由療法降低血糖濃度之方法中。在某些具體實施例中，該調節物係可藉由進行根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，該調節物係藉由進行根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。

本發明之特徵亦為 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於人類或動物身體中藉由療法預防或治療新陳代謝病症之方法中。在某些具體實施例

中，該調節物係可藉由進行根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，該調節物係藉由進行根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為RUP43 GPCR之調節物，該受體包含GPR131胺基酸順序，供使用於人類或動物身體中藉由療法預防或治療高血糖濃度併發症之方法中。在某些具體實施例中，該調節物係可藉由進行根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，該調節物係藉由進行根據第一方面之方法確認。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇X；

- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合行

生物。在某些具體實施例中，該調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係根據第三方面。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於 $10\ \mu\text{M}$ ，低於 $1\ \mu\text{M}$ ，低於 $100\ \text{nM}$ 或低於 $10\ \text{nM}$ 。在一些具

體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自10 nM至10 μ M間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自10 nM至1 μ M間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自10 nM至100 nM間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞cAMP檢測，使用經轉染HEK293細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽；及黑色素細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於10 μ M，低於1 μ M，低於100 nM或低於10 nM。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於10 μ M在該檢測中，低於9 μ M在該檢測中，低於8 μ M在該檢測中，低於7 μ M在該檢測中，低於6 μ M在該檢測中，低於5 μ M在該檢測中，低於4 μ M在該檢測中，低於3 μ M在該檢測中，低於2 μ M在該檢測中，低於1 μ M在該檢測中，低於900 nM在該檢測中，低於800 nM在該檢測中，低於700 nM在該檢測中，低於600 nM在該檢測中，低於500 nM在該檢測中，低於400 nM在該檢測中，低於300 nM在該檢測中，低於200 nM在該檢測中，低於100 nM在該檢測中，低於90 nM在該檢測中，低於80 nM在該檢測中，低於70 nM在該檢測中，低於60 nM在該檢測中，低於50 nM在該檢測中，低於40 nM在該檢測中，低於30 nM在該檢測中，低於20 nM在該檢測

中或低於 10 nM 在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC₅₀ 低於選自 10 nM 至 10 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC₅₀ 低於選自 10 nM 至 1 μ M 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC₅₀ 低於選自 10 nM 至 100 nM 間隔之數值。

在某些具體實施例中，該動物係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠或非人類靈長動物。人類或動物之更佳者為人類。

於第十九方面，本發明之特徵為一種使用 RUP43 GPCR 之調節物以製備降低血糖濃度用藥劑之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，該方法包括首先進行根據第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。

本發明之特徵亦為一種使用 RUP43 GPCR 之調節物以製備預防或治療新陳代謝病症用藥劑之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，該方法包括進行根據第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及

(d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種使用 RUP43 GPCR 之調節物以製備預防或治療高血糖濃度併發症用藥劑之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，該方法包括進行根據第一方面之方法，藉以確認調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及

(j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，調節物不為抗體或其抗原結合衍生物。在某些具體實施例中，該調節物不為肽。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之脂肪細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，調節物為會刺激得自哺乳動物之骨骼肌細胞中之葡萄糖吸收之化合物。在某些具體實施例中，該調節物係根據第三方面。在某些具體實施例中，該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。在某些較佳具體實施例中，該調節物為催動劑。

在某些具體實施例中，該調節物係對GPCR具選擇性。

在一些具體實施例中，該調節物為化合物1、化合物2或化合物3。在一些具體實施例中，該調節物為化合物1。在一些具體實施例中，該調節物為化合物2。在一些具體實施例中，該調節物為化合物3。

在某些具體實施例中，該調節物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於10 μM ，低於1 μM ，低於100 nM或低於10 nM。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自10 nM至10 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自10 nM至1 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於選自10 nM至100 nM間隔之數值。在某些具體實施例中，該 EC_{50} 係使用選自包括以下之檢測進行測定：全細胞cAMP檢測，使用經轉染HEK293細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽；及黑色素

細胞檢測，使用經轉染黑色素細胞進行，該細胞係表現具有順序識別碼：2或6之胺基酸順序之重組RUP43 GPCR多肽。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於10 μM ，低於1 μM ，低於100 nM或低於10 nM。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，具有 EC_{50} 低於10 μM 在該檢測中，低於9 μM 在該檢測中，低於8 μM 在該檢測中，低於7 μM 在該檢測中，低於6 μM 在該檢測中，低於5 μM 在該檢測中，低於4 μM 在該檢測中，低於3 μM 在該檢測中，低於2 μM 在該檢測中，低於1 μM 在該檢測中，低於900 nM在該檢測中，低於800 nM在該檢測中，低於700 nM在該檢測中，低於600 nM在該檢測中，低於500 nM在該檢測中，低於400 nM在該檢測中，低於300 nM在該檢測中，低於200 nM在該檢測中，低於100 nM在該檢測中，低於90 nM在該檢測中，低於80 nM在該檢測中，低於70 nM在該檢測中，低於60 nM在該檢測中，低於50 nM在該檢測中，低於40 nM在該檢測中，低於30 nM在該檢測中，低於20 nM在該檢測中或低於10 nM在該檢測中。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自10 nM至10 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自10 nM至1 μM 間隔之數值。在一些具體實施例中，該調節物為催動劑，在該檢測中具有 EC_{50} 低於選自10 nM至100 nM間隔之數值。

於第二十方面，本發明之特徵為一種製備醫藥或生理學上可接受組合物之方法，其包括將根據第二方面之化合物

與載劑混合。

在某些具體實施例中，該組合物為醫藥。在某些具體實施例中，該組合物為生理學上可接受。

在某些具體實施例中，該化合物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹腔腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 1%，至少 5%，至少 10%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。在一些具體實施例中，相對於腹腔腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

於第二十一方面，本發明之特徵為一種醫藥或生理學上可接受之組合物，其包含、基本上由或由根據第二方面之化合物所組成。

在某些具體實施例中，該組合物為醫藥。在某些具體實施例中，醫藥組合物包含根據第二方面之化合物。在某些具體實施例中，醫藥組合物基本上由根據第二方面之化合物所組成。在某些具體實施例中，醫藥組合物係由根據第二方面之化合物所組成。

在某些具體實施例中，該組合物係為生理學上可接受。在某些具體實施例中，生理學上可接受之組合物包含根據第二方面之化合物。在某些具體實施例中，生理學上可接受之組合物基本上包含根據第二方面之化合物。在某些具

體實施例中，生理學上可接受之組合物係由根據第二方面之化合物所組成。

在某些具體實施例中，該化合物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

於第二十二方面，本發明之特徵為一種調節RUP43 GPCR活性之方法，該受體包含GPR131胺基酸順序，其中該調節為在需要該調節之個體中降低血糖含量，其包括使該受體與治療上有效量之根據第二方面之化合物，或與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物接觸。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之根據第二方面之化合物。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。

在某些具體實施例中，該化合物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一

些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於**第二十三**方面，本發明之特徵為一種調節 RUP43 GPCR 活性之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中該調節係在需要該調節之個體中預防或治療新陳代謝病症，其包括使該受體與治療上有效量之根據**第二**方面之化合物，或與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據**第二十一**方面之組合物接觸。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之根據**第二**方面之化合物。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據**第二十一**方面之組合物。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及

(d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種調節RUP43 GPCR活性之方法，該受體包含GPR131胺基酸順序，其中該調節係在需要該調節之個體中預防或治療高血糖濃度之併發症，其包括使該受體與治療上有效量之根據第二方面之化合物，或與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物接觸。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之根據第二方面之化合物。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；

- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，該化合物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用

率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於**第二十四**方面，本發明之特徵為一種在需要降低之個體中降低血糖濃度之方法，其包括使該受體與治療上有效量之根據**第二**方面之化合物，或與治療上有效量之關於 RUP43 GPCR 之醫藥或生理學上可接受之根據**第二十一**方面之組合物接觸，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之根據**第二**方面之化合物。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據**第二十一**方面之組合物。

在某些具體實施例中，該化合物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 1%，至少 5%，至少 10%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40%

或至少 45%。在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於**第二十五**方面，本發明之特徵為在需要降低之個體中預防或治療新陳代謝病症之方法，其包括使該受體與治療上有效量之根據**第二**方面之化合物或與治療上有效量之關於 RUP43 GPCR 之醫藥或生理學上可接受之根據**第二十一**方面之組合物接觸，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之根據**第二**方面之化合物。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據**第二十一**方面之組合物。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第 1 型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第 2 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝

病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為在需要預防或治療之個體中預防或治療高血糖濃度併發症之方法，其包括使該受體與治療上有效量之根據第二方面之化合物或與治療上有效量之關於RUP43 GPCR之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物接觸，該受體包含GPR131胺基酸順序。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之根據第二方面之化合物。在某些具體實施例中，該接觸係與治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，該化合物係為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具

體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於第二十六方面，本發明之特徵為一種降低血糖濃度之方法，其包括對需要該降低之個體提供或投予根據第二方面之化合物或使用治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。在某些具體實施例中，該提供或投予化合物係提供或投予根據第二方面之化合物。在某些具體實施例中，該提供或投予醫藥或生理學上可接受之組合物係提供或投予醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。

在某些具體實施例中，該化合物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實

施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。最佳為人類。

於第二十七方面，本發明之特徵為一種治療新陳代謝病症之方法，其包括對需要該治療或預防之個體提供或投予根據第二方面之化合物或使用治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。在某些具體實施例中，該提供或投予化合物係提供或投予根據第二方面之化合物。在某些具體實施例中，該提供或投予醫藥或生理學上可接受之組合物係提供或投予醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某

些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種治療高葡萄糖濃度併發症之方法，其包括對需要該治療或預防之個體提供或投予根據第二方面之化合物或使用治療上有效量之醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。在某些具體實施例中，該提供或投予化合物係提供或投予根據第二方面之化合物。在某些具體實施例中，該提供或投予醫藥或生理學上可接受之組合物係提供或投予醫藥或生理學上可接受之根據第二十一方面之組合物。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇 X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實

施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，該化合物係為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠、非人類靈長動物或人類。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為老鼠、大白鼠、非人類靈長

動物或人類。最佳為人類。

於**第二十八**方面，本發明之特徵為根據**第二**方面之化合物，供使用於藉由療法以治療人類或動物身體之方法中。

在某些具體實施例中，該化合物係為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該動物係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠或非人類靈長動物。人類或動物之更佳者為人類。

於**第二十九**方面，本發明之特徵為根據**第二**方面之化合物，供使用於藉由療法以降低人類或動物身體中之血糖濃度之方法中。

在某些具體實施例中，該化合物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用

率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該動物係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠或非人類靈長動物。人類或動物之更佳者為人類。

於第三十方面，本發明之特徵為根據第二方面之化合物，供使用於藉由療法以預防或治療人類或動物身體中之新陳代謝病症之方法中。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第 1 型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第 2 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第 1 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第 2 型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為根據第二方面之化合物，供使用於藉由療法以預防或治療人類或動物身體中之高血糖濃度併發症之方法中。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇 X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，

併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，該化合物為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

在某些具體實施例中，該動物係為哺乳動物。在某些具體實施例中，該哺乳動物係為馬、母牛、綿羊、豬、貓、狗、兔子、老鼠、大白鼠或非人類靈長動物。人類或動物之更佳者為人類。

於第三十一方面，本發明之特徵為一種使用根據第二方面之化合物以製備降低血糖濃度用藥劑之方法。

在某些具體實施例中，該化合物係為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至少40%或至少45%。在一些具體實施例中，相對於腹腔內投藥，該口服生物利用率係為至少20%，至少25%，至少30%，至少35%，至

少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

於**第三十二**方面，本發明之特徵為一種使用根據**第二**方面之化合物以製備預防或治療新陳代謝病症用藥劑之方法。在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

本發明之特徵亦為一種使用根據**第二**方面之化合物以製備預防或治療高血糖濃度併發症用藥劑之方法。在某些具體實施例中，併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；

- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

在某些具體實施例中，該化合物係為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少1%，至少5%，至少10%，至少15%，至少

20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

於**第三十三**方面，本發明之特徵為一種調節 RUP43 GPCR 之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其包括使該受體與根據**第二**方面之化合物或與醫藥或生理學上可接受之根據**第二十一**方面之組合物接觸。在某些具體實施例中，該接觸係與根據**第二**方面之化合物。在某些具體實施例中，該接觸係與醫藥或生理學上可接受之根據**第二十一**方面之組合物。

在某些具體實施例中，該化合物係為口服生物可利用。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 1%，至少 5%，至少 10%，至少 15%，至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。在一些具體實施例中，相對於腹膜腔內投藥，該口服生物利用率係為至少 20%，至少 25%，至少 30%，至少 35%，至少 40% 或至少 45%。

在某些具體實施例中，該口服生物可利用之化合物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。

於**第三十四**方面，本發明之特徵為一種確認一或多種候選化合物作為結合至 RUP43 GPCR 之化合物之方法，該受體

包含 GPR131 胺基酸順序，其包括以下步驟：

- (a) 使該受體與可偵測地經標識之已知配位體 GPCR，於候選化合物存在或不存在下接觸；與
- (b) 測定該經標識配位體之結合是否於候選化合物存在下被抑制；

其中該抑制係為候選化合物為結合至 RUP43 GPCR 之化合物之指標。

在某些具體實施例中，GPR131 胺基酸順序係選自包括：

- (a) 順序識別碼：2 之胺基酸順序；
- (b) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330；
- (c) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其附帶條件是 RUP43G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺基酸位置 1 上；
- (d) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：3 與順序識別碼：4 進行 PCR；
- (e) 順序識別碼：6 之胺基酸順序；
- (f) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：7 與順序識別碼：8 進行 PCR；
- (g) 順序識別碼：2 之胺基酸順序，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；

- (h) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (i) 順序識別碼：2胺基酸2-330，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代，其附帶條件是RUP43G蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2之胺基酸位置1上；及
- (j) 被多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至順序識別碼：1之補體。

在某些具體實施例中，RUP43 GPCR係為重組。在某些具體實施例中，該接觸包括與表現GPCR之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜接觸。在某些具體實施例中，該表現GPCR之宿主細胞係包含表現載體，此載體包含使該受體編碼之多核苷酸。

在一些具體實施例中，GPR131胺基酸順序係為順序識別碼：2之胺基酸順序。在一些具體實施例中，GPR131胺基酸順序係為順序識別碼：2胺基酸順序之變種。在一些具體實施例中，該順序識別碼：2胺基酸順序之變種係為該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物。在一些具體實施例中，該順序識別碼：2之胺基酸順序之變種係為該胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之非內源構成上活化突變種。在某些具體實施例中，該順序識別碼：2之胺基酸順序之變種係為該胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之生物活性片段。在某些具體實施例中，該順序識別碼：

2之胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之生物活性片段，係為**順序識別碼：2**之胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物，不存在N-末端甲硫胺酸。在某些具體實施例中，該**順序識別碼：2**之胺基酸順序之變種係為至少約75%，至少約80%，至少約85%，至少約90%，至少約91%，至少約92%，至少約93%，至少約94%，至少約95%，至少約96%，至少約97%，至少約98%或至少約99%，相同於**順序識別碼：2**之胺基酸順序。在一些具體實施例中，該**順序識別碼：2**之胺基酸順序之變種係為至少約90%，至少約91%，至少約92%，至少約93%，至少約94%，至少約95%，至少約96%，至少約97%，至少約98%或至少約99%相同於**順序識別碼：2**之胺基酸順序。

在某些具體實施例中，該細胞膜製劑係經由以Brinkman PolytronTM使細胞均化而製成。在某些具體實施例中，該細胞膜製劑係經由各該Polytron，以10-20秒延續時間之3次爆裂均化而製成。

在某些具體實施例中，該候選化合物不為抗體或其衍生物。

在某些具體實施例中，該候選化合物不為肽。

在某些具體實施例中，該已知配位體系為根據第二方面之化合物。

在某些具體實施例中，該已知配位體系為根據第三方面之調節物。

在某些具體實施例中，該已知配位體為化合物1、化合物2或化合物3。在某些具體實施例中，該已知配位體為化合物1。在某些具體實施例中，該已知配位體為化合物2。在某些具體實施例中，該已知配位體為化合物3。

在某些具體實施例中，該已知配位體為對GPCR專一之抗體或該抗體之抗原結合衍生物。

在某些具體實施例中，該標識係選自包括：

- (a) 放射性同性素；
- (b) 酵素；及
- (c) 螢光團。

在某些具體實施例中，該標識為放射性同性素。在某些具體實施例中，該標識係選自包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 及 ^{125}I 。

化合物1、化合物2或化合物3可使用下文此項技藝中已知之技術經放射性標識。在某些具體實施例中，化合物1、化合物2或化合物3係以 ^3H 或 ^{14}C 經放射性標識。

在其他具體實施例中，該方法進一步包括以下步驟，將經標識第一種已知配位體之結合被候選化合物抑制之程度，與該經標識第一種已知配位體之結合被已知會結合至GPCR之第二種配位體抑制之第二種程度作比較。

於**第三十五**方面，本發明之特徵為一種偵測會結合至RUP43 GPCR之配位體之方法，該受體包含GPR131胺基酸順序，其包括以下步驟：

- (a) 使試驗配位體與表現該受體之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜，在允許該受體與該試驗配位體間之交互作

用之條件下接觸；與

(b) 偵測經結合至該受體之配位體。

在某些具體實施例中，GPR131 胺基酸順序係選自包括：

- (a) 順序識別碼：2 之胺基酸順序；
- (b) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330；
- (c) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其附帶條件是 RUP43G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺基酸位置 1 上；
- (d) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：3 與順序識別碼：4 進行 PCR；
- (e) 順序識別碼：6 之胺基酸順序；
- (f) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：7 與順序識別碼：8 進行 PCR；
- (g) 順序識別碼：2 之胺基酸順序，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (h) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (i) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代，其附帶條件是 RUP43G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順

序識別碼：2之胺基酸位置1上；及

- (j) 被多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至順序識別碼：1之補體。

在一些具體實施例中，GPR131胺基酸順序係為**順序識別碼：2**之胺基酸順序。在一些具體實施例中，GPR131胺基酸順序係為**順序識別碼：2**胺基酸順序之變種。在一些具體實施例中，該**順序識別碼：2**胺基酸順序之變種係為該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物。在一些具體實施例中，該**順序識別碼：2**之胺基酸順序之變種係為該胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之非內源構成上活化突變種。在某些具體實施例中，該**順序識別碼：2**之胺基酸順序之變種係為該胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之生物活性片段。在某些具體實施例中，該**順序識別碼：2**之胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物之生物活性片段，係為**順序識別碼：2**之胺基酸順序或該胺基酸順序之對偶質變種或哺乳動物正交類似物，不存在N-末端甲硫胺酸。在某些具體實施例中，該**順序識別碼：2**之胺基酸順序之變種係為至少約75%，至少約80%，至少約85%，至少約90%，至少約91%，至少約92%，至少約93%，至少約94%，至少約95%，至少約96%，至少約97%，至少約98%或至少約99%，相同於**順序識別碼：2**之胺基酸順序。在一些具體實施例中，該**順序識別碼：2**胺基酸順序之變種係為至少約90%，至少約91%，至少約

92%，至少約 93%，至少約 94%，至少約 95%，至少約 96%，至少約 97%，至少約 98% 或至少約 99% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。

在某些具體實施例中，RUP43 GPCR 係為重組。在某些具體實施例中，該接觸包括與表現 GPCR 之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜接觸。在某些具體實施例中，該表現 GPCR 之宿主細胞包含表現載體，此載體包含使該受體編碼之多核苷酸。

在某些具體實施例中，該試驗配位體不為抗體或其抗原結合衍生物。

在某些具體實施例中，該試驗配位體不為肽。

在某些具體實施例中，該細胞膜製劑係經由以 Brinkman PolytronTM 使細胞均化而製成。在某些具體實施例中，該細胞膜製劑係經由各該 Polytron，以 10-20 秒延續時間之 3 次爆裂均化而製成。

在某些具體實施例中，該試驗配位體係經標識。在某些具體實施例中，該標識係為放射性同位素。在某些具體實施例中，該標識係選自包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 及 ^{125}I 。

申請人保留權力以排除來自任何本發明具體實施例之任何一或多種候選化合物。申請人亦保留權力以排除來自任何本發明具體實施例之任何一或多種調節物。申請人進一步保留權力以排除來自任何本發明具體實施例之任何多核苷酸或多肽。申請人另外保留權力以排除任何代謝病症或任何高血糖濃度併發症。亦明確地意欲涵蓋在內的是，本

發明之代謝病症可被包含在具體實施例中，無論是個別地或以任何組合。亦明確地意欲涵蓋在內的是，本發明之高血糖濃度併發症可被包含在具體實施例中，無論是個別地或以任何組合。

在整個本申請案中，各種公報、專利及已公告之專利申請案係被引用。在本申請案中論及之此等公報、專利及已公告之專利申請案之揭示內容，係據此以其全文併於本發明揭示內容中供參考。公報、專利或已公告之專利申請案由申請人於此處之引用，並非申請人認可該公報、專利或已公告之專利申請案作為先前技藝。

所揭示本發明在熟練技師範圍內之修正與延伸，係被涵蓋在上述揭示內容與下文請求項內。

詳細說明

定義

已環繞受體所發展之科學文獻已採用多種術語以指稱對於受體具有各種作用之配位體。為清楚且一致起見，下述定義將使用於整個本專利文件中。達此等定義與此等術語之其他定義衝突之程度時，下述定義將加以控制：

催動劑係意謂當其結合至受體時會活化胞內回應之物質(例如配位體、候選化合物)。在一些具體實施例中，**催動劑**係為先前未知當其結合至受體時會活化胞內回應(例如加強GTP γ S結合至細胞膜或提高胞內cAMP含量)之物質。在一些具體實施例中，**催動劑**係為先前未知在得自哺乳動物之脂肪細胞中或在骨骼肌細胞中當其結合至受體時會刺激

葡萄糖吸收之物質。

於本文中使用的氨基酸縮寫係列示於表A中：

表A

丙胺酸	ALA	A
精胺酸	ARG	R
天冬素	ASN	N
天門冬胺酸	ASP	D
半胱胺酸	CYS	C
麩胺酸	GLU	E
麩醯胺	GLN	Q
甘胺酸	GLY	G
組胺酸	HIS	H
異白胺酸	ILE	I
白胺酸	LEU	L
離胺酸	LYS	K
甲硫胺酸	MET	M
苯丙胺酸	PHE	F
脯胺酸	PRO	P
絲胺酸	SER	S
蘇胺酸	THR	T
色胺酸	TRP	W
酪胺酸	TYR	Y
纈胺酸	VAL	V

拮抗劑係意謂在與催動劑相同位置處競爭性地結合至受體，但其不會活化胞內回應，且可藉以抑制藉由催動劑所誘出之胞內回應之物質(例如配位體、候選化合物)。拮抗劑於催動劑不存在下並不會減少基線胞內回應。在一些具

體實施例中，拮抗劑係為先前未知當其結合至受體時會與催動劑競爭以抑制細胞回應之物質，例如其中細胞回應係為GTP γ S結合至細胞膜或升高胞內cAMP含量。

抗體於本文中係意欲涵蓋單株抗體與多株抗體。抗體係進一步意欲涵蓋IgG, IgA, IgD, IgE及IgM。抗體包括整個抗體，包括單鏈整個抗體，及其抗原結合片段，包括Fab, Fab', F(ab)₂及F(ab')₂。抗體可來自任何動物來源。抗體較佳為人類、老鼠、兔子、山羊、天竺鼠、大頰鼠、駱駝、驢子、綿羊、馬或雞。抗體較佳係具有結合親和力，具有解離常數或Kd值低於 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M及 10^{-15} M。本發明之抗體可藉此項技藝中已知之任何適當方法製成。抗體之衍生物係欲予涵蓋，但不限於抗原結合片段。

GPCR多肽或胺基酸順序之生物活性片段係意謂具有天然生成GPCR之結構與生物化學功能之多肽或胺基酸順序之片段。在某些具體實施例中，生物活性片段係偶合至G蛋白質。在某些具體實施例中，生物活性片段係結合至內源配位體。

候選化合物係意謂易於接受篩檢技術之分子(例如而非限制於化合物)。

化學基團、部份基團或基團：

"C₁₋₆烷基"一詞表示直鏈或分枝狀碳基團，含有如所指示之碳數目，關於實例，在一些具體實施例中，烷基為"C₁₋₄

烷基"且基團含有1至4個碳，於再其他具體實施例中，烷基為" C_{2-6} 烷基"且基團含有1至6個碳。在一些具體實施例中，烷基含有1至3個碳，一些具體實施例含有1至2個碳，而一些具體實施例含有1個碳。烷基之實例包括但不限於甲基、乙基、正-丙基、異丙基、正-丁基、異丁基、第三-丁基、第二-丁基、正-戊基、異戊基、第二-戊基、新-戊基、己基、異己基、第二-己基、新-己基等。

"鹵素"或"鹵基"一詞表示氟基、氯基、溴基或碘基。

密碼子係意謂三個核苷酸(或核苷酸之相當物)之基團群，其一般係包含一個核苷[腺苷(A)、鳥嘌呤核糖苷(G)、胞嘧啶核苷(C)、尿嘧啶核苷(U)及胸苷(T)]經偶合至磷酸根基團，且其當被轉譯時，會使胺基酸編碼。

組合物係意謂包含至少一種成份之物質。"醫藥組合物"係為組合物之實例。

化合物功效係意謂化合物抑制或刺激受體功能性能力之一種度量；意即活化/抑制訊息轉導途徑之能力，與受體結合親和力對照。偵測化合物功效之舉例方式係揭示於本專利文件之實例段落中。

包含、基本上由...所組成及由...所組成係根據其標準意義被定義於本文中。於M.P.E.P.中所提出之經定義意義，係控制高於此項技藝中經定義意義，而在控制聯邦電路案件法律中所提出之經定義意義，係控制高於M.P.E.P.中所提出之意義。

構成上活性之受體係意謂受體藉由不為經過受體結合至

其配位體或其化學相當物之方式，被安定化呈活性狀態。
構成上活性之受體可為內源或非內源。

構成上活化之受體係意謂已被改質以致能夠成為構成上
活性之內源受體。

構成受體活化作用係意謂受體在結合至其配位體或其化
學相當物不存在下之活化作用。

接觸或接觸作用係意謂致使至少兩種部份物質在一起，
無論是在活體外系統或活體內系統中。

減少係用以指降低可度量之量，且係與術語"降低"、
"減縮"、"下降"及"減輕"同義地使用。

高血糖濃度係意謂在哺乳動物中之斷食血糖濃度大於哺
乳動物之正常斷食血糖濃度。舉例言之，正常人類斷食血
糖濃度係低於100毫克/公合。於本文中使用之高人類血糖
濃度係為斷食血糖濃度100毫克/公合或較大。藉由說明而
非限制，高血糖濃度係涵蓋高血糖。

內源係意謂哺乳動物自然產生之物質。內源關於例如而
非限制於"受體"一詞，係意謂其係藉由哺乳動物(例如而非
限制於人類)自然產生。應明瞭的是內源係涵蓋基因之對偶
質變種，以及經如此編碼之對偶質多肽變種。於本文中使
用之"內源GPCR"與"原本GPCR"可交換使用。比較上而言，
非內源一詞，就此而論，係意謂其並非藉由哺乳動物(例如
而非限制於人類)自然地產生。例如而非限制於受體，在其
內源形式上，其並非構成上活性，但當被操控變成構成上
活性時，最佳係於本文中被稱為"非內源構成上活化之受

體"。

表現載體在本文中係被定義為DNA順序，其係為在對該表現載體之適當宿主細胞重組體中之無性繁殖DNA之轉錄與經轉錄mRNA之轉譯所需要。經適當建構之**表現載體**應含有複製來源，以供自律複製於宿主細胞、可選擇標記物、有限數目之可使用限制酵素位置、供高複本數目之可能性及活性啟動子中。該欲被轉錄之無性繁殖DNA係可操作地連結至該表現載體內之構成上或條件上活性啟動子。藉由說明方式而非限制，pCMV係為表現載體。

G蛋白偶合受體融合蛋白質與GPCR融合蛋白質，就本文中所揭示之本發明而論，各意謂非內源蛋白質，包含內源、構成上活性GPCR或經融合到至少一個G蛋白質之非內源構成上活化GPCR，最佳為此種G蛋白質之 α 亞單位(此係為結合GTP之亞單位)，其中G蛋白質較佳為與天然地和內源GPCR偶合之G蛋白質相同之類型。例如而非限制，在內源狀態中，若G蛋白質"Gs α "為與GPCR偶合之主要G蛋白質，則以專一GPCR為基礎之GPCR融合蛋白質係為非內源蛋白質，包含經融合至Gs α 之GPCR；在一些情況中，如將於下文所敘述者，非主要G蛋白質可經融合至GPCR。G蛋白質可經直接融合至構成上活性GPCR之C-末端，或可以有間隔基介於兩者之間。

宿主細胞係意謂能夠具有載體被併入其中之細胞。在某些具體實施例中，載體係為表現載體。舉例之宿主細胞包括但不限於293、293T、CHO、MCB3901及COS-7細胞，以及

黑色素細胞。

於本文中**使用之需要預防或治療**係指藉由看護者(例如，在人類之情況中為醫師、護士、護理執行者等；在動物之情況中，包括非人類哺乳動物，為獸醫)所施行之判斷，個體或動物需要或將得利於治療。此項判斷係以多種因素為基礎施行，其係在看護者專業知識之領域中，但其包括個體或動物係為生病或即將生病之瞭解，由於可藉由本發明化合物治療之症狀之結果。

於本文中**使用之個體**係指任何動物，包括哺乳動物，較佳為老鼠、大白鼠、其他齧齒動物、兔子、狗、貓、豬、牛、綿羊、馬或靈長類動物，而最佳為人類。

與"回應"一詞有關係之**抑制或抑制作用**係意謂於化合物存在下，與化合物不存在之相反情況比較下，回應係被降低或防止。

於本文中**使用之減弱之葡萄糖容許度(IGT)**係意欲表示與胰島素抗藥性有關聯之症狀，其係介於顯著第2型糖尿病與正常葡萄糖容許度(NGT)之中間。IGT係藉由一種程序診斷，當藉由2-小時餐後血漿葡萄糖含量評估時，其中受感染人員之餐後葡萄糖回應係被測定為異常。在此項試驗中，係對病患給予經度量之葡萄糖量，且血糖含量係於規則間隔下度量，通常為每半小時，歷經最初兩小時，而接著為每小時。在"正常"或非IGT個體中，於最初兩小時期間，葡萄糖含量係上升至低於140毫克/公合之程度，然後迅速地下降。在IGT個體中，血糖含量係較高，且下降程度係在較

緩慢速率下。

於本文中使用之**胰島素抗藥性**係意欲涵蓋藉多種方法中之任一種施行之胰島素抗藥性之一般診斷，包括但不限於：靜脈內葡萄糖容許度試驗或斷食胰島素含量之度量法。在斷食胰島素含量之高度與胰島素抗藥性之程度之間，習知有一種優越關聯性。因此，吾人可利用提高之斷食胰島素含量作為胰島素抗藥性之替代標記，以達成確認正常葡萄糖容許度(NGT)個體中何者具有胰島素抗藥性之目的。胰島素抗藥性之診斷亦可使用血糖正常之葡萄糖夾持試驗施行。

逆催動劑係意謂結合至受體之無論是內源形式或構成上活化形式，以降低催動劑不存在下所發現之受體基線胞內回應之物質(例如配位體、候選化合物)。

單離係意謂物質被移離其原先環境(例如，若其係為天然生成，則為天然環境)。例如，存在於有生命動物中之天然生成多核苷酸或多肽並未被單離，但分離自天然系統中之一部份或全部共存物質之相同多核苷酸或DNA或多肽，係被單離。此種多核苷酸可為載體之一部份，及/或此種多核苷酸或多肽可為組合物之一部份，而仍然被單離，因該載體或組合物並非其天然環境之一部份。

配位體係意謂專一性地結合至GPCR之分子。配位體可為例如多肽、脂質、小分子、抗體。內源配位體為一種配位體，其係為對原本GPCR之內源天然配位體。配位體可為GPCR"拮抗劑"、"催動劑"、"部份催動劑"或"逆催動劑"

或其類似物。

於本文中**使用之調節或改質術語**，係意欲指稱增加或減少特定活性、功能或分子之量、品質或作用。藉由說明方式，而非限制，G蛋白偶合受體之催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑係為該受體之調節物。

部份催動劑係意謂當其結合至受體時會活化胞內回應之物質(例如配位體、候選化合物)，相較於完全催動劑係達較小程度/範圍。

醫藥組合物係意謂包含至少一種活性成份之組合物，而其中組合物係易於接受研究，以在哺乳動物(例如而非限制於人類)中獲得所指定之有效結果。一般熟諳此藝者將瞭解且明瞭適於測定活性成份是否具有所要有有效結果之技術，以技師之需求為基礎。

多核苷酸係意謂超過一種核苷酸之RNA、DNA或RNA/DNA雜種順序，呈無論是單鏈或雙螺旋形式。本發明之多核苷酸可藉任何已知方法製備，包括合成、重組、來自活體世代或其組合，以及利用任何此項技藝中已知之純化方法。

多肽係指胺基酸之聚合體，無關於聚合體之長度。因此，肽、寡肽及蛋白質係被包含在多肽之定義內。此術語亦未指定或排除多肽之表現後改質。例如，包含糖基、乙醯基、磷酸根基團、脂質基團等之共價連接之多肽，係明確地被多肽一詞所涵蓋。

引物係被用於本文中，以表示特定寡核苷酸順序，其係

對標的核苷酸順序互補，且用以雜化至標的核苷酸順序。引物係充作藉由DNA聚合酶、RNA聚合酶或反轉錄酶催化之核苷酸聚合反應之引發點。

純化係被用於本文中，以描述本發明之多核苷酸或多核苷酸載體，其已自其他化合物分離，包括但不限於其他核酸、碳水化合物、脂質及蛋白質(譬如用於合成多核苷酸之酵素)。在某些具體實施例中，當至少約50%，至少約60%，至少約75%，至少約85%，至少約90%，至少約95%，至少約96%，至少約97%，至少約98%，至少約99%或至少約99.5%試樣含有單一多核苷酸順序時，多核苷酸係實質上純。在一些具體實施例中，實質上純多核苷酸典型上係包含約50%，約60%，約70%，約80%，約90%，約95%，約96%，約97%，約98%，約99%或約99.5%重量/重量多核苷酸試樣。

同樣地，純化一詞係被使用於本文中，以描述本發明之多肽，其已被分離自其他化合物，包括但不限於核酸、脂質、碳水化合物及其他蛋白質。在某些具體實施例中，當至少約50%，至少約60%，至少約75%，至少約85%，至少約90%，至少約95%，至少約96%，至少約97%，至少約98%，至少約99%或至少約99.5%多肽分子試樣具有單一胺基酸順序時，多肽係實質上純。在一些具體實施例中，實質上純多肽典型上係包含約50%，約60%，約70%，約80%，約90%，約95%，約96%，約97%，約98%，約99%或約99.5%重量/重量之蛋白質試樣。

同樣地，純化一詞係被使用於本文中，以描述本發明之

調節物。在某些具體實施例中，實質上純之調節物典型上係包含至少約 70%，至少約 80%，至少約 90%，至少約 95%，至少約 96%，至少約 97%，至少約 98%，至少約 99% 或至少約 99.5% 重量 / 重量之該調節物製劑。在某些具體實施例中，調節物具有 "至少" 純度範圍從任何數目至千分之一位置，在 90% 與 100% 之間 (例如至少 99.995% 純)。

