

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-532135

(P2007-532135A)

(43) 公表日 平成19年11月15日(2007. 11. 15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 2 4
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 6 3
C O 7 D 417/14 (2006.01)	C O 7 D 417/14 C S P	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 147 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-508478 (P2007-508478)
 (86) (22) 出願日 平成17年4月12日 (2005. 4. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年11月17日 (2006. 11. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/012447
 (87) 国際公開番号 W02005/116653
 (87) 国際公開日 平成17年12月8日 (2005. 12. 8)
 (31) 優先権主張番号 60/561, 954
 (32) 優先日 平成16年4月13日 (2004. 4. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

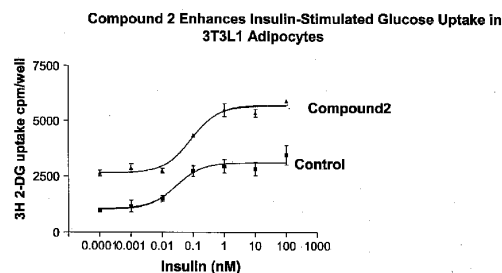
(71) 出願人 504381423
 アリーナ ファーマシューティカルズ,
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 21, サン ディエゴ, ナンシー リ
 ッジ ドライブ 6166
 (74) 代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72) 発明者
 キュー, ジュン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 26, サンディエゴ, カミニト アル
 バレス 10558

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高血糖症および関連障害の処置のための、ヒトGタンパク質共役レセプターおよびそのモジュレーター

(57) 【要約】

本発明は、1以上の候補化合物がGタンパク質共役レセプター (GPCR) のモジュレーターか血中グルコース濃度のモジュレーターか否かを同定する方法に関する。特定の実施形態では、このGPCRはヒトのGPCRである。本発明はまた、このGPCRのモジュレーターを用いる方法に関する。好ましいモジュレーターはアゴニストである。本発明のアゴニストは、血中グルコース濃度を低下させるための治療剤、特定の代謝障害（例えば、インスリン抵抗性、グルコース寛容減損、および糖尿病）を予防または処置するための治療剤、および上昇した血中グルコース濃度の合併症（例えば、アテローム性動脈硬化症、心臓病、発作、高血圧症および末梢血管疾患）を予防または処置するための治療剤として有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 以上の候補化合物を R U P 4 3 G P C R のモジュレーターと同定する方法であって、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該レセプターは、G タンパク質と共役し；該方法は、工程：

(a) 候補化合物を該レセプターと接触させる工程；および

(b) 該レセプターの機能性が調節されるか否かを決定する工程；

を包含し、ここで、レセプターの機能性における変化は、該候補化合物が R U P 4 3 G P C R のモジュレーターであることを示す、方法。

【請求項 2】

前記 G P R 1 3 1 アミノ酸配列が：

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；

(c) 前記 R U P 4 3 G タンパク質共役レセプターが配列番号 2 のアミノ酸 1 位のメチオニン残基を含まない、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；

(d) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、該核酸配列は、ヒト D N A サンプルについて、配列番号 3 のプライマーおよび配列番号 4 のプライマーを用いて P C R を行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；

(e) 配列番号 6 のアミノ酸配列；

(f) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、該核酸配列は、ヒト D N A サンプルについて、配列番号 7 のプライマーおよび配列番号 8 のプライマーを用いて P C R を行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；

(g) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号 2 のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；

(i) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されており、ただし、前記 R U P 4 3 G タンパク質共役レセプターが配列番号 2 のアミノ酸 1 位のメチオニン残基を含まない、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；および

(j) ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 R U P 4 3 G P C R が組換え体である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記接触させる工程が、前記 R U P 4 3 G P C R を発現する宿主細胞または前記 R U P 4 3 G P C R を発現する宿主細胞の膜と接触させることを含み、該宿主細胞は、該 R U P 4 3 G P C R をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記接触させる工程が、前記 R U P 4 3 G P C R の公知のアゴニストの存在下で実施される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記接触させる工程が、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 の存在下で実施される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

1 以上の候補化合物を哺乳動物における血中グルコース濃度のモジュレーターと同定する方法であって、工程：

10

20

30

40

50

(a) 候補化合物を、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含む G P C R と接触させる工程であって、ここで該レセプターが G タンパク質と共役する、工程；および

(b) 該レセプターの機能性が調節されるか否かを決定する工程；
を包含し、ここで、レセプターの機能性における変化は、該候補化合物が、哺乳動物における血中グルコース濃度のモジュレーターであることを示す、方法。

【請求項 8】

前記 G P R 1 3 1 アミノ酸配列が：

(a) 配列番号 2 のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；

(c) 前記 R U P 4 3 G タンパク質共役レセプターが配列番号 2 のアミノ酸 1 位のメチオニン残基を含まない、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ； 10

(d) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、該核酸配列は、ヒト D N A サンプルについて、配列番号 3 のプライマーおよび配列番号 4 のプライマーを用いて P C R を行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；

(e) 配列番号 6 のアミノ酸配列；

(f) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、該核酸配列は、ヒト D N A サンプルについて、配列番号 7 のプライマーおよび配列番号 8 のプライマーを用いて P C R を行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列； 20

(g) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号 2 のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；

(i) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されており、ただし、前記 R U P 4 3 G タンパク質共役レセプターが配列番号 2 のアミノ酸 1 位のメチオニン残基を含まない、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；および

(j) ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列からなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記 R U P 4 3 G P C R が組換え体である、請求項 7 または請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記接触させる工程が、前記 R U P 4 3 G P C R を発現する宿主細胞または前記 R U P 4 3 G P C R を発現する宿主細胞の膜と接触させることを含み、該宿主細胞は、該 R U P 4 3 G P C R をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、請求項 7 ~ 請求項 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記接触させる工程が、前記 R U P 4 3 G P C R の公知のアゴニストの存在下で実施される、請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 12】

前記接触させる工程が、化合物 1、化合物 2、および化合物 3 の存在下で実施される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

レセプター機能性の上昇は、前記候補化合物が、哺乳動物における血中グルコース濃度を低下させる化合物であることを示す、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記決定する工程が、サイクリック A M P (c A M P)、サイクリック G M P (c G M P)、イソシトール (i s o s i t o l) 三リン酸 (I P 3)、ジアシルグリセロール (D A G) および C a ²⁺ からなる群より選択されるセカンドメッセンジャーのレベルの測 50