再者，當於本文中使用时，純化術語並不需要絕對純度；而是，其係意欲作為相對定義。

受體功能性係指受體在細胞中接受刺激並緩和作用之正常操作，包括但不限於調節基因轉錄、調節離子之流入或流出量、達成催化反應及 / 或調節經過 G-蛋白質之活性。

第二信使係意謂由於受體活化作用之結果所產生之胞內回應。第二信使可包括例如肌醇三磷酸鹽 (IP₃)、二醯基甘油 (DAG)、環 AMP (cAMP)、環 GMP (cGMP)、MAP 激酶活性及 Ca²⁺。第二信使回應可被度量，以測定受體活化作用。此外，第二信使回應可被度量，以確認候選化合物，作為例如逆催動劑、部份催動劑、催動劑及拮抗劑。

信噪比係意謂回應活化、放大或刺激所產生之信號，其中信號係高於回應非活化、非放大或非刺激之本噪聲或基底含量。

間隔基係意謂胺基酸之經轉譯數目，其係定位於基因 (例如吾人感興趣之 GPCR) 之最後密碼子或最後胺基酸之後，但在吾人感興趣 G 蛋白質之起始密碼子或開始區域之前，其中經轉譯數目之胺基酸係放置在具有吾人感興趣 G 蛋白質

之開始區域之架構中。經轉譯胺基酸之數目可為一、二、三、四等，且高達十二。

與"回應"一詞有關係之刺激或刺激作用係意謂與化合物不存在之相反情況比較下，於化合物存在下，回應係被增加。

病患係意謂靈長類動物，包括但不限於人類與狒狒，以及寵物動物，譬如狗與貓，實驗室動物，譬如大白鼠與老鼠，及農場動物，譬如馬、綿羊及母牛。

於本文中使用的治療上有效量係指活性化合物或藥劑在組織、系統、動物、個體或人類中誘出生物或醫藥回應之量，其係為研究人員、獸醫、醫生或其他臨床家所正在尋找的，其包括下列之一或多個：

- (1) 預防疾病；例如在可能易罹患疾病、症狀或病症，但尚未歷經或顯示該疾病之病理學或徵狀學之個體中預防疾病、症狀或病症，
- (2) 抑制疾病；例如在正歷經或顯示疾病、症狀或病症之病理學或徵狀學之個體中抑制該疾病、症狀或病症(意即遏制病理學及/或徵狀學之進一步發展)，及
- (3) 改善疾病；例如在正歷經或顯示疾病、症狀或病症之病理學或徵狀學之個體中改善疾病、症狀或病症(意即使病理學及/或徵狀學逆轉)。

變種，當此術語於本文中使用时，係為多核苷酸或多肽，其係個別與參考多核苷酸或多肽不同，但保留基本性質。多核苷酸之典型變種係在核苷酸順序上與另一種參考多核

苷酸不同。於變種之核苷酸順序上之改變，可以或可以不變更已被參考多核苷酸編碼之多肽之胺基酸順序。多肽之典型變種係在胺基酸順序上與另一種參考多肽不同。變種與參考多肽可在胺基酸順序上藉由任何組合之一或多個取代、添加、缺失而有所不同。多核苷酸或多肽之變種可為天然生成者，譬如對偶質變種，或其可為未知會天然地存在之變種。多核苷酸與多肽之非天然生成變種可藉由致突變技術或藉由直接合成製成。

A. 序文

提出下述段落之順序係為呈現效率，而非意欲亦不應被解釋為限制下文揭示內容或請求項。

B. 受體表現

1. 吾人感興趣之 GPCR 多肽

本發明之 RUP43 GPCR 係包含 GPR131 胺基酸順序。於本文中
使用之 "GPR131 胺基酸順序" 係意欲涵蓋順序識別碼：2
之內源人類 GPR131 胺基酸順序，以及變種胺基酸順序，至少約 75%，至少約 80%，至少約 85%，至少約 90%，至少約 91%，至少約 92%，至少約 93%，至少約 94%，至少約 95%，至少約 96%，至少約 97%，至少約 98% 或至少約 99% 相同於
順序識別碼：2 之胺基酸順序。換言之，包含順序識別碼：2
胺基酸順序之變種之 GPCR 亦可使用於主題方法中。在某些
具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含順序
識別碼：2 胺基酸順序之對偶質變種。在某些具體實施例
中，順序識別碼：2 胺基酸順序之對偶質變種係被內源

GPR131 核苷酸順序編碼，後者可藉由在人類 DNA 試樣上，使用專一引物順序識別碼：3 與順序識別碼：4，進行聚合酶連鎖反應(PCR)而獲得。在一些具體實施例中，順序識別碼：2 胺基酸順序之對偶質變種係被內源 GPR131 核苷酸順序編碼，後者可藉由在人類 DNA 試樣上，使用包含順序識別碼：3 之專一引物與包含順序識別碼：4 之專一引物，進行聚合酶連鎖反應(PCR)而獲得。在某些具體實施例中，人類 DNA 試樣為人類基因組 DNA。在某些具體實施例中，此方法為 RT-PCR (反轉錄-聚合酶連鎖反應)。RT-PCR 技術係為熟練技師所習知。在某些具體實施例中，人類 cDNA 試樣為人類單細胞或巨噬細胞 cDNA。在某些具體實施例中，人類 cDNA 試樣為人類脂肪細胞 cDNA。在某些具體實施例中，人類 cDNA 試樣為人類骨骼肌細胞 cDNA。在某些具體實施例中，係提供人類 DNA 試樣。在某些具體實施例中，人類 DNA 試樣係得自商業來源。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之變種胺基酸順序係為順序識別碼：2 胺基酸順序之哺乳動物正交類似物。藉由說明方式而非限制，兔子 (例如 GenBank[®] 收受號碼 BAC55237)、母牛 (例如 GenBank[®] 收受號碼 NP_778219)、老鼠 (例如 GenBank[®] 收受號碼 NP_778150) 及大白鼠 (例如 GenBank[®] 收受號碼 NP_808797) 之 GPR131 胺基酸順序，係被設想為在 "GPR131 胺基酸順序" 之範圍內。應明瞭的是，於本文中使用了 "GPR131 GPCR" 係為內源 RUP43 GPCR；藉由說明方式而非限制，內源人類 RUP43 GPCR 係為 GenBank[®] 收受號碼 NM_170699 (具有相同於順序識別碼：2 之

胺基酸順序)之人類 GPR131 及其對偶基因，內源兔子 RUP43 GPCR 係為 GenBank® 收受號碼 BAC55237 之兔子 GPR131 及其對偶基因，內源母牛 RUP43 GPCR 係為 GenBank® 收受號碼 NP_778219 之母牛 GPR131 及其對偶基因，內源老鼠 RUP43 GPCR 係為 GenBank® 收受號碼 NP_778150 之老鼠 GPR131 及其對偶基因，及內源大白鼠 RUP43 GPCR 係為 GenBank® 收受號碼 NP_808797 之大白鼠 GPR131 及其對偶基因。

在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含順序識別碼：2 之胺基酸順序、順序識別碼：2 之對偶基因或順序識別碼：2 之哺乳動物正交類似物之非內源構成上活化突變種。正如此項技藝中所已知，構成上活化之 GPCR 可使用多種方法製成(參閱，例如 PCT 申請案號 PCT/US98/07496，於 1998 年 10 月 22 日以 WO 98/46995 公告；與美國專利 6,555,339；其中每一案之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考)。順序識別碼：2 之胺基酸順序，順序識別碼：2 之對偶基因，順序識別碼：2 之哺乳動物正交類似物，內源 GPR131 之非內源構成上活化突變種或至少約 75%，至少約 80%，至少約 85%，至少約 90%，至少約 91%，至少約 92%，至少約 93%，至少約 94%，至少約 95%，至少約 96%，至少約 97%，至少約 98% 或至少約 99% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序之胺基酸順序之生物活性片段，均可使用於本發明。藉由說明方式而非限制，N-末端甲硫胺酸或 N-末端訊息肽之缺失係為所設想，以提供可使用於主題方法中之生物活性片段。藉由進一步說明而非限制，可使用於主

題方法中之 RUP43 GPCR 可包含順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其附帶條件是 RUP43 G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺基酸位置 1 上；

在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含胺基酸順序，至少約 75%，至少約 80%，至少約 85%，至少約 90%，至少約 91%，至少約 92%，至少約 93%，至少約 94%，至少約 95%，至少約 96%，至少約 97%，至少約 98% 或至少約 99% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含胺基酸順序，至少約 95%，至少約 96%，至少約 97%，至少約 98% 或至少約 99% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含胺基酸順序，至少約 75% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含胺基酸順序，至少約 80% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含胺基酸順序，至少約 85% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含胺基酸順序，至少約 90% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含胺基酸順序，至少約 91% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之 GPCR 可包含胺基酸順序，至少約 92% 相同於順序識別碼：2 之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題

方法中之GPCR可包含胺基酸順序，至少約93%相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之GPCR可包含胺基酸順序，至少約94%相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之GPCR可包含胺基酸順序，至少約95%相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之GPCR可包含胺基酸順序，至少約96%相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之GPCR可包含胺基酸順序，至少約97%相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之GPCR可包含胺基酸順序，至少約98%相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。在某些具體實施例中，可使用於主題方法中之GPCR可包含胺基酸順序，至少約99%相同於順序識別碼：2之胺基酸順序。所謂對順序識別碼：2之胺基酸順序具有至少例如95%"同一性"之胺基酸順序，係指該胺基酸順序係相同於順序識別碼：2之胺基酸順序，惟順序識別碼：2之胺基酸順序中每100個胺基酸可包含至高五個胺基酸改變。因此，為獲得對順序識別碼：2具有至少95%同一性之胺基酸順序，可將該順序中之至高5%(100中之5)胺基酸殘基被另一個胺基酸插入、取代，或刪除，與順序識別碼：2之胺基酸順序比較。此等改變可發生在胺基或羧基末端或介於此等末端位置間之任何位置，個別地散置在無論是該順序之殘基中，或在該順序內之一或多個鄰接基團中。

在一些具體實施例中，可使用於主題方法中之GPR131胺基酸順序，係為被對於多核苷酸順序互補之順序所編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至濾器結合之DNA，其具有順序識別碼：1中提出之順序。藉由說明方式而非限制，可使用於主題方法中之GPR131胺基酸順序係為被多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件雜化至順序識別碼：1之補體。雜化技術係為熟練技師所習知。較佳嚴厲雜化條件包括於包含以下物質之溶液：50%甲醯胺，5xSSC (150mM NaCl, 15mM檸檬酸三鈉)，50mM磷酸鈉 (pH 7.6)，5x Denhardt 氏溶液，10%葡聚糖硫酸鹽及20微克/毫升變性、經剪切之鮭魚精蟲DNA，在42°C下過夜培養；接著在0.1xSSC中，於約65°C下洗滌濾器。

a. 順序同一性

一種測定質問順序(例如順序識別碼：2之胺基酸順序)與欲被質問順序間之最良好整體匹配(亦被稱為總體順序對準)之較佳方法，可使用FASTDB電腦程式測定，以Brutlag等人之演算法為基礎 [Comp App Biosci (1990) 6: 237-245；其揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。在順序對準中，質問與被質問順序均為胺基酸順序。該總體順序對準之結果係以同一性百分比表示。被使用於FASTDB胺基酸對準中之較佳參數為：基質=PAM 0，K-tuple=2，失配補償=1，接合補償=20，隨機群=25，長度=0，截止評分=1，限幅大小=順序長度，間隙補償=5，間隙大小補償=0.05，限幅大小=247或被質問胺基酸順序之長度，看那一個比較短。

若被質問順序比質問順序短，此係由於N-或C-末端缺失，而非由於內部缺失所致，則其結果，以同一性百分比表示，必須以手動方式校正，因為當計算總體同一性百分比時，FASTDB程式不會考慮被質問順序之N-與C-末端截頭。相對於質問順序，對於在N-與C-末端截頭之被質問順序，同一性百分比係被校正，其方式是計算質問順序中為被質問順序之N-與C-末端，不與相應被質問順序殘基匹配/對準之殘基數目，作為質問順序總鹼基之百分比。殘基是否匹配/對準，係藉由FASTDB順序對準之結果測得。然後，將此百分比自藉由上述FASTDB程式，使用所指定參數計算而得之同一性百分比減去，以達成最後同一性百分比評分。此最後同一性百分比評分即為用於本發明之目的者。只有對被質問順序之N-與C-末端，未與質問順序匹配/對準之殘基被考慮，以達成手動調整同一性百分比評分之目的。意即，只質問該被質問順序之最遠N-與C-末端殘基外側之胺基酸殘基。

例如，將90胺基酸殘基被質問順序與100-殘基質問順序對準，以測定同一性百分比。缺失係發生在被質問順序之N-末端，因此，FASTDB對準並未與N-末端之第一個殘基匹配/對準。10個未成對殘基係表示此順序之10%（於N-與C-末端未匹配之殘基數目/於質問順序中之殘基總數），因此，將10%自藉由FASTDB程式所計算之同一性百分比評分中減去。若其餘90個殘基係完全地匹配，則最後同一性百分比為90%。

在另一項實例中，係將90-殘基被質問順序與100-殘基質問順序比較。此次，缺失係為內部，因此沒有殘基在被質問順序之N-或C-末端，其未與該質問順序匹配/對準。於此情況中，藉由FASTDB計算之同一性百分比並未以手動方式校正。再一次，只有主題順序之N-與C-末端外側之殘基位置，當在FASTDB對準中顯示時，其未與質問順序匹配/對準，係以手動方式校正。對本發明之目的而言，未施行其他校正。

b. 融合蛋白質

在某些具體實施例中，吾人感興趣之多肽為融合蛋白質，並可含有例如親和標記功能部位或報告子功能部位。適當親和標記包括任何胺基酸順序，其可專一性地結合至另一種部份物質，通常為另一種多肽，最通常為抗體。適當親和標記包括抗原決定部位標記，例如V5標記、FLAG標記、HA標記(得自紅血球凝集素流感病毒)、myc標記及其類似物，正如此項技藝中所已知者。適當親和標記亦包括其結合受質為已知之功能部位，例如HIS、GST及MBP標記，正如此項技藝中所已知者，及得自其他蛋白質之功能部位，專一性結合配對物例如抗體，特別是單株抗體，係可供其採用。適當親和標記亦包括任何蛋白質-蛋白質交互作用功能部位，譬如IgG Fc區域，其可專一性地結合，並使用適當結合配對物例如IgG Fc受體檢出。明確地意欲涵蓋的是，此種融合蛋白質可含有異種N-末端功能部位(例如抗原決定部位標記)，於架構內與GPCR融合，該GPCR已具有其N-末

端甲硫胺酸殘基無論是被刪除或被替代胺基酸取代。

適當報告子功能部位包括可報告多肽存在之任何功能部位。雖然已明瞭親和標記可用以報告多肽之存在，使用例如經標識之抗體，其係專一性地結合至該標記，但發光報告子功能部位係更經常使用。適當發光報告子功能部位包括蟲螢光素酶(得自例如螢火蟲，*Vargula*、*Renilla reniformis* 或 *Renilla muelleri*)或其發光變種。其他適當報告子功能部位包括螢光蛋白質(得自例如水母、珊瑚及其他腔腸動物，其本身係得自多管水母屬、海紫羅蘭屬、海扇屬、細長海筆屬物種)或其發光變種。此等報告子蛋白質之發光變種係為此項技藝中所極為習知，且當與原本報告子蛋白質比較時，可為較明亮、較微暗或具有不同激發及/或發射光譜。例如，有些變種係經改變，以致其已不再顯現綠色，而可呈現藍色、青色、黃色、增強之黃紅色(個別稱為BFP、CFP、YFP、eYFP及RFP)或具有其他發射光譜，正如此項技藝中所已知者。其他適當報告子功能部位包括可經過生物化學或顏色改變而報告多肽存在之功能部位，譬如 β -半乳糖苷酶、 β -尿甘酸酶、氣霉素乙醯轉移酶及分泌之胚胎鹼性磷酸酶。

亦如此項技藝中所已知者，親和標記或報告子功能部位可存在於吾人感興趣多肽之任何位置上。但是，在大部份具體實施例中，其係存在於吾人感興趣多肽之C-或N-末端。

2. 使吾人感興趣GPCR多肽編碼之核酸

由於操控核酸之遺傳密碼與重組技術係為已知，且吾人

感興趣 GPCR 多肽之胺基酸順序係如上文所述，故使吾人感興趣 GPCR 多肽編碼之核酸之設計與製造，係良好地在技師之技術內。在某些具體實施例中，係使用標準重組 DNA 技術 (Ausubel 等人, 分子生物學之簡短擬案, 第 3 版, Wiley & Sons, 1995; Sambrook 等人, 分子無性繁殖：實驗室手冊, 第二版 (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.) 方法。例如，GPCR 編碼順序可單離自 GPCR 編碼順序庫，使用多種重組方法之任一種或其組合，其不必在本文中描述。核苷酸在使蛋白質編碼之核酸順序中之後續取代、缺失及/或添加，亦可使用標準重組 DNA 技術進行。

例如，位置引導致突變與次代無性繁殖可用以在使吾人感興趣多肽編碼之多核苷酸中引進/刪除/替代核酸殘基。在其他具體實施例中，可使用 PCR。使吾人感興趣多肽編碼之核酸亦可藉由化學合成完全製自寡核苷酸 (例如 Cello 等人, Science (2002) 297: 1016-8)。

在一些具體實施例中，使吾人感興趣多肽編碼之核酸之密碼子係達最佳化，以供表現於特定物種之細胞中，該物種特別是哺乳動物，例如老鼠、大白鼠、大頰鼠、非人類靈長動物或人類物種。在一些具體實施例中，使吾人感興趣多肽編碼之核酸之密碼子係達最佳化，以供表現於特定物種之細胞中，該物種特別是兩棲物種。

a. 載體

本發明進一步提供載體 (亦被稱為 "構造物")，其包含主題核酸。在本發明之許多具體實施例中，主題核酸順序係

在該順序已被可操作地連結至表現控制順序(包括例如啟動子)後，被表現於宿主中。主題核酸典型上亦被置於表現載體中，該載體可在宿主細胞中複製，無論是作為附加體或作為宿主染色體DNA之一個完整部份。通常，表現載體將含有選擇標記物，例如四環素或新霉素，以允許偵測以所要DNA順序轉變之細胞(參閱，例如美國專利4,704,362，其係併於本文供參考)。載體，包括單一與雙重表現卡匣載體，係為此項技藝中所習知(Ausubel等人，*分子生物學之簡短擬案*，第3版，Wiley & Sons, 1995；Sambrook等人，*分子無性繁殖：實驗室手冊*，第二版(1989) Cold Spring Harbor, N.Y.)。適當載體包括病毒載體、質粒、黏接質體、人造染色體(人類人造染色體、細菌人造染色體、酵母人造染色體等)、微染色體等。反轉錄酶病毒、腺病毒及與腺有關聯之病毒載體均可使用。

對於在細胞中產生吾人感興趣多肽之目的而言，多種表現載體可採用於此項技藝中。一種適當載體為pCMV，其係使用於某些具體實施例中。此載體係在布達佩斯(Budapest)條約之條款下，關於微生物寄存物之國際認知，於1998年10月13日(10801 Blvd. 大學, Manassas, VA 20110-2209 USA)，寄存於美國培養物類型收集處(ATCC)，以達成專利程序之目的。此DNA係由ATCC測試，並測定為可用。ATCC已對pCMV指定下列寄存物編號：ATCC # 203351。

主題核酸通常包含使吾人感興趣之主題多肽編碼之單一開放譯讀骨架，但是，在某些具體實施例中，由於供吾人

感興趣多肽表現之宿主細胞可為真核細胞，例如哺乳動物細胞，譬如人類細胞，故開放譯讀骨架可被插入序列插入。主題核酸典型上為轉錄單位之一部份，該單位除了主題核酸以外，可含有3'與5'未轉譯區域(UTR)，其可導引RNA安定性、轉譯效率等。主題核酸亦可為表現卡匣之一部份，該卡匣除了主題核酸以外，含有啟動子，其係導引吾人感興趣多肽之轉錄與表現，及轉錄終止子。

真核生物啟動子可為在真核生物宿主細胞中具功能性之任何啟動子，包括病毒啟動子與衍生自真核生物基因之啟動子。舉例之真核生物啟動子包括但不限於下列：老鼠金屬硫酮素I基因順序之啟動子(Hamer等人, J. Mol. Appl. Gen. 1: 273-288, 1982); 疱疹病毒之TK啟動子(McKnight, Cell 31: 355-365, 1982); SV40早期啟動子(Benoist等人, Nature (London) 290: 304-310, 1981); 酵母膽汁基因順序啟動子(Johnston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 6971-6975, 1982); Silver等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 5951-5955, 1984), CMV啟動子、EF-1啟動子、蛻化素-回應啟動子、四環素-回應啟動子等。病毒啟動子可為特別令人感興趣的，因其一般而言係為特別強之啟動子。在某些具體實施例中，係使用一種啟動子，其係為標的病原之啟動子。供使用於本發明中之啟動子係經選擇，以致其在其正被引進其中之細胞類型(及/或動物)中具功能性。在某些具體實施例中，啟動子係為CMV啟動子。

在某些具體實施例中，主題載體亦可提供可選擇標記物之表現。適當載體與可選擇標記物係為此項技藝中所習

知，並討論於 Ausubel 等人，(分子生物學之簡短擬案，第3版，Wiley & Sons, 1995) 與 Sambrook 等人，(分子無性繁殖：實驗室手冊，第三版(2001) Cold Spring Harbor, N.Y.)。多種不同基因已被採用作為可選擇標記物，而被採用於主題載體中作為可選擇標記物之特定基因，主要是為方便而經選擇。已知之可選擇標記物基因包括：胸腺核苷激酶基因、二氫葉酸鹽還原酶基因、黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶基因、CAD、腺苷脫胺酶基因、天冬素合成酶基因、抗生素抗藥性基因，例如 tetr、amp^r、Cmr 或 cat、kan^r 或 neor (胺基糖苷磷酸轉移酶基因)、潮霉素 B 磷酸轉移酶基因等。

如上述，吾人感興趣之多肽可為含有親和力功能部位及/或報告子功能部位之融合蛋白質。在報告子或標記與 GPCR (例如在 GPCR 之 C-或 N-末端) 之間製造融合之方法，係良好地在熟諳此藝者之技術內 (例如 McLean 等人，Mol. Pharma. Mol. Pharmacol. 1999 56 : 1182-91 ; Ramsay 等人，Br. J. Pharmacology, 2001, 315-323)，故將不作任何進一步描述。明確地意欲涵蓋在內的是，此種融合蛋白質可含有異種 N-末端功能部位 (例如抗原決定部位標記)，於架構內與 GPCR 融合，該 GPCR 已具有其 N-末端甲硫胺酸殘基，無論是被刪除或被替代胺基酸取代。應明瞭的是，吾人感興趣之多肽可首先製自原本多肽，然後可操作地連結至適當報告子/標記，如上述。

主題核酸亦可含有限制位置、多重無性繁殖位置、引物結合位置、可連接末端、重組位置等，通常是為幫助建構

使吾人感興趣多肽編碼之核酸。

b. 宿主細胞

本發明進一步提供包含載體之宿主細胞，該載體包含主題核酸。適當宿主細胞包括原核細胞，例如細菌細胞(例如大腸桿菌)，以及真核細胞，例如動物細胞(例如昆蟲、哺乳動物、魚、兩棲動物、鳥或爬蟲類細胞)，植物細胞(例如玉米或 Arabidopsis 細胞)或真菌細胞(例如釀酒酵母細胞)。在某些具體實施例中，適用於表現使核酸編碼之吾人感興趣多肽之任何細胞，均可作為宿主細胞使用。通常，係使用動物宿主細胞系，其實例如下：猴子腎臟細胞(COS 細胞)、藉由 SV40 轉變之猴子腎臟 CVI 細胞(COS-7, ATCC CRL 165 1)；人類胚胎腎臟細胞(HEK-293 ["293"], Graham 等人, J. Gen Virol. 36 : 59 (1977))；HEK-293T ["293T"] 細胞；大頰鼠嬰兒之腎臟細胞(BHK, ATCC CCL10)；中國大頰鼠卵巢細胞(CHO, Urlaub 與 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77 : 4216, (1980)；敘利亞金色大頰鼠細胞 MCB3901 (ATCC CRL-9595)；老鼠賽托利氏細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23 : 243-251 (1980))；猴子腎臟細胞(CVI ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL2)；犬科動物腎臟細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝臟細胞(hep G2, HB 8065)；老鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL 51)；TRI 細胞(Mather 等人, Annals N. Y. Acad. Sci 383 : 44-68 (1982))；NIH/3T3 細胞(ATCC CRL-1658)；及老鼠 L 細胞(ATCC CCL-1)。在某些具

體實施例中，係使用黑色素細胞。黑色素細胞為已在低等脊椎動物中發現之皮膚細胞。有關聯之物質與方法將按照根據美國專利第 5,462,856 號與美國專利第 6,051,386 號之揭示內容。此等專利揭示內容係據此以其全文併於本文供參考。其他細胞系將為一般熟諳此項技藝者所明瞭，且極多種細胞系可得自美國培養物類型收集處，10801 Boulevard 大學，Manassas, V. 20110-2209。

C. 候選化合物之篩檢

1. 一般性 GPCR 篩選檢測技術

當 G 蛋白質受體變得活性時，其係結合至 G 蛋白質(例如 Gq、Gs、Gi、Gz、Go)且刺激 GTP 之結合至 G 蛋白質。然後，G 蛋白質係充作 GTPase，且慢慢地使 GTP 水解成 GDP，而其中受體係在正常條件下變成去活化。但是，經活化之受體係持續使 GDP 交換成 GTP。GTP 之不可水解類似物 [³⁵S]GTP γ S，可用以監測經加強之結合至表現經活化受體之細胞膜。據報告 [³⁵S]GTP γ S 可於配位體不存在與存在下用以監測 G 蛋白偶合至細胞膜。此監測作用之實例，在此項技藝中所習知且可採用之其他實例中，特別是由 Traynor 與 Nahorski 在 1995 所報告。此項檢測系統之一種較佳用途，係為候選化合物之最初篩檢，因為此系統係一般性地可應用於所有 G 蛋白偶合受體，而不管會與受體之胞內功能部位交互作用之特定 G 蛋白質為何。

2. 專一 GPCR 篩選檢測技術

一旦候選化合物係使用 "一般性" G 蛋白偶合受體檢測

(意即選擇化合物係為催動劑或逆催動劑之檢測)而被確認，則在一些具體實施例中進一步篩檢以確認化合物已在受體位置交互作用，係為較佳。例如，藉由"一般性"檢測所確認之化合物可不結合至受體，但可替代地僅只是使G蛋白質自胞內功能部位"解開"。

a. G_s、G_z 及 G_i

G_s會刺激酵素腺苷基環化酶。另一方面，G_i(及G_z與G_o)，會抑制腺苷基環化酶。腺苷基環化酶會催化ATP轉化成cAMP；因此，會偶合G_s蛋白質之經活化GPCR係與增加細胞含量之cAMP有關聯。另一方面，會偶合G_i(或G_z、G_o)蛋白質之經活化GPCR係與降低細胞含量之cAMP有關聯。一般性地參閱"胞突接合傳遞之間接機制"，第8章，從神經元至腦部(第3版)Nichols, J. G.等人編著，Sinauer聯合公司(1992)。因此，可利用偵測cAMP之檢測以測定候選化合物是否為例如受體之逆催動劑(意即此種化合物將降低cAMP之含量)。此項技藝中已知用於度量cAMP之多種途徑均可利用；在一些具體實施例中，一種較佳途徑係在ELISA為基礎之格式中倚賴利用抗-cAMP抗體。可利用之另一種檢測類型係為全細胞第二信使報告子系統檢測。對於基因之啟動子係驅動特定基因所編碼之蛋白質之表現。環AMP係驅動基因表現，其方式是促進cAMP-回應性DNA結合蛋白質或轉錄因子(CREB)之結合，其係接著結合至啟動子，在稱為cAMP回應構件之專一位置，並驅動該基因之表現。於報告子基因例如β-半乳糖苷酶或蟲螢光素酶之前，可建構報告子系統，

其具有含有多重 cAMP 回應構件之啟動子。因此，經活化 Gs- 連結之受體會造成 cAMP 之蓄積，然後其會活化基因與報告子蛋白質之表現。報告子蛋白質，譬如 β -半乳糖苷酶或蟲螢光素酶，可接著使用標準生物化學檢測 (Chen 等人 1995) 偵測。

b. Go 與 Gq.

Gq 與 Go 係與酵素磷脂酶 C 之活化作用有關聯，其係依次使磷脂 PIP₂ 水解，釋出兩種胞內信使：二醯基甘油 (DAG) 與肌醇 1,4,5-三磷酸鹽 (IP₃)。增加之 IP₃ 蓄積係與 Gq- 及 Go- 結合受體之活化作用有關聯。一般性地參閱"胞突接合傳遞之間接機制", 第 8 章, 從神經元至腦部 (第 3 版) Nichols, J. G. 等人編著, Sinauer 聯合公司 (1992)。可利用偵測 IP₃ 蓄積之檢測，以測定候選化合物是否為例如 Gq- 或 Go- 結合受體之逆催動劑 (意即此種化合物會降低 IP₃ 之含量)。Gq- 結合受體亦可使用 AP1 報告子檢測進行檢驗，此係由於 Gq 依賴性磷脂酶 C 會造成含有 AP1 構件基因之活化作用；因此，經活化 Gq- 結合受體將証實增加此種基因之表現，而其中對其之逆催動劑將証實降低此種表現，而催動劑將証實增加此種表現。供此種偵測用之市購可得檢測物係可取用。

3. GPCR 融合蛋白質

利用內源構成上活性之 GPCR 或非內源構成上活化之 GPCR，以用於篩檢候選化合物，以直接確認逆催動劑或催動劑，係提供令人感興趣之篩檢挑戰，其原因在於藉由定義，受體係為活性的，即使在結合於其上之內源配位體不

存在下亦然。因此，為區別例如候選化合物存在下之非內源受體與該化合物不存在下之非內源受體間之情況，其目的是此種區別允許瞭解關於此種化合物是否可為逆催動劑或催動劑或對於此種受體未具有影響，故在一些具體實施例中，較佳係利用可加強此種區別之途徑。在一些具體實施例中，較佳途徑係利用 GPCR 融合蛋白質。

一般而言，一旦使用上文提出之檢測技術(以及熟諳此項技藝者已知之其他技術)測定出非內源 GPCR 已於構成上被活化，即能夠測定會與內源 GPCR 偶合之主要 G 蛋白質。G 蛋白質之偶合至 GPCR 係提供可被評估之發出訊息途徑。在一些具體實施例中，篩檢較佳係使用哺乳動物表現系統進行，因為將預期此種系統具有內源 G 蛋白質於其中。因此，藉由定義，在此種系統中，非內源構成上活化之 GPCR 將連續地發出訊息。在一些具體實施例中，此訊息較佳係被加強，以致在例如對受體之逆催動劑存在下，較可能情況是，特別是就篩檢而論，其將能夠更易於區別受體間之情況，當其與逆催動劑接觸時。

GPCR 融合蛋白質係意欲加強與非內源 GPCR 偶合之 G 蛋白之功效。GPCR 融合蛋白質對於以無論是內源、構成上活性之 GPCR 或非內源構成上活化之 GPCR 篩檢可為較佳，因為此種途徑會增加此種篩檢技術中所產生之信號。這在幫助顯著"信噪"比之中是重要的；此種顯著比例對於如本文中所示候選化合物之篩檢係為較佳。

可用於 GPCR 融合蛋白質表現之構造物之建構，係在此項

技藝中具有一般技術者之範圍內。市購可得表現載體與系統係提供可吻合研究人員特定需求之多種途徑。於此種GPCR融合蛋白質構造物之建構上之重要標準，係包括但不限於GPCR順序與G蛋白質順序應在架構內(較佳情況是，內源GPCR之順序係為G蛋白質順序之上游)，且GPCR之"終止"密碼子應被刪除或置換，以致在GPCR表現時，G蛋白質亦可被表現。GPCR可直接連結至G蛋白質，或可以有間隔基殘基介於此兩者之間(較佳為不超過約12個，惟此數目可容易地由一般熟諳此藝者確定)。基於方便性，較佳係使用間隔基。在一些具體實施例中，偶合至非內源GPCR之G蛋白質較佳係在產生GPCR融合蛋白質構造物之前已被確認。由於只有少數G蛋白質已被確認，故包含G蛋白質順序之構造物(意即一般性G蛋白質構造物，參閱下文實例5(a))較佳係可用於插入內源GPCR順序於其中；這就具有不同順序之多種不同內源GPCR之大規模篩檢而論，係提供進一步效率。

如上述，偶合至 G_i 、 G_z 及 G_o 之經活化GPCR，預期會抑制cAMP形成，使得以此等GPCR類型為基礎之檢測具挑戰性[意即cAMP訊息會在活化時降低，因此使得直接確認例如催動劑(其將進一步降低此訊息)具挑戰性]。正如將於本文中所揭示者，已被確定的是，對於此等受體類型，能夠產生未以GPCR之內源G蛋白質為基礎之GPCR融合蛋白質，以努力建立一種可實行之環化酶為基礎之檢測。因此，例如，內源 G_i 偶合之受體可被融合至Gs蛋白質-此種融合構造物，於表現時，會"驅動"或"迫使"內源GPCR與例如Gs而非

"天然" Gi 蛋白質偶合，以致環化酶為基礎之檢測可被建立。因此，對 Gi、Gz 及 Go 偶合之受體，在一些具體實施例中，當使用 GPCR 融合蛋白質，且此檢測係以腺苷基環化酶活性之偵測為基礎時，融合構造物較佳係以 Gs (或會刺激酵素腺苷基環化酶形成之相當 G 蛋白質) 建立。

表 B

G 蛋白質	於 GPCR 活化作用時 (意即構成活化作用或催動劑結合) 對於 cAMP 生產之作用	於 GPCR 活化作用時 (意即構成活化作用或催動劑結合) 對於 IP ₃ 蓄積之作用	在與逆催動劑接觸時對於 cAMP 生產之作用	在與逆催動劑接觸時對於 IP ₃ 蓄積之作用
Gs	增加	N/A	降低	N/A
Gi	降低	N/A	增加	N/A
Gz	降低	N/A	增加	N/A
Go	降低	增加	增加	降低
Gq	N/A	增加	N/A	降低

同樣地有效者為 G 蛋白質融合構造物，其係利用與 Gs、Gi、Gz 或 Go 蛋白質融合之 Gq 蛋白質。在一些具體實施例中，較佳融合構造物可以 Gq 蛋白質達成，其中 G-蛋白質 α -亞單位 ("G α q") 之最初六 (6) 個胺基酸係被刪除，而在 G α q 之 C-末端之最後五 (5) 個胺基酸係被吾人感興趣 G 蛋白質之 G α 之相應胺基酸置換。例如，融合構造物可具有與 Gi 蛋白質融合之 Gq (6 胺基酸缺失) 而造成 "Gq/Gi 融合構造物"。此融合構造物將迫使內源 Gi 偶合之受體偶合至其非內源 G 蛋白質 Gq，以致使第二信使例如肌醇三磷酸鹽或二醯基甘油可被度量，代替 cAMP 生產。

4. 標的Gi偶合GPCR與訊息增強子Gs偶合GPCR之共同轉染(cAMP為基準之檢測)