定を通してである、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

cAMP の細胞内レベルが上昇している、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記決定する工程が、メラニン保有細胞アッセイの使用を通して、または前記 RUP43 GPCR を含む膜への GTPγS 結合の測定を通してである、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

RUP43 GPCR のモジュレーターを作製するためのプロセスであって、工程：

(a) 請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法に従って該モジュレーターを同定する工程；および

(b) (a) において同定されたモジュレーターを合成する工程を包含する、プロセス。

【請求項 18】

請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法によって同定された、モジュレーター。

【請求項 19】

前記モジュレーターが、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストおよびアンタゴニストからなる群より選択される、請求項 18 に記載のモジュレーターまたは請求項 17 に記載のプロセス。

【請求項 20】

前記モジュレーターがアゴニストである、請求項 18 に記載のモジュレーターまたは請求項 17 に記載のプロセス。

【請求項 21】

前記アゴニストが部分アゴニストである、請求項 20 に記載のアゴニスト。

【請求項 22】

前記モジュレーターが、前記 RUP43 GPCR の機能性を上昇させる、請求項 18 に記載のモジュレーターまたは請求項 17 に記載のプロセス。

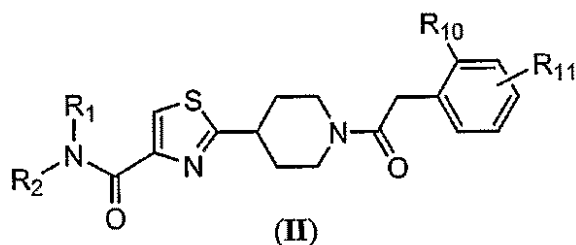
【請求項 23】

前記モジュレーターが、cAMP の細胞内レベルを上昇させる、請求項 18 に記載のモジュレーターまたは請求項 17 に記載のプロセス。

【請求項 24】

式 (II)

【化 1】



の化合物またはその薬学的に受容可能な塩であって、ここで、：

R₁ は、H または C₁ - 6 アルキルであり；

R₂ は、2-メチル-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル基である；または

R₁ および R₂ は、それらが結合する窒素と一緒にあって、3, 4-ジヒドロ-2H-キノリン-1-イル基を形成し；そして

R₁₀ および R₁₁ は、各々独立して、H またはハロゲンである、化合物またはその薬学的に受容可能な塩。

【請求項 25】

薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を調製する方法であって、

キャリアとRUP43 GPCRのモジュレーターを混合する工程を包含し、該レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む、方法。

【請求項26】

RUP43 GPCRを調節する方法であって、該レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、該方法は、該レセプターと該レセプターのモジュレーターとを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項27】

RUP43 GPCRを調節する方法であって、該レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、該調節は、血中グルコース濃度の低下を必要とする哺乳動物における血中グルコース濃度を低下させるためであり、該方法は、該レセプターを該レセプターの治療有効量のモジュレーターと接触させる工程を包含する、方法。 10

【請求項28】

RUP43 GPCRを調節する方法であって、該レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、該調節は、代謝障害の予防または処置を必要とする哺乳動物における代謝障害を予防または処置するためであり、該方法は、該レセプターを、治療有効量の該レセプターのモジュレーターと接触させる工程を包含し、該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。 20

【請求項29】

RUP43 GPCRを調節する方法であって、該レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、該調節は、上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする哺乳動物における上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するためであり、該方法は、該レセプターを、治療有効量の該レセプターのモジュレーターと接触させる工程を包含し、該合併症は、以下：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、方法。 30

【請求項30】

血中グルコース濃度の低下を必要とする哺乳動物における血中グルコース濃度の低下方法であって、該方法は、治療有効量のRUP43 GPCRのモジュレーターを該レセプターと接触させる工程を包含し、該レセプターが、GPR131アミノ酸配列を含む、方法。 40

【請求項31】

代謝障害を予防または処置する必要のある哺乳動物における代謝障害を予防または処置する方法であって、該方法は、治療有効量のRUP43 GPCRのモジュレーターを該レセプターと接触させる工程を包含し、該レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；

- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。

【請求項 3 2】

上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする哺乳動物における上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法であって、該方法は、治療有効量の R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを該レセプターと接触させる工程を包含し、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該合併症は、以下：

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

10

からなる群より選択される、方法。

【請求項 3 3】

20

哺乳動物における血中グルコースを低下させる方法であって、該方法は、該低下を必要とする哺乳動物に R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを提供または投与する工程を包含し、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 3 4】

代謝障害を予防または処置する方法であって、該方法は、該予防または処置を必要とする哺乳動物に R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを提供または投与する工程を包含し、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

30

からなる群より選択される、方法。

【請求項 3 5】

上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法であって、該方法は、該予防または処置を必要とする哺乳動物に R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを提供または投与する工程を包含し、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該合併症は、以下：

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

40

からなる群より選択される、方法。

【請求項 3 6】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 2 7 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 37】

前記モジュレーターが、請求項 18～23 のいずれか 1 項による、請求項 27～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

前記 RUP43 GPCR のモジュレーターが、該 RUP43 GPCR のアゴニストである、請求項 27～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

前記モジュレーターが、請求項 24 に記載の化合物である、請求項 27～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

前記モジュレーターが、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 27～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 27～40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 27～40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

哺乳動物における血中グルコースを低下させる方法であって、該方法は、該低下を必要とする哺乳動物に GPR131 GPCR のアゴニストを提供または投与する工程を包含する、方法。

【請求項 44】

代謝障害を予防または処置する方法であって、該方法は、該予防または処置を必要とする哺乳動物に GPR131 GPCR のアゴニストを提供または投与する工程を包含し、該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。

【請求項 45】

前記代謝障害が糖尿病である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 46】

前記代謝障害がグルコース寛容減損である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 47】

前記代謝障害がインスリン抵抗性である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 48】

前記代謝障害が高インスリン血症である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 49】

上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法であって、該方法は、該予防または処置を必要とする哺乳動物に GPR131 GPCR のアゴニストを提供または投与する工程を包含し、該合併症は、以下：

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；

10

20

30

40

50

- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、方法。

【請求項 50】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 27～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物であって、該組成物は、RUP43 GPCR のモジュレーターを含むか、RUP43 GPCR のモジュレーターから本質的になるか、または RUP43 GPCR のモジュレーターからなり、該レセプターは、GPR131 アミノ酸配列を含む、組成物。 10

【請求項 52】

RUP43 GPCR のモジュレーターを含む薬学的組成物であって、該レセプターは、GPR131 アミノ酸配列および薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。