已知Gi偶合受體會抑制腺苷基環化酶，因此降低cAMP生產之含量，其可使得cAMP含量之評估具挑戰性。在某些具體實施例中，在度量cAMP生產上之降低作為活化作用時主要偶合Gi之受體活化作用之指標之一種有效技術，可藉由共同轉染訊息增強子而達成，例如非內源構成上活化之受體，其主要係於活化作用時與Gs偶合(例如TSHR-A623I；參閱下文)，與Gi連結之GPCR偶合。正如所顯見者，Gs偶合受體之活化作用可以cAMP生產上之增加為基礎進行測定。Gi偶合受體之活化作用會導致降低cAMP生產。因此，共同轉染途徑係意欲有利地利用此等"相反"影響。例如，非內源構成上活化之Gs偶合受體("訊息增強子")與單獨表現載體之共同轉染，係提供基線cAMP訊息(意即，雖然Gi偶合之受體將降低cAMP含量，但此"降低"將相對於藉由構成上活化Gs偶合訊息增強子所建立之實質增加cAMP含量)。然後，藉由共同轉染訊息增強子與"標的受體"，Gi偶合標的受體之逆催動劑將會增加所度量之cAMP訊息，而Gi偶合標的受體之催動劑將會降低此訊息。

使用此途徑直接確認之候選化合物應獨立地評估，以確保此等並非以訊息增強受體作為標的(這可在針對經共同轉染之受體篩檢之前或之後達成)。

D. 醫藥化學

候選化合物

此項技藝中已知之任何分子可經測試其調節(增加或降低)本發明 GPCR 活性之能力。為確認會調節活性之化合物，可將候選化合物直接提供至表現受體之細胞。

本發明之此項具體實施例係極適合篩檢化學庫，關於會調節例如抑制、拮抗或催動受體之量或活性之分子。此化學庫可為肽化合物庫、擬肽化合物庫、化學合成化合物庫，重組體例如噬菌體顯示庫，及活體外轉譯為基礎之化合物庫，其他非肽合成有機化合物庫等。本發明之此項具體實施例亦極適合篩檢內源候選化合物，包含生物物質，包括但不限於血漿與組織萃取物，及篩檢已知具有生物學活性之內源化合物庫。

在一些具體實施例中，候選化合物之直接確認係搭配經由結合化學技術產生之化合物進行，而其中數以千計之化合物係隨機地製成，以供此種分析用。候選化合物可為化學庫之一個成員。這可包括任何合宜數目之個體成員，例如數十至數百至數千至數百萬種適當化合物，例如肽、類肽及其他寡聚合化合物(環狀或線性)及模板為基礎之較小分子，例如苯并二氮七園類、乙內醯脲類、聯芳基類、碳環狀與多環狀化合物(例如萘類、吩噻吡類、吡啶類、類固醇等)、碳水化合物與胺基酸衍生物、二氫吡啶類、二苯甲基類及雜環類(例如三吡啶類、吡啶類、噻唑啶類等)。所引用之數目及所列表化合物之類型，係為說明性，而非限制。較佳化學庫包括低分子量之化學化合物與潛在治療劑。

舉例之化學庫可市購得自數種來源(ArQule, Tripos/PanLabs,

ChemDesign, 藥典)。在一些情況中，此等化學庫係使用結合策略產生，其係使化合物庫各成員之同一性編碼在成員化合物所連接之受質上，因此允許直接且立即確認有效調節物之分子。因此，在許多結合途徑中，於化合物板上之位置係指定之化合物之組成。而且，在一項實例中，單一板位置可具有1-20種化學品，其可經由投予含有吾人感興趣交互作用之井而經篩檢。因此，若檢出調節，則交互作用對之愈來愈小匯集庫可被檢出關於調節活性。藉由此種方法，許多候選者分子可經篩檢。

適合使用之許多不同化合物庫係為此項技藝中已知，並可用以提供根據本發明欲被測試之化合物。或者，化合物庫可使用標準方法建構。再者，更一般而言，結構上受束縛之有機不同(例如非肽)化合物庫亦可使用。舉例言之，可使用苯并二氮七園庫(參閱，例如 Bunin 等人, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4708-4712)。

於本發明之另一項具體實施例中，結合化學可用以確認本發明 GPCR 之調節物。結合化學係能夠建立含有數以百計、數以千計化合物之化合物庫，其中許多可於結構上類似。雖然高通過量篩檢程式係能夠篩檢此等巨大化合物庫，關於對已知標的之親和力，但新穎途徑已被發展，其係達成較小尺寸之化合物庫，但其係提供最大化學多樣性(參閱，例如 Matter, 1997, 醫藥化學期刊 40: 1219-1229)。

一種結合化學方法，親和力指紋圖譜，已於先前被用以測試小分子之不連續化合物庫，關於對所界定蛋白質名單

之結合親和力。藉由此篩檢所獲得之指紋圖譜，係用以預測個別化合物庫成員對於吾人感興趣之其他蛋白質或受體（在本發明中，為本發明之受體）之親和力。將此指紋圖譜與得自己知會與吾人感興趣之蛋白質反應之其他化合物之指紋圖譜比較，以預測化合物庫之化合物是否可能以類似方式反應。例如，並非測試大化合物庫中之每一配位體關於與複合物或蛋白質成份之交互作用，而是僅具有指紋圖譜類似已知具有該活性之其他化合物之配位體可能被測試（參閱，例如 Kauvar 等人，1995，化學與生物學 2：107-118；Kauvar，1995，親和力指紋圖譜，國際製藥 .8：25-28；及 Kauvar，在新穎未知領域中之農業化學品免疫檢測上藉由圖樣辨識之毒性化學偵測，編輯者 D. Kurtz., L. Stanker 及 J.H. Skerritt., 1995, AOAC：Washington, D.C., 305-312）。

經確認為調節物之候選化合物

一般而言，此種篩檢之結果將為具有獨特核心結構之化合物；接著，可使此等化合物環繞較佳核心結構接受另外之化學改質，以進一步增強其醫藥性質。此種技術係為此項技藝中已知，故將不詳細地在本專利文件中提出。

在某些具體實施例中，該經確認之調節物係為生物可利用。一般熟諳此項技藝者可採用之多種計算途徑已被發展，以預測藥物之口服生物利用率 [Ooms 等人，Biochim Biophys Acta (2002) 1587：118-25；Clark & Grootenhuis, Curr Opin Drug Discov Devel (2002) 5：382-90；Cheng 等人，J Comput Chem (2002) 23：172-83；Norinder & Haeberlein, Adv Drug Deliv Rev (2002) 54：291-313；Matter

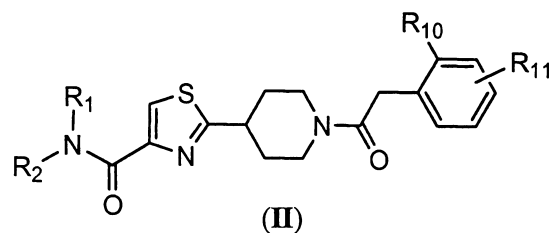
等人, Comb Chem High Throughput Screen (2001) 4: 453-75; Podlogar & Muegge, Curr Top Med Chem (2001) 1: 257-75; 其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。再者, 陽電子發射局部 X 射線檢法 (PET) 已成功地由許多集團使用, 以獲得藥物分佈之直接度量, 包括在哺乳動物身體中, 於藥物之口服投藥後, 口服生物利用率之評估, 包括非人類靈長動物與人類身體 [Noda 等人, J Nucl Med (2003) 44: 105-8; Gulyas 等人, Eur J Nucl Med Mol Imaging (2002) 29: 1031-8; Kanerva 等人, 精神藥理學 (1999) 145: 76-81; 其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。亦參閱下文, 包括實例 25。

在某些具體實施例中, 該生物可利用經確認之調節物進一步能夠越過血液-腦部障壁。一般熟諳此項技藝者可採用之多種計算途徑已被發展, 以預測血液-腦部障壁之滲透 [Ooms 等人, Biochim Biophys Acta (2002) 1587: 118-25; Clark & Grootenhuis, Curr Opin Drug Discov Devel (2002) 5: 382-90; Cheng 等人, J Comput Chem (2002) 23: 172-83; Norinder & Haeberlein, Adv Drug Deliv Rev (2002) 54: 291-313; Matter 等人, Comb Chem High Throughput Screen (2001) 4: 453-75; Podlogar & Muegge, Curr Top Med Chem (2001) 1: 257-75; 其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。多種活體外方法已被發展出, 以預測藥物之血液-腦部障壁滲透性 [Lohmann 等人, J Drug Target (2002) 10: 263-76; Hansen 等人, J Pharm Biomed Anal (2002) 27: 945-58; Otis 等人, J Pharmacol Toxicol Methods (2001) 45: 71-7; Dehouck 等人, J neurochem (1990) 54: 1798-801; 其中每一件之揭示內容係據此

以其全文併於本文供參考]。再者，多種策略已被發展出，以加強藥物傳輸越過血液-腦部障壁 [Scherrmann, *Vascul Pharmacol* (2002) 38: 349-54; Pardridge, *Arch Neurol* (2002) 59: 35-40; Pardridge, *神經元* (2002) 36: 555-8; 其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。最後，陽電子發射局部X射線檢法(PET)已由許多集團成功地使用，以獲得藥物分佈之直接度量，包括在腦部內，於哺乳動物身體中，包括非人類靈長動物與人類身體 [Noda 等人, *J Nucl Med* (2003) 44: 105-8; Gulyas 等人, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2002) 29: 1031-8; Kanerva 等人, *精神藥理學* (1999) 145: 76-81; 其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。亦參閱下文，包括實例 26。

E. 本發明之化合物

本發明之一方面係關於式(II)化合物：



或其藥學上可接受之鹽，

其中：

R₁ 為 H 或 C₁₋₆ 烷基；

R₂ 為 2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡啶-3-基；或

R₁ 與 R₂ 和彼等所結合之氮一起形成 3,4-二氫-2H-喹啉-1-基；及

R_{10} 與 R_{11} 各獨立為H或鹵素。

F. 製造本發明化合物之合成方法

本發明化合物之製備-一般合成方法

本發明之新穎化合物可容易地根據多種合成方法製備，其全部均為熟諳此藝者所熟悉。某些製備本發明化合物之方法包括但不限於下文圖式1-3中所述者。

新穎2-六氫吡啶-4-基-噻唑類之中間物(AD)可以圖式1所示製成。於氮上以適當保護基(意即PG)保護之硫醯胺(AA)，係經由Hantzsch-類似反應，以在羧酸上經保護之3-鹵基-2-酮基-丙酸(AB)環化，而得二保護之2-六氫吡啶-4-基-噻唑(AC)。一般而言，兩個保護基係為不同。環化作用之適當溶劑包括例如醇類(譬如甲醇、乙醇及丙醇)、低碳鹵化碳類(譬如二氯甲烷、二氯乙烷及氯仿)、DMF等。環化作用之反應溫度可涵蓋從約室溫至約為所使用溶劑沸點之範圍；一般而言，此溫度範圍係為約 50°C 至約 90°C 。

對於硫醯胺(AA)之適當保護基包括胺基甲酸第三-丁酯(BOC)、胺基甲酸苄酯(Cbz)、胺基甲酸對-甲氧基苄酯(Moz)等。各種方法均可用以保護硫醯胺(AA)之氮。例如，胺基甲酸第三-丁酯基團可使用多種試劑，譬如 $(\text{BOC})_2\text{O}$ ，以適當鹼(譬如NaOH、KOH或 Me_4NOH)，及在適當溶劑(THF、 CH_3CN 、DMF、EtOH、MeOH、 H_2O 或其混合物)中，於約 0°C 至約 50°C 之溫度下引進。

對於3-鹵基-2-酮基-丙酸(AB)之適當保護基，包括烷基酯類(譬如甲基、乙基、丙基及第三-丁基)、經取代之甲基酯

類(譬如甲氧基甲基、甲氧基乙氧基甲基及苄氧基甲基)、視情況經取代之苄基酯類(譬如苄基、4-甲氧基苄基及2,6-二甲氧基苄基)等。一種特別有用之經保護3-鹵基-2-酮基-丙酸(AB)係為3-溴基-2-酮基-丙酸乙酯,亦常被稱為溴丙酮酸乙酯。

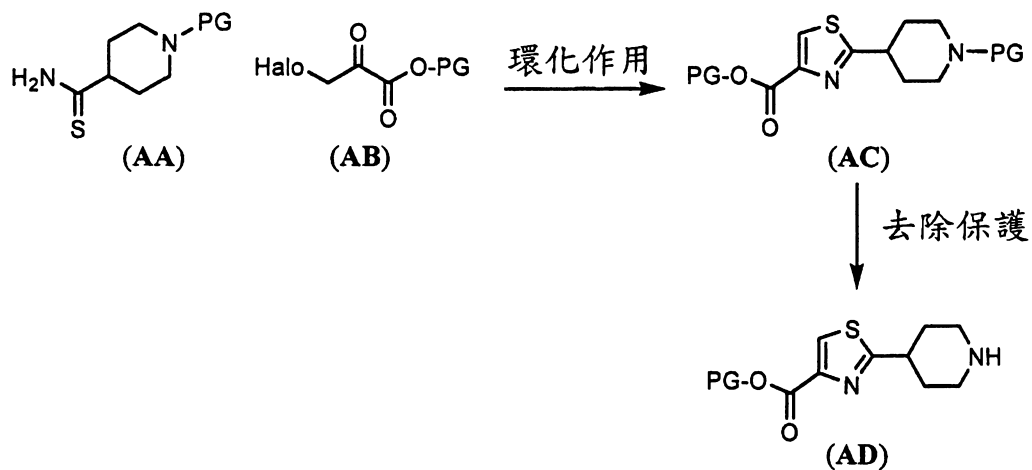
適合極多種合成轉變之其他代表性保護基,係揭示於Greene與Wuts,有機合成之保護基,第三版,John Wiley & Sons, New York, 1999,其揭示內容係以其全文併於本文供參考。

為方便起見,於2-六氫吡啶-4-基-噻唑(AC)中之兩個保護基係經選擇,因此一個保護基可實質上被移除,而不會實質上影響另一個保護基。此類型之策略係被稱為正交保護。一項實例包括以BOC基團保護氮,及保護羧酸成為甲基或乙基酯。在此實例中,BOC基團可在酸性條件下被移除,而不會實質上影響酯基。或者,由於BOC基團並未實質上在鹼性條件下被水解,故該酯可被移除,而不會實質上影響BOC基團。許多正交保護圖式係為此項技藝中已知,並可被應用於此處。

接著,如圖式1中所示,對於2-六氫吡啶-4-基-噻唑類(AC)之氮保護基係被移除(意即去除保護),而實質上保持羧酸保護,以獲得共用中間物(AD)。在該氮係以BOC基團保護時之情況中,有效分裂可於酸存在下,且視情況於適當溶劑中達成。適當酸包括HCl(含水或無水)、HBr(含水或無水)、H₂SO₄、三氟醋酸、對-甲苯磺酸等。當存在時,適當溶劑包括酯溶劑(譬如醋酸乙酯)、烷基醇類(譬如甲醇、乙

醇、異-丙醇、正-丙醇及正-丁醇)、醚性溶劑(譬如四氫呋喃與二氧陸園)等或其混合物。可視情況添加清除劑,以捕獲所釋出之陽離子。適當清除劑包括硫酚、甲苯醚、硫代甲苯醚、甲硫酚、甲酚、硫化二甲烷等。關於2-六氫吡啶-4-基-噻唑類(AC)中之氮,其去除保護之反應溫度範圍可涵蓋從約-20°C至約為所使用溶劑之沸點範圍;一般而言,此溫度範圍係為約-10°C至約50°C。

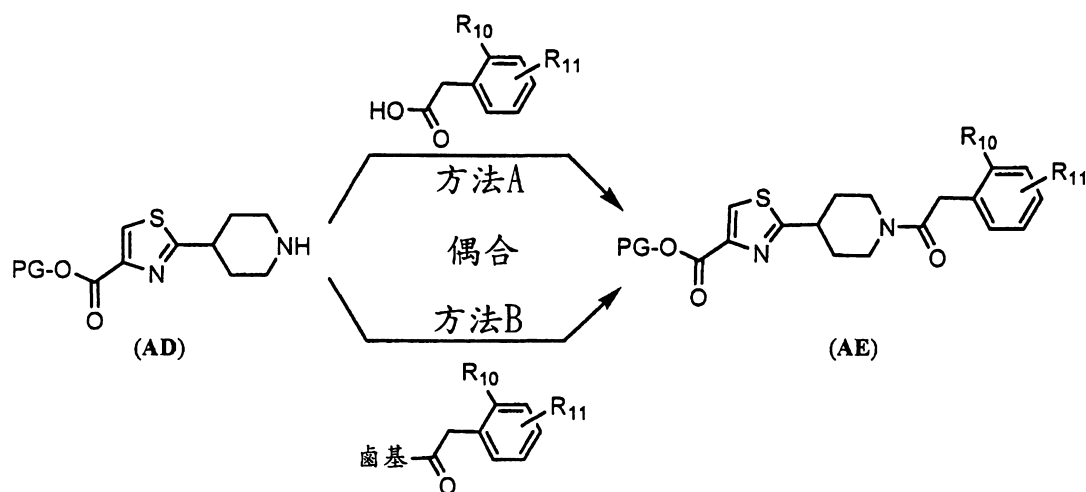
圖式 1



中間物(AD)係於脫水縮合劑與惰性溶劑存在下,使用或未使用鹼,與羧酸偶合,以提供醯胺(AE),如圖式2方法A中所示。適當脫水縮合劑包括二環己基碳化二亞胺(DCC)、1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC·HCl)、六氟磷酸溴-參-四氫吡咯基-磷(PyBroP)、六氟磷酸O-(7-氮苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基錄(HATU)、1-環己基-3-甲基聚苯乙烯-碳化二亞胺等。適當鹼包括三級胺類(譬如N,N-二異丙基-乙胺、N-甲基嗎福啉及三乙胺)。適當惰性溶劑包括低鹵代化碳溶劑(較佳為二氯甲烷、二氯乙烷及氯仿)、含醚溶劑(譬如四氫呋喃與二氧陸園)、腈溶劑(譬如乙腈)、醯胺溶

劑(譬如N,N-二甲基甲醯胺與N,N-二甲基乙醯胺)或其混合物。選用之其他試劑可使用於此偶合反應，且此等試劑包括1-羥基苯并三唑(HOBT)、HOBT-6-羧醯胺基甲基聚苯乙烯、1-羥基-7-氮苯并三唑(HOAT)等。適當反應溫度範圍為約-25°C至約60°C，及約0°C至約35°C。

圖式 2

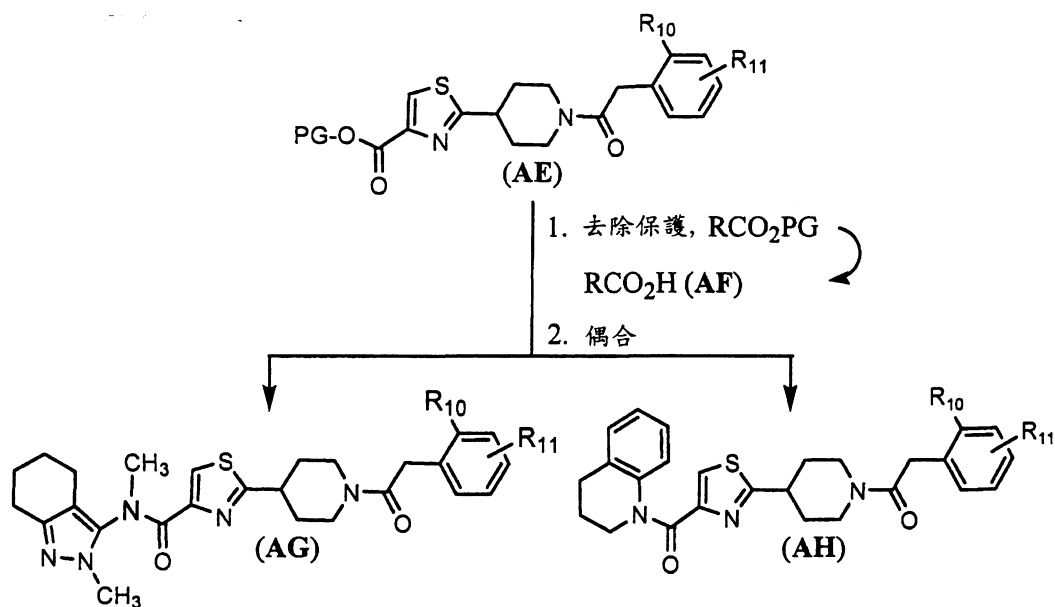


或者，醯胺(AE)可藉由醯胺化反應，使用鹵化醯與中間物(AD)，於鹼與惰性溶劑存在下獲得，如圖式2方法B中所示。適當鹵化醯包括氯化醯或溴化醯。適當鹼包括鹼金屬碳酸鹽(譬如碳酸鈉與碳酸鉀)、鹼金屬氫碳酸鹽(譬如碳酸氫鈉與碳酸氫鉀)、鹼金屬氫氧化物(譬如氫氧化鈉與氫氧化鉀)、三級胺類(譬如N,N-二異丙基乙胺、三乙胺及N-甲基嗎福啉)及芳族胺類(譬如吡啶、咪唑及聚(4-乙烯基吡啶))。適當惰性溶劑包括低碳鹵化碳溶劑(譬如二氯甲烷、二氯乙烷及氯仿)、含醚溶劑(譬如四氫呋喃與二氧陸園)、醯胺溶劑(譬如N,N-二甲基甲醯胺與N,N-二甲基乙醯胺)及芳族溶劑(譬如甲苯、苯及吡啶)。適當反應溫度範圍為約-25°C至

約 55°C，較佳為約 -5°C 至約 40°C。

醯胺 (AE) 中之經保護酸基係被移除，而得其相應之羧酸，如圖式 3 中所示。使羧酸去除保護之適當方法係為原先熟諳此藝者所已知。例如，可使烷基酯類 (譬如甲基、乙基及正-丙基) 經由水解作用，於鹼存在下及在適當溶劑中轉化成羧酸類。適當鹼包括鹼金屬碳酸鹽 (譬如碳酸鈉與碳酸鉀)、鹼金屬氫碳酸鹽 (譬如碳酸氫鈉與碳酸氫鉀) 及鹼金屬氫氧化物 (譬如氫氧化鋰、氫氧化鈉及氫氧化鉀)。去除保護之適當溶劑包括烷基醇類 (譬如甲醇、乙醇、異-丙醇、正-丙醇及正-丁醇)、含醚溶劑 (譬如四氫呋喃與二氧陸園) 等或其混合物，此水解作用較佳係於 H₂O 存在下進行。供醯胺 (AE) 中酸基去除保護之反應溫度，其範圍可為約室溫至約為所使用溶劑之沸點；一般而言，溫度範圍係為約 50°C 至約 90°C。供酯類以及其他其他適當保護基用之其他去除保護方法，係描述於 Greene 與 Wuts, 有機合成之保護基, 第三版, John Wiley & Sons, New York, 1999, 同前文出處。羧酸 (AF) 係與無論是甲基-(2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡啶-3-基)-胺或 1,2,3,4-四氫-喹啉偶合，個別獲得式 (AG) 與 (AH) 化合物。一般而言，此偶合可於脫水縮合劑與惰性溶劑存在下，使用或未使用鹼，或藉由醯胺化反應，使用產生自羧酸 (AF) 之鹵化醯，於鹼與惰性溶劑存在下進行，各方法均如前文關於圖式 2 所述。

圖式 3



本發明之一些具體實施例包括如下文所顯示表 1 中所示之化合物。

表 1

化合物 #	結構	化學名稱
1		2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸甲基-(2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡唑-3-基)-醯胺
2		2-(2-氯苯基)-1-{4-[4-(3,4-二氫-2H-喹啉-1-羰基)-噻唑-2-基]-六氫吡啶-1-基}-乙酮
3		2-{1-[2-(2-氟苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸甲基-(2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡唑-3-基)-醯胺

G. 醫藥組合物

本發明係提供治療(與預防)之方法，其方式是對需要該治療(或預防)之個體投予治療上有效量之本發明調節物[亦參閱，例如PCT申請案號PCT/IB02/01461，於2002年8月29日以WO 02/066505公告；其中每一案之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。於一項較佳方面，調節物為催動劑。於一項較佳方面，調節物係實質上經純化。個體較佳為動物，包括但不限於譬如母牛、豬、馬、雞、非人類靈長類動物、貓、狗、兔子、大白鼠、老鼠等動物，且較佳為哺乳動物，而最佳為人類。

本發明之調節物可投予非人類動物[參閱下文實例]及/或人類，單獨或在醫藥或生理學上可接受之組合物中，其中係使用此項技藝中習知之技術，將其與適當載劑或賦形劑混合。適當藥學上可接受之載劑係為此項技藝中可取用；例如，參閱Remington氏醫藥科學，第16版，1980，Mack出版公司(Oslo等人編著)。

然後，於治療上有效劑量下提供該醫藥或生理學上可接受之組合物。治療上有效劑量係指當以說明性而非限制地藉由本文中所述方法測定時，足以造成預防或改善病症之病徵或生理狀態之調節物量，其中預防或改善病症之病徵或生理狀態係包括但不限於降低血糖濃度、預防或治療某些代謝病症，譬如胰島素抗藥性、減弱之葡萄糖容許度及糖尿病，以及預防或治療高血糖濃度之併發症，譬如動脈粥瘤硬化、心臟疾病、中風、高血壓及末梢血管疾病。

特別考慮的是，本發明之調節物可單獨或併用其他藥學

上或生理學上可接受之化合物一起提供。用於治療本發明病症之其他化合物，其中本發明病症之治療係包括但不限於降低血糖濃度，預防或治療某些代謝病症，譬如胰島素抗藥性、減弱之葡萄糖容許度及糖尿病，以及預防或治療高血糖濃度之併發症，譬如動脈粥瘤硬化、心臟疾病、中風、高血壓及末梢血管疾病，係為目前此項技藝中所習知。本發明之一方面係涵蓋根據本文中所揭示之具體實施例，進一步包含一或多種藥劑之用途，該藥劑係選自包括磺醯脲(例如優降糖(glibenclamide)、葛利皮再得(glipizide)、葛利可拉再(gliclazide)、葛利美皮利得(glimepiride))、美革里汀奈(meglitinide)(例如瑞巴葛奈(repaglinide)、拿貼葛奈(nateglinide))、雙縮脲(例如二甲雙胍(metformin))、 α -葡萄糖苷酶抑制劑(例如阿卡糖(acarbose)、約巴瑞史塔(epalrestat)、米葛利妥(miglitol)、沃葛利糖(voglibose))、噻唑啉二酮(例如若西葛塔宗(rosiglitazone)、皮歐葛塔宗(pioglitazone))、胰島素類似物(例如胰島素利思普羅(lispro)、胰島素阿斯帕特(aspart)、胰島素葛拉金(glargine))、吡啶羧酸鎳/生物素及生物劑(例如脂結合素或包含其C-末端球形功能部位之片段，或脂結合素或該片段之多聚體；或脂結合素受體AdipoR1或AdipoR2之催動劑，較佳為其中該催動劑係為口服生物可利用)。此外，明確意欲涵蓋在內的是，本發明之調節物，例如本發明之催動劑與部份催動劑可單獨或併用磷酸二酯酶(PDE)抑制劑(包含對於類型4 cAMP 專一之PDE(PDE4)具選擇性之抑制劑，例如洛弗拉斯特(Roflumilast)；對於PDE4B具選擇性之抑制劑；及

對於 PDE4B2 具選擇性之抑制劑)一起提供。

在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括減弱之葡萄糖容許度、胰島素抗藥性、胰島素過多及糖尿病。在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

在某些具體實施例中，高血糖濃度之併發症係選自包括徵候簇 X、動脈粥瘤硬化、粥瘤疾病、心臟疾病、高血壓、中風、神經病、視網膜病、腎病及末梢血管疾病。心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇 X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例

中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

投藥途徑

適當投藥途徑包括口腔、鼻、直腸、經黏膜、經皮或腸投藥，非經腸傳輸，包括肌內、皮下、髓內注射，以及鞘內、直接室內、靜脈內、腹膜腔內、鼻內、肺內(吸入)或眼球內注射，使用此項技藝中已知之方法。其他特佳投藥途徑係為氣溶膠與積貯配方。持續釋出配方，特別是本發明藥劑之積貯，係明確地意欲涵蓋在內。在某些具體實施例中，投藥途徑為口腔。

組合物/配方

供使用於根據本發明之醫藥或生理學上可接受之組合物與藥劑，可以習用方式調配，使用一或多種生理學上可接受之載劑，包括賦形劑與輔助劑。適當配方係依所選擇之投藥途徑而定。

某些本文中所述之藥劑係包含藥學上或生理學上可接受之載劑與至少一種本發明之調節物。對注射而言，可將本發明之藥劑調配在水溶液中，較佳係在生理學上可相容之緩衝劑中，譬如 Hanks 氏溶液、林格氏溶液或生理食鹽水緩衝劑，譬如磷酸鹽或重碳酸鹽緩衝劑。對於經黏膜投藥而言，對於欲被滲透障壁適當之浸透劑，係被使用於此配方中。此種浸透劑係為此項技藝中一般已知。

可以經口方式服用之醫藥或生理學上可接受之製劑，包括由明膠製成之推送配合膠囊，以及由明膠與增塑劑譬如甘油或花楸醇製成之柔軟密封膠囊。推送配合膠囊可含有活性成份，並混合填料，譬如乳糖，黏合劑譬如澱粉，及/或潤滑劑譬如滑石或硬脂酸鎂，及視情況選用之安定劑。在軟性膠囊中，可使活性化合物溶解或懸浮於適當液體中，譬如脂肪油類、液態石蠟或液態聚乙二醇。此外，可添加安定劑。供口服投藥之所有配方應在適合此種投藥之劑量中。

對面頰投藥而言，組合物可採取以習用方式調配之片劑或錠劑形式。

對於藉吸入投藥，供根據本發明使用之化合物可合宜地以氣溶膠噴霧呈現形式，自霧化罐用之加壓包裝，並利用適當氣態推進劑，例如二氧化碳進行傳輸。在加壓氣溶膠之情況中，可經由提供閥門，決定劑量單位，以傳輸經計量之量。供使用於吸入器或吹入器中之膠囊與藥筒，例如明膠製成，可經調配而含有化合物與適當粉末基料譬如乳糖或澱粉之粉末混合物。

此等化合物可經調配，以藉由注射供非經腸投藥，例如藉由大丸劑注射或連續灌注。注射用配方可以單位劑量呈現，例如在安瓿瓶中或在多劑量容器中，具有外加之防腐劑。組合物可採取多種形式，譬如懸浮液、溶液或乳化液，在水性媒劑中，並可含有調配劑，譬如懸浮、安定化及/或分散劑。

醫藥或生理學上可接受之供非經腸投藥之配方，包括呈水溶性形式之活性化合物之水溶液。含水懸浮液可含有會增加此懸浮液黏度之物質，譬如羧甲基纖維素鈉、花楸醇或葡聚糖。此懸浮液亦可視情況含有適當安定劑或會增加化合物之溶解度以允許製備高度濃縮溶液之藥劑。

或者，活性成份可呈粉末或凍乾形式，在使用之前以適當媒劑賦形，譬如無菌、不含熱原之水。

除了前述配方之外，化合物亦可被調配成積貯製劑。此種長期作用配方可藉由植入(例如皮下方式或肌內方式)或藉由肌內注射投藥。因此，例如此等化合物可使用適當聚合性或疏水性物質(例如作成在可接受油中之乳化液)或離子交換樹脂調配，或作成節制性地可溶之衍生物，例如作成節制性可溶鹽。

在一項特定具體實施例中，化合物可經由受控釋出系統傳輸。於一項具體實施例中，可使用泵(Langer, 同前文出處；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201-240；Buchwald 等人, 1980, 手術, 88: 507-516；Saudek 等人, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574-579)。於另一項具體實施例中，可使用聚合物質(受控釋出之醫療應用, Langer 與 Wise 編著, CRC 出版社, Boca Raton, Florida, 1974；受控藥物生物利用率, 藥物產品設計與性能, Smolen 與 Ball 編著, Wiley, New York, 1984；Ranger 與 Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61；Levy 等人, 1985, Science 228: 190-192；During 等人, 1989, Ann. Neurol. 25: 351-356；Howard 等人, 1989, J. Neurosurg. 71: 858-863)。其他受控釋出系統係討

論於 Langer 之回顧 (1990, Science 249: 1527-1533) 中。

此外，化合物可使用持續釋出系統傳輸，譬如含有治療劑之固體疏水性聚合體之半透性基質。各種持續釋出物質已被建立，且係為熟諳此藝者所習知。持續釋出膠囊，依其化學性質而定，可釋出化合物歷經數週，至高達超過 100 天。

依治療試劑之化學性質與生物安定性而定，可採用調節物安定化作用之其他策略。

醫藥或生理學上可接受之組合物亦可包含適當固體或凝膠相載劑或賦形劑。此種載劑或賦形劑之實例包括但不限於碳酸鈣、磷酸鈣、各種糖類、澱粉、纖維素衍生物、明膠，及聚合體，譬如聚乙二醇。

有效劑量

適用於本發明之醫藥或生理學上可接受之組合物，包括其中係以有效量包含活性成份以達成其意欲目的之組合物。更明確言之，治療上有效量係意謂有效預防被治療病患現有病徵之發展或使其緩和之量。有效量之測定係在熟諳此藝者之能力範圍內，尤其是在明白本文中所提供之詳細揭示內容之後。

對於在本發明方法中使用之任何化合物，治療上有效劑量最初可估計自細胞培養物檢測。例如，劑量可被調配在動物模式中，以達成循環濃度範圍，其包括或涵蓋一個濃度點或範圍，經証實會在細胞中刺激葡萄糖吸收，以預防或治療某些代謝病症，或以預防或治療高血糖濃度之併發

症[參閱下文實例，關於活體外檢測與活體內動物模式]。
此種資訊可用以更精確地測定可使用於人類之劑量。

治療上有效劑量係指該化合物之量會造成病患中病徵之改善。此種化合物之毒性與治療功效，可藉標準醫藥程序，在細胞培養物或實驗動物中測定，例如測定LD₅₀(使50%試驗個體群致死之劑量)與ED₅₀(在50%試驗個體群中，於治療上有效之劑量)。於毒性與治療作用間之劑量比係為治療指數，且其可以LD₅₀與ED₅₀間之比例表示。顯示高治療指數之化合物係為較佳。

得自此等細胞培養物檢測與動物研究之資料，可用於調配供使用於人類之劑量範圍。此種化合物之劑量較佳係位於循環濃度之範圍內，包括ED₅₀，具有極少或無毒性。此劑量可在此範圍內改變，依所採用之劑型及所使用之投藥途徑而定。正確配方、投藥途徑及劑量可由個別醫師鑒於病患症狀作選擇(參閱，例如Fingl等人, 1975, 於"治療學之藥理學基礎", 第1章中)。

劑量與間隔可個別調整，以提供活性化合物之血漿含量，其係足以預防或治療本發明之病症，依特定狀況而定。必須達成此等作用之劑量係依個別特徵與投藥途徑而定。

劑量間隔亦可使用最低有效濃度之數值測定。化合物應使用保持血漿含量高於最低有效濃度歷經10-90%時間，較佳係在30-99%之間，而最佳係在50-90%間之服用法投藥。於局部投藥或選擇性吸收之情況中，藥物之有效局部濃度可能不與血漿濃度有關聯。

所投予組合物之量當然係依被治療病患、病患體重、疾患之嚴重性、投藥方式及指定醫師之判斷而定。

可在每日或規則基礎下投藥以達成所要結果之本發明調節物量之較佳劑量範圍，係為0.1-100毫克/公斤身體質量。其他較佳劑量範圍係為0.1-30毫克/公斤身體質量。其他較佳劑量範圍係為0.1-10毫克/公斤身體質量。其他較佳劑量範圍係為0.1-3.0毫克/公斤身體質量。當然，此等每日劑量可在一天之過程期間，以少量週期性地傳輸或投藥。應注意的是，此等劑量範圍僅為較佳範圍，並非意謂限制本發明。該所要之結果包括但不限於降低血糖濃度，預防或治療某些代謝病症，譬如胰島素抗藥性、減弱之葡萄糖容許度及糖尿病，以及預防或治療高血糖濃度之併發症，譬如動脈粥瘤硬化、心臟疾病、中風、高血壓及末梢血管疾病。

H. 治療方法

本發明係特別描述一些方法，包括但不限於降低血糖濃度之方法，預防或治療某些代謝病症譬如胰島素抗藥性與糖尿病之方法，及預防或治療高血糖濃度之併發症譬如動脈粥瘤硬化、心臟疾病、中風、高血壓及末梢血管疾病之方法，其包括對需要此種治療之個體提供本發明之調節物。在某些具體實施例中，調節物為催動劑。在一些具體實施例中，該調節物係為口服生物可利用。在一些具體實施例中，該口服生物可利用之調節物係進一步能夠越過血液-腦部障壁。在某些具體實施例中，調節物係在醫藥或生理學上可接受之組合物中提供至個體。在某些具體實施例

中，調節物係在醫藥組合物中提供至個體。在某些具體實施例中，調節物係在生理學上可接受之組合物中提供至個體。在某些具體實施例中，調節物係在醫藥或生理學上可接受之組合物中提供至個體，其係以經口方式服用。在某些具體實施例中，個體係為非人類哺乳動物。在某些具體實施例中，個體係為哺乳動物。在某些具體實施例中，個體或哺乳動物係為人類。

在某些具體實施例中，代謝病症係選自包括減弱之葡萄糖容許度、胰島素抗藥性、胰島素過多及糖尿病。在一些具體實施例中，糖尿病為第1型糖尿病。在某些較佳具體實施例中，糖尿病為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第1型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為第2型糖尿病。在某些具體實施例中，代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素抗藥性。在某些具體實施例中，代謝病症為胰島素過多。在某些具體實施例中，代謝病症係關於個體中之高血糖濃度。

在某些具體實施例中，高血糖濃度之併發症係選自包括徵候簇X、動脈粥瘤硬化、粥瘤疾病、心臟疾病、高血壓、中風、神經病、視網膜病、腎病及末梢血管疾病。心臟疾病包括但不限於心臟機能不全、冠狀機能不全、冠狀動脈疾病及高血壓。在某些具體實施例中，併發症為徵候簇X。在某些具體實施例中，併發症為動脈粥瘤硬化。在某些具體實施例中，併發症為粥瘤疾病。在某些具體實施例中，

併發症為心臟疾病。在某些具體實施例中，併發症為心臟機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀機能不全。在某些具體實施例中，併發症為冠狀動脈疾病。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為高血壓。在某些具體實施例中，併發症為中風。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為視網膜病。在某些具體實施例中，併發症為神經病。在某些具體實施例中，併發症為末梢血管疾病。在某些具體實施例中，併發症為多囊卵巢徵候簇。在某些具體實施例中，併發症為血脂肪過多。

I. 其他利用性

調節(意即增加、降低或阻斷)RUP43受體功能性之藥劑可經由使候選化合物與RUP43受體接觸，並測定候選化合物對於RUP43受體功能性之作用而被確認。化合物調節RUP43受體功能性之選擇性，可經由將其對於RUP43受體之作用與其對於其他G蛋白質偶合受體之作用作比較進行評估。藉由說明而非限制，內源RUP43受體之調節物，在與得自相同物種之一或多種其他內源G蛋白質-偶合受體比較下，可經證實係為選擇性。藉由說明而非限制，若內源RUP43受體之催動劑對於內源RUP43受體之EC50係為至少100倍低於該催動劑對於得自相同物種之一或多種其他內源G蛋白質-偶合受體之EC50，則該催動劑可經證實係為選擇性RUP43催動劑。在確認會調節RUP43受體功能性之化合物後，此種候選化合物可進一步在其他檢測中測試，包括但不限於活體內模

式，以確認或定量其活性。RUP43受體功能性之調節物係為治療上可用於治療其中涉及正常或迷行RUP43受體功能性之疾病與生理學症狀。

RUP43受體配位體之藥劑可經由使候選化合物與RUP43受體接觸，並測定候選化合物是否結合至RUP43受體而被確認。結合至RUP43受體之化合物之選擇性，可經由將其結合至RUP43受體與其在其他受體上之結合作比較進行評估。藉由說明而非限制，內源RUP43受體之配位體，在與得自相同物種之一或多種其他內源G蛋白質-偶合受體比較下，可經証實係為選擇性。RUP43受體功能性調節物之配位體係為治療上可用於治療其中涉及正常或迷行RUP43受體功能性之疾病與生理學症狀。

本發明亦關於經確認為RUP43受體調節物或配位體之本發明化合物之經放射性同性素標識之變型，其不僅可用於放射線成像，且亦可用於檢測中，活體外與活體內兩者，以使組織試樣(包括人類)中之RUP43受體定位與定量，並藉由抑制經放射性同性素標識化合物之結合，以確認RUP43受體配位體。本發明之進一步目的係為發展新穎RUP43受體檢測，其包含此種經放射性同性素標識之化合物。

本發明係包含經確認為RUP43受體調節物或配位體之本發明化合物之經放射性同性素標識之變型。

本發明亦關於可用於偵測經結合至RUP43受體之配位體之待測配位體之經放射性同性素標識之變型。在一些具體實施例中，本發明係明確地意欲涵蓋該可用於偵測經結合

至 RUP43 受體之配位體之經放射性標識待測配位體之化合物庫。在某些具體實施例中，該化合物庫包含至少約 10，至少約 10^2 ，至少約 10^3 ，至少約 10^5 或至少約 10^6 該經放射性標識之待測化合物。本發明之進一步目的係為發展新穎 RUP43 受體檢測，其包含此種經放射性同性素標識之待測配位體。

在一些具體實施例中，一種化合物之經放射性同性素標識變型係與該化合物相同，惟以下事實除外，一或多個原子係被一個具有原子質量或質量數不同於典型上在天然中發現(意即天然生成)之原子質量或質量數之原子置換或取代。可被併入本發明化合物中之適當放射性核素，包括但不限於 ^2H (氘)， ^3H (氚)， ^{11}C ， ^{13}C ， ^{14}C ， ^{13}N ， ^{15}N ， ^{15}O ， ^{17}O ， ^{18}O ， ^{18}F ， ^{35}S ， ^{36}Cl ， ^{82}Br ， ^{75}Br ， ^{76}Br ， ^{77}Br ， ^{123}I ， ^{124}I ， ^{125}I 及 ^{131}I 。被併入本發明放射性標識化合物中之放射性核素，係依該放射性標識化合物之特定應用而定。例如，對於活體外 RUP43 受體標識與競爭檢測而言，併入 ^3H ， ^{14}C ， ^{82}Br ， ^{125}I ， ^{131}I ， ^{35}S 之化合物一般而言最有用。對放射線成像應用而言， ^{11}C ， ^{18}F ， ^{125}I ， ^{123}I ， ^{124}I ， ^{131}I ， ^{75}Br ， ^{76}Br 或 ^{77}Br 一般而言最有用。在一些具體實施例中，放射性核素係選自包括 ^3H ， ^{11}C ， ^{18}F ， ^{14}C ， ^{125}I ， ^{124}I ， ^{131}I ， ^{35}S 及 ^{82}Br 。

併入放射同位素至有機化合物中之合成方法係可應用於本發明化合物，且係為此項技藝中所習知。此等合成方法，例如併入活性含量之氘至標的分子中，係如下述：

A. 以氘氣體之催化還原作用 - 此程序於正常情況下會產

生高比活性產物，且需要經鹵化或不飽和之先質。

B. 以硼氫化 [^3H]鈉之還原作用 - 此程序係頗較不昂貴，且需要含有可還原官能基之先質，譬如醛類、酮類、內酯、酯類等。

C. 以氫化 [^3H]鋰鋁之還原作用 - 此程序係提供在幾乎理論比活性下之產物。其亦需要含有可還原官能基之先質，譬如醛類、酮類、內酯、酯類等。

D. 氬氣體曝露標識 - 此程序係涉及使含有可交換質子之先質，於適當觸媒存在下，曝露至氬氣體。

E. 使用碘化甲烷 [^3H]之N-甲基化作用 - 此程序經常被採用以製備O-甲基或N-甲基 (^3H)產物，其方式是以高比活性碘化甲烷 (^3H)處理適當先質。此方法通常允許較高比活性，例如約70-90 Ci/毫莫耳。

併入活性含量之 ^{125}I 至標的分子中之合成方法包括：

A. Sandmeyer 與類似反應 - 此程序係使芳基或雜芳基胺轉變成重氮鹽，譬如四氟硼酸鹽，接著使用 Na^{125}I 成為 ^{125}I 標識之化合物。一種代表程序係由 Zhu, D.-G. 與同事報告於 *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 943-948 中。

B. 酚之鄰位 ^{125}I 碘化作用 - 此程序允許併入 ^{125}I 於酚之鄰位，如由 Collier, T.L. 與同事在 *J. Labeled Compd Radiopharm.* **1999**, 42, S264-S266 中所報告者。

C. 芳基與雜芳基溴化物與 ^{125}I 交換 - 此方法一般為兩步驟程序。第一個步驟為芳基或雜芳基溴化物之轉化成其相應之三烷基錫中間物，使用例如 Pd 催化反應 [意即 $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$]

或經過芳基或雜芳基鋰，於三烷基錫鹵化物或六烷基二錫 [例如 $(\text{CH}_3)_3\text{SnSn}(\text{CH}_3)_3$] 存在下進行。一種代表程序係由 Bas, M.-D. 與同事報告於 *J. Labeled Compd Radiopharm.* **2001**, *44*, S280-S282 中。

在一些具體實施例中，一種化合物之經放射性同位素標識變型係與該化合物相同，惟係添加一或多個包含放射性核素之取代基。在一些進一步具體實施例中，化合物為多肽。在一些進一步具體實施例中，化合物為抗體或其抗原結合片段。在一些進一步具體實施例中，該抗體為單株。適當放射性核素包括但不限於 ^2H (氘), ^3H (氚), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I 及 ^{131}I 。被併入本發明放射性標識化合物中之放射性核素係依該放射性標識化合物之特定應用而定。例如，對活體外 RUP43 受體標識與競爭檢測而言，併入 ^3H , ^{14}C , ^{82}Br , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 之化合物一般而言最有用。對放射線成像應用而言， ^{11}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br 或 ^{77}Br 一般而言最有用。在一些具體實施例中，放射性核素係選自包括 ^3H , ^{11}C , ^{18}F , ^{14}C , ^{125}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{35}S 及 ^{82}Br 。

添加一或多個包含放射性核素之取代基之方法，係在熟練技師之範圍內，且包括但不限於藉由酵素方法添加同位素放射性碘 [Marchalonis JJ, *生物化學期刊* (1969) 113: 299-305; Thorell JI 與 Johansson BG, *Biochimica et Biophysica Acta* (1969) 251: 363-9; 其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]，及/或藉由氘胺-T/碘同位素/碘珠粒方法 [Hunter WM

與 Greenwood FC, Nature (1962) 194: 495-6; Greenwood FC 等人, 生物化學期刊 (1963) 89: 114-23; 其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。

所揭示受體與方法之其他用途，將為熟諳此項技藝者基於尤其是本專利文件之調閱而變得明瞭。

【實施方式】

實例

提出下述實例係為達說明本發明之目的，而非限制。雖然於本文中係揭示特定核酸與胺基酸順序，但咸信一般熟諳此藝者具有對此等順序施行較小修正之能力，同時達成相同或實質上類似下文所報告之結果。此種修正途徑係被視為在此揭示內容之範圍內。

提供下述實例係為達說明目的，並非作為限制之方式。一般熟諳此藝者能夠以本文之揭示內容為基礎，設計相當之檢測與方法，其全部係構成本發明之一部份。

有關於本發明主題事項且一般熟諳此項技藝者所習知之重組 DNA 技術，可參閱例如 Maniatis T 等人, 分子無性繁殖：實驗室手冊 (1989) Cold Spring Harbor 實驗室；美國專利第 6,399,373 號；及 PCT 申請案號 PCT/IB02/01461，於 2002 年 8 月 29 日以 WO 02/066505 公告；其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考。

實例 1

人類 GPCR 之全長無性繁殖

a. 內源人類 RUP43 (順序識別碼：1 & 2)

使全長內源人類 RUP43 (GPR131，例如 GenBank® 收受號碼 NM_170699) 編碼之多核苷酸順序可按此處所述經無性繁殖。
順序識別碼：1 為內源人類 RUP43 (GPR131) 多核苷酸編碼順序，可按此處所述經無性繁殖。**順序識別碼：2** 為其相應經編碼之內源人類 RUP43 (GPR131) 多肽。

全長內源人類 RUP43 係使用鉑 PCR SuperMix (Invitrogen 目錄 #11306-016) 及專一引物

5'-GACAAGCATGACGCCCAACAGCACTGGCGAG-3' (5'-引物；**順序識別碼：3**) 與 5'-CTTGAATTAGTTCAAGTCCAGGTCGACACTGC-3' (3'-引物；**順序識別碼：4**)，以人類 DNA 作為模板，藉由 PCR 進行無性繁殖。人類 DNA 可為基因組 DNA 或 cDNA。所使用之循環條件為 25 次循環之 95°C 歷經 40 秒，60°C 歷經 50 秒及 72°C 歷經 1 分鐘。將 1.0 kb PCR 產物無性繁殖至 pCRII-TOPO™ 載體 (Invitrogen) 中。

b. HA/V5His 雙重標記之內源人類 RUP43 (順序識別碼：5 & 6)

使具有 N-末端 HA 抗原決定部位標記與 C-末端配置之 V5His 抗原決定部位標記之全長內源人類 RUP43 (GPR131) 多肽 (不存在 N-末端甲硫胺酸) 編碼之多核苷酸，係按此處所述進行無性繁殖。"HA" 抗原決定部位標記係包含胺基酸順序 MYPYDVPDYA。"V5" 包含胺基酸順序 GKPIP NPLLGLDST；"His" 包含胺基酸順序 HHHHHH。**順序識別碼：5** 係為內源人類 RUP43 (GPR131) 多核苷酸編碼順序 (不存在使 N-末端甲硫胺酸編碼之密碼子)，具有 5'-末端 HA 抗原決定部位標記與

3'-末端 V5His 抗原決定部位標記。順序識別碼：6 係為其相應經編碼之 HA/V5His 雙重標記之 RUP43 多肽。

PCR 係使用 EST 無性繁殖系 (IMAGE # 5221127, GenBank® 收受號碼 BC033625) 作為模板，與 pfu 聚合酶 (Stratagene)，使用由製造者提供之緩衝系統，經補充 10% DMSO, 0.25 μ M 各引物及 0.5 mM 各 4 種核苷酸進行。循環條件為 25 次循環之 95°C 歷經 40 秒，60°C 歷經 50 秒及 72°C 歷經 1 分鐘 40 秒。5'PCR 引物係併入 HindIII 位置且具有以下順序：

5'-GACAAGCTTGACGCCCAACAGCACTGGCGAG-3' (順序識別碼：7)。3'PCR 引物係併入 EcoRI 位置且具有以下順序：

5'-CTTGAATTCGTTCAAGTCCAGGTCGACACTGC-3' (順序識別碼：8)。使 1.0 kb PCR 產物以 HindIII 與 EcoRI 消化，並無性繁殖至 5'HA/3'V5His 雙重標記之 pCMV 表現載體中。

實例 2

非內源構成上活化之人類 RUP43 之製備

咸信熟諳此藝者具有選擇核酸順序突變技術之能力。下文所提出者係為可被利用以產生人類 GPCR 之非內源變型之途徑。此處關於內源人類 RUP43 (GPR131) 所揭示之突變型，係以演算法途徑為基礎，而其中係使對於保守脯胺酸 (或供其使用之內源保守取代) 殘基 (位於 GPCR 之 TM6 區域，接近 TM6/IC3 界面) 為 N-末端之第 16 個胺基酸 (位於 GPCR 之 IC3 區域中) 突變，較佳係對組胺酸、精胺酸或離胺酸之胺基酸殘基，最佳係對離胺酸之胺基酸殘基。

藉由說明而非限制，內源人類 RUP43 (GPR131) 之非內源構

成上活化之變型可經由使順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸突變而製成，較佳係對離胺酸。

1. Transformer Site-Directed (轉變子位置引導)TM之致突變

非內源人類GPCR之製備可在人類GPCR上，使用特別是Transformer Site-DirectedTM致突變套件(Clontech)，根據製造者之說明書達成。利用兩種致突變引物，最佳為會產生離胺酸突變之離胺酸致突變寡核苷酸，與選擇標記物寡核苷酸。為方便起見，亦指出欲被併入人類GPCR中之密碼子突變型，呈標準形式。

2. QuikChangeTM Site-DirectedTM致突變

非內源人類GPCR之製備亦可利用QuikChangeTM Site-DirectedTM致突變套件(Stratagene，根據製造者之說明書)達成。較佳係使用內源GPCR作為模板，並利用兩種致突變引物，以及最佳為離胺酸致突變寡核苷酸與選擇標記物寡核苷酸(被包含在套件中)。為方便起見，係指出被併入新穎人類GPCR中之密碼子突變型，與個別寡核苷酸，呈標準形式。

實例3

受體表現

雖然有多種細胞可用於此項技藝中，供蛋白質之表現，但最佳應利用哺乳動物細胞或黑色素細胞。其主要原因係在實用性上斷定，意即利用例如酵母細胞以表現GPCR，於可能之情況下，係於擬案中引進非哺乳動物細胞，其可能不會(事實上，在酵母之情況中確實不會)包括已針對哺乳動物系統所發展之受體偶合基因機制與分泌途徑-因此，在

非哺乳動物細胞中所得之結果，雖然具有潛在用途，但不像得自哺乳動物細胞或黑色素細胞之結果一樣地較佳。在哺乳動物細胞中，CHO、COS-7、MCB3901、293及293T細胞係為特佳，惟所利用之特定哺乳動物細胞可在技師之特定需求下斷定。在一些具體實施例中，可使用得自哺乳動物之脂肪細胞或骨骼肌細胞。參閱關於黑色素細胞之下文，包括實例10。

a. 短暫轉移感染

於第一天，293細胞之 6×10^6 /10公分培養皿係被浮出覆蓋。於第二天，製備兩個反應管件(各管件所遵照之比例係為每板)：管件A係經由將4微克DNA(例如pCMV載體；pCMV載體具有受體cDNA等)在0.5毫升不含血清DMEM(Gibco BRL)中混合而製成；管件B係經由將24毫升帶脂胺(Gibco BRL)在0.5毫升不含血清DMEM中混合而製成。藉由逆轉(數次)，使管件A與B互混，接著在室溫下培養30-45分鐘。此互混物係被稱為"轉移感染混合物"。將已覆蓋之293細胞以1XPBS洗滌，接著添加5毫升不含血清DMEM。將1毫升轉移感染混合物添加至細胞中，接著在 37°C /5% CO_2 下培養4小時。藉由吸出移除轉移感染混合物，接著添加10毫升DMEM/10%牛胎兒血清。使細胞在 37°C /5% CO_2 下培養。於48小時培養後，採集細胞，並用於分析。

b. 安定細胞系

將大約 12×10^6 個293細胞覆蓋於15公分組織培養板上。在含有十百分比牛胎兒血清與一百分比丙酮酸鈉、L-麩醯胺

及抗生素之DME高葡萄糖培養基中生長。在覆蓋293細胞之後二十四小時(或達~80%匯合),將細胞使用12微克DNA(例如pCMV載體,具有受體cDNA)轉移感染。將12微克DNA與60毫升帶脂胺及未具有血清之2毫升DME高葡萄糖培養基合併。自板吸出培養基,並將細胞以未具有血清之培養基洗滌一次。將DNA、帶脂胺及培養基混合物,伴隨著未具有血清之10毫升培養基,添加至板。在37°C下培養四至五小時之後,將培養基吸出,並添加含有血清之25毫升培養基。在轉移感染之後二十四小時,再一次吸出培養基,並添加具有血清之新培養基。在轉移感染之後四十八小時,將培養基吸出,並添加具有血清之培養基,其含有基因素(G418藥物),在大約 12×10^6 之最後濃度下,將293細胞覆蓋於15公分組織培養板上。於含有十百分比牛胎兒血清與一百分比丙酮酸鈉、L-麩醯胺及抗生素之DME高葡萄糖培養基中生長。在覆蓋293細胞之後二十四小時(或至~80%匯合),將細胞使用12微克DNA(例如pCMV載體,具有受體cDNA)轉移感染。使12微克DNA與60毫升帶脂胺及未具有血清之2毫升DME高葡萄糖培養基合併。將培養基自板吸出,並將細胞以未具有血清之培養基洗滌一次。將DNA、帶脂胺及培養基混合物,伴隨著未具有血清之10毫升培養基,添加至板。在37°C下培養四至五小時之後,吸出培養基,並添加含有血清之25毫升培養基。在轉移感染之後二十四小時,再一次吸出培養基,並添加具有血清之新培養基。在轉移感染之後四十八小時,吸出培養基,並添加具有血清

之培養基，其含有基因素(G418藥物)，在最後濃度為500微克/毫升下。經轉染細胞現在係接受選擇，關於含有G418抗藥性基因之陽性轉染細胞。當選擇發生時，係每隔四至五天置換培養基。在選擇期間，使細胞生長，以產生安定匯集庫，或分裂供安定無性繁殖系選擇。

實例4

供測定GPCR活化作用之檢測

有多種途徑可用於評估人類GPCR之活化作用。下述係為說明例；咸信一般熟諳此藝者具有決定優先地有利於技師需求之技術之能力。

1. 細胞膜結合檢測： $[^3\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 檢測

當G蛋白質偶合受體係呈其活化態時，無論是由於配位體結合或構成活化作用之結果，受體係偶合至G蛋白質，並刺激GDP之釋出，及GTP對G蛋白質之後續結合。G蛋白質-受體複合物之 α 亞單位係充作GTPase，且慢慢地使GTP水解成GDP，此時受體通常係已失活。經活化之受體係持續以GDP交換GTP。可利用不可水解之GTP類似物 $[^3\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 以証實 $[^3\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 對於表現經活化受體之細胞膜之經加強結合。使用 $[^3\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 結合以度量活化作用之優點係為：(a)其係一般性地可應用於所有G蛋白質-偶合受體；(b)其係於細胞膜表面之近端，使其較不可能附著會影響胞內階式反應之分子。

此檢測係利用G蛋白質偶合受體刺激 $[^3\text{S}]\text{GTP } \gamma\text{S}$ 結合至表現有關聯受體之細胞膜之能力。因此，此檢測可用於直

接確認方法，以篩檢候選化合物，對於內源GPCR與非內源構成上活化之GPCR。此檢測係為一般性，且在所有G蛋白質-偶合受體上，對於藥物發現具有應用性。

[³⁵S]GTP γ S 檢測係在 20 mM HEPES，及 1 與約 20 mM 間之 MgCl₂ (此量可經調整，以使結果最佳化，惟 20 mM 為較佳) pH 7.4，結合緩衝劑具有約 0.3 與約 1.2 nM 間之 [³⁵S]GTP γ S (此量可經調整，以使結果最佳化，惟 1.2 為較佳) 與 12.5 至 75 微克膜蛋白質 (例如，表現Gs融合蛋白質之 293 細胞；此量可經調整，以達最佳化) 及 10 μ M GDP (此量可以改變，以達最佳化) 中培養 1 小時。然後添加麥牙凝集素珠粒 (25 微升；Amersham)，並將混合物於室溫下再培養 30 分鐘。然後，在室溫下，使管件於 1500x 克下離心 5 分鐘，接著在閃爍計數器中計數。

2. 腺苷基環化酶

經設計供細胞為基礎之檢測用之 Flash PlateTM 腺苷基環化酶套件 (新英格蘭核能 (New England Nuclear)；目錄編號 SMP004A) 可經修改，與粗製漿膜一起使用。此閃光板之井可含有閃爍體塗層，其亦含有辨識 cAMP 之專一抗體。在井中產生之 cAMP 可藉由直接競爭放射性 cAMP 示蹤劑對 cAMP 抗體之結合進行定量。下述係充作關於在表現受體之全細胞中度量 cAMP 含量上變化之簡略提案。

經轉染細胞係在短暫轉移感染後大約二十四小時採集。小心地吸出培養基並拋棄。將 10 毫升 PBS 溫和地添加至各細胞培養皿，接著小心吸出。將 1 毫升 Sigma 細胞解離緩衝

劑與3毫升PBS添加至各板。將細胞以吸量管吸離板，並將細胞懸浮液收集至50毫升圓錐形離心管中。然後，使細胞在室溫下，於1,100 rpm下離心5分鐘。小心地使細胞丸粒再懸浮於適當體積之PBS(約3毫升/板)中。然後，將細胞使用血球計計數，並添加另外之PBS以獲得適當數目之細胞(具有最後體積為約50微升/井)。

cAMP標準物與偵測緩衝劑(包含1 μCi 示蹤劑 [^{125}I] cAMP (50微升)對11毫升偵測緩衝劑)係根據製造者之說明書製備並保持。檢測緩衝液係經新製備以供篩檢，且含有50微升刺激緩衝劑、3微升待測化合物(12 μM 最後檢測濃度)及50微升細胞。將檢測緩衝液儲存在冰上，直到利用為止。較佳係在例如96-井板中進行之檢測，係藉由添加50微升cAMP標準物至適當井中而引發，接著添加50微升PBSA至井H-11與H12。將50微升刺激緩衝劑添加至所有井中。使用能夠分配3微升化合物溶液之針銷工具，將DMSO(或經選擇之候選化合物)添加至適當井中，其中最後檢測濃度為12 μM 待測化合物，與100微升總檢測體積。然後，將細胞添加至井中，並在室溫下培養60分鐘。接著，添加100微升含有示蹤劑cAMP之偵測混合物至井中。然後，將板再培養2小時，接著在Wallac MicroBeta閃爍計數器中計數。然後，將cAMP/井之數值自標準cAMP曲線外推，其係被包含在各檢測板內。

3. 供Gi偶合標的GPCR用之細胞為基礎之cAMP

TSHR為Gs偶合之GPCR，其會造成cAMP於活化作用時蓄

積。TSHR 將於構成上經由使胺基酸殘基 623 突變(意即改變丙胺酸殘基至異白胺酸殘基)而被活化。預期 Gi 偶合受體會抑制腺苷基環化酶，因此降低 cAMP 生產含量，其可使得 cAMP 含量之評估具挑戰性。用於度量 cAMP 生產上之降低作為 Gi 偶合受體活化作用指標之有效技術，可藉由共同轉染作為"訊息增強子"之最佳為非內源構成上活化之 TSHR (TSHR-A623I) (或內源構成上活性之 Gs 偶合受體) 與 Gi 連結標的 GPCR 以建立 cAMP 之基線含量而達成。在建立 Gi 偶合受體之非內源變型時，標的 GPCR 之此非內源變型係接著與訊息增強子共轉染，且可用於篩檢者即為此物質。吾人將利用此種途徑以在使用 cAMP 檢測時有效地產生訊息。在一些具體實施例中，此途徑較佳係使用於直接確認針對 Gi 偶合受體之候選化合物。應注意的是，對於 Gi 偶合 GPCR，當使用此途徑時，標的 GPCR 之逆催動劑將會增加 cAMP 訊息，而催動劑將會降低 cAMP 訊息。

於第一天， 2×10^4 個 293 細胞/井將浮出覆蓋。於第二天，將製備兩個反應管件(對各管件所遵照之比例係為每板)：管件 A 係經由將 2 微克經轉染至哺乳動物細胞中之各受體之 DNA，為提供總計 4 微克 DNA (例如 pCMV 載體；pCMV 載體具有經突變之 TSHR (TSHR-A623I)；TSHR-A623I 與 GPCR 等) 在 1.2 毫升不含血清之 DMEM (Irvine 科學, Irvine, CA) 中混合而製成；管件 B 係經由將 120 微升帶脂胺 (Gibco BRL) 在 1.2 毫升不含血清之 DMEM 中混合而製成。然後，藉由逆轉(數次)使管件 A 與 B 互混，接著在室溫下培養 30-45 分鐘。此互混物

係被稱為"轉移感染混合物"。經覆蓋之293細胞係以1XPBS洗滌，接著添加10毫升不含血清之DMEM。然後，將2.4毫升轉移感染混合物添加至細胞中，接著在37°C /5% CO₂下培養4小時。然後，藉由吸出移除轉移感染混合物，接著添加25毫升DMEM/10%牛胎兒血清。然後，將細胞在37°C /5% CO₂下培養。24小時培養後，接著採集細胞，並利用於分析。

Flash PlateTM腺苷基環化酶套件(新英格蘭核能(New England Nuclear); 目錄編號SMP004A)係經設計，針對以細胞為基礎之檢測，但可經修正，與粗製漿膜一起使用，依熟練技師之需求而定。閃光板井係含有閃爍體塗層，其亦含有辨識cAMP之專一抗體。在井中產生之cAMP可藉由直接競爭放射性cAMP示蹤劑對cAMP抗體之結合進行定量。下述係充作關於在表現受體之全細胞中度量cAMP含量上變化之簡略提案。

經轉染細胞係在短暫轉移感染後大約二十四小時採集。小心地吸出培養基並拋棄。將10毫升PBS溫和地添加至各細胞培養皿，接著小心吸出。將1毫升Sigma細胞解離緩衝劑與3毫升PBS添加至各板。將細胞以吸量管吸離板，並將細胞懸浮液收集至50毫升圓錐形離心管中。然後，使細胞在室溫下，於1,100 rpm下離心5分鐘。小心地使細胞丸粒再懸浮於適當體積之PBS(約3毫升/板)中。然後，將細胞使用血球計計數，並添加另外之PBS以獲得適當數目之細胞(具有最後體積為約50微升/井)。

cAMP標準物與偵測緩衝劑(包含1 μ Ci示蹤劑 [¹²⁵I]cAMP

(50 微升) 對 11 毫升偵測緩衝劑) 係根據製造者之說明書製備並保持。檢測緩衝液係經新製備以供篩檢，且含有 50 微升刺激緩衝劑、3 微升待測化合物 ($12 \mu\text{M}$ 最後檢測濃度) 及 50 微升細胞。將檢測緩衝液儲存在冰上，直到利用為止。此檢測可藉由添加 50 微升 cAMP 標準物至適當井中而引發，接著添加 50 微升 PBSA 至井 H-11 與 H12。將 50 微升刺激緩衝劑添加至所有井中。使用能夠分配 3 微升化合物溶液之針銷工具，將經選擇之化合物 (例如 TSH) 添加至適當井中，其中最後檢測濃度為 $12 \mu\text{M}$ 待測化合物，與 100 微升總檢測體積。然後，將細胞添加至井中，並在室溫下培養 60 分鐘。接著，添加 100 微升含有示蹤劑 cAMP 之偵測混合物至井中。然後，將板再培養 2 小時，接著在 Wallac MicroBeta 閃爍計數器中計數。然後，將 cAMP/ 井之數值自標準 cAMP 曲線外推，其係被包含在各檢測板內。

4. 報告子為基礎之檢測

a. CRE-LUC 報告子檢測 (Gs-結合之受體)

使 293 與 293T 細胞浮出覆蓋於 96 井板上，在每井 2×10^4 個細胞之密度下，並根據製造者之說明書，於隔天使用帶脂胺試劑 (BRL) 轉染。DNA/ 脂質混合物係對各 6-井轉移感染，按下述製備：將 100 微升 DMEM 中之 260 毫微克質粒 DNA 溫和地與 100 微升 DMEM 中之 2 微升脂質混合 (260 毫微克質粒 DNA 包含 200 毫微克 8xCRE-Luc 報告子質粒，50 毫微克包含內源受體或非內源受體之 pCMV 或單獨之 pCMV，及 10 毫微克 GPRS 表現質粒 (GPRS 在 pcDNA3 (Invitrogen) 中)。8XCRE-Luc 報告

子質粒係按下述製成：載體 SRIF- β -gal 係經由使大白鼠生長激素釋放抑制因子啟動子 (-71/+51) 在 p β gal-基本載體 (Clontech) 之 BglV-HindIII 位置上無性繁殖而獲得。cAMP 回應構件之八 (8) 份複製物係藉由 PCR 自腺病毒模板 AdpCF126CCRE8 獲得 [參閱 Suzuki 等人, Hum Gene Ther (1996) 7: 1883-1893; 其揭示內容係據此以其全文併於本文供參考), 並無性繁殖至 SRIF- β -gal 載體中, 於 Kpn-BglV 位置, 造成 8xCRE- β -gal 報告子載體。此 8xCRE-Luc 報告子質粒係經由以得自 pGL3-基本載體 (Promega) 之蟲螢光素酶基因, 在 HindIII-BamHI 位置上置換 8xCRE- β -gal 報告子載體中之 β -半乳糖苷酶基因而產生。於室溫下培養 30 分鐘後, 將 DNA/脂質混合物以 400 微升 DMEM 稀釋, 並將 100 微升經稀釋之混合物添加至各井中。在細胞培養物培養器中, 於 4 小時培養後, 將具有 10% FCS 之 100 微升 DMEM 添加至各井中。隔天, 將經轉染細胞以 200 微升/井之具有 10% FCS 之 DMEM 更換。八 (8) 小時後, 在以 PBS 一次洗滌後, 將井更換成 100 微升/井未具有酚紅之 DMEM。隔天, 使用 LucLiteTM 報告子基因檢測套件 (Packard), 按照製造者之說明書, 度量蟲螢光素酶活性, 並於 1450 MicroBetaTM 閃爍與發光計數器 (Wallac) 上讀取。

b. AP1 報告子檢測 (Gq-結合之受體)

偵測 Gq 刺激之方法係依 Gq 依賴性磷脂酶 C 造成在其啟動子中含有 AP1 構件之基因之活化作用之已知性質而定。PathdetectTM AP-1 順式報告系統 (Stratagene, 目錄 # 219073) 可按照上文關於 CREB 報告子檢測所提出之擬案加以利用, 惟磷

酸鈣沉澱物之成份為410毫微克 pAP1-Luc、80毫微克 pCMV-受體表現質粒及20毫微克 CMV-SEAP。

c. SRF-LUC 報告子檢測(Gq-結合之受體)

一種偵測 Gq 刺激之方法係依 Gq 依賴性磷脂酶 C 造成在其啟動子中含有血清回應因子之基因之活化作用之已知性質而定。可利用 PathdetectTM SRF-Luc-報告系統 (Stratagene) 以檢測在例如 COS7 細胞中之 Gq 偶合活性。細胞係使用哺乳動物 TransfectionTM 套件 (Stratagene, 目錄#200285), 根據製造者之說明書, 以此系統之質粒成份, 及所指示之使內源或非內源 GPCR 編碼之表現質粒轉染。簡言之, 係依照製造者之說明書, 將410毫微克 SRF-Luc、80毫微克 pCMV-受體表現質粒及20毫微克 CMV-SEAP (經分泌之鹼性磷酸酶表現質粒; 鹼性磷酸酶活性係在經轉染細胞之培養基中度量, 以控制試樣之間轉移感染效率之偏差) 合併於磷酸鈣沉澱物中。使一半沉澱物均等地分佈在96-井板之3井中, 保持在不含血清培養基中之細胞上, 歷經24小時。最後5小時, 將細胞與例如1 μ M 待測化合物一起培養。然後, 依照製造者之說明書, 使細胞溶解, 並使用 LucliteTM 套件 (Packard, 目錄#6016911) 和 "Trilux 1450 Microbeta" 液體閃爍與發光計數器 (Wallac), 檢測蟲螢光素酶活性。數據可使用 GraphPad PrismTM 2.0a (GraphPad 軟體公司) 分析。

d. 胞內 IP3 蓄積檢測(Gq-結合之受體)