【請求項 53】

前記モジュレーターが、請求項 18～23 のいずれか 1 項による、請求項 52 に記載の薬学的組成物。

【請求項 54】

前記 RUP43 GPCR のモジュレーターが、該 RUP43 GPCR のアゴニストである、請求項 52 に記載の薬学的組成物。 20

【請求項 55】

前記モジュレーターが、請求項 24 に記載の化合物である、請求項 52 に記載の薬学的組成物。

【請求項 56】

前記モジュレーターが、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 52 に記載の薬学的組成物。

【請求項 57】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 52～56 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

【請求項 58】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 52～56 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。 30

【請求項 59】

哺乳動物における血中グルコースを低下させる方法であって、該方法は、該低下を必要とする哺乳動物に請求項 52～58 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を提供または投与する工程を包含する、方法。

【請求項 60】

代謝障害を予防または処置する方法であって、該方法は、該予防または処置を必要とする哺乳動物に請求項 52～58 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を提供または投与する工程を包含し、該代謝障害は、以下： 40

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。

【請求項 61】

上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法であって、該方法は、該予防または処置を必要とする哺乳動物に請求項 52～58 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物を提供または投与する工程を包含し、該合併症は、以下：

- (a) 症候群 X；

- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、方法。

10

【請求項 6 2】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 5 9～6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

治療によるヒトまたは動物体の処置方法において使用するための、RUP43 GPCR のモジュレーターであって、該レセプターは、GPR131 アミノ酸配列を含む、モジュレーター。

【請求項 6 4】

治療によってヒトまたは動物体の血中グルコース濃度を低下させる方法において使用するための、RUP43 GPCR のモジュレーターであって、該レセプターは、GPR131 アミノ酸配列を含む、モジュレーター。

20

【請求項 6 5】

治療によってヒトまたは動物体における代謝障害を予防または処置する方法において使用するための、RUP43 GPCR のモジュレーターであって、該レセプターは、GPR131 アミノ酸配列を含み、該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、モジュレーター。

【請求項 6 6】

治療によってヒトまたは動物体における上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法において使用するための、RUP43 GPCR のモジュレーターであって、該レセプターは、GPR131 アミノ酸配列を含み、該合併症は、以下：

30

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、モジュレーター。

40

【請求項 6 7】

前記動物が哺乳動物である、請求項 6 3～6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記モジュレーターが、請求項 1 8～2 3 のいずれか 1 項による、請求項 6 3～6 7 のいずれか 1 項に記載のモジュレーター。

【請求項 6 9】

50

前記 R U P 4 3 G P C R のモジュレーターが、該 R U P 4 3 G P C R のアゴニストである、請求項 6 3 ～ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記モジュレーターが、請求項 2 4 に記載の化合物である、請求項 6 3 ～ 6 7 のいずれか 1 項に記載のモジュレーター。

【請求項 7 1】

前記モジュレーターが、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 6 3 ～ 6 7 のいずれか 1 項に記載のモジュレーター。

【請求項 7 2】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 6 3 ～ 7 1 のいずれか 1 項に記載のモジュレーター。 10

【請求項 7 3】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 6 3 ～ 7 1 のいずれか 1 項に記載のモジュレーター。

【請求項 7 4】

血中グルコース濃度を低下させるための医薬の調製のために R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを使用する方法であって、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 7 5】

代謝障害を予防または処置するための医薬の調製のために R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを使用する方法であって、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該代謝障害は、以下： 20

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。

【請求項 7 6】

上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置のための医薬の調製のために R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを使用する方法であって、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該合併症は、以下： 30

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、方法。

【請求項 7 7】

前記モジュレーターが、請求項 1 8 ～ 2 3 のいずれか 1 項による、請求項 7 4 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記 R U P 4 3 G P C R のモジュレーターが、該 R U P 4 3 G P C R のアゴニストである、請求項 7 4 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記モジュレーターが、請求項 2 4 に記載の化合物である、請求項 7 4 ～ 7 6 のいずれ 50

か 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記モジュレーターが、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 7 4～7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 7 4～8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 7 4～8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8 3】

RUP 4 3 GPCR の活性を調節するためのプロセスであって、該レセプターは、GPR 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該プロセスは、工程：

(a) 該レセプターのモジュレーターを、請求項 1～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程；および

(b) 該レセプターを、(a) において同定されたモジュレーターと接触させる工程を包含する、プロセス。

【請求項 8 4】

薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を調製するためのプロセスであって、該プロセスは、工程：

20

(a) RUP 4 3 GPCR のモジュレーターを、請求項 1～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程であって、該レセプターは、GPR 1 3 1 アミノ酸配列を含む、工程；および

(b) キャリアと (a) で同定されたモジュレーターとを混合する工程を包含する、プロセス。

【請求項 8 5】

RUP 4 3 GPCR の活性を調節するためのプロセスであって、該レセプターは、GPR 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該調節は、血中グルコース濃度の低下を必要とする哺乳動物における血中グルコース濃度を低下させるためであり、該プロセスは、工程：

(a) 該レセプターのモジュレーターを、請求項 1～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程；および

30

(b) 該レセプターを、(a) において同定された治療有効量のモジュレーターと接触させる工程を包含する、プロセス。

【請求項 8 6】

RUP 4 3 GPCR の活性を調節するためのプロセスであって、該レセプターは、GPR 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該調節は、代謝障害の予防または処置を必要とする哺乳動物において代謝障害を予防または処置するためであり、該プロセスは、工程：

(a) 該レセプターのモジュレーターを、請求項 1～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程；および

40

(b) 該レセプターを、(a) において同定された治療有効量のモジュレーターと接触させる工程

を包含し；ここで、該代謝障害は、以下：

(i) 糖尿病；

(i i) グルコース寛容減損；

(i i i) インスリン抵抗性；および

(i v) 高インスリン血症

からなる群より選択される、プロセス。

【請求項 8 7】

RUP 4 3 GPCR の活性を調節するためのプロセスであって、該レセプターは、G

50

P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該調節は、上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする哺乳動物において上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するためであり、該プロセスは、工程：

(a) 該レセプターのモジュレーターを、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程；および

(b) 該レセプターを、(a) において同定された治療有効量のモジュレーターと接触させる工程

を包含し；ここで、該合併症は、以下：

(i) 症候群 X；

(i i) アテローム性動脈硬化症；

(i i i) アテローム性疾患；

(i v) 心臓病；

(v) 高血圧症；

(v i) 発作；

(v i i) ニューロパシー；

(v i i i) 網膜症；

(i x) 腎症；および

(x) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、プロセス。

【請求項 8 8】

血中グルコース濃度の低下を必要とする哺乳動物において血中グルコース濃度を低下させるためのプロセスであって、該プロセスは、工程：

(a) R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程であって、該レセプターは G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含む、工程；および

(b) (a) において同定された治療有効量のモジュレーターを、該レセプターと接触させる工程

を包含する、プロセス。

【請求項 8 9】

代謝障害の予防または処置を必要とする哺乳動物において代謝障害を予防または処置するためのプロセスであって、該プロセスは、工程：

(a) R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程であって、該レセプターは G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含む、工程；および

(b) (a) において同定された治療有効量のモジュレーターを該レセプターと接触させる工程

を包含し；ここで、該代謝障害は、以下：

(i) 糖尿病；

(i i) グルコース寛容減損；

(i i i) インスリン抵抗性；および

(i v) 高インスリン血症

からなる群より選択される、プロセス。

【請求項 9 0】

上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする哺乳動物において上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するためのプロセスであって、該プロセスは、工程：

(a) R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程であって、該レセプターは G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含む、工程；および

(b) (a) において同定された治療有効量のモジュレーターを該レセプターと接触さ

10

20

30

40

50

せる工程

を包含し；ここで、該合併症は、以下：

- (i) 症候群 X；
- (ii) アテローム性動脈硬化症；
- (iii) アテローム性疾患；
- (iv) 心臓病；
- (v) 高血圧症；
- (vi) 発作；
- (vii) ニューロパシー；
- (viii) 網膜症；
- (ix) 腎症；および
- (x) 末梢脈管疾患

10

からなる群より選択される、プロセス。

【請求項 9 1】

哺乳動物において血中グルコースを低下させるためのプロセスであって、該プロセスは、工程：

(a) RUP 43 GPCR のモジュレーターを、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程であって、該レセプターは GPR 131 アミノ酸配列を含む、工程；および

(b) (a) において同定されたモジュレーターを、該低下を必要とする哺乳動物に提供または投与する工程を包含する、プロセス。

20

【請求項 9 2】

代謝障害を予防または処置するためのプロセスであって、該プロセスは、工程：

(a) RUP 43 GPCR のモジュレーターを、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程であって、該レセプターは GPR 131 アミノ酸配列を含む、工程；および

(b) (a) において同定されたモジュレーターを、該予防または処置を必要とする哺乳動物に提供または投与する工程を包含し；ここで、該代謝障害は、以下：

30

- (i) 糖尿病；
- (ii) グルコース寛容減損；
- (iii) インスリン抵抗性；および
- (iv) 高インスリン血症

からなる群より選択される、プロセス。

【請求項 9 3】

上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するためのプロセスであって、該プロセスは、工程：

(a) RUP 43 GPCR のモジュレーターを、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法に従って同定する工程であって、該レセプターは GPR 131 アミノ酸配列を含む、工程；および

40

(b) (a) において同定されたモジュレーターを、該予防または処置を必要とする哺乳動物に提供または投与する工程を包含し；該合併症は、以下：

- (i) 症候群 X；
- (ii) アテローム性動脈硬化症；
- (iii) アテローム性疾患；
- (iv) 心臓病；
- (v) 高血圧症；
- (vi) 発作；

50

- (v i i) ニューロパシー；
- (v i i i) 網膜症；
- (i x) 腎症；および
- (x) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、プロセス。

【請求項 9 4】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 8 5～9 3 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 9 5】

血中グルコース濃度を低下させるための医薬の調製のために R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを使用するプロセスであって、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該プロセスは、請求項 1～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法を実施することにより該モジュレーターを同定する工程を包含する、プロセス。 10

【請求項 9 6】

代謝障害を予防または処置するための医薬の調製のために R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを使用するプロセスであって、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該プロセスは、請求項 1～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法を実施することにより該モジュレーターを同定する工程を包含し；該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

20

からなる群より選択される、プロセス。

【請求項 9 7】

上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するための医薬の調製のために R U P 4 3 G P C R のモジュレーターを使用するプロセスであって、該レセプターは、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該プロセスは、請求項 1～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法を実施することにより該モジュレーターを同定する工程を包含し；該合併症は、以下：

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

30

からなる群より選択される、プロセス。

【請求項 9 8】

前記モジュレーターが、請求項 1 8～2 3 のいずれか 1 項による、請求項 8 5～9 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

40

【請求項 9 9】

前記 R U P 4 3 G P C R のモジュレーターが該 R U P 4 3 G P C R のアゴニストである、請求項 8 5～9 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 0 0】

前記モジュレーターが請求項 2 4 に記載の化合物である、請求項 8 5～9 7 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 0 1】

前記モジュレーターが化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 8 5～9 7 50

のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 102】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 85～101 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 103】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 85～101 のいずれか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 104】

薬学的組成物を調製する方法であって、請求項 24 に記載の化合物と薬学的に受容可能なキャリアとを混合する工程を包含する、方法。

10

【請求項 105】

前記化合物が化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

薬学的組成物であって、請求項 24 に記載の化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 107】

前記化合物が化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 106 に記載の薬学的組成物。

【請求項 108】

20

RUP43 GPCR を調節する方法であって、該レセプターは GPR131 アミノ酸配列を含み、該方法は、該レセプターを請求項 24 に記載の化合物または請求項 106 もしくは請求項 107 に記載の薬学的組成物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 109】

RUP43 GPCR の活性を調節する方法であって、該レセプターは GPR131 アミノ酸配列を含み、該調節は、血中グルコース濃度の低下を必要とする哺乳動物における血中グルコース濃度を低下させるためであり、該方法は、該レセプターを、治療有効量の請求項 24 に記載の化合物または治療有効量の請求項 106 もしくは請求項 107 に記載の薬学的組成物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 110】

30

RUP43 GPCR の活性を調節する方法であって、該レセプターは GPR131 アミノ酸配列を含み、該調節は、代謝障害の予防または処置を必要とする哺乳動物における代謝障害を予防または処置するためであり、該方法は、該レセプターを、治療有効量の請求項 24 に記載の化合物または治療有効量の請求項 106 もしくは請求項 107 に記載の薬学的組成物と接触させる工程を包含し、該代謝性障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。