在第1天, 可將包含受體(內源或非內源)之細胞覆蓋於24井板上, 通常為 1×10^5 個細胞/井(惟此數目可經最佳化)。於

第2天，細胞可經轉染，其方式是首先將50微升不含血清DMEM/井中之0.25微克DNA與50微升不含血清DMEM/井中之2微升帶脂胺混合。使溶液溫和地混合，並在室溫下培養15-30分鐘。將細胞以0.5毫升PBS洗滌，並將400微升不含血清之培養基與轉移感染培養基混合，且添加至細胞中。然後，將細胞在37°C /5%CO₂下培養3-4小時，接著移除轉移感染培養基，並以1毫升/井之正規生長培養基置換。於第3天，將細胞以³H-肌-肌醇標識。短暫地移除培養基，並將細胞以0.5毫升PBS洗滌。然後，添加/井0.5毫升不含肌醇/不含血清之培養基(GIBCO BRL)，伴隨著0.25 μCi之³H-肌-肌醇/井，並將細胞在37°C /5%CO₂下培養16-18小時過夜。於第4天，將細胞以0.5毫升PBS洗滌，並添加0.45毫升檢測培養基，其含有不含肌醇/不含血清之培養基、10 μM巴吉林(pargyline)、10 mM氯化鋰或0.4毫升檢測培養基及50微升10x凱坦斯林(ketanserin)(ket)至最後濃度為10 μM。然後，將細胞在37°C下培養30分鐘。接著，將細胞以0.5毫升PBS洗滌，並添加/井200微升剛製成/冰冷終止溶液(1M KOH；18 mM 硼酸 Na；3.8 mM EDTA)。使溶液保持在冰上歷經5-10分鐘或直到細胞溶解為止，然後藉由200微升剛製成/冰冷中和作用溶液中和(7.5% HCl)。接著將溶胞產物轉移至1.5毫升Eppendorf管，並添加/管1毫升氯仿/甲醇(1:2)。使溶液形成旋渦15秒，並將上層相施加至Biorad AG1-X8TM陰離子交換樹脂(100-200網目)。首先，將樹脂在1:1.25 W/V下，以水洗滌，並將0.9毫升上層相裝填至管柱。將管柱以10毫升5 mM肌-肌醇與10

毫升 5 mM 硼酸 Na/60 mM 甲酸 Na 洗滌。肌醇參磷酸鹽係以 2 毫升 0.1 M 甲酸/1 M 甲酸銨溶離至含有 10 毫升閃爍藥液之閃爍小玻瓶中。管柱係經由以 10 毫升 0.1 M 甲酸/3 M 甲酸銨洗滌而再生，並以 dd H₂O 沖洗兩次，且於 4°C 下儲存在水中。

實例 5

融合蛋白質製備

a. GPCR：Gs 融合構造物

GPCR-G 蛋白質融合構造物之設計可按下述達成：大白鼠 G 蛋白質 Gs α (長形式；Itoh H. 等人, 83 *PNAS* 3776 (1986)) 之兩個 5' 與 3' 末端係經設計以包含 HindIII (5'-AAGCTT-3') 順序於其上。在正確順序(包含側接 HindIII 順序)確認之後，藉由次代無性繁殖，使用該載體之 HindIII 限制位置，使整體順序穿梭至 pcDNA3.1(-) (Invitrogen，目錄編號 V795-20) 中。Gs α 順序之正確取向係在次代無性繁殖至 pcDNA3.1(-) 中之後測定。然後確認在 HindIII 順序上含有大白鼠 Gs α 基因之經改質 pcDNA3.1(-)；此載體目前可以"一般性" Gs α 蛋白質載體取得。pcDNA3.1(-) 載體含有多種習知限制位置在 HindIII 位置之上游，因此有利地提供在 Gs 蛋白質之上游插入內源構成上活性 GPCR 之編碼順序之能力。可利用此相同途徑以產生其他"一般性" G 蛋白質載體，而當然，可利用技師所習知之其他市購可得或專利載體 - 重要標準是 GPCR 之順序應在上游，並在與 G 蛋白質之架構內。

b. Gq(6 胺基酸缺失)/Gi 融合構造物

Gq(del)/Gi 融合構造物之設計可按下述達成：G α q-亞單位之

N-末端六(6)個胺基酸(胺基酸2至7, 具有TLESIM之順序)係被刪除, 且具有順序EYNLV之C-末端五(5)個胺基酸係被具有順序DCGLF之G α i蛋白質之相應胺基酸置換。此融合構造物係藉由PCR, 使用下列引物:

5'-gatcAAGCTTCCATGGCGTGCTGCCTGAGCGAGGAG-3'

(順序識別碼: 9)與

5'-gatcGGATCCTTAGAACAGGCCGCAGTCCTTCAGGTTTCAGCTGCAGGATGGTG-3'

(順序識別碼: 10)

與質粒63313獲得, 該質粒含有老鼠G α q-野生型變型, 具有血球凝集素標記, 作為模板。在下方封端中之核苷酸係被包含作為隔體。

TaqPlus精密DNA聚合酶(Stratagene)係被利用於放大作用, 藉由下列循環, 其中步驟2至4重複35次: 95°C歷經2分鐘; 95°C歷經20秒; 56°C歷經20秒; 72°C歷經2分鐘; 及72°C歷經7分鐘。PCR產物係被無性繁殖至pCRII-TOPO載體(Invitrogen)中, 並使用ABI大染料終止子套件(P.E. Biosystems)定序。得自含有融合構造物順序之TOPO無性繁殖系之插入物, 係藉由2步驟無性繁殖程序, 被穿梭至表現載體pcDNA3.1(+)中, 在HindIII/BamHI位置上。亦參閱PCT申請案號PCT/USO2/05625, 於2002年9月6日以WO02068600公告, 其揭示內容係據此以其全文併於本文供參考。

實例6

[³⁵S]GTP γ S 檢測

A. 細胞膜製劑

在一些具體實施例中，包含吾人感興趣之標的 GPCR，且供使用於確認候選化合物作為例如逆催動劑、催動劑或拮抗劑之細胞膜，較佳係按下述製成：

a. 物質

"細胞膜刮除緩衝劑" 包含 20 mM HEPES 與 10 mM EDTA, pH 7.4；"細胞膜洗滌緩衝劑" 包含 20 mM HEPES 與 0.1 mM EDTA, pH 7.4；"結合緩衝劑" 包含 20 mM HEPES, 100 mM NaCl 及 10 mM MgCl₂, pH 7.4。

b. 程序

在整個程序中，所有物質係被保持在冰上。首先，將培養自細胞之匯合單層吸出，接著以 10 毫升冷 PBS 沖洗，接著吸出。然後，添加 5 毫升細胞膜刮除緩衝劑，以刮除細胞；接著，將細胞萃取物轉移至 50 毫升離心管（於 4°C 下，在 20,000 rpm 下離心 17 分鐘）。然後，吸出上層清液，並使丸粒再懸浮於 30 毫升細胞膜洗滌緩衝劑中，接著於 4°C 下，在 20,000 rpm 下離心 17 分鐘。然後，吸出上層清液，並使丸粒再懸浮於結合緩衝劑中。然後，使用 Brinkman Polytron™ 均化器（15-20 秒爆裂，直到所有物質均呈懸浮為止）使其均化。其在本文中係被稱為"膜蛋白質"。

Bradford 蛋白質檢測

在均化之後，細胞膜之蛋白質濃度係使用 Bradford 蛋白質檢測測定（蛋白質可被稀釋至約 1.5 毫克/毫升，分成數液份並冷凍（-80°C）供稍後使用；當經冷凍時，供使用之擬案係如下述：於檢測當天，係使經冷凍之膜蛋白質在室溫下解

凍，接著渦動，然後以 Polytron，在約 12 x 1,000 rpm 下均化約 5-10 秒；應注意的是，關於多重製劑，均化器應在不同製劑均化之間經徹底清潔過)。

a. 物質

結合緩衝劑(依照上述)；Bradford 染料試劑；Bradford 蛋白質標準物，將按照製造者之說明書使用(Biorad，目錄編號 500-0006)。

b. 程序

製備一式兩份管件，一支包含細胞膜，而一支作為對照"空白試驗"。各含有 800 微升結合緩衝劑。然後，將 10 微升 Bradford 蛋白質標準物(1 毫克/毫升)添加至各管件，接著將 10 微升膜蛋白質添加至僅僅一支管件(並非空白試驗者)。然後，將 200 微升 Bradford 染料試劑添加至各管件，接著使其各形成旋渦。五(5)分鐘後，使管件再形成旋渦，並將其中之物質轉移至比色杯。然後，使用 CECIL 3041 分光光度計，在波長 595 下讀取比色杯。

確認檢測

a. 物質

GDP 緩衝劑包含 37.5 毫升結合緩衝劑與 2 毫克 GDP (Sigma，目錄編號 G-7127)，接著為在結合緩衝劑中之一系列稀釋，以獲得 0.2 μM GDP (GDP 於各井中之最後濃度為 0.1 μM GDP)；各井包含候選化合物，具有最後體積為 200 微升，包含 100 微升 GDP 緩衝劑(最後濃度 0.1 μM GDP)、在結合緩衝劑中之 50 微升膜蛋白質及在結合緩衝劑中之 50 微升 [^3S]GTP γS

(0.6 nM) (每 10 毫升結合緩衝劑 2.5 微升 [^{35}S]GTP γS)。

b. 程序

候選化合物較佳係使用 96-井板格式篩檢(此等可在 -80°C 下冷凍)。膜蛋白質(或具有表現載體而排除標的 GPCR 之細胞膜, 作為對照組)係短暫地經均化, 直到呈懸浮為止。然後, 使用上文提出之 Bradford 蛋白質檢測, 測定蛋白質濃度。然後, 使膜蛋白質(與對照組)在結合緩衝劑中稀釋至 0.25 毫克/毫升(最後檢測濃度 12.5 微克/井)。接著, 將 100 微升 GDP 緩衝劑添加至 Wallac ScintistripTM (Wallac) 之各井中。接著使用 5 微升針銷工具, 以轉移 5 微升候選化合物至此種井中(意即, 5 微升在總檢測體積 200 微升中, 係為 1:40 比例, 以致候選化合物之最後篩檢濃度為 $10\ \mu\text{M}$)。再一次, 為避免污染, 於各轉移步驟後, 應將針銷工具在包含水(1X)、乙醇(1X)及水(2X)之三個儲槽中沖洗-於每次沖洗後, 應將過量液體自工具振盪, 並以紙與 kimwipes 乾燥。然後, 將 50 微升膜蛋白質添加至各井(亦利用對照井, 其包含未具有標的 GPCR 之細胞膜), 並在室溫下預培養 5-10 分鐘。然後, 將結合緩衝劑中之 50 微升 [^{35}S]GTP γS (0.6 nM) 添加至各井中, 接著於室溫下, 在振盪器上培養 60 分鐘(再一次, 於此實例中, 將板以箔覆蓋)。接著, 於 22°C 下, 經由板在 4000 RPM 下旋轉 15 分鐘, 使檢測停止。然後, 將板以 8 通道歧管吸氣, 並以板蓋密封。接著, 將板於 Wallac 1450 上, 使用設定 "Prot. #37" 讀取(依照製造者說明書)。

實例 7

環 AMP 檢測

確認候選化合物為例如逆催動劑、催動劑或拮抗劑之另一種檢測途徑，係經由利用環化酶為基礎之檢測達成。除了直接確認以外，可利用此項檢測途徑作為獨立途徑，以提供得自如前文實例 6 中所提出之 [^{35}S]GTP γS 途徑之結果之証實。

經修正 FlashPlateTM 腺苷基環化酶套件 (新英格蘭核能 (New England Nuclear); 目錄編號 SMP004A) 較佳係用於直接確認候選化合物作為對內源或非內源構成上活性 GPCR 之逆催動劑與催動劑，根據下列擬案。

於轉移感染後大約三天，採集經轉染細胞。經由使懸浮細胞在含有 20mM HEPES (pH 7.4) 與 10mM MgCl_2 之緩衝劑中均化，製備細胞膜。均化作用係在冰上，使用 Brinkman PolytronTM 進行大約 10 秒。使所形成之勻漿於 4°C 下，在 49,000 X 克下離心 15 分鐘。然後，使所形成之丸粒再懸浮於含有 20mM HEPES (pH 7.4) 與 0.1mM EDTA 之緩衝劑中，均化 10 秒，接著於 4°C 下，在 49,000 x 克下離心 15 分鐘。然後，將所形成之丸粒儲存於 -80°C 下，直到利用為止。在直接確認篩檢當天，使細胞膜丸粒在室溫下慢慢地解凍，再懸浮於含有 20mM HEPES (pH 7.4) 與 10mM MgCl_2 之緩衝劑中，產生最後蛋白質濃度為 0.60 毫克/毫升 (將再懸浮細胞膜置於冰上，直到使用為止)。

根據製造者之說明書，製備與保持 cAMP 標準物與偵測緩

衝劑 (包含 2 μCi 示蹤劑 $\{[^{125}\text{I}]\text{cAMP}$ (100 微升) 對 11 毫升偵測緩衝劑)。檢測緩衝液為新製成以供篩檢，且包含 20mM HEPES, pH 7.4, 10mM MgCl_2 , 20mM 磷酸肌酸 (Sigma), 0.1 單位 / 毫升肌酸磷酸激酶 (Sigma), 50 μM GTP (Sigma) 及 0.2 mM ATP (Sigma)；然後，將檢測緩衝液儲存在冰上，直到利用為止。

較佳係將候選化合物添加至例如 96-井板之井中 (3 微升 / 井；12 μM 最後檢測濃度)，伴隨著 40 微升膜蛋白質 (30 微克 / 井) 與 50 微升檢測緩衝液。然後，在室溫下將此互混物培養 30 分鐘，伴隨著溫和振盪。

在培養之後，將 100 微升偵測緩衝劑添加至各井，接著培養 2-24 小時。然後，將板在 Wallac MicroBetaTM 板讀取器中，使用 "Prot. #31" 計數 (依照製造者說明書)。

作為實例而非限制，所獲得之說明性篩選檢測板 (96 井格式) 結果係呈現於 **圖 1** 中。各條塊係表示各井中不同化合物之結果，"標的 GPCR" 係為與 GPR131 不相關之內源構成上活性 Gs- 偶合 GPCR 之 $\text{Gs}\alpha$ 融合蛋白質構造物。於 **圖 1** 中所呈現之結果，亦提供標準偏差，以各板之平均結果 ("m") 為基礎，而此平均加上兩個關於選擇逆催動劑作為來自初期篩檢 "前導" 之任意優先性係涉及候選化合物之選擇，其係降低百分比回應達至少平均板回應，減去兩個標準偏差。反之，關於選擇催動劑作為來自初期篩檢 "前導" 之任意優先性係涉及候選化合物之選擇，增加百分比回應達至少平均板回應，加上兩個標準偏差。以此等選擇程序為基礎，在下列井中之候選化合物係直接經確認為對該內源 GPCR 之推斷

逆催動劑(化合物A)與催動劑(化合物B)，個別在井A2與G9中。參閱圖1。為清楚起見應指出的是：此等化合物已被直接確認，而無需關於此GPCR內源配位體之任何知識。藉由聚焦在以受體功能為基礎而非化合物結合親和力之檢測技術，可確定能夠降低此受體之功能活性(化合物A)以及增加受體之功能活性(化合物B)之化合物。

實例 8

用於度量胞內鈣濃度之螢光計成像板讀取器 (FLIPR) 檢測

將得自個別無性繁殖細胞系之標的受體(實驗)與 pCMV (負對照組) 安定地轉染細胞接種至聚-D-離胺酸預處理之 96-井板 (Becton-Dickinson, #356640)，在 5.5×10^4 個細胞/井下，使用完全培養基 (DMEM，具有 10% FBS, 2mM L-麩醯胺, 1mM 丙酮酸鈉)，以供隔天檢測。為製備 Fluo4-AM (分子探測物, #F14202) 培養緩衝劑儲備液，使 1 毫克 Fluo4-AM 溶於 467 微升 DMSO 與 467 微升 Pluoronic 酸 (分子探測物, #P3000) 中，而得 1mM 儲備溶液，可將其儲存在 -20°C 下歷經一個月。Fluo4-AM 為螢光鈣指示劑染料。

候選化合物係在洗滌緩衝劑 (1X HBSS/2.5 mM 羧苯磺胺 (probenicid)/20mM HEPES，於 pH 7.4 下) 製成。

於檢測時，係將培養基自井移除，並於細胞中裝填 100 微升 $4 \mu\text{M}$ Fluo4-AM/2.5 mM 羧苯磺胺 (Sigma, #P8761)/ 20mM HEPES/ 完全培養基，在 pH 7.4 下。在 37°C /5% CO_2 下之培養，係允許進行 60 分鐘。

1 小時培養後，移除 Fluo4-AM 培養緩衝劑，並將細胞以 100

微升洗滌緩衝劑洗滌2X。於各井中留置100微升洗滌緩衝劑。使板返回培養器，在37°C /5% CO₂下，歷經60分鐘。

FLIPR(螢光計成像板讀取器；分子裝置)係被程式化，以在第30秒添加50微升候選化合物，並記錄藉由候選化合物所引起之胞內鈣濃度([Ca²⁺])之短暫改變，歷經另一150秒。利用FLIPR軟體，使用總螢光變化計數，以測定催動劑活性。此儀器軟體係使螢光讀數正規化，而得在零下之相當最初讀數。

在一些具體實施例中，包含標的受體之細胞係進一步包含Ga15、Ga16或嵌合Gq/Gi α 單位。

雖然前文係提供使用安定地轉染細胞，關於催動劑活性之FLIPR檢測，但一般熟諳此藝者將容易地能夠修改此檢測，以特徵鑒定拮抗劑活性。該一般熟諳此藝者亦易於明瞭的是，或者，可使用暫時地轉染之細胞。

實例9

MAP激酶檢測

可監測MAP激酶(有絲分裂原活化之激酶)以評估受體活化作用。MAP激酶可藉由數種途徑偵測。一種途徑係以評估磷醯化狀態為基礎，無論是未磷醯基化(不活性)或磷醯基化(活性)。磷醯基化蛋白質在SDS-PAGE中具有較緩慢移動性，且因此可使用Western氏沾吸，與未經刺激之蛋白質比較。或者，對磷醯基化蛋白質專一之抗體係可取用(New England Biolabs)，其可用以偵測磷醯基化激酶上之增加。在任一方法中，細胞係以待測化合物刺激，然後以Laemmli

緩衝劑萃取。將可溶性離份施加至 SDS-PAGE 凝膠，並將蛋白質以電泳方式轉移至硝基纖維素或 Immobilon。免疫反應性譜帶係藉由標準 Western 氏沾吸技術偵測。可見或化學發光信號係被記錄於薄膜上，並可藉由光密度分析法定量。

另一種途徑係經由磷醯化作用檢測，以 MAP 激酶活性之評估為基礎。細胞係以待測化合物刺激，並製備可溶性萃取物。萃取物係在 30°C 下培養 10 分鐘，使用 γ - 32 P-ATP，一種 ATP 再生系統，及對 MAP 激酶之專一受質，譬如藉由胰島素調節之磷醯基化熱與酸安定蛋白質，或 PHAS-I。藉由添加 H_3PO_4 使反應終止，並使試樣轉移至冰。將一液份點加至 Whatman P81 層析紙上，其係保留磷醯基化蛋白質。將層析紙洗滌，並在液體閃爍計數器中計數 32 P。或者，將細胞萃取物與 γ - 32 P-ATP，一種 ATP 再生系統，及藉由鏈霉胺基酸結合至過濾載體之生物素化髓磷脂鹼性蛋白質一起培養。髓磷脂鹼性蛋白質係為經活化 MAP 激酶之受質。磷醯化反應係在 30°C 下進行 10 分鐘。萃取物可接著經過濾器吸出，其係保留磷醯基化髓磷脂鹼性蛋白質。將濾器洗滌，並藉由液體閃爍計數，計數 32 P。

實例 10

黑色素細胞技術

黑色素細胞為在低等脊椎動物中發現之皮膚細胞。其含有色素沉著細胞器，稱為黑色素體。黑色素細胞能夠在 G-蛋白質偶合受體 (GPCR) 活化作用時，沿著微管網絡再分配此等黑色素體。此色素移動之結果係為此等細胞之顯見淡

化或變暗。在黑色素細胞中，由於Gi-偶合受體活化作用所造成之胞內cAMP含量降低，會造成黑色素體潛移至細胞中央，而造成顏色上之急驟淡化。若cAMP含量接著被提升，則在Gs-偶合受體活化作用之後，黑色素體係被再分散，且細胞再一次呈現暗色。由於Gq-偶合受體活化作用所造成之二醯基甘油含量增加，亦可引致此再分散。此外，此技術亦適合研究某些受體酪胺酸激酶。黑色素細胞之回應係於受體活化作用之數分鐘內發生，並造成單純強效顏色改變。此回應可容易地使用習用吸光率微板讀取器或適度視頻成像系統偵測。與其他皮膚細胞不同，黑色素細胞係衍生自神經脊，且顯示會表現發出訊息蛋白質之全部補體。特定言之，此等細胞會表現極端地廣範圍之G-蛋白質，且因此能夠於功能性上表現幾乎所有GPCR。

可利用黑色素細胞以確認針對GPCR之化合物，包括天然配位體。此方法可以下述方式進行，引進能夠分散或聚集其色素以回應特定刺激之色素細胞系之待測細胞，並表現對GPCR進行編碼之外源無性繁殖系。一種刺激劑，例如褪黑激素，係設定色素配置之最初狀態，其中若GPCR之活化作用引致色素分散，則色素係被聚集在待測細胞內。但是，以刺激劑刺激細胞以設定色素配置之最初狀態，其中若GPCR之活化作用引致色素聚集，則色素係被分散。然後，將待測細胞與化學化合物接觸，並測定細胞中之色素配置是否從色素配置之最初狀態改變。色素細胞由於候選化合物所致之分散，包括但不限於配位體，偶合至GPCR將在陪

替氏培養皿上呈現暗色，而色素細胞之聚集將呈現淡色。

物質與方法係遵照根據美國專利第 5,462,856 號與美國專利第 6,051,386 號之揭示內容，此等專利揭示內容係據此以其全文併於本文供參考。

將細胞覆蓋於例如 96-井板上(每板一種受體)。轉移感染後 48 小時，將各板上之一半細胞以 10nM 褪黑激素處理。褪黑激素會活化黑色素細胞中之內源 Gi-偶合受體，並造成彼等聚集其色素。使其餘一半細胞轉移至不含血清之培養基 0.7X L-15 (Gibco)。一小時後，在不含血清培養基中之細胞係保持呈色素分散狀態，而經褪黑激素處理之細胞係呈色素聚集狀態。此時，將細胞以劑量回應之待測/候選化合物處理。若所覆蓋之 GPCR 結合至待測/候選化合物，則預期黑色素細胞會進行顏色改變，以回應該化合物。若受體為 Gs 或 Gq 偶合受體之任一種，則褪黑激素聚集之黑色素細胞係進行色素分散。對照上而言，若受體為 Gi-偶合受體，則預期色素分散之細胞會進行劑量依賴性色素聚集。

實例 11

人類與老鼠 RUP43 之組織分佈

RUP43 被人類與老鼠脂肪細胞與骨骼肌細胞之表現，係藉由 RT-PCR 質問。RUP43 被人類白血球子集之表現，係藉由 TaqMan RT-PCR 質問。

a.

人類前脂肪細胞係購自 Biowhittaker，且無論是允許保持未分化或使其接受分化。人類經分化脂肪細胞係購自

Zen Bio。RNA 係製自此等未分化或經分化人類脂肪細胞，並轉化成 cDNA。然後進行 RT-PCR，以質問 RUP43 之表現，使用專一引物 5'-CTACCTGTACCTCGAAGTCTA-3' (有意義引物；順序識別碼：11) 與 5'-AGTGGCGGGCGCTGCTCAT-3' (反有意義引物；順序識別碼：12)。所使用之循環條件為 94°C 歷經 2 分鐘，94°C 歷經 15 秒，55°C 歷經 30 秒，及 72°C 歷經 1 分鐘，其中對最後三個步驟進行 35 次循環。發現 RUP43 係以內源方式被已分化之人類脂肪細胞表現，而被人類前脂肪細胞則達較小程度 (圖 2A)。

b.

RUP43 被人類皮下 ("Sub Q") 與內臟脂肪之表現，係藉由如上文 [a] 中之 RT-PCR 質問。皮下脂肪試樣係得自十位具有 BMI 範圍為 19 至 35 之個體。內臟脂肪試樣係得自八位具有 BMI 範圍為 19 至 45 之個體。甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (GAPDH) 之 RT-PCR 係用以顯示可比擬之試樣負載。已發現人類 RUP43 係以內源方式表現在皮下與內臟脂肪中 (圖 2B)。

c.

允許老鼠 3T3L1 細胞保持未分化或使其接受分化。RNA 係製自未分化之 3T3L1 細胞，經分化之 3T3L1 細胞，或老鼠骨骼肌細胞。RNA 之轉化成 cDNA 無論是於反轉錄酶存在 ("+") 或不存在 ("-"; 負對照組) 下進行。然後，進行 RT-PCR 以質問 RUP43 之表現，使用專一引物

5'-TGAGCTGTCGGCCATTCCCAT-3' (有意義引物；順序識別碼：13) 與 5'-GATTGTCCTCTTGGCTCTTC-3' (反有意義引物；順序

識別碼：14)。

所使用之循環條件為 94°C 歷經 2 分鐘，94°C 歷經 15 秒，55°C 歷經 30 秒及 72°C 歷經 1 分鐘，其中對於最後三個步驟進行 35 次循環。已發現 RUP43 係被已分化之老鼠 3T3L1 脂肪細胞表現，而被未分化之 3T3L1 脂肪細胞則達較小程度。亦發現 RUP43 係以內源方式被老鼠骨骼肌細胞表現(圖 2C)。

d.

人類骨骼肌細胞係得自 Cambrex。RNA 係製自此骨骼肌細胞，並轉化成 cDNA。使用按 [a] 中方式製自從 Biowhittaker 獲得之人類脂肪細胞之 cDNA，作為正對照組。RT-PCR 係按 [a] 中所述進行。已發現 RUP43 係以內源方式被骨骼肌細胞表現，且如前文 [a] 所示，被脂肪細胞表現(圖 2D)。

實例 12

脂肪細胞分化

a. 老鼠 3T3L1 細胞之分化

3T3L1 生長培養基	1000 毫升
DMEM	1000 毫升
10% BCS	100 毫升
L-麩醯胺, 200mM	10 毫升
P/S	10 毫升
3T3L1 正規培養基	1000 毫升
DMEM	1000 毫升
10% FBS	100 毫升
L-麩醯胺, 200mM	10 毫升
P/S	10 毫升
3T3L1 誘發培養基	1000 毫升

DMEM	1000 毫升
10% FBS	100 毫升
L-麩醯胺, 200mM	10 毫升
P/S	10 毫升
胰島素 (10 毫克 / 毫升)	1 毫升
IBMax (10 毫克 / 毫升)	11.1 毫升
地塞米松 (10 毫克 / 毫升)	328 微升

3T3L1 只有胰島素之培養基	1000 毫升
DMEM	1000 毫升
10% FBS	100 毫升
L-麩醯胺, 200mM	10 毫升
P/S	10 毫升
胰島素 (10 毫克 / 毫升)	1 毫升

DMEM: HYQ DEM/ 高葡萄糖, SH30081.01, 500 毫升 SH30081.02, 1000 毫升

BCS: 小牛血清, Hyclone SH30073.03

FBS: 牛胎兒血清, Hyclone SH30071.03

L-麩醯胺, 200mm, 100x. Hyclone SH40003-11

青霉素-鏈霉素, 100 毫升, Hyclone SV30010

胰蛋白酶, HYQ, 0.05% 1x, SH30236.0 1100 毫升

HYQ DPBS/ 變性, 1x SH30028.02, 50 毫升

將 3T3L1 細胞於 50% 匯合下接種，以致使培養物於隔天完全匯合。於細胞已達到 100% 匯合後兩天，添加誘發培養基。二至五天後，使細胞更換至只有胰島素之培養基。於誘發後二至五天，使細胞返回正規培養基歷經兩天，完成此 3T3L1 分化成脂肪細胞之過程。

b. 人類前脂肪細胞之分化

使購自 Cambrex 之人類前脂肪細胞，於 1×10^6 個細胞 / 板下，接種在 24-井板中。兩天後，當細胞達到 100% 匯合時，添加

購自 Cambrex 之誘發培養基。將細胞在誘發培養基中培養十天，藉以完成此初生人類前脂肪細胞分化成脂肪細胞之過程。

實例 13

人類骨骼肌細胞之分化

將人類初生未分化骨骼肌細胞在購自 Cambrex 之 SKGM-2 培養基中培養。當骨骼肌胚細胞培養物達成 50-70% 匯合時，移除 SKGM-2 培養基，並添加融合培養基 (DMEM-F12，經補充 2% 馬血清)。

細胞在融合培養基中之培養係持續 4-7 天 (其中係每隔一天置換融合培養基) 或直到在整個培養物中發現肌管為止。

發現所形成之經分化培養物包含多核 (超過 3 個核) 肌管。

若肌管欲被使用於需要長期時間在培養物中之檢測中時，則將融合培養基移除，並以 SKGM-2 培養基置換。為達最良好性能，係每隔一天置換 SKGM-2 培養基，以保持培養物歷經 2-3 週。肌管培養物最好在分化後 2 週時使用。

實例 14

內源 RUP43 偶合至 GS

藉由 RUP43 之 Gs 偶合係經由將 cAMP 在以內源人類、老鼠或大白鼠 RUP43 轉染之 HEK293 細胞中之胞內含量，與假轉染 HEK293 細胞 ("pCMV") 作比較而進行質問。胞內 cAMP 含量之測定係藉由環化酶檢測，使用 Perkin Elmer 閃光板套件 (SMP004B)，具有 ^{125}I 作為示蹤劑 (NEX130)，基本上依照製造者說明書進行。

HEK293 細胞係在 1.2×10^7 之密度下覆蓋，並允許黏附過夜。HEK293 細胞係接著以單獨之 pCMV 或以含有使內源人類、老鼠或大白鼠 RUP43 編碼之多核苷酸之 pCMV，使用帶脂胺(每 15 公分培養皿 120 微克)轉染。使經轉染細胞回復過夜。對於此檢測，係採集經轉染細胞，並添加至閃光板井，在最後細胞計數為 1×10^6 個細胞下。允許其黏附，然後使其接受示蹤劑歷經兩小時。然後抽吸所有井，並將板使用微板讀取器 (Wallac 1450 Microbeta 計數器) 讀取。已發現 RUP43-轉染 HEK293 細胞之胞內含量係顯著大於假轉染細胞，顯示 RUP43 証明可偵測含量之構成 Gs 偶合 (圖 3)。

實例 15

化合物 1 作為 RUP43 催動劑之確認

物質

得自 ATCC 之 HEK293 細胞係用於所有檢測。培養基包含 90 毫升 DMEM，經補充 10% 牛胎兒血清 (Gibco, BRL)。環 AMP 度量值係使用具有直接 cAMP $^{[125I]}$ 偵測系統之腺苷基環化酶活化作用 FlashPlate[®] 檢測進行測定。

短暫轉移感染與全細胞環化酶閃光板檢測

將 HEK293 細胞 (5×10^5 個細胞 / 毫升) 覆蓋在 15 公分培養皿中。隔天，按製造者建議，將細胞使用 FuGENE 6 試劑 (Roche 應用科學) 轉染。簡言之，係將包含 OptiMEM (Gibco, BRL) 與 FuGENE 6 試劑之轉移感染混合物混合在一起，並允許在室溫下培養 5 分鐘。將轉移感染試劑逐滴添加至含有 2 微克內源人類 RUP43 受體質粒 (經轉染) 或 2 微克空 pCMV 載體 (假)

之個別管件中，並使其在室溫下培養15分鐘。將DNA/轉移感染混合物逐滴添加至各透視板中，並在保持於37°C，95/5% O₂/CO₂下之潮濕培養器中培養過夜。隔天，將培養基以正常生長培養基置換，並使細胞培養過夜。

於第3天，將細胞以PBS沖洗一次，並使用非酵素細胞-解離緩衝劑(Gibco, BRL)逐出板，及再懸浮於檢測刺激緩衝劑[®](Perkin Elmer)中，於2X10⁶個細胞/毫升之密度下，供cAMP度量。將化合物1或媒劑於2X所要之最後濃度下，連續性地在刺激緩衝劑中稀釋。將化合物1與媒劑(50微升/井)添加至96-井FlashPlate[®](Perkin Elmer)之透視井中。將經轉染或假細胞以液份添加至各井(50微升/井)，並使其在室溫下，於板式振盪器上培養1小時。將偵測緩衝劑[®](Perkin Elmer，100微升)添加至各井，並在室溫下培養2小時，伴隨著溫和攪拌。於2小時培養結束時，將板抽吸，並使用Wallac 1450 Microbeta計數器測定cAMP含量。

已發現化合物1，以劑量依存方式，導致增加胞內cAMP，特別是在以內源人類RUP43轉染之HEK293細胞中，而未在假轉染細胞中，確認化合物1係為RUP43之催動劑(圖4)。

實例 16

化合物2作為RUP43催動劑之確認

使用黑色素細胞技術(前文實例10)，已發現化合物2係為內源人類RUP43之催動劑(圖5)。簡言之，黑色素細胞係使用胰蛋白酶(0.7X)採集自細胞匯合燒瓶(T-185平方公分燒瓶)，並藉由電擊穿孔轉染。使內源人類RUP43編碼之多核

苷酸(30微克)係用於黑色素細胞之轉移感染。於電擊穿孔後，將細胞預覆蓋在燒瓶中大約3-4小時，以除去未存活細胞與碎屑。於完成時，使燒瓶接著胰蛋白酶化，並以一式三份覆蓋於384井聚-D-離胺酸塗覆之板上，以供檢測。轉移感染後四十八小時，將檢測板在分光光度計中讀取(吸光率 T_0)。然後，使細胞與連續性地稀釋之化合物#2(100uM-51.2pM, 5-倍稀釋液，0.5% DMSO最後)一起培養一小時，並再一次讀取(吸光率 T_{60})。分析三份複製之吸光率數據，且當與正對照井(200)及負對照井(100)比較時，以百分比對照回應描繪。曲線高度為對照組之大約92%，具有 $EC_{50}=0.212\text{ uM}$ 。

實例 17

活體外葡萄糖吸收檢測

活體外葡萄糖吸收檢測係按此處所述進行。

緩衝劑與試劑：

飢餓培養基：DMEM/高葡萄糖，具有0.5%BSA。

KRPH緩衝劑：5mM NaHPO_4 , pH7.4 (每次使得KRPH緩衝劑為剛製成)

20mM HEPES, pH 7.4

1mM MgSO_4

1mM CaCl_2

136mM NaCl

4.7mM KCl

1% BSA

2-脫氧葡萄糖(DOG)：儲備液100 mM：16.4毫克/毫升在水中(於4C下儲存1-2週)。對各井，添加1微升含有 $1\text{ }\mu\text{Ci}[^3\text{H}]\text{-2-DOG}$ 與1微升冷儲備液2-DOG及2毫升KRPH。

細胞鬆弛素 B (CytoB)：儲備液 (10mM，在 95% 乙醇中)：保持在 -20°C 下。

使用最後 $10\ \mu\text{M}$ 下之 CytoB，以阻斷載劑所媒介之吸收。亦在結束時使用此濃度，以終止反應。終止緩衝劑為 PBS 加上 $10\ \mu\text{M}$ CytoB ("PBS")。

1% Triton-X：此係為促溶作用緩衝劑。

將細胞覆蓋在 24-井板中。

程序：

1. 使細胞飢餓至少 2 小時。
2. 以 KRPH 緩衝劑洗滌細胞 2 次，並添加 2 毫升 KRPH 至井中。
3. 以胰島素及 / 或以待測化合物或以媒劑 (對照組) 處理細胞 20 分鐘。
4. 20 分鐘後，自井吸出緩衝劑，且立即添加 1 毫升 KRPH 緩衝劑加上 2-DOG。對 CytoB 處理之細胞，於吸收檢測之前 5 分鐘，添加 CytoB。
5. 4 分鐘後，自井吸出緩衝劑，並添加 3 毫升冷 PBS。於完成檢測後，將各井中之細胞以冷 PBS 洗滌 2 次。完全吸出終止 PBS，然後添加 700 微升 1% Triton X。於 37°C 培養器中放置 30 分鐘。
6. 計數全部溶胞產物中之 CPM。計算 CPM/ 井。

自以胰島素及 / 或以待測化合物處理之各細胞及以媒劑處理之細胞 (對照組) 所獲得之數值中減去 CytoB 值。

實例 18


化合物 2 在老鼠 3T3L1 脂肪細胞中刺激葡萄糖吸收

將經分化老鼠 3T3L1 脂肪細胞以 $50\ \mu\text{M}$ 化合物 2 處理，歷經不同時間，然後根據實例 17 測定葡萄糖吸收。自 **圖 6** 得以顯見，化合物 2 會在 3T3L1 脂肪細胞中刺激葡萄糖吸收。此等結果顯示 RUP43 催動劑為在胰島素未能控制之高血糖中調

節葡萄糖含量之吸引人候選者。經刺激葡萄糖吸收之快速時間過程，指出RUP43催動劑可比目前可採用以降低血糖濃度之藥物提供更快速治療效果。



實例 19

化合物 2 在老鼠 3T3L1 脂肪細胞中加強胰島素刺激之葡萄糖吸收

將經分化老鼠 3T3L1 脂肪細胞使用 ("化合物 2") 或未使用 ("對照組") 化合物 2 在不含血清之培養基中處理 3 小時。然後，將 3T3L1 細胞以新的 KRPH 緩衝劑洗滌兩次，並以不同濃度之胰島素處理 20 分鐘。在以胰島素處理後，根據實例 17 測定葡萄糖吸收。自  7 得以顯見化合物 2 會在 3T3L1 脂肪細胞中加強胰島素刺激之葡萄糖吸收。此等結果顯示 RUP43 催動劑可增加胰島素功效，藉以降低為達成最高葡萄糖吸收所需要之胰島素濃度。

實例 20

化合物 2 在人類初生人類脂肪細胞中刺激葡萄糖吸收

人類前脂肪細胞 (Cambrex) 係經分化成脂肪細胞。經分化之初生人類脂肪細胞係在不含血清之培養基中使用或未使用 50 μ M 化合物處理 23 小時。然後，將人類脂肪細胞以新的 KRPH 緩衝劑洗滌兩次，並使用或未使用 100 nM 胰島素處理 20 分鐘。在使用或未使用胰島素處理後，根據實例 17 測定葡萄糖吸收。自  8 得以顯見化合物 2 會在初生人類脂肪細胞中刺激葡萄糖吸收。自  8 亦得以顯見化合物 2 會在初生人類脂肪細胞中加強胰島素刺激之葡萄糖吸收。顯著地，

如同關於老鼠3T3L1細胞所發現者，RUP43催動劑可在初生人類脂肪細胞中，於胰島素不存在下，刺激葡萄糖吸收，且RUP43-刺激之葡萄糖吸收之程度係相當於胰島素刺激之葡萄糖吸收之程度。

實例 21

化合物 2 在大白鼠 L6 肌胚細胞中刺激葡萄糖吸收

大白鼠骨骼肌 L6 肌胚細胞係得自 ATCC，並於 24-井板中生長至匯合。

a.

將匯合 L6 細胞使用或未使用不同濃度之化合物 2 在不含血清之培養基中處理 3 小時。然後，將 L6 細胞以 KRPH 緩衝劑洗滌兩次。將已經以化合物 2 處理之 L6 細胞與 KRPH 緩衝劑一起培養 20 分鐘；將未以化合物 2 處理之 L6 細胞，以 10nM 或 100nM 胰島素處理 20 分鐘。在使用或未使用胰島素處理後，根據實例 17 測定葡萄糖吸收。自 **圖 9A** 得以顯見化合物 2 會在大白鼠 L6 肌胚細胞中刺激葡萄糖吸收。RUP43 催動劑在大白鼠 L6 肌胚細胞中係比胰島素刺激較大葡萄糖吸收。因骨骼肌細胞係負責活體內葡萄糖處置之 80%，故所獲得之結果顯示 RUP43 催動劑係為吸引人候選者，提供比胰島素更良好之活體內葡萄糖處置。

b.

將匯合 L6 肌胚細胞以 50 μ M 化合物 2 處理，歷經不同時間。於各治療期間結束時，根據實例 17 測定葡萄糖吸收。此等結果顯示 RUP43 催動劑可於 20 分鐘內在骨骼肌細胞中

刺激葡萄糖吸收，此時間架構係類似胰島素之情況(圖9B)。此等結果顯示RUP43催動劑係為吸引人候選者，以在相當於胰島素之短期時間內調節活體內葡萄糖含量。

實例 22

化合物 2 在大白鼠 L6 肌胚細胞中加強胰島素刺激之葡萄糖吸收

將匯合大白鼠 L6 肌胚細胞在不含血清之培養基中使用或未使用 50 μ M 化合物處理 23 小時。然後，將 L6 細胞以新的 KRPH 緩衝劑洗滌兩次。接著，將 L6 細胞使用或未使用 100nM 胰島素處理 20 分鐘。在使用或未使用胰島素處理後，根據實例 17 測定葡萄糖吸收。自圖 10 得以顯見，類似關於脂肪細胞所發現者，化合物 2 會在大白鼠 L6 肌胚細胞中加強胰島素刺激之葡萄糖吸收。此等結果進一步顯示 RUP43 催動劑可增加胰島素功效，藉以降低為達成最高葡萄糖吸收所需要之胰島素濃度。因此，對於患有胰島素過多所造成關於胰島素抗藥性問題之個體，RUP43 係代表吸引人候選之治療選擇。

實例 23

化合物 2 在初生人類骨骼肌細胞中刺激葡萄糖吸收

使得自 Cambrex 之初生人類骨骼肌細胞生長至 50% 匯合，然後在培養時以誘發培養基分化 5 至 7 天。然後，將經分化之初生人類骨骼肌細胞轉移至生長培養基，歷經 7 至 10 天。

a.

將經分化之人類骨骼肌細胞使用或未使用不同濃度之化

合物 2，在不含血清之培養基中處理 3 小時。在使用或未使用化合物 2 處理後，將細胞以新的 KRPH 緩衝劑洗滌兩次。然後，將已經以化合物 2 處理之細胞以 KRPH 緩衝劑培養 20 分鐘；將未以化合物 2 處理之細胞以 10nM 或 100nM 胰島素培養 20 分鐘。在使用或未使用胰島素處理後，根據實例 17 測定葡萄糖吸收。自 **圖 11A** 得以顯見 RUP43 催動劑可在人類骨骼肌細胞中，於胰島素不存在下調節葡萄糖吸收，且比胰島素更有效。所獲得之結果顯示 RUP43 催動劑在人類骨骼肌細胞中，有效刺激葡萄糖吸收，於其中進行 80% 葡萄糖處置。所獲得之結果顯示 RUP43 催動劑係為吸引人候選者，在對胰島素作用反拗之高血糖中控制葡萄糖含量。

b.

將經分化之人類骨骼肌細胞以 50 μ M 化合物 2 處理，歷經不同時期。於各治療期間結束時，根據實例 17 測定葡萄糖吸收。所獲得之結果係呈現於 **圖 11B** 中。在人類骨骼肌細胞中，關於 RUP43 催動劑所發現之快速刺激葡萄糖吸收，顯示 RUP43 催動劑係為吸引人候選者，直接且在短期時間內調節活體內葡萄糖含量。

實例 24

口服生物利用率

用於直接評估口服生物利用率之物理化學分析途徑，係為一般熟諳此項技藝者所習知，且可使用 [參閱，例如但不限於：Wong PC 等人, *Cardiovasc Drug Rev* (2002) 20 : 137-52；與 Buchan P 等人, *Headache* (2002) 補充 2 : S54-62；其中每一件之揭

示內容係據此以其全文併於本文供參考]。藉由進一步說明而非限制，該替代分析途徑可包含液相層析法-協力質量光譜法 [Chavez-Eng CM 等人, J chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2002) 767: 117-29; Jetter A 等人, Clin Pharmacol Ther (2002) 71: 21-9; Zimmerman JJ 等人, J Clin Pharmacol (1999) 39: 1155-61; 及 Barrish A 等人, Rapid Commun Mass Spectrom (1996) 10: 1033-7; 其中每一件之揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。最近，陽電子發射局部 X 射線檢法 (PET) 已被成功地用以獲得藥物分佈之直接度量，包括在哺乳動物身體中，於藥物之口服投藥後之口服生物利用率 [Gulyas 等人, Eur J Nucl Med Mol Imaging (2002) 29: 1031-8; 其揭示內容係據此以其全文併於本文供參考]。

或者，藉由說明而非限制，按例如經過實例 26 之老鼠模式所發展之活體內數據為基礎。調節物係藉由口腔灌食法，在劑量範圍為 0.1 毫克/公斤至 100 毫克/公斤下投藥。此調節物之作用係經証實為劑量依賴性，且可比擬腹膜腔內投藥後之作用，其中作用係為血糖濃度之降低 (實例 26)。經過口服投藥達成有利作用之半最高降低所需要之調節物劑量，係與經過腹膜腔內投藥達成有利作用之半最高降低所需要之調節物劑量比較。以下述作為說明，若該口服劑量為該腹膜腔內劑量之兩倍，則調節物之口服生物利用率係被採取為 50%。更一般性而言，若該口服劑量為 θ 毫克/公斤，而該腹膜腔內劑量為 ρ 毫克/公斤，則調節物之口服生物利用率作為百分比，係被採取為 $[(\rho/\theta) \times 100]$ 。

實例 25**血液腦部障壁模式**

本發明化合物越過血液-腦部障壁之能力，可使用腦部衍生之細胞測定。藉由說明而非限制，一種所設想之方法係利用 Dehouck 等人之血液/腦部障壁模式 [J Neurochem (1990) 54: 1798-801; 據此以其全文併於本文供參考]，其係使用腦部微血管內皮細胞與星形細胞之共培養物。

使牛微血管內皮 (BBCE) 細胞單離並經特徵鑒定，按藉由 Meresse 等人所述 [J Neurochem (1989) 53: 1363-1371; 據此以其全文併於本文供參考]。簡言之，在從牛腦部之一個半球藉由機械均化而單離之後，將微血管接種於塗有藉由牛角膜內皮細胞分泌之胞外間質之培養皿上。於接種五天後，第一份內皮細胞係自微血管潛移出，並開始形成微菌落。當菌落足夠大時，使五個最大島狀物胰蛋白酶化，並接種至 35-毫米-直徑明膠-塗覆培養皿 (每培養皿一份無性繁殖系)，於 Dulbecco 氏變性 Eagle 培養基 (DMEM) 存在下，經補充 15% 小牛血清 (Seromed)、3mM 麩醯胺、50 微克/毫升間他霉素 (gentamicin)、2.5 微克/毫升兩性霉素 B (霉吉宗 (fungizone)) 及牛成纖維細胞生長因子 (1 毫微克/毫升，每隔一天添加)。將得自一個 35-毫米-直徑培養皿之內皮細胞於匯合時採集，並接種於 60-毫米-直徑明膠-塗覆培養皿上。6-8 天後，使融合細胞於分流比 1: 20 下繼代培養。將第三繼代之細胞 (~100 個培養皿) 儲存於液態氮中。

星形細胞之初生培養物係製自新生大白鼠大腦皮質。在

腦膜已被清除後，強迫腦部組織溫和地經過尼龍篩網，如由 Booher 與 Sensenbrenner 所述 [Neurobiology (1972) 2: 97-105; 據此以其全文併於本文供參考]。將補充 10% 牛胎兒血清 (Seromed)、2mM 麩醯胺及 50 微克/毫升間他霉素之 DMEM 使用於大腦組織之解離及星形細胞之發育。

將培養板插入物 (Millicell-CM; 孔隙大小 0.4 μM ; 直徑 30 毫米; Millipore) 於兩個側面上塗覆藉由 Bornstein 方法之修正 [Lab Invest (1958) 7: 134-139; 據此以其全文併於本文供參考] 所製成之大白鼠尾膠原。

將星形細胞在 2.5×10^5 個細胞/毫升之濃度下，使用倒置濾器，覆蓋於底側上。8 天後，將濾器正確地定位，並更換培養基一週兩次。於接種後三週，星形細胞之培養物變得被安定化。然後，將在繼代 3 下冷凍之 BBCE 細胞再培養於 60-毫米-直徑明膠-塗覆培養皿中。使融合細胞胰蛋白酶化，並在 4×10^5 個細胞之濃度下覆蓋於濾器上側。用於共培養之培養基係為 DMEM，經補充 15% 小牛血清、2 mM 麩醯胺、50 微克/毫升間他霉素及每隔一天添加之 1 毫微克/毫升牛成纖維細胞生長因子。在此等條件下，BBCE 細胞係在 8 天內形成匯合單層。

將培養板置入六井板中，其中 2 毫升緩衝劑被添加至上方案室，而 2 毫升被添加至含有插入物之板。將六井板放置在 37°C 下之振盪水浴中。將本發明化合物添加至上方案室中，並自下方室，於不同時間點移除 100 微升。在某些具體實施例中，待測化合物係經放射性標識。在某些具體實施例中，

放射性標識係為³H或¹⁴C。在一些具體實施例中，最後時間點為約20分鐘，約30分鐘，約40分鐘，約50分鐘，約60分鐘，約70分鐘，約80分鐘或約90分鐘。於不同時間點，存在於下方室中之總待測化合物百分比係經測定。使用白胺酸作為滲透性正對照組。使用菊糖作為滲透性負對照組。

在某些具體實施例中，於最後時間點，在下方室中測定出至少約10%，至少約20%，至少約30%，至少約40%，至少約50%，至少約60%，至少約70%，至少約80%或至少約90%之本發明化合物，係為本發明化合物能夠越過血液-腦部障壁之指標。

實例 26

RUP43 催動劑在大白鼠中對於葡萄糖等穩性之活體內作用

A. 在大白鼠中之口服葡萄糖容許度試驗 (oGTT)

使10週大之雄性 Zucker 糖尿病脂肪 (ZDF) 大白鼠 (查理士河 (Charles River)) 斷食18小時，且隨機地分組 (n=11) 以接受各種劑量下之 RUP43 催動劑，或使用已知會增加胰島素敏感性之對照若西葛塔宗 (rosiglitazone) (RSG，10毫克/公斤)。RUP43 催動劑係以腹膜腔內方式傳輸。RSG係以腹膜腔內方式傳輸。RUP43 催動劑之較佳劑量為0.1-100毫克/公斤。其他較佳劑量係選自包括：0.1毫克/公斤，0.3毫克/公斤，1.0毫克/公斤，3.0毫克/公斤，10毫克/公斤，30毫克/公斤及100毫克/公斤。安慰劑組係投予媒劑。

於待測化合物與對照 RSG 投藥後三十分鐘，將大白鼠以經口方式投予2克/公斤劑量下之右旋糖。血糖含量係在不

同時間點，使用葡萄糖計 Elite XL (Bayer) 測定。將右旋糖投藥時間採用為 "0 分鐘"，則舉例之時間點為 -30 分鐘，0 分鐘，30 分鐘，60 分鐘，90 分鐘及 120 分鐘。平均葡萄糖濃度係自各治療組之十一隻動物平均。此等結果可証實 RUP43 催動劑會以劑量依存方式，於大白鼠中，在以葡萄糖激發後降低血糖。

或者，如此處所述之口服葡萄糖容許度試驗，係在大白鼠中，緊接於七次每日注射 RUP43 催動劑、RSG 或媒劑之後進行。

明確地意欲涵蓋在內的是，此處所述之口服葡萄糖容許度試驗亦可在不同動物中進行，例如在老鼠或兔子中。

B. ZDF 大白鼠對 RUP43 催動劑之急性回應

將 10 週大之雄性 Zucker 糖尿病脂肪 (ZDF) 大白鼠 (查理士河 (Charles River)) 隨機地分組 (n=6) 以接受媒劑 (腹膜腔內方式)、RUP43 催動劑 (腹膜腔內方式) 或若西葛塔宗 (rosiglitazone) (RSG, 10 毫克/公斤, 腹膜腔內方式)。RUP43 催動劑之較佳劑量為 0.1-100 毫克/公斤。其他較佳劑量係選自包括：0.1 毫克/公斤，0.3 毫克/公斤，1.0 毫克/公斤，3.0 毫克/公斤，10 毫克/公斤，30 毫克/公斤及 100 毫克/公斤。在化合物投藥後，移除食物，並在不同時間下測定血糖含量。葡萄糖含量測定之舉例時間為 0 小時，1 小時，2 小時，3 小時及 4 小時，然後是每日，歷經達到一週。於各時點之血糖降低係以原先葡萄糖含量之百分比表示，自各組之六隻動物平均。此等動物具有血糖含量 (餵食狀態) 為 300-400 毫克/公合，顯

著地高於非糖尿病野生型動物。與媒劑對照物比較，以 RUP43 催動劑或 RSG 處理可証實顯著地降低葡萄糖含量。此等數據可証實 RUP43 催動劑具有改善糖尿病動物中之葡萄糖等穩性之功效。

或者，將大白鼠每日以 RUP43 催動劑、RSG 或媒劑注射歷經七天，然後緊接著每日測定血糖含量，歷經七天。

明確地意欲涵蓋在內的是，此處所述之急性回應試驗亦可在不同動物中進行，例如在老鼠或兔子中。

實例 27

本發明化合物之合成

實例 27A： 2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸甲基(2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡唑-3-基)-醯胺

2-六氫吡啶-4-基-噻唑-4-羧酸乙酯二氫溴化物鹽

將 4-(胺基碳硫基)四氫吡啶-1(2H)-羧酸第三-丁酯(2.0 克，8.2 毫莫耳)與溴丙酮酸乙酯(1.6 克，8.2 毫莫耳)在 30 毫升 EtOH 中之溶液於 80°C 下攪拌 4 小時。然後，使混合物冷卻至室溫，接著添加 48% HBr(1.0 毫升，14 毫莫耳)。將反應混合物再攪拌 1 小時，然後濃縮成油性固體。以乙醚研製，獲得 3.0 克(91%)黃褐色固體：¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.02 (br s, 1H), 8.77 (br s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.01 (br s, 1H), 4.29 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.44-3.33 (m, 3H), 3.02 (q, J = 11.7 Hz, 2H), 2.19 (d, J = 13.2 Hz, 2H), 1.97-1.88 (m, 2H), 1.29 (t, J = 7.0 Hz, 3H)。對 C₁₁H₁₆N₂O₂S+H 之 MS 計算值：241, 發現值：241。

2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸乙酯

將 2-六氫吡啶-4-基-噻唑-4-羧酸乙酯二氫溴化物鹽 (1.0 克, 3.2 毫莫耳)、2-氯苯基醋酸 (0.55 克, 3.2 毫莫耳)、六氟磷酸 O-(7-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基鏷 (1.4 克, 3.5 毫莫耳) 及二異丙基乙胺 (3.0 毫升, 17 毫莫耳) 在 30 毫升 CH_2Cl_2 中之溶液於 40°C 下攪拌 8 小時。然後, 將粗製混合物以 30 毫升 CH_2Cl_2 稀釋, 並以 1 M 檸檬酸 (3 X 50 毫升)、飽和 NaHCO_3 水溶液 (1 X 30 毫升) 及飽和 NaCl 水溶液 (1 X 30 毫升) 洗滌。將所形成之有機層以 MgSO_4 脫水乾燥, 過濾及濃縮成褐色油。於矽膠上, 以 EtOAc: 己烷 (3: 1) 純化, 獲得 0.94 克 (75%) 淡褐色油: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.08 (s, 1H), 7.39 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 7.2, 2.0$ Hz, 1H), 7.25-7.19 (m, 2H), 4.76 (apparent d, 1H), 4.42 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.99-3.95 (m, 1H), 3.88 (d, AB 圖樣, $J_{AB} = 16.0$ Hz, 1H), 3.83 (d, AB 圖樣, $J_{AB} = 16.0$ Hz, 1H), 3.34 (tt, $J = 11.7, 3.7$ Hz, 1H), 3.21-3.14 (m, 1H), 2.83-2.76 (m, 1H), 2.20-2.16 (m, 2H), 1.74 (qd, $J = 12.3, 4.1$ Hz, 1H), 1.63 (qd, $J = 12.3, 4.0$ Hz, 1H), 1.40 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

對 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}+\text{H}$ 之 MS 計算值: 393, 發現值: 393.

2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸

將 2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸乙酯 (0.94 克, 2.4 毫莫耳) 在 20 毫升 MeOH 中之溶液, 以 1 M NaOH (20 毫升, 20 毫莫耳) 稀釋, 並使其在 60°C 下攪拌 4 小時。然後, 使粗製混合物濃縮, 以移除 MeOH 溶劑。然後, 將此鹼性水溶液以 CH_2Cl_2 洗滌 (2 X 25 毫升), 並以 5 M HCl 酸化至 $\text{pH} = 1$ 。將所形成之酸性水溶液以 CH_2Cl_2 萃取 (3 X 25 毫升)。將有機層合併, 以 MgSO_4 脫水乾燥, 過濾及濃縮, 而得 0.51

克 (58%) 白色泡沫狀固體：¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.96 (br s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.45-7.40 (m, 1H), 7.33-7.25 (m, 3H), 4.43 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 3.87 (d, AB 圖樣, J_{AB} = 16.0 Hz, 1H), 3.82 (d, AB 圖樣, J_{AB} = 16.0 Hz, 1H), 3.38-3.31 (m, 1H), 3.25 (appart, J = 11.8 Hz, 1H), 2.79 (appart, J = 11.6 Hz, 1H), 2.08 (t, J = 10.6 Hz, 2H), 1.67 (qd, J = 12.1, 3.7 Hz, 1H), 1.53 (qd, J = 12.2, 4.0 Hz, 1H).

對 C₁₇H₁₇ClN₂O₃S+H 之 MS 計算值：365, 發現值：365.

2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸甲基-(2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡唑-3-基)-醯胺二鹽酸鹽

將 N,1-二甲基-4,5,6,7-四氫-1H-吡唑-3-胺 (23 毫克, 0.14 毫莫耳)、六氟磷酸 O-(7-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基鏷 (75 毫克, 0.20 毫莫耳) 及 2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸 (50 毫克, 0.14 毫莫耳) 在 10 毫升 CH₂Cl₂ 中之溶液於 40°C 下攪拌 8 小時。然後, 將粗製混合物以 20 毫升 CH₂Cl₂ 稀釋, 並以 1 M 檸檬酸 (3 X 30 毫升)、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (1 X 30 毫升) 及飽和 NaCl 水溶液 (1 X 30 毫升) 洗滌。將所形成之有機層以 MgSO₄ 脫水乾燥, 過濾及濃縮成黃色油。藉由梯度 HPLC (乙腈-水, 具有 0.1% TFA) 純化, 並轉化成二鹽酸鹽, 獲得 56 毫克 (70%) 白色固體：¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.28 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.43-7.41 (m, 1H), 7.30-7.26 (m, 3H), 4.50 (t, J = 11.8 Hz, 1H), 4.09-4.03 (m, 1H), 3.98-3.91 (m, 2H), 3.83 (d, J = 12.8 Hz, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.24-3.20 (m, 1H), 2.89-2.82 (m, 1H), 2.83-2.66 (m, 2H), 2.47-2.41 (m, 1H), 2.03-1.88 (m, 4H), 1.72-1.60 (m, 3H), 1.46-1.26 (m, 3H).

對 C₂₆H₃₀ClN₅O₂S+H 之 MS 計算值：512, 發現值：512.

實例 27B: 2-(2-氯苯基)-1-{4-[4-(3,4-二氫-2H-喹啉-1-羰基)-噻唑-2-基]-六氫吡啶-1-基}-乙酮

藉由如 **實例 29A** 之相同一般程序，2-(2-氯苯基)-1-{4-[4-(3,4-二氫-2H-喹啉-1-羰基)-噻唑-2-基]-六氫吡啶-1-基}-乙酮係得自 1,2,3,4-四氫喹啉，為黃色固體。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.78 (s, 1H), 7.42-7.40 (m, 1H), 7.30-7.24 (m, 3H), 7.18 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.03 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.91 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.72 (br s, 1H), 4.28 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 3.94-3.81 (m, 5H), 3.30-3.20 (m, 2H), 2.98-2.91 (m, 1H), 2.83 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.04 (五重峰, J = 6.6 Hz, 2H), 1.99-1.93 (br m, 2H), 1.60-1.51 (m, 2H). 對 C₂₆H₂₆ClN₃O₂S+H 之 MS 計算值：480, 發現值：480.

實例 27C: 2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸甲基-(2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡啶-3-基)-醯胺

藉由如 **實例 29A** 之相同一般程序，2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸甲基-(2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡啶-3-基)-醯胺係得自 2-{1-[2-(2-氯苯基)-乙醯基]-六氫吡啶-4-基}-噻唑-4-羧酸，為白色固體。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (d, J = 10.4 Hz, 1H), 7.30 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.26-7.22 (m, 1H), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.05 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 4.47 (appart, J = 13.6 Hz, 1H), 3.90-3.79 (m, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.63 (d, J = 4.4 Hz, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.17-3.11 (m, 1H), 3.04-2.95 (m, 1H), 2.91-2.79 (m, 1H), 2.61-2.43 (m, 2H), 2.27 (dt, J = 15.3, 5.7 Hz, 1H), 1.99-1.88 (m, 3H), 1.79-1.72 (m, 1H), 1.64-1.38 (m, 5H). 對 C₂₆H₃₀FN₅O₂S+H 之 MS 計算值：496, 發現值：496.

【圖式簡單說明】

圖 1. 作為實例而非限制，圖 1 係描繪得自候選化合物針對 "標的受體" 之初期篩檢之結果，該受體係為與 RUP43 不相關之內源構成上活性之 Gs-偶合 GPCR 之 Gs α 融合蛋白質構造物。關於 "化合物 A" 之結果係提供於井 A2 中。關於 "化合物 B" 之結果係提供於井 G9 中 (參閱實例 7)。

圖 2. 藉由脂肪細胞與骨骼肌細胞之 RUP43 表現之 RT-PCR 分析。人類與老鼠脂肪細胞係表現 RUP43。人類與老鼠骨骼肌細胞係表現 RUP43 (參閱實例 11)。

圖 3. 內源 RUP43 偶合至 Gs (參閱實例 14)。

圖 4. 確認化合物 1 作為 RUP43 之催動劑 (參閱實例 15)。

圖 5. 確認化合物 2 作為 RUP43 之催動劑 (參閱實例 16)。

圖 6. 化合物 2 在老鼠 3T3L1 脂肪細胞中藉由化合物 2 刺激葡萄糖吸收 (參閱實例 18)。

圖 7. 化合物 2 在老鼠 3T3L1 脂肪細胞中加強胰島素刺激之葡萄糖吸收 (參閱實例 19)。

圖 8. 化合物 2 在初生人類脂肪細胞中刺激葡萄糖吸收 (參閱實例 20)。

圖 9. 化合物 2 在大白鼠 L6 肌胚細胞中刺激葡萄糖吸收 (參閱實例 21)。

圖 10. 化合物 2 在大白鼠 L6 肌胚細胞中加強胰島素刺激之葡萄糖吸收 (參閱實例 22)。

圖 11. 化合物 2 在初生人類骨骼肌細胞中刺激葡萄糖吸收 (參閱實例 23)。

序列表

<110> Arena 醫藥公司

Qiu, Jun

Webb, Robert R.

Unett, David J.

Gatlin, Joel

Connolly, Daniel T.

<120> 用於治療高血糖症及相關病症之人類 G 蛋白偶合受體與其調節物

<130> 86.WO1

<140> 094111561

<141> 2005-04-12

<150> 60/561,954

<151> 2004-04-13

<160> 14

<170> PatentIn 3.2 版

<210> 1

<211> 993

<212> DNA

<213> 人類

<400> 1

```

atgacgcccc acagcactgg cgaggtgccc agccccattc ccaagggggc tttggggctc      60
tccctggccc tggcaagcct catcatcacc gcgaacctgc tctagccct gggcatcgcc      120
tgggaccgcc gcctgcgcag cccacctgct ggctgcttct tctgagcct actgctggct      180
gggctgctca cgggtctggc attgcccaca ttgccagggc tgtggaacca gagtgcgccg      240
ggttactggc cctgcctcct cgtctacttg gctcccaact tctccttct ctccctgctt      300
gccaacctct tgctgggtgca cggggagcgc tacatggcag tctgaggcc actccagccc      360
cctgggagca ttcggctggc cctgctcctc acctgggctg gtcccctgct ctttgccagt      420
ctgcccgtc tggggtggaa ccaactggacc cctgggtgcca actgcagctc ccaggetatc      480
ttccagccc cctacctgta cctcgaagtc tatgggctcc tgetgcccgc cgtgggtgct      540
gctgccttcc tctctgtccg cgtgctggcc actgcccacc gccagctgca ggacatctgc      600
cggctggagc gggcagtgct ccgcgatgag cctccgccc tggcccgggc cttacctgg      660
aggcaggcaa gggcacaggc tggagccatg ctgctcttcg ggctgtgctg ggggcccctac      720
gtggccacac tgctcctctc agtcctggcc tatgagcagc gcccgccact ggggcccctgg      780

```

acaactgttgt ccctcctctc cctaggaagt gccagtgag cggcagtgcc cgtagccatg 840
 gggctggggcg atcagcgccta cacagccccc tggagggcag ccgccc aaag gtgcctgcag 900
 gggctgtggg gaagagcctc ccgggacagt cccggcccca gcattgccta ccaccaagc 960
 agccaaagca gtgtcgacct ggacttgaac taa 993

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> 人類

<400> 2

Met Thr Pro Asn Ser Thr Gly Glu Val Pro Ser Pro Ile Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Ser Leu Ala Leu Ala Ser Leu Ile Ile Thr Ala Asn
 20 25 30

Leu Leu Leu Ala Leu Gly Ile Ala Trp Asp Arg Arg Leu Arg Ser Pro
 35 40 45

Pro Ala Gly Cys Phe Phe Leu Ser Leu Leu Leu Ala Gly Leu Leu Thr
 50 55 60

Gly Leu Ala Leu Pro Thr Leu Pro Gly Leu Trp Asn Gln Ser Arg Arg
 65 70 75 80

Gly Tyr Trp Ser Cys Leu Leu Val Tyr Leu Ala Pro Asn Phe Ser Phe
 85 90 95

Leu Ser Leu Leu Ala Asn Leu Leu Leu Val His Gly Glu Arg Tyr Met
 100 105 110

Ala Val Leu Arg Pro Leu Gln Pro Pro Gly Ser Ile Arg Leu Ala Leu
 115 120 125

Leu Leu Thr Trp Ala Gly Pro Leu Leu Phe Ala Ser Leu Pro Ala Leu
 130 135 140

Gly Trp Asn His Trp Thr Pro Gly Ala Asn Cys Ser Ser Gln Ala Ile
 145 150 155 160

Phe Pro Ala Pro Tyr Leu Tyr Leu Glu Val Tyr Gly Leu Leu Leu Pro
 165 170 175

Ala Val Gly Ala Ala Ala Phe Leu Ser Val Arg Val Leu Ala Thr Ala
 180 185 190

His Arg Gln Leu Gln Asp Ile Cys Arg Leu Glu Arg Ala Val Cys Arg
 195 200 205

Asp Glu Pro Ser Ala Leu Ala Arg Ala Leu Thr Trp Arg Gln Ala Arg
 210 215 220

Ala Gln Ala Gly Ala Met Leu Leu Phe Gly Leu Cys Trp Gly Pro Tyr
 225 230 235 240

Val Ala Thr Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Tyr Glu Gln Arg Pro Pro
 245 250 255

Leu Gly Pro Gly Thr Leu Leu Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Ala Ser
 260 265 270

Ala Ala Ala Val Pro Val Ala Met Gly Leu Gly Asp Gln Arg Tyr Thr
 275 280 285

Ala Pro Trp Arg Ala Ala Ala Gln Arg Cys Leu Gln Gly Leu Trp Gly
 290 295 300

Arg Ala Ser Arg Asp Ser Pro Gly Pro Ser Ile Ala Tyr His Pro Ser
 305 310 315 320

Ser Gln Ser Ser Val Asp Leu Asp Leu Asn
 325 330

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 引物順序

<400> 3

gacaagcatg acgccaaca gcaactggcga g

31

<210> 4

<211> 32
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 引物順序

<400> 4
 ctggaattag ttcaagtcca ggtcgacact gc 32

<210> 5
 <211> 1176
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 新穎順序

<400> 5
 atgtacccat acgacgtccc agactacgct ggaagcttga cgcccaacag cactggcgag 60
 gtgcccagcc ccattcccaa gggggctttg gggctctccc tggccctggc aagcctcatc 120
 atcaccgca accctgctcct agccctgggc atcgctggg accgccgct gcgcagccca 180
 cctgctggct gcttcttct gagcctactg ctggctgggc tgctcacggg tctggcattg 240
 cccacattgc cagggtgtg gaaccagagt cgccgggggtt actggctctg cctcctcgtc 300
 tacttggctc ccaacttctc ctctctctcc ctgcttgcca acctcttgct ggtgcacggg 360
 gagcgtaca tggcagtcct gagggcactc cagccccctg ggagcattcg gctggccctg 420
 ctctcacct gggctggctc cctgctcttt gccagtctgc ccgctctggg gtggaaccac 480
 tggaccctg gtgccaactg cagctcccag gctatcttcc cagcccccta cctgtacctc 540
 gaagtctatg ggctcctgct gcccgccgtg ggtgctgctg ccttctctc tgtccgcgtg 600
 ctggccactg cccaccgcca gctgcaggac atctgccggc tggagcgggc agtgtgccgc 660
 gatgagccct ccgccctggc ccgggccctt acctggaggc aggcaagggc acaggctgga 720
 gccatgctgc tcttcgggct gtgctggggg ccctacgtgg ccacactgct cctctcagtc 780
 ctggcctatg agcagcggcc gccactgggg cctgggacac tgttgtccct cctctcccta 840
 ggaagtgcca gtgcagcggc agtgcccgtg gccatggggc tgggcgatca gcgctacaca 900
 gccccctgga gggcagccgc ccaaagggtg ctgcaggggc tgtggggaag agcctcccgg 960
 gacagtcccg gccccagcat tgctaccac ccaagcagcc aaagcagtgt cgacctggac 1020
 ttgaacgaat tcggatccaa gggcaattct gcagatatcc agcacagtgg cggccgctcg 1080

agtctagagg gccgcgggtt cgaaggtaag cctatcccta accctctcct cggctctgat 1140
 tctacgcgta ccggatcatca tcacatcac cattga 1176