40

【請求項 111】

RUP43 GPCR を調節する方法であって、該レセプターは GPR131 アミノ酸配列を含み、該調節は、上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする哺乳動物における上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するためであり、該方法は、該レセプターを治療有効量の請求項 24 に記載の化合物または治療有効量の請求項 106 もしくは請求項 107 に記載の薬学的組成物と接触させる工程を包含し、該合併症は、以下：

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；

50

- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 1 2】

血中グルコース濃度の低下を必要とする哺乳動物において血中グルコース濃度を低下させる方法であって、該方法は、治療有効量の請求項 2 4 に記載の化合物または治療有効量の請求項 1 0 6 もしくは請求項 1 0 7 に記載の薬学的組成物を R U P 4 3 G P C R と接触させる工程を包含し、該レセプターは G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含む、方法。 10

【請求項 1 1 3】

代謝障害の予防または処置を必要とする哺乳動物において代謝障害を予防または処置する方法であって、該方法は、治療有効量の請求項 2 4 に記載の化合物または治療有効量の請求項 1 0 6 もしくは請求項 1 0 7 に記載の薬学的組成物を R U P 4 3 G P C R と接触させる工程を包含し、該レセプターは G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 1 4】

上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする哺乳動物において上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法であって、該方法は、治療有効量の請求項 2 4 に記載の化合物または治療有効量の請求項 1 0 6 もしくは請求項 1 0 7 に記載の薬学的組成物を R U P 4 3 G P C R と接触させる工程を包含し、該レセプターは G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該合併症は、以下： 30

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 1 5】

血中グルコース濃度を低下させる方法であって、該方法は、該低下を必要とする哺乳動物に、治療有効量の請求項 2 4 に記載の化合物または治療有効量の請求項 1 0 6 もしくは請求項 1 0 7 に記載の薬学的組成物を提供または投与する工程を包含する、方法。

【請求項 1 1 6】

代謝障害を予防または治療する方法であって、該方法は、該予防または処置を必要とする哺乳動物に治療有効量の請求項 2 4 に記載の化合物または治療有効量の請求項 1 0 6 もしくは請求項 1 0 7 に記載の薬学的組成物を提供または投与する工程を包含し、該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。

【請求項 117】

上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するための方法であって、該方法は、該予防または処置を必要とする哺乳動物に治療有効量の請求項 24 に記載の化合物または治療有効量の請求項 106 もしくは請求項 107 に記載の薬学的組成物を投与または提供する工程を包含し、該合併症は、以下：

10

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患

20

からなる群より選択される、方法。

【請求項 118】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 109～117 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 119】

前記化合物が、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 108～118 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 120】

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 108～119 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 121】

30

前記モジュレーターが、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である、請求項 108～119 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 122】

治療によるヒトまたは動物体の処置方法において使用するための、請求項 24 に記載の化合物。

【請求項 123】

治療によってヒトまたは動物体における血中グルコース濃度を低下させる方法において使用するための、請求項 24 に記載の化合物。

【請求項 124】

治療によってヒトまたは動物体における代謝障害を予防または処置する方法において使用するための、請求項 24 に記載の化合物であって、該代謝障害は、以下：

40

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、化合物。

【請求項 125】

治療によってヒトまたは動物体における上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法において使用するための、請求項 24 に記載の化合物であって、該合併症は、以下：

50

- (a) 症候群 X ;
- (b) アテローム性動脈硬化症 ;
- (c) アテローム性疾患 ;
- (d) 心臓病 ;
- (e) 高血圧症 ;
- (f) 発作 ;
- (g) ニューロパシー ;
- (h) 網膜症 ;
- (i) 腎症 ; および
- (j) 末梢脈管疾患

10

からなる群より選択される、化合物。

【請求項 1 2 6】

前記化合物が、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 1 2 2 ~ 1 2 5 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 1 2 7】

前記動物が哺乳動物である、請求項 1 2 2 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 1 2 8】

血中グルコース濃度を低下させるための医薬の調製のために請求項 2 4 に記載の化合物を使用する方法。

【請求項 1 2 9】

20

代謝障害の予防または処置のための医薬の調製のために請求項 2 4 に記載の化合物を使用する方法であって、該代謝障害は、以下：

- (a) 糖尿病 ;
- (b) グルコース寛容減損 ;
- (c) インスリン抵抗性 ; および
- (d) 高インスリン血症

からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 3 0】

上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置のための医薬の調製のために請求項 2 4 に記載の化合物を使用する方法であって、該合併症は、以下：

30

- (a) 症候群 X ;
- (b) アテローム性動脈硬化症 ;
- (c) アテローム性疾患 ;
- (d) 心臓病 ;
- (e) 高血圧症 ;
- (f) 発作 ;
- (g) ニューロパシー ;
- (h) 網膜症 ;
- (i) 腎症 ; および
- (j) 末梢脈管疾患

40

からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 3 1】

前記化合物が、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 1 2 8 ~ 1 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

1 以上の候補化合物を、RUP43 GPCR に結合する化合物と同定する方法であって、該レセプターは GPR131 アミノ酸配列を含み、該方法は、工程：

(a) 該レセプターを、該候補化合物の存在下または非存在下で、該レセプターの検出可能に標識された既知のリガンドと接触させる工程 ; および

(b) 該標識された既知のリガンドの該レセプターに対する結合が、該候補化合物の存

50

在下で阻害されるか否かを決定する工程

を包含し；該阻害は、該候補化合物が、該 R U P 4 3 G P C R に結合する化合物であることを示す、方法。

【請求項 1 3 3】

請求項 1 に記載の方法であって、前記 G P R 1 3 1 アミノ酸配列は、以下：

- (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；
- (c) 前記 R U P 4 3 G タンパク質共役レセプターが配列番号 2 のアミノ酸 1 位のメチオニン残基を含まない、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；
- (d) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、該核酸配列は、ヒト D N A サンプルについて、配列番号 3 のプライマーおよび配列番号 4 のプライマーを用いて P C R を行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；
- (e) 配列番号 6 のアミノ酸配列；
- (f) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、該核酸配列は、ヒト D N A サンプルについて、配列番号 7 のプライマーおよび配列番号 8 のプライマーを用いて P C R を行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；
- (g) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号 2 のアミノ酸配列；
- (h) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；
- (i) 配列番号 2 のアミノ酸 2 2 3 位のアラニンがリジンに置換されており、ただし、前記 R U P 4 3 G タンパク質共役レセプターが配列番号 2 のアミノ酸 1 位のメチオニン残基を含まない、配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；および
- (j) ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、G タンパク質共役レセプターのアミノ酸配列からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 3 4】