<210> 6
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> 人造

<220>
 <223> 新穎順序

<400> 6

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Ser Leu Thr Pro Asn
 1 5 10 15

Ser Thr Gly Glu Val Pro Ser Pro Ile Pro Lys Gly Ala Leu Gly Leu
 20 25 30

Ser Leu Ala Leu Ala Ser Leu Ile Ile Thr Ala Asn Leu Leu Leu Ala
 35 40 45

Leu Gly Ile Ala Trp Asp Arg Arg Leu Arg Ser Pro Pro Ala Gly Cys
 50 55 60

Phe Phe Leu Ser Leu Leu Leu Ala Gly Leu Leu Thr Gly Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Pro Thr Leu Pro Gly Leu Trp Asn Gln Ser Arg Arg Gly Tyr Trp Ser
 85 90 95

Cys Leu Leu Val Tyr Leu Ala Pro Asn Phe Ser Phe Leu Ser Leu Leu
 100 105 110

Ala Asn Leu Leu Leu Val His Gly Glu Arg Tyr Met Ala Val Leu Arg
 115 120 125

Pro Leu Gln Pro Pro Gly Ser Ile Arg Leu Ala Leu Leu Leu Thr Trp
 130 135 140

Ala Gly Pro Leu Leu Phe Ala Ser Leu Pro Ala Leu Gly Trp Asn His
 145 150 155 160

Trp Thr Pro Gly Ala Asn Cys Ser Ser Gln Ala Ile Phe Pro Ala Pro
 165 170 175

200539867

Tyr Leu Tyr Leu Glu Val Tyr Gly Leu Leu Leu Pro Ala Val Gly Ala
180 185 190

Ala Ala Phe Leu Ser Val Arg Val Leu Ala Thr Ala His Arg Gln Leu
195 200 205

Gln Asp Ile Cys Arg Leu Glu Arg Ala Val Cys Arg Asp Glu Pro Ser
210 215 220

Ala Leu Ala Arg Ala Leu Thr Trp Arg Gln Ala Arg Ala Gln Ala Gly
225 230 235 240

Ala Met Leu Leu Phe Gly Leu Cys Trp Gly Pro Tyr Val Ala Thr Leu
245 250 255

Leu Leu Ser Val Leu Ala Tyr Glu Gln Arg Pro Pro Leu Gly Pro Gly
260 265 270

Thr Leu Leu Ser Leu Leu Ser Leu Gly Ser Ala Ser Ala Ala Ala Val
275 280 285

Pro Val Ala Met Gly Leu Gly Asp Gln Arg Tyr Thr Ala Pro Trp Arg
290 295 300

Ala Ala Ala Gln Arg Cys Leu Gln Gly Leu Trp Gly Arg Ala Ser Arg
305 310 315 320

Asp Ser Pro Gly Pro Ser Ile Ala Tyr His Pro Ser Ser Gln Ser Ser
325 330 335

Val Asp Leu Asp Leu Asn Glu Phe Gly Ser Lys Gly Asn Ser Ala Asp
340 345 350

Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu
355 360 365

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
370 375 380

Gly His His His His His His
385 390

<210> 7
<211> 31
<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 引物順序

<400> 7

gacaagcttg acgccaaca gcactggcga g

31

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 引物順序

<400> 8

cttgaattcg ttcaagtcca ggtcgacact gc

32

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 引物順序

<400> 9

gatcaagctt ccatggcgtg ctgcctgagc gaggag

36

<210> 10

<211> 53

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 引物順序

<400> 10

gatcggatcc ttagaacagg ccgcagtcct tcaggttcag ctgcaggatg gtg

53

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 引物順序

<400> 11

ctacctgtac ctcggaagtct a

21

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 引物順序

<400> 12

agtggcgggc gctgctcat

19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 老鼠引物順序

<400> 13

tgagctgtcg gccattccca t

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 老鼠引物順序

<400> 14

gattgtccct cttggctctt c

21

五、中文發明摘要：

本發明係關於確認一或多種候選化合物是否為G蛋白偶合受體(GPCR)調節物或血糖濃度調節物之方法。在某些具體實施例中，GPCR係為人類。本發明亦關於使用GPCR調節物之方法。較佳調節物為催動劑。本發明之催動劑可作為治療劑使用，以降低血糖濃度，預防或治療某些代謝病症，譬如胰島素抗藥性、減弱之葡萄糖容許度及糖尿病，及預防或治療高血糖濃度之併發症，譬如動脈粥瘤硬化、心臟疾病、中風、高血壓及末梢血管疾病。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種確認一或多種候選化合物作為 RUP43 GPCR 之調節物之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中受體係偶合至 G 蛋白質；其包括以下步驟：
 - (a) 使候選化合物與受體接觸；與
 - (b) 測定受體功能性是否經調節；其中於受體功能性上之變化係為候選化合物為 RUP43 GPCR 調節物之指標。
2. 如請求項 1 之方法，其中 GPR131 胺基酸順序係選自包括：
 - (a) 順序識別碼：2 之胺基酸順序；
 - (b) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330；
 - (c) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其附帶條件是 RUP43 G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺基酸位置 1 上；
 - (d) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：3 與順序識別碼：4 進行 PCR；
 - (e) 順序識別碼：6 之胺基酸順序；
 - (f) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：7 與順序識別碼：8 進行 PCR；
 - (g) 順序識別碼：2 之胺基酸順序，其中在順序識別碼：2

之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；

(h) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；

(i) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代，其附帶條件是 RUP43 G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺基酸位置 1 上；及

(j) 被多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至順序識別碼：1 之補體。

3. 如請求項 1 或 2 之方法，其中該 RUP43 GPCR 係為重組體。
4. 如請求項 1 或 2 之方法，其中該接觸包括與表現 RUP43 GPCR 之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜接觸，其中該宿主細胞包含表現載體，此載體包含使 RUP43 GPCR 編碼之多核苷酸。
5. 如請求項 1 或 2 之方法，其中該接觸係於 RUP43 GPCR 之已知催動劑存在下進行。
6. 如請求項 5 之方法，其中該接觸係於化合物 1、化合物 2 或化合物 3 存在下進行。
7. 一種在哺乳動物中確認一或多種候選化合物作為血糖濃度調節物之方法，其包括以下步驟：

(a) 使候選化合物與包含 GPR131 胺基酸順序之 GPCR 接觸，其中受體係偶合至 G 蛋白質；與

(b) 測定受體功能性是否經調節；

其中於受體功能性上之變化係為候選化合物為在哺乳動

物中血糖濃度調節物之指標。

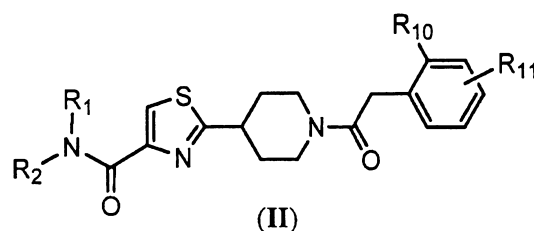
8. 如請求項7之方法，其中GPR131胺基酸順序係選自包括：
- (a) 順序識別碼：2之胺基酸順序；
 - (b) 順序識別碼：2之胺基酸2-330；
 - (c) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其附帶條件是RUP43G蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2之胺基酸位置1上；
 - (d) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類DNA試樣上，使用引物順序識別碼：3與順序識別碼：4進行PCR；
 - (e) 順序識別碼：6之胺基酸順序；
 - (f) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之G蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類DNA試樣上，使用引物順序識別碼：7與順序識別碼：8進行PCR；
 - (g) 順序識別碼：2之胺基酸順序，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代；
 - (h) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代；
 - (i) 順序識別碼：2之胺基酸2-330，其中在順序識別碼：2之胺基酸位置223上之丙胺酸係被離胺酸取代，其附帶條件是RUP43 G蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2之胺基酸位置1上；及

- (j) 被多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至順序識別碼：1 之補體。
9. 如請求項 7 或 8 之方法，其中該 RUP43 GPCR 係為重組體。
10. 如請求項 7 或 8 之方法，其中該接觸包括與表現 RUP43 GPCR 之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜接觸，其中該宿主細胞包含表現載體，此載體包含使 RUP43 GPCR 編碼之多核苷酸。
11. 如請求項 7 或 8 之方法，其中該接觸係於 RUP43 GPCR 之已知催動劑存在下進行。
12. 如請求項 11 之方法，其中該接觸係於化合物 1、化合物 2 及化合物 3 存在下進行。
13. 如請求項 1、2、7 及 8 中任一項之方法，其中受體功能性上之增加係為候選化合物為在哺乳動物中降低血糖濃度之化合物之指標。
14. 如請求項 1、2、7 及 8 中任一項之方法，其中該測定係經過第二信使含量之度量，該第二信使係選自包括環 AMP (cAMP)、環 GMP (cGMP)、肌醇三磷酸鹽 (IP3)、二醯基甘油 (DAG) 及 Ca^{2+} 。
15. 如請求項 14 之方法，其中 cAMP 之胞內含量係被增加。
16. 如請求項 1、2、7 及 8 中任一項之方法，其中該測定係經由利用黑色素細胞檢測，或經過 GTP γ S 結合至包含 RUP43 GPCR 之細胞膜之度量。
17. 一種製造 RUP43 GPCR 調節物之方法，其包括以下步驟：
- (a) 如請求項 1 至 16 中任一項之方法，確認該調節物；

與

(b) 合成(a)中所確認之調節物。

18. 一種如請求項1至16中任一項之方法所確認之調節物。
19. 如請求項18之調節物，其中該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。
20. 如請求項18之調節物，其中該調節物為催動劑。
21. 如請求項20之調節物，其中該催動劑為部份催動劑。
22. 如請求項18之調節物，其中該調節物會增加RUP43 GPCR之功能性。
23. 如請求項18之調節物，其中該調節物會增加cAMP之胞內含量。
24. 如請求項17之方法，其中該調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。
25. 如請求項17之方法，其中該調節物為催動劑。
26. 如請求項25之方法，其中該催動劑為部份催動劑。
27. 如請求項17之方法，其中該調節物會增加RUP43 GPCR之功能性。
28. 如請求項17之方法，其中該調節物會增加cAMP之胞內含量。
29. 一種式(II)化合物：



或其藥學上可接受之鹽，

其中：

R_1 為 H 或 C_{1-6} 烷基；

R_2 為 2-甲基-4,5,6,7-四氫-2H-吡啶-3-基；或

R_1 與 R_2 和彼等所結合之氮一起形成 3,4-二氫-2H-喹啉-1-基；及

R_{10} 與 R_{11} 各獨立為 H 或鹵素。

30. 一種製備醫藥或生理學上可接受組合物之方法，其包括將載劑與 RUP43 GPCR 之調節物互混，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。
31. 一種調節活體外 RUP43 GPCR 之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其包括使該受體與該受體之調節物接觸。
32. 一種 GPR131 GPCR 之催動劑於藥劑製備上之用途，該藥劑係用於降低血糖。
33. 一種 GPR131 GPCR 之催動劑於藥劑製備上之用途，該藥劑係用於預防或治療新陳代謝病症，選自包括：
 - (a) 糖尿病；
 - (b) 減弱之葡萄糖容許度；
 - (c) 胰島素抗藥性；及
 - (d) 胰島素過多。
34. 一種 GPR131 GPCR 之催動劑於藥劑製備上之用途，該藥劑係用於預防或治療高血糖濃度之併發症，選自包括：
 - (a) 徵候簇 X；
 - (b) 動脈粥瘤硬化；
 - (c) 粥瘤疾病；

- (d) 心臟疾病；
 - (e) 高血壓；
 - (f) 中風；
 - (g) 神經病；
 - (h) 視網膜病；
 - (i) 腎病；及
 - (j) 末梢血管疾病。
35. 如請求項 32 至 34 中任一項之用途，其中催動劑為部份催動劑。
36. 一種醫藥或生理學上可接受之組合物，其包含 RUP43 GPCR 之調節物，基本上由其所組成或由其所組成，該受體包含 GPR131 胺基酸順序。
37. 一種醫藥組合物，其包含 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，及藥學上可接受之載劑。
38. 如請求項 37 之醫藥組合物，其中調節物係如請求項 18 至 23 中之任一項。
39. 如請求項 37 之醫藥組合物，其中 RUP43 GPCR 之調節物為 RUP43 GPCR 之催動劑。
40. 如請求項 37 之醫藥組合物，其中調節物係如請求項 29 之化合物。
41. 如請求項 37 之醫藥組合物，其中調節物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。
42. 如請求項 37 至 41 中任一項之醫藥組合物，其中調節物為會增加藉由得自哺乳動物之脂肪細胞之葡萄糖吸收之化合

物。

43. 如請求項 37 至 41 中任一項之醫藥組合物，其中調節物為會增加藉由得自哺乳動物之骨骼肌細胞之葡萄糖吸收之化合物。
44. 一種 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於藉由療法以治療人類或動物身體之方法中。
45. 一種 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於藉由療法以降低人類或動物身體中之血糖濃度之方法中。
46. 一種 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於藉由療法以預防或治療人類或動物身體中之新陳代謝病症之方法中，其中該代謝病症係選自包括
 - (a) 糖尿病；
 - (b) 減弱之葡萄糖容許度；
 - (c) 胰島素抗藥性；及
 - (d) 胰島素過多。
47. 一種 RUP43 GPCR 之調節物，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，供使用於藉由療法以預防或治療人類或動物身體中之高血糖濃度併發症之方法中，其中併發症係選自包括：
 - (a) 徵候簇 X；
 - (b) 動脈粥瘤硬化；
 - (c) 粥瘤疾病；
 - (d) 心臟疾病；
 - (e) 高血壓；

- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

48. 如請求項 44 至 47 中任一項之調節物，其中動物為哺乳動物。
49. 如請求項 44 至 47 中任一項之調節物，其中調節物係如請求項 18 至 23 中之任一項。
50. 如請求項 44 至 47 中任一項之調節物，其中 RUP43 GPCR 之調節物為 RUP43 GPCR 之催動劑。
51. 如請求項 44 至 47 中任一項之調節物，其中調節物係如請求項 29 之化合物。
52. 如請求項 44 至 47 中任一項之調節物，其中調節物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。
53. 如請求項 44 至 47 中任一項之調節物，其中調節物為會增加藉由得自哺乳動物之脂肪細胞之葡萄糖吸收之化合物。
54. 如請求項 44 至 47 中任一項之調節物，其中調節物為會增加藉由得自哺乳動物之骨骼肌細胞之葡萄糖吸收之化合物。
55. 一種 RUP43 GPCR 調節物於藥劑製備上之用途，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，該藥劑係用於降低血糖濃度。
56. 一種 RUP43 GPCR 調節物於藥劑製備上之用途，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，該藥劑係用於預防或治療新陳代謝病症，其中代謝病症係選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

57. 一種 RUP43 GPCR 調節物於藥劑製備上之用途，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，該藥劑係用於預防或治療高血糖濃度之併發症，其中併發症係選自包括

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

58. 如請求項 55 至 57 中任一項之用途，其中調節物係如請求項 18 至 23 中之任一項。

59. 如請求項 55 至 57 中任一項之用途，其中 RUP43 GPCR 之調節物為 RUP43 GPCR 之催動劑。

60. 如請求項 55 至 57 中任一項之用途，其中調節物為如請求項 29 之化合物。

61. 如請求項 55 至 57 中任一項之用途，其中調節物為化合物

1、化合物2或化合物3。

62. 如請求項55至57中任一項之用途，其中調節物為會增加藉由得自哺乳動物之脂肪細胞之葡萄糖吸收之化合物。

63. 如請求項55至57中任一項之用途，其中調節物為會增加藉由得自哺乳動物之骨骼肌細胞之葡萄糖吸收之化合物。

64. 如請求項56之用途，其中代謝病症為糖尿病。

65. 如請求項56之用途，其中代謝病症為減弱之葡萄糖容許度。

66. 如請求項56之用途，其中代謝病症為胰島素抗藥性。

67. 如請求項56之用途，其中代謝病症為胰島素過多。

68. 一種調節RUP43 GPCR活體外活性之方法，該受體包含GPR131胺基酸順序，其包括以下步驟：

(a) 如請求項1至16中任一項之方法，確認受體之調節物；與

(b) 使該受體與(a)中確認之調節物接觸。

69. 一種製備醫藥或生理學上可接受組合物之方法，其包括以下步驟：

(a) 如請求項1至16中任一項之方法，確認RUP43 GPCR之調節物，該受體包含GPR131胺基酸順序；與

(b) 使載劑與(a)中確認之調節物互混。

70. 如請求項55之用途，其中調節物係如請求項1至16中任一項之方法經確認。

71. 如請求項56之用途，其中調節物係如請求項1至16中任一項之方法經確認。

72. 如請求項 57 之用途，其中調節物係如請求項 1 至 16 中任一項之方法經確認。
73. 如請求項 70 至 72 中任一項之用途，其中調節物係如請求項 19 至 22 中之任一項。
74. 如請求項 70 至 72 中任一項之用途，其中調節物係如請求項 29 之化合物。
75. 如請求項 70 至 72 中任一項之用途，其中調節物為會增加藉由得自哺乳動物之脂肪細胞之葡萄糖吸收之化合物。
76. 如請求項 70 至 72 中任一項之用途，其中調節物為會增加藉由得自哺乳動物之骨骼肌細胞之葡萄糖吸收之化合物。
77. 一種製備醫藥組合物之方法，其包括使如請求項 29 之化合物與藥學上可接受之載劑互混。
78. 如請求項 77 之方法，其中化合物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。
79. 一種醫藥組合物，其包含如請求項 29 之化合物及藥學上可接受之載劑。
80. 如請求項 79 之醫藥組合物，其中化合物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。
81. 一種調節活體外 RUP43 GPCR 之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其包括使該受體與如請求項 29 之化合物或與如請求項 79 或 80 之醫藥組合物接觸。
82. 一種如請求項 29 之化合物於藥劑製備上之用途，該藥劑係調節 RUP43 GPCR 之活性，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中該調節係為降低血糖濃度。

83. 一種如請求項 29 之化合物於藥劑製備上之用途，該藥劑係調節 RUP43 GPCR 之活性，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中該調節係為預防或治療新陳代謝病症，選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

84. 一種如請求項 29 之化合物於藥劑製備上之用途，該藥劑係調節 RUP43 GPCR，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其中該調節係為預防或治療高血糖濃度之併發症，其中併發症係選自包括：

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

85. 一種如請求項 29 之化合物於藥劑製備上之用途，該藥劑係用於降低血糖濃度。

86. 一種如請求項 29 之化合物於藥劑製備上之用途，該藥劑係

用於預防或治療新陳代謝病症，選自包括：

- (a) 糖尿病；
- (b) 減弱之葡萄糖容許度；
- (c) 胰島素抗藥性；及
- (d) 胰島素過多。

87. 一種如請求項 29 之化合物於藥劑製備上之用途，該藥劑係用於預防或治療高血糖濃度之併發症，其中併發症係選自包括

- (a) 徵候簇 X；
- (b) 動脈粥瘤硬化；
- (c) 粥瘤疾病；
- (d) 心臟疾病；
- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

88. 如請求項 81 之方法，其中化合物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。

89. 如請求項 81 之方法，其中化合物會增加藉由得自哺乳動物之脂肪細胞之葡萄糖吸收。

90. 如請求項 81 之方法，其中化合物會增加藉由得自哺乳動物之骨骼肌細胞之葡萄糖吸收。

91. 請求項 82 至 87 中任一項之用途，其中化合物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。
92. 請求項 82 至 87 中任一項之用途，其中化合物會增加藉由得自哺乳動物之脂肪細胞之葡萄糖吸收。
93. 請求項 82 至 87 中任一項之用途，其中化合物會增加藉由得自哺乳動物之骨骼肌細胞之葡萄糖吸收。
94. 如請求項 29 之化合物，其係使用於藉由療法以治療人類或動物身體之方法中。
95. 如請求項 29 之化合物，其係使用於藉由療法以降低人類或動物身體中之血糖濃度之方法中。
96. 如請求項 29 之化合物，其係使用於藉由療法以預防或治療人類或動物身體中之新陳代謝病症之方法中，其中代謝病症係選自包括：
- (a) 糖尿病；
 - (b) 減弱之葡萄糖容許度；
 - (c) 胰島素抗藥性；及
 - (d) 胰島素過多。
97. 如請求項 29 之化合物，其係使用於藉由療法以預防或治療人類或動物身體中之高血糖濃度併發症之方法中，其中併發症係選自包括：
- (a) 徵候簇 X；
 - (b) 動脈粥瘤硬化；
 - (c) 粥瘤疾病；
 - (d) 心臟疾病；

- (e) 高血壓；
- (f) 中風；
- (g) 神經病；
- (h) 視網膜病；
- (i) 腎病；及
- (j) 末梢血管疾病。

98. 如請求項 94 至 97 中任一項之化合物，其中化合物為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。

99. 如請求項 94 至 97 中任一項之化合物，其中動物為哺乳動物。

100. 一種確認一或多種候選化合物作為結合至 RUP43 GPCR 之化合物之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其包括以下步驟：

(a) 使該受體與該受體之可偵測地經標識之已知配位體，於候選化合物存在或不存在下接觸；與

(b) 測定該經標識已知配位體之結合至受體是否於候選化合物存在下被抑制；

其中該抑制係為候選化合物為結合至 RUP43 GPCR 之化合物之指標。

101. 如請求項 100 之方法，其中 GPR131 胺基酸順序係選自包括：

(a) 順序識別碼：2 之胺基酸順序；

(b) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330；

(c) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其附帶條件是 RUP43G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺

氨基酸位置 1 上；

- (d) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：3 與順序識別碼：4 進行 PCR；
- (e) 順序識別碼：6 之胺基酸順序；
- (f) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：7 與順序識別碼：8 進行 PCR；
- (g) 順序識別碼：2 之胺基酸順序，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (h) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；
- (i) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代，其附帶條件是 RUP43 G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺基酸位置 1 上；及
- (j) 被多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至順序識別碼：1 之補體。

102. 如請求項 100 或 101 之方法，其中該接觸包括與表現 GPCR 之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜接觸。

103. 如請求項 102 之方法，其中該宿主細胞包含表現載體，此載體包含使該受體編碼之多核苷酸。

- 104.如請求項 100 或 101 之方法，其中已知配位體為化合物 1、化合物 2 或化合物 3。
- 105.一種偵測會結合至 RUP43 GPCR 之配位體之方法，該受體包含 GPR131 胺基酸順序，其包括以下步驟：
- (a) 使待測配位體與表現該受體之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜，在允許該受體與該待測配位體間之交互作用之條件下接觸；與
 - (b) 偵測經結合至該受體之配位體。
- 106.如請求項 105 之方法，其中 GPR131 胺基酸順序係選自包括：
- (a) 順序識別碼：2 之胺基酸順序；
 - (b) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330；
 - (c) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其附帶條件是 RUP43 G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺基酸位置 1 上；
 - (d) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：3 與順序識別碼：4 進行 PCR；
 - (e) 順序識別碼：6 之胺基酸順序；
 - (f) 被包含核酸順序之多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，該核酸順序可藉由一種程序獲得，其包括在人類 DNA 試樣上，使用引物順序識別碼：7 與順序識別碼：8 進行 PCR；
 - (g) 順序識別碼：2 之胺基酸順序，其中在順序識別碼：2

之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；

(h) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代；

(i) 順序識別碼：2 之胺基酸 2-330，其中在順序識別碼：2 之胺基酸位置 223 上之丙胺酸係被離胺酸取代，其附帶條件是 RUP43 G 蛋白偶合受體未包含甲硫胺酸殘基在順序識別碼：2 之胺基酸位置 1 上；及

(j) 被多核苷酸編碼之 G 蛋白偶合受體之胺基酸順序，其係在嚴厲條件下雜化至順序識別碼：1 之補體。

107. 如請求項 105 或 106 之方法，其中該接觸包括與表現 GPCR 之宿主細胞或與宿主細胞之細胞膜接觸。

108. 如請求項 107 之方法，其中該宿主細胞包含表現載體，此載體包含使該受體編碼之多核苷酸。

109. 如請求項 100、101、105 及 106 中任一項之方法，其中經確認或偵測之配位體系為如請求項 1、2、7 及 8 中任一項之 RUP43 GPCR 之調節物。

110. 如請求項 109 之方法，其中調節物係選自包括催動劑、部份催動劑、逆催動劑及拮抗劑。

111. 如請求項 109 之方法，其中調節物為催動劑。

112. 如請求項 111 之方法，其中催動劑為部份催動劑。

十一、圖式：

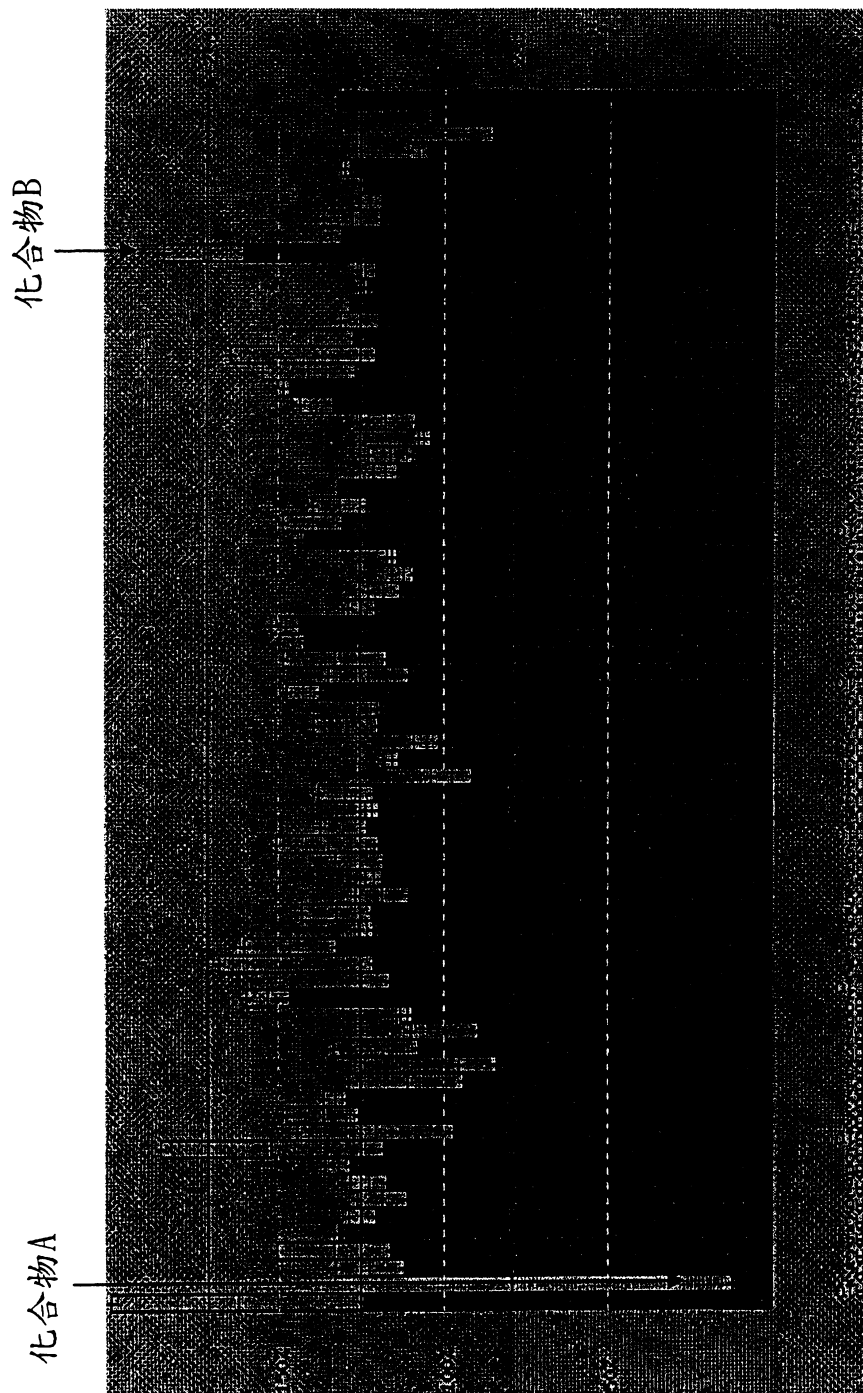
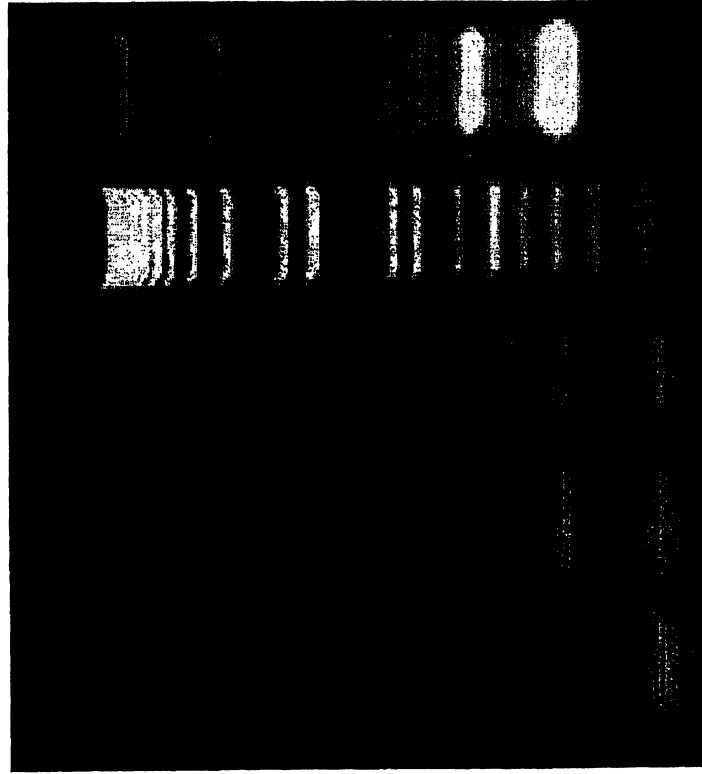


圖1

圖2A 在初生人類脂肪細胞中之RUP43表現

1 2 3 4 5



1. 前脂肪細胞
2. 脂肪細胞
(Biowhittaker)
3. 脂肪細胞
(Zen Bio)
4. DNA MW 梯狀物
5. pRUP43

圖2B 在人類脂肪組織中之RUP43表現

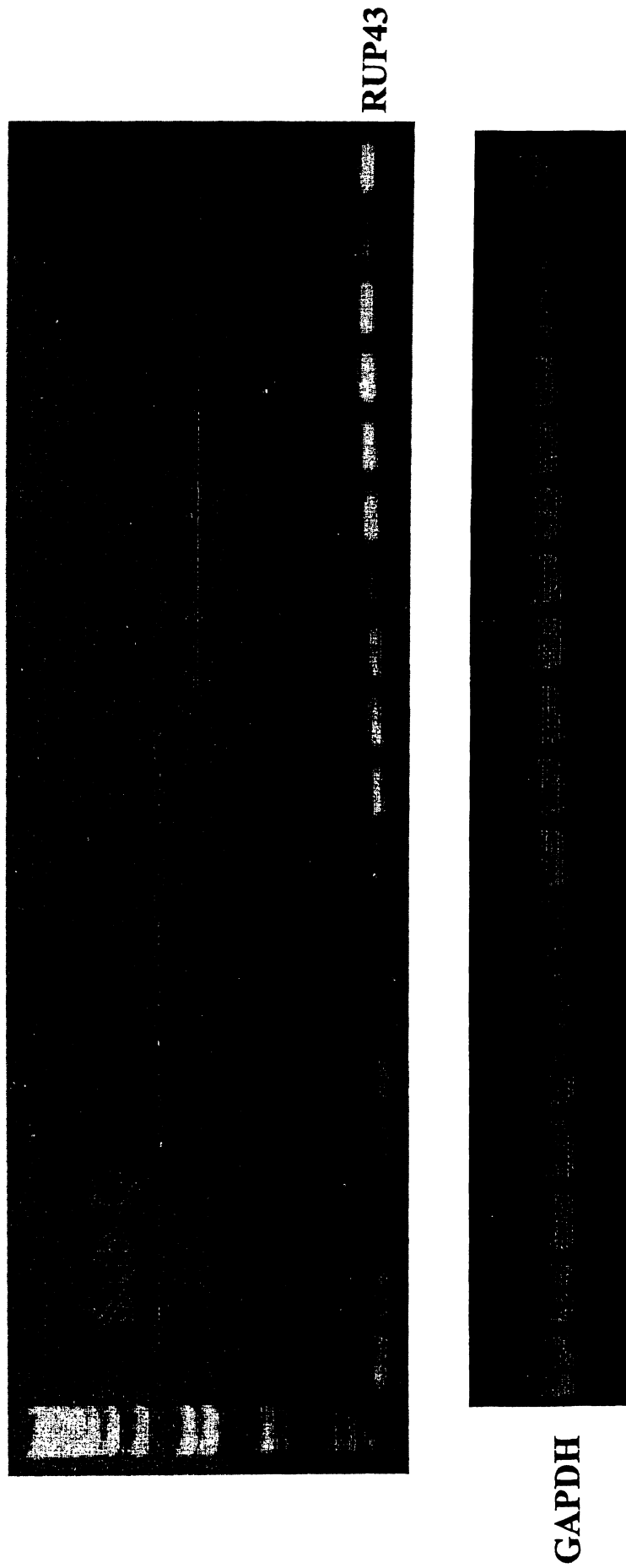
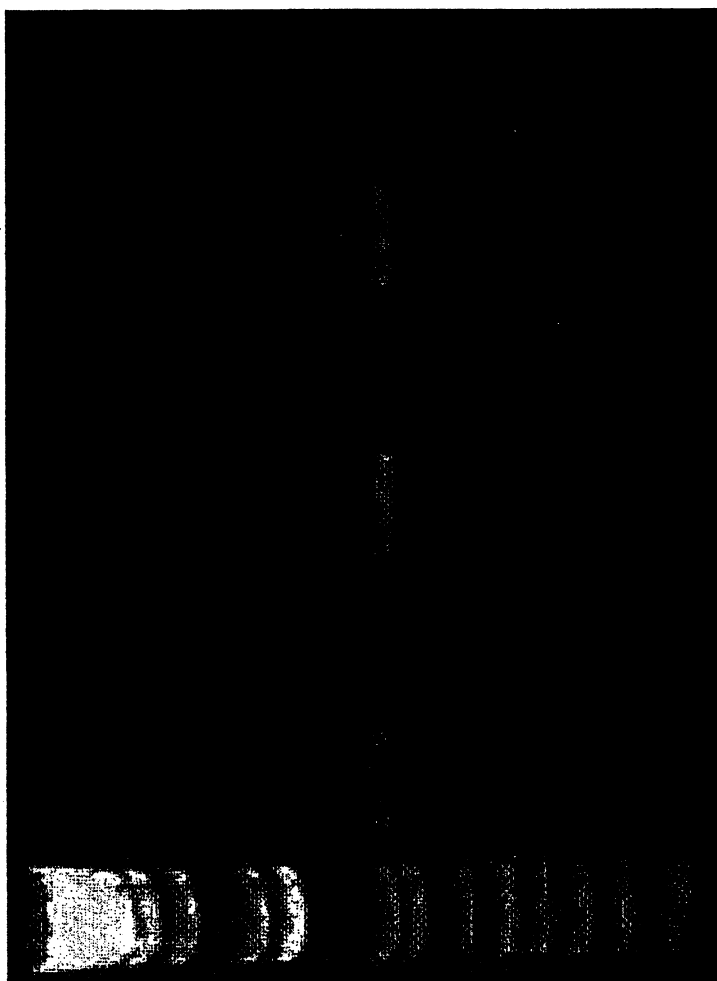