前記接触させる工程が、前記 G P C R を発現する宿主細胞または前記 G P C R を発現する宿主細胞の膜と接触させることを含む、請求項 1 3 2 または請求項 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記宿主細胞が、該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、請求項 1 3 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記既知のリガンドが、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である、請求項 1 3 2 ~ 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

R U P 4 3 G P C R に結合するリガンドを検出するための方法であって、該レセプターは G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含み、該方法は、工程：

- (a) 試験リガンドを、該レセプターと該試験リガンドとの間の相互作用を許容する条件下で、該レセプターを発現する宿主細胞または該レセプターを発現する宿主細胞の膜と接触させる工程；および
 - (b) 該レセプターに結合したリガンドを検出する工程
- を包含する、方法。

【請求項 1 3 8】

請求項 1 3 7 に記載の方法であって、前記 G P R 1 3 1 アミノ酸配列は、以下：

- (a) 配列番号 2 のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 2 のアミノ酸 2 - 3 3 0 ；

(c) 前記 R U P 4 3 Gタンパク質共役レセプターが配列番号 2 のアミノ酸 1 位のメチオニン残基を含まない、配列番号 2 のアミノ酸 2-330；

(d) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、該核酸配列は、ヒト D N A サンプルについて、配列番号 3 のプライマーおよび配列番号 4 のプライマーを用いて P C R を行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；

(e) 配列番号 6 のアミノ酸配列；

(f) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、該核酸配列は、ヒト D N A サンプルについて、配列番号 7 のプライマーおよび配列番号 8 のプライマーを用いて P C R を行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；

(g) 配列番号 2 のアミノ酸 223 位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号 2 のアミノ酸配列；

(h) 配列番号 2 のアミノ酸 223 位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号 2 のアミノ酸 2-330；

(i) 配列番号 2 のアミノ酸 223 位のアラニンがリジンに置換されており、ただし、前記 R U P 4 3 Gタンパク質共役レセプターが配列番号 2 のアミノ酸 1 位のメチオニン残基を含まない、配列番号 2 のアミノ酸 2-330；および

(j) ストリンジェントな条件下で配列番号 1 の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列からなる群より選択される、方法。

【請求項 139】

前記接触させる工程が、前記 G P C R を発現する宿主細胞または前記 G P C R を発現する宿主細胞の膜と接触させることを含む、請求項 137 または請求項 138 に記載の方法。

【請求項 140】

前記宿主細胞が、該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含み、該宿主細胞が、該レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、請求項 139 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、示した日に、米国速達郵便によって米国特許商標庁に出願した以下の仮出願による優先権の利益を主張する：2004年4月13日出願した米国仮出願第60/561,954号。上記仮出願の開示は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、1以上の候補化合物がGタンパク質共役レセプター(GPCR)のモジュレーターであるか、または血中グルコース濃度のモジュレーターであるかを同定する方法に関する。特定の実施形態では、GPCRはヒトGPCRである。本発明はまた、GPCRのモジュレーターを用いる方法に関する。好ましいモジュレーターはアゴニストである。本発明のアゴニストは、血中グルコース濃度を低下させるための治療剤として、特定の代謝障害(例えば、インスリン抵抗性、グルコース寛容減損、および糖尿病)を予防または処置するための治療剤として、そして上昇した血中グルコース濃度の合併症(例えば、アテローム性動脈硬化症、心臓病、発作、高血圧症および末梢脈管疾患)を予防または処置するための治療剤として、有用である。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

以下の考察は、本発明の理解を促進することを意図するが、本発明の先行技術であるこ

10

20

30

40

50

とを意図するわけでも認めるわけでもない。

【0004】

(A. 高血糖症)

血中グルコース濃度は、代表的に、狭い範囲に維持される。血中グルコース濃度の上昇は通常、インスリンの放出増加をもたらし、次いでこれは、標的細胞に作用して、グルコース取り込みを増加させる。血中グルコースホメオスタシスの調節不全は、血中グルコース濃度の持続した上昇、すなわち、高血糖症をもたらし得る。高血糖症を有する一部の個体は、2型糖尿病を発症することになり得る。組織が高血糖に慢性的にさらされることにより、ニューロパシー、網膜症および腎症の微小血管の問題ならびに発作、冠状心臓病、および末梢脈管疾患の大血管(macrovascular)合併症を含む多様な合併症がもたらされ得る。高血糖症は、より良好な管理選択肢を必要とする、主な、そして増えつつある医療問題である[非特許文献1；この開示は、その全体が本明細書中に参考として援用される]。

【0005】

(B. Gタンパク質共役レセプター)

多数のレセプタークラスがヒトに存在するが、これまでのところ、最も豊富でかつ治療的に適切であるのは、Gタンパク質共役レセプター(GPCR)クラスによって表される。約30,000~約40,000の遺伝子がヒトゲノムに存在すると見積もられ、そしてこれらのうち、約2%がGPCRをコードすると見積もられる。

【0006】

GPCRは、薬学的製品の開発のための重要な領域を表す；100の公知のGPCRのうち約20から、全ての処方薬剤のうちの約60%が開発された。例えば、1999年には、上位100位のブランド名の処方薬物のうち、以下の薬物は、GPCRと相互作用する(薬物に関連する処置される原発性疾患および/または原発性障害は、カッコ内に示される)：

【0007】

【表1】

Claritin® (アレルギー)	Prozac® (うつ病)	Vasotec® (高血圧症)
Paxil® (うつ病)	Zoloft® (うつ病)	Zyprexa® (精神病性障害)
Cozaar® (高血圧症) I	mitrex® (片頭痛)	Zantac® (逆流)
Propulsid® (逆流疾患)	Risperdal® (精神病性障害)	Serevent® (喘息)
Pepcid® (逆流)	Gaster® (潰瘍)	Atrovent® (気管支痙攣)
Effexor® (うつ病)	Depakote® (癲癇)	Cardura® (前立腺肥大)
Allegra® (アレルギー)	Lupron® (前立腺癌)	Zoladex® (前立腺癌)
Diprivan® (感覚脱失)	BuSpar® (不安)	Ventolin® (気管支痙攣)
Hytrin® (高血圧症)	Wellbutrin® (うつ病)	Zyrtec® (鼻炎)
Plavix® (MI/発作)	Toprol-XL® (高血圧症)	Tenormin® (アングナ)
Xalatan® (緑内障)	Singulair® (喘息)	Diovan® (高血圧症)
Harnal® (前立腺肥大)		

(Med Ad News 1999 Data).