圖2C 在老鼠3T3L1脂肪細胞與骨骼肌細胞中 之RUP43表現

1 2 3 4 5 6 7

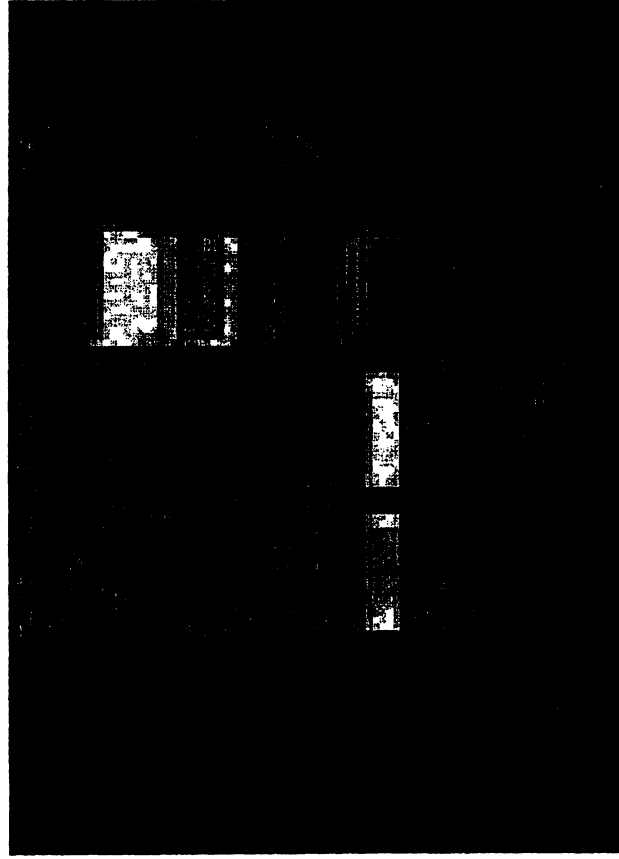


1. DNA MW 梯狀物
2. 未經分化 3T3L1 +
3. 未經分化 3T3L1 -
4. 經分化 3T3L1 +
5. 經分化 3T3L1 -
6. 老鼠骨骼肌 +
7. 老鼠骨骼肌 -

+ : 使用反轉錄酶
- : 未使用反轉錄酶

圖2D
在人類骨骼肌細胞中之RUP43表現

1 2 3



RUP43

通道1: 人類骨骼肌
通道2: 人類脂肪細胞
通道3: DNA MW 梯狀物

圖3

CAMP在經轉染293細胞中之RUP43刺激

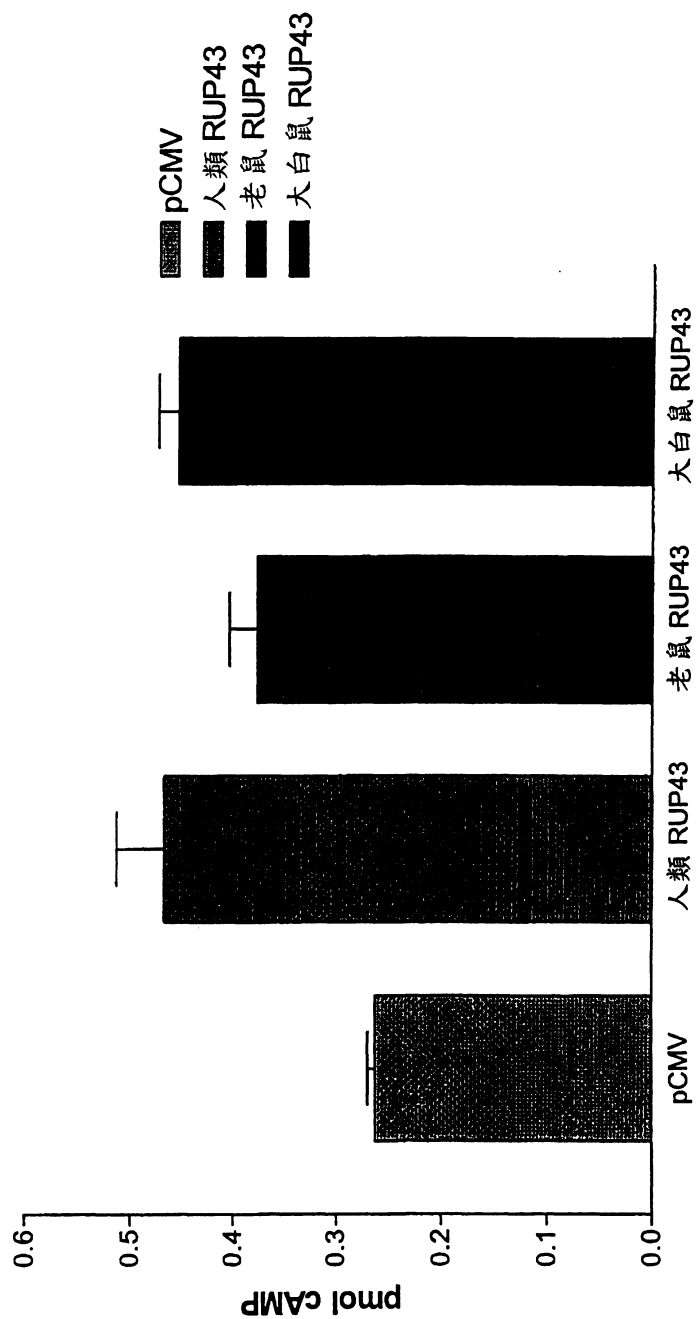
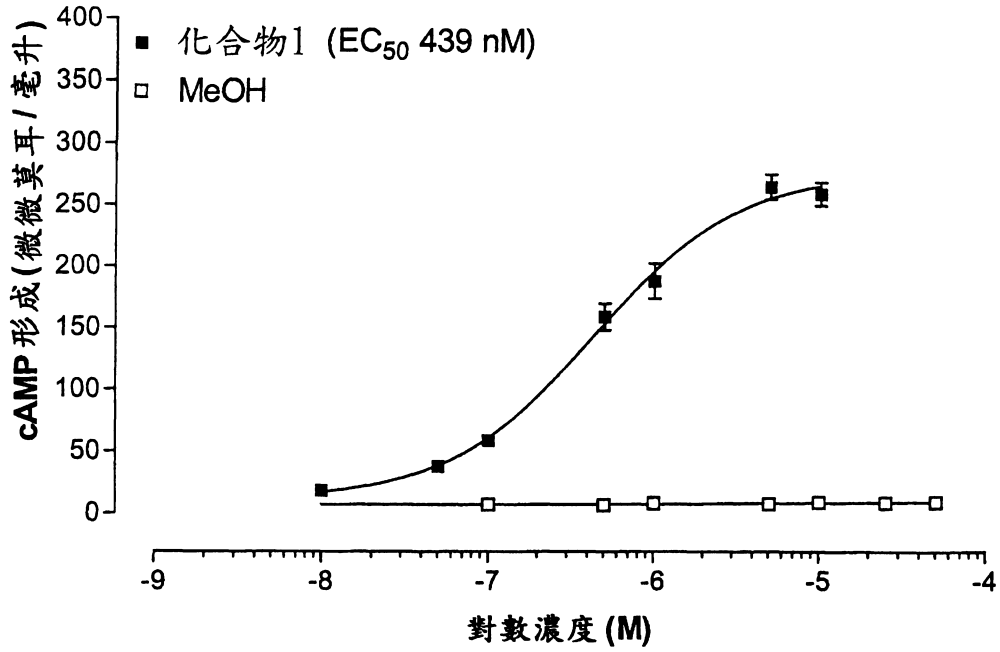
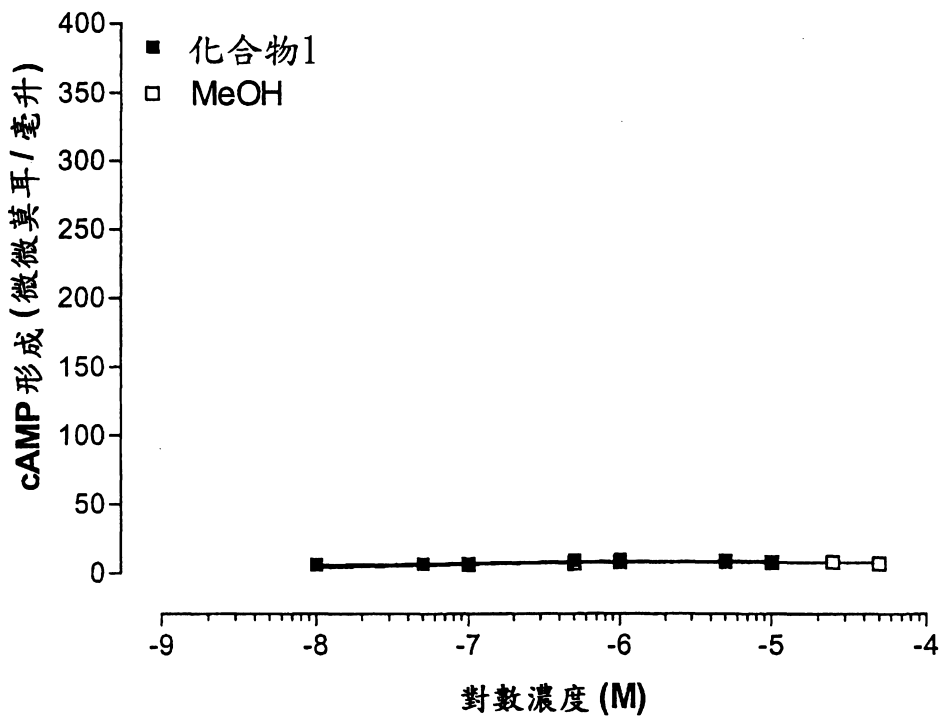


圖 4

經轉染HEK細胞



假轉染HEK細胞



● ●
圖5 對於RUP43之化合物2劑量回應

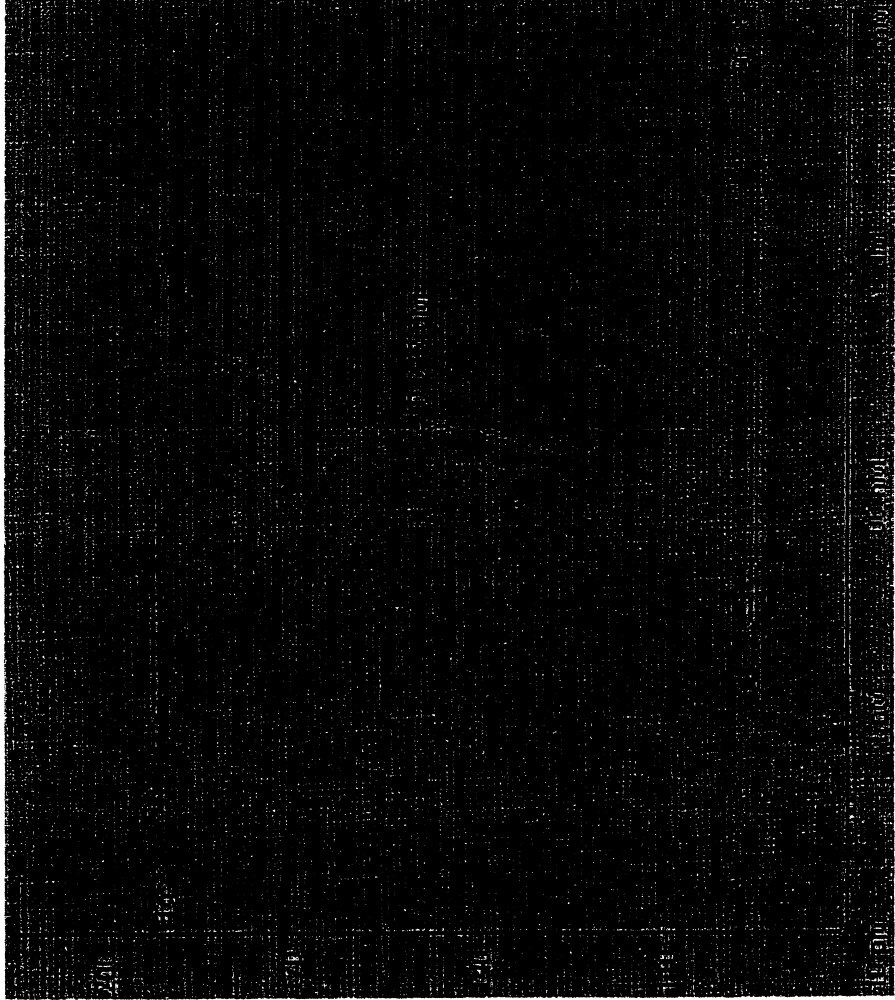


圖6 在3T3-L-1細胞中化合物2
對於葡萄糖吸收之時間過程

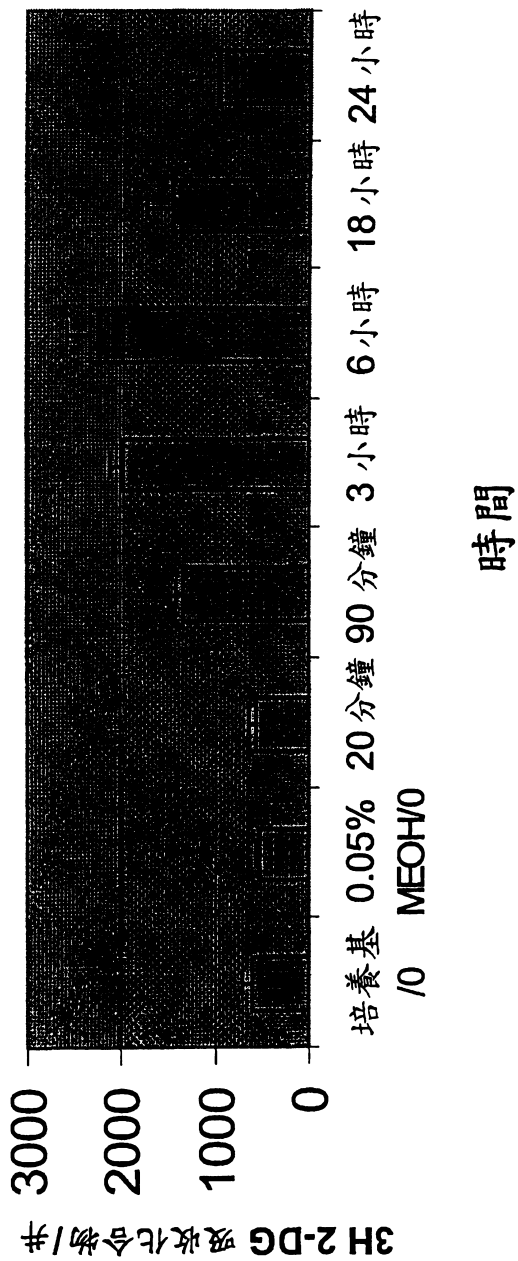


圖7 在3T3-L-1脂肪細胞中化合物2提高胰島素-
刺激之葡萄糖吸收

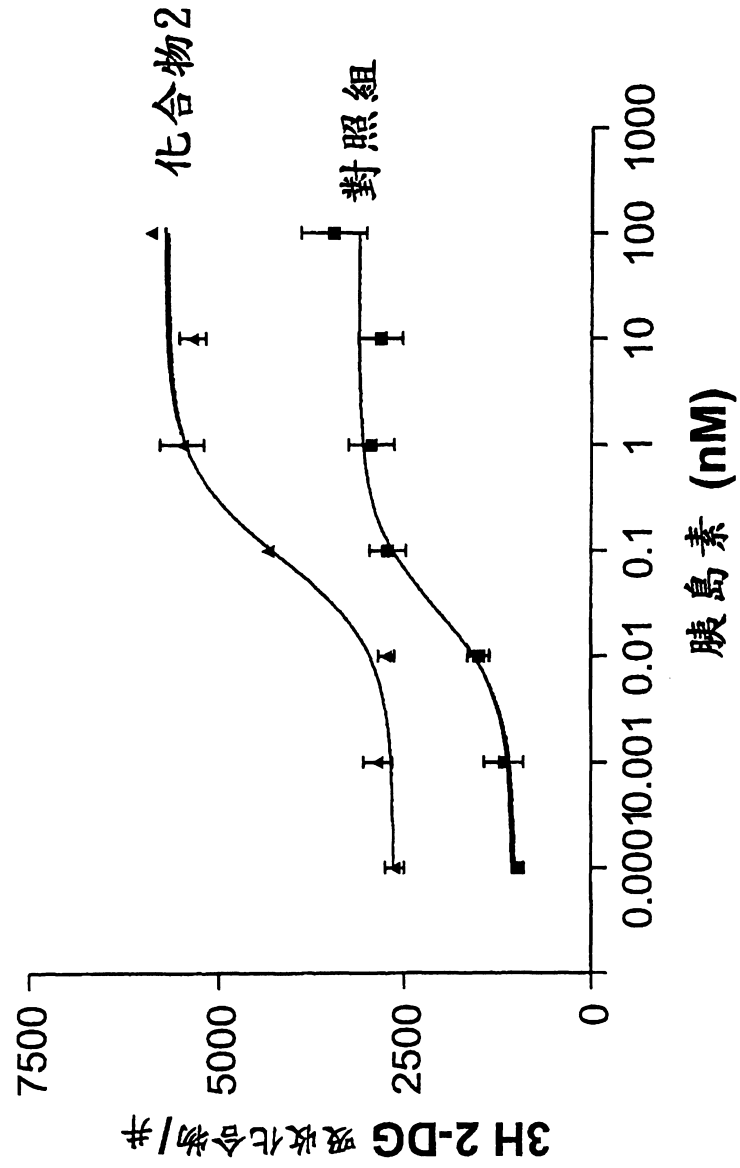


圖8 在初生人類脂肪細胞中化合物2
提高胰島素-刺激之葡萄糖吸收

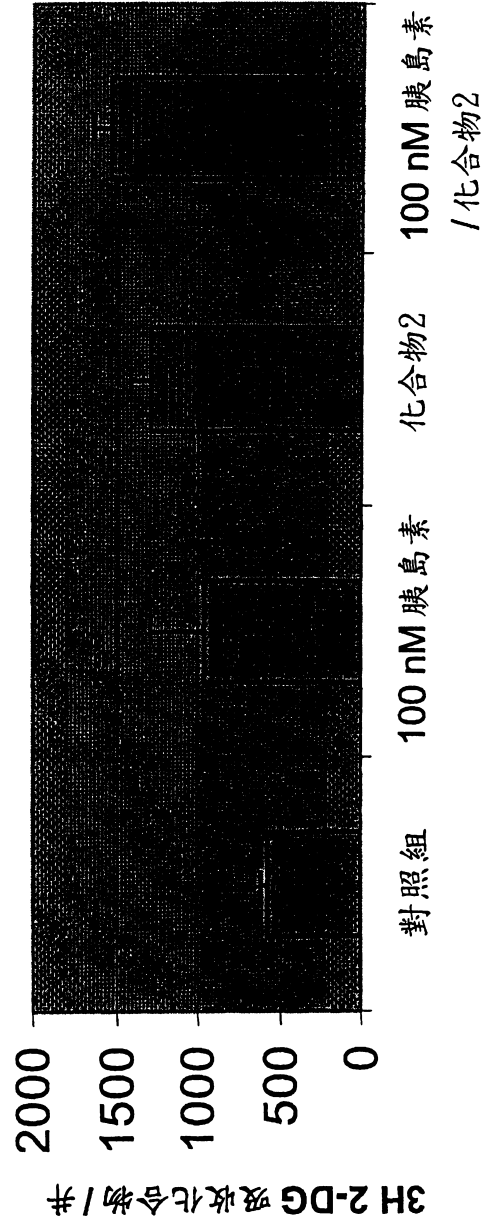


圖9A 在L6肌胚細胞中化合物2
對於葡萄糖吸收之劑量回應

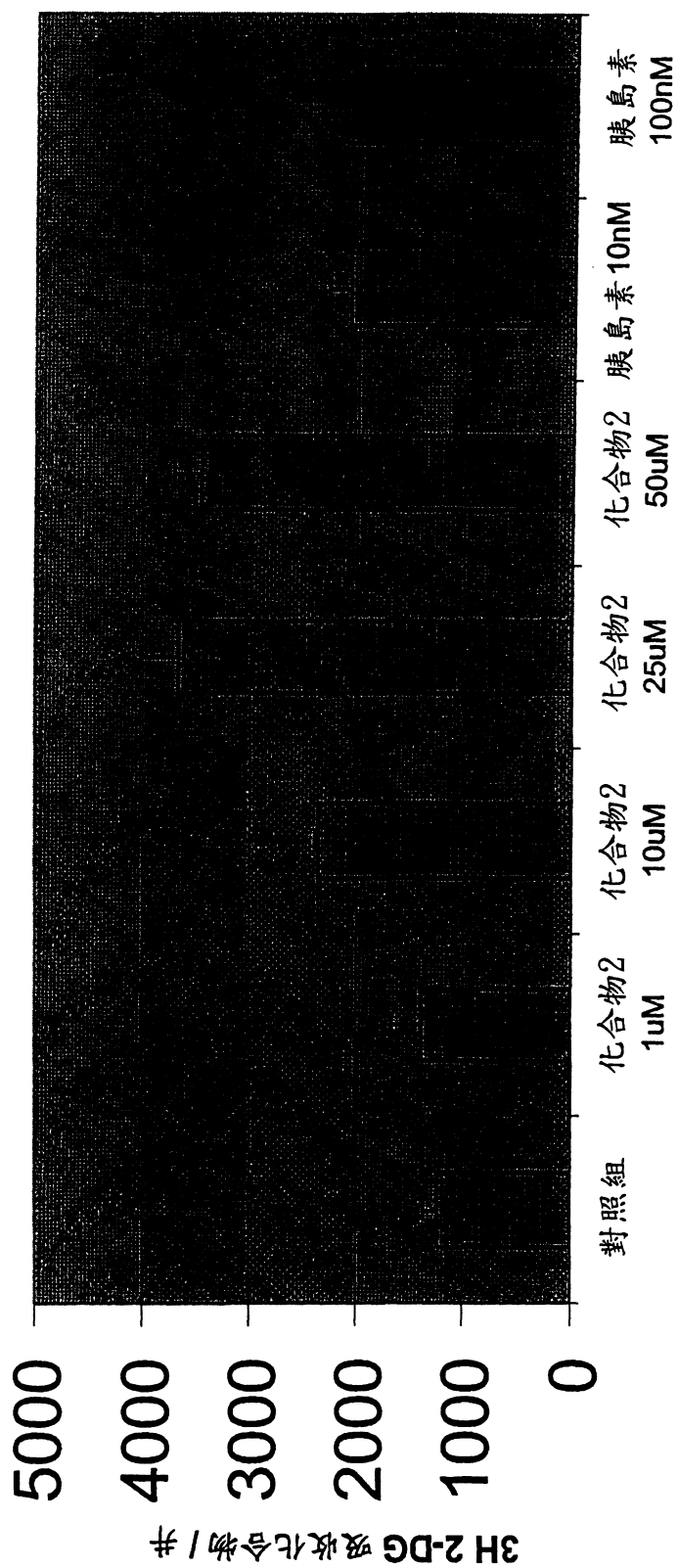


圖9B 在L6肌胚細胞中化合物2對於葡萄糖
吸收之時間過程

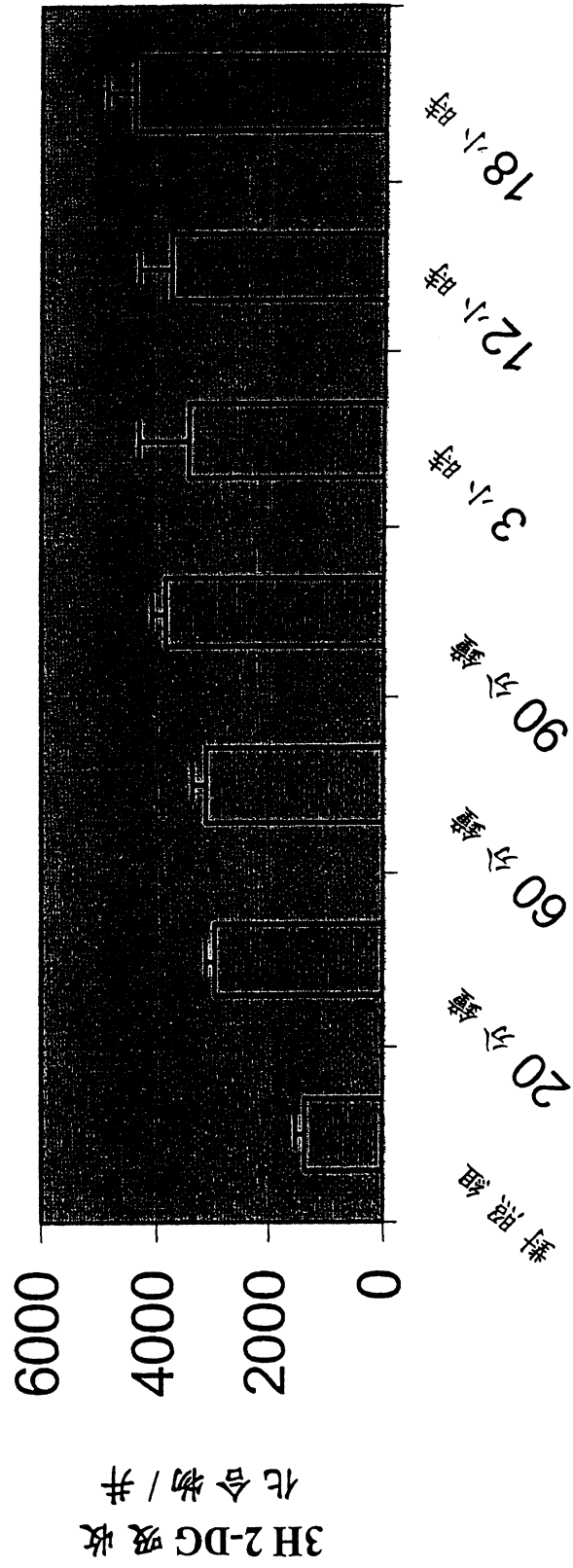


圖10 在L6肌胚細胞中化合物2
提高胰島素-刺激葡萄糖吸收

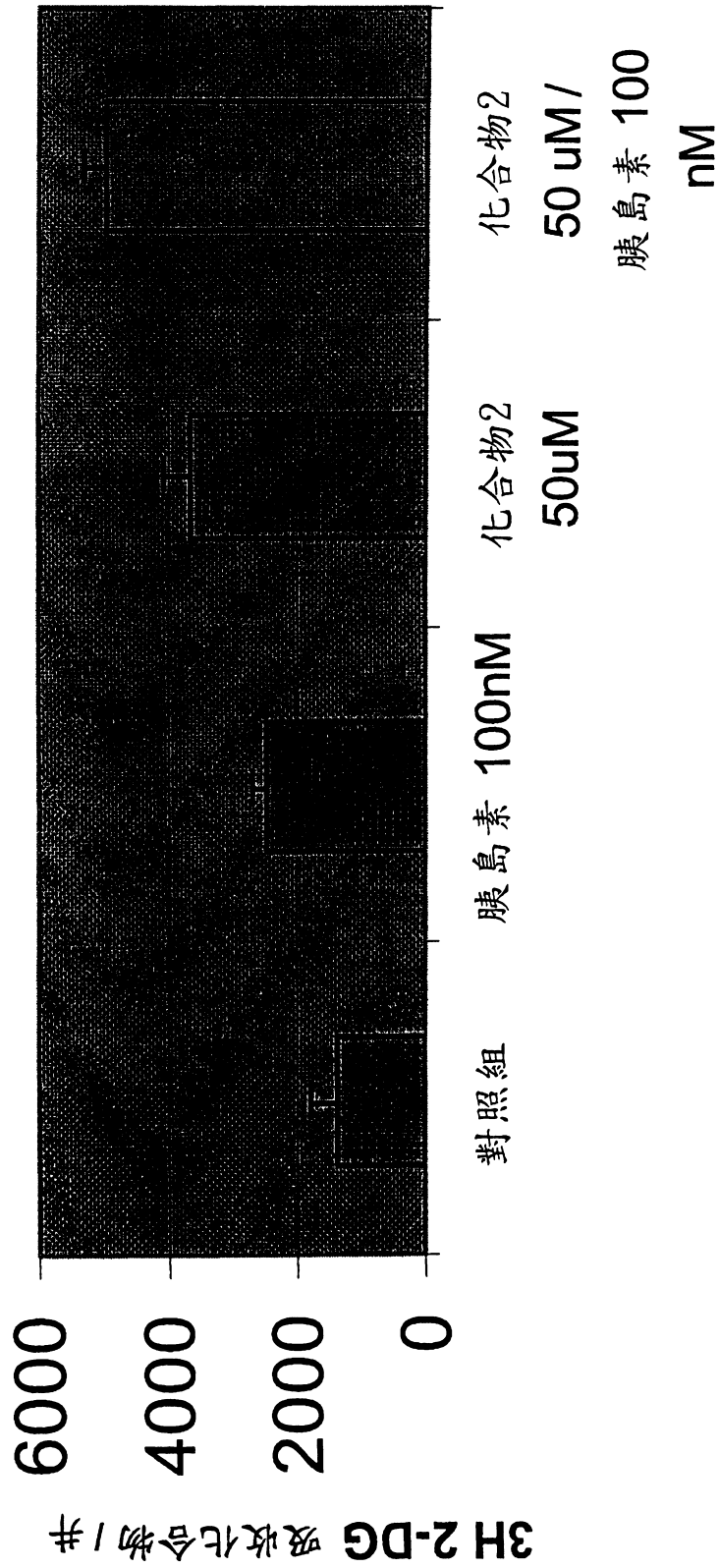


圖11A 在經分化人類骨骼肌細胞中化合物2
對於葡萄糖吸收之劑量回應

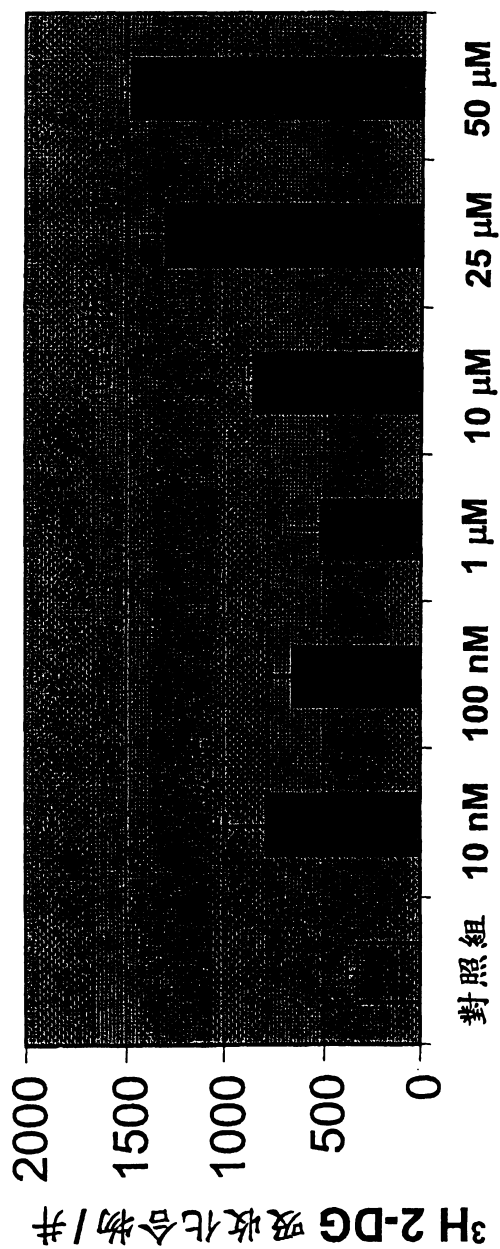
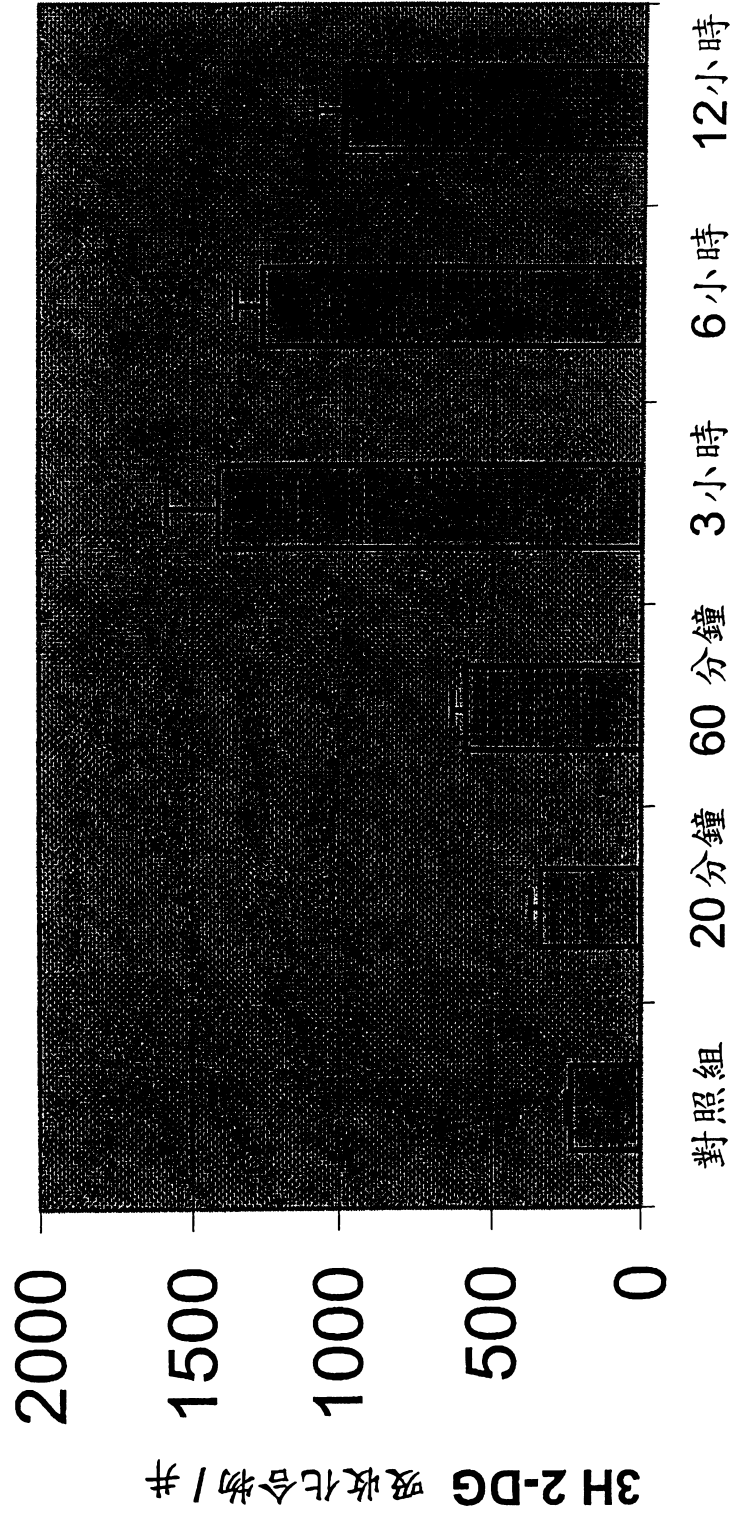


圖11B 在經分化人類骨骼肌細胞中化合物2
對於葡萄糖吸收之時間過程



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