GPCRは、共通の構造モチーフを共有し、7つのαらせんを形成する、22と24との間の疎水性アミノ酸の7つの配列を有し、これらのαらせんの各々は、膜を貫通する(各貫通は、数字によって同定される、すなわち、膜貫通-1(TM-1)、膜貫通-2(

T M-2) など)。これらの膜貫通らせんは、細胞膜の外側（すなわち、「細胞外」側）において、膜貫通-2と膜貫通-3との間、膜貫通-4と膜貫通-5との間、そして膜貫通-6と膜貫通-7との間でアミノ酸鎖によって連結される（これらは、それぞれ、「細胞外」領域1、2および3（E C-1、E C-2およびE C-3）と呼ばれる）。これらの膜貫通らせんはまた、細胞膜の内側（すなわち「細胞内」側）において、膜貫通-1と膜貫通-2との間、膜貫通-3と膜貫通-4との間、そして膜貫通-5と膜貫通-6との間でアミノ酸鎖によって連結される（これらは、それぞれ、「細胞内」領域1、2および3（I C-1、I C-2およびI C-3）と呼ばれる）。これらのレセプターの「カルボキシ」（「C」）末端は、細胞内の細胞内腔に位置し、そしてこれらのレセプターの「アミノ」（「N」）末端は細胞外の細胞外腔に位置する。

10

【0008】

一般に、リガンドがレセプター（しばしば、レセプターの「活性化」と呼ばれる）と結合した場合、細胞内領域と細胞内「Gタンパク質」との間での共役を促進する、そのレセプターのコンホメーション変化が存在する。GPCRがGタンパク質に関して「無差別」であること、すなわち、GPCRが1種より多くのGタンパク質と相互作用し得ることが報告されている。非特許文献2を参照のこと。他のGタンパク質が存在するとはいえ、現在、Gq、Gs、Gi、GzおよびGoは、同定されたGタンパク質である。Gタンパク質とのリガンド活性化GPCR共役は、シグナル伝達カスケードプロセスを示す（「シグナル伝達」といわれる）。正常な条件下で、シグナル伝達は最終的に、細胞の活性化または細胞阻害をもたらす。理論によって束縛されることを望まないが、レセプターのI C-3ループならびにカルボキシ末端がGタンパク質と相互作用すると考えられる。

20

【0009】

ホスホリパーゼC経路へのいくつかのクラスのGPCRと共役するようである、無差別のGタンパク質（例えば、Gα15またはGα16〔非特許文献3〕）または同じ経路への多数の異なるGPCRと共役するように設計されたキメラGタンパク質（例えば、ホスホリパーゼC〔非特許文献4〕）もまた存在する。

【0010】

生理学的条件下で、GPCRは、2つの異なるコンホメーション（「不活性」状態および「活性」状態）の間で平衡して細胞膜中に存在する。不活性状態のレセプターは、細胞内シグナル伝達経路に連結して、シグナル伝達を開始して生物学的応答をもたらすことができない。レセプターのコンホメーションを活性状態に変更することにより、（Gタンパク質による）シグナル伝達経路への連結が可能により、生物学的応答を生じる。

30

【0011】

レセプターは、リガンドまたは化合物（例えば、薬物）によって活性状態で安定化され得る。近年の知見（このレセプターのアミノ酸配列への改変を含むが、排他的に限定しない）は、活性状態のコンホメーションのこのレセプターを促進して安定化する、リガンドまたは薬物以外の手段を提供する。これらの手段は、このレセプターへのリガンド結合の効果をシミュレートすることにより、活性状態のこのレセプターを効果的に安定化する。このようなリガンド依存性手段による安定化は、「構成的レセプター活性化」と呼ばれる。

40

【0012】

（RUP43）

RUP43（ここで、内因性RUP43がGPR131（例えば、GenBank（登録商標）登録番号NM__170699）であり得ることが理解される）は、胆汁酸についてのレセプターとして作用すると近年報告された〔特許文献1として2004年1月7日に公開された欧州特許出願第02717114.9号；および非特許文献5；これらの各々の開示は、その全体が本明細書中に参考として援用される〕。白血球内でのRUP43発現は、単球に特異的であることが報告され、そして単球のRUP43において作用する胆汁酸は、腫瘍壊死因子α（TNFα）の発現を阻害することが報告された。特許文献1に開示される化合物は、本発明の方法において用いられ得る。

50

【特許文献1】欧州特許公開1378749号明細書

【非特許文献1】Nestor, Reviews in Cardiovascular Medicine (2003) 4: S11-S18

【非特許文献2】Kenakin, T., 43 Life Sciences 1095 (1988)

【非特許文献3】OffermannsおよびSimon, J Biol Chem (1995) 270: 15175-80

【非特許文献4】MilliganおよびRees, Trends in Pharmaceutical Sciences (1999) 20: 118-24

【非特許文献5】Kawamataら, J Biol Chem (2003) 278: 9435-9440 10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

(発明の要旨)

出願人は、RUP43のアゴニストが脂肪細胞および骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを増加させることを予想外に見出した。出願人は、RUP43のアゴニストが、哺乳動物において血中グルコース濃度を低下させる予想外の有用性を有することを開示する。出願人はさらに、RUP43においてアゴニスト活性を有する新規化合物およびそのための用途を開示する。 20

【0014】

第一の局面では、本発明は、1以上の候補化合物をRUP43 GPCRのモジュレーターとして同定する方法を特徴とし、このレセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、このレセプターは、Gタンパク質と共役し；この方法は、工程：(a) 候補化合物をこのレセプターと接触させる工程；および(b) このレセプターの機能性が調節されるかどうかを決定する工程；を包含し、ここで、レセプターの機能性における変化は、この候補化合物がRUP43 GPCRのモジュレーターであることを示す。

【0015】

特定の実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、以下からなる群より選択される： 30

(a) 配列番号2のアミノ酸配列；

(b) 配列番号2のアミノ酸2-330；

(c) RUP43 Gタンパク質共役レセプターが配列番号2のアミノ酸1位のメチオニン残基を含まない、配列番号2のアミノ酸2-330；

(d) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、この核酸配列は、ヒトDNAサンプルについて、配列番号3のプライマーおよび配列番号4のプライマーを用いてPCRを行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；

(e) 配列番号6のアミノ酸配列；

(f) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、この核酸配列は、ヒトDNAサンプルについて、配列番号7のプライマーおよび配列番号8のプライマーを用いてPCRを行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列； 40

(g) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号2のアミノ酸配列；

(h) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号2のアミノ酸2-330；

(i) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されており、ただし、RUP43 Gタンパク質共役レセプターが配列番号2のアミノ酸1位のメチオニン残基を含まない、配列番号2のアミノ酸2-330；および 30

(j) ストリンジェントな条件下で配列番号1の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列。

【0016】

特定の実施形態では、上記RUP43 GPCRは、組換え体である。特定の実施形態では、上記接触させる工程が、このGPCRを発現する宿主細胞またはこのGPCRを発現する宿主細胞の膜と接触させることを含み、上記宿主細胞は、上記レセプターをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRの公知のリガンドの存在下で実施される。いくつかの実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRの公知のモジュレーターが存在下で実施される。いくつかの実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRの公知のアゴニストの存在下で実施される。いくつかの実施形態では、このGPCRの上記公知のアゴニストは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、GPCRの上記公知のアゴニストは、化合物1である。いくつかの実施形態では、このGPCRの上記公知のアゴニストは、化合物2である。いくつかの実施形態では、このGPCRの上記公知のアゴニストは、化合物3である。いくつかの実施形態では、上記公知のアゴニストは、上記決定する工程のために、約EC50～約EC75で存在する。

【0018】

本発明はまた、1以上の候補化合物を哺乳動物における血中グルコース濃度のモジュレーターと同定する方法に関し、この方法は、工程：

候補化合物を、GPR131アミノ酸配列を含むGPCRと接触させる工程であって、ここでこのレセプターがGタンパク質と共役する、工程；および

このレセプターの機能性が調節されるか否かを決定する工程；
を包含し、ここで、レセプターの機能性における変化は、この候補化合物が、哺乳動物における血中グルコース濃度のモジュレーターであることを示す。

【0019】

特定の実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、以下からなる群より選択される：

(a) 配列番号2のアミノ酸配列；

(b) 配列番号2のアミノ酸2-330；

(c) RUP43 Gタンパク質共役レセプターが配列番号2のアミノ酸1位のメチオニン残基を含まない、配列番号2のアミノ酸2-330；

(d) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、この核酸配列は、ヒトDNAサンプルについて、配列番号3のプライマーおよび配列番号4のプライマーを用いてPCRを行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；

(e) 配列番号6のアミノ酸配列；

(f) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、この核酸配列は、ヒトDNAサンプルについて、配列番号7のプライマーおよび配列番号8のプライマーを用いてPCRを行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；

(g) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号2のアミノ酸配列；

(h) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号2のアミノ酸2-330；

(i) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されており、ただし、RUP43 Gタンパク質共役レセプターが配列番号2のアミノ酸1位のメチオニン残基を含まない、配列番号2のアミノ酸2-330；および

(j) ストリンジェントな条件下で配列番号1の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列。

レオチドによってコードされる、Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列。

【0020】

特定の実施形態では、レセプターの機能性の上昇は、この候補化合物が、哺乳動物における血中グルコース濃度を低下させる化合物であることを示す。

【0021】

特定の実施形態では、上記GPCRは組換え体である。特定の実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRを発現する宿主細胞またはこのGPCRを発現する宿主細胞の膜と接触させることを含み、上記宿主細胞は、このレセプターをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRの公知のリガンドの存在下で実施される。いくつかの実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRの公知のモジュレーターの存在下で実施される。いくつかの実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRの公知のアゴニストの存在下で実施される。いくつかの実施形態では、このGPCRの上記公知のアゴニストは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、このGPCRの上記公知のアゴニストは、化合物1である。いくつかの実施形態では、このGPCRの上記公知のアゴニストは、化合物2である。いくつかの実施形態では、このGPCRの上記公知のアゴニストは、化合物3である。いくつかの実施形態では、上記公知のアゴニストは、上記決定する工程のために、約EC50～約EC75で存在する。

10

20

【0023】

特定の実施形態では、上記1以上の候補化合物は、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。

【0024】

特定の実施形態では、上記1以上の候補化合物はペプチドではない。

【0025】

特定の実施形態では、上記1以上の候補化合物は胆汁酸ではない。

【0026】

いくつかの実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸配列の改変体である。いくつかの実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列の上記改変体は、上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体または哺乳動物オルソログである。いくつかの実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列の上記改変体は、上記アミノ酸配列または上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログの非内因性の構成的に活性化された変異体である。特定の実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列の上記改変体は、上記アミノ酸配列または上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログの生物学的に活性なフラグメントである。特定の実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列または上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログの上記生物学的に活性なフラグメントは、N末端メチオニンがない、配列番号2または上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログのアミノ酸配列である。特定の実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列の上記改変体は、配列番号2のアミノ酸配列に対して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%同一である。いくつかの実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列の上記改変体は、配列番号2のアミノ酸配列に対して、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%同一である。

30

40

【0027】

50

特定の実施形態では、G P R 1 3 1 アミノ酸配列を含む上記 R U P 4 3 G P C R は、1 以上のエピトープタグをさらに含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、上記 1 以上のエピトープタグを含む融合タンパク質は、配列番号 6 のアミノ酸配列である。

【0028】

特定の実施形態では、上記 G タンパク質は、細胞内 c A M P のレベルの上昇をもたらす。いくつかの好ましい実施形態では、上記 G タンパク質は G s である。

【0029】

特定の実施形態では、上記 G タンパク質は、百日咳毒素感受性である。特定の実施形態では、上記 G タンパク質は G i または G o である。特定の実施形態では、上記 G タンパク質は G i である。特定の実施形態では、上記 G タンパク質は G o である。

【0030】

特定の実施形態では、上記 G タンパク質は G α 1 5 または G α 1 6 である。特定の実施形態では、上記 G タンパク質は G α 1 5 である。特定の実施形態では、上記 G タンパク質は G α 1 6 である。

【0031】

特定の実施形態では、上記 G タンパク質は G q である。

【0032】

特定の実施形態では、上記方法は、候補化合物によって引き起こされるレセプターの調節を、このレセプターを公知のレセプターモジュレーターと接触させることにより引き起こされるこのレセプターの第 2 の調節に対して比較する工程をさらに包含する。特定の実施形態では、上記公知のモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である。特定の実施形態では、上記アゴニストは化合物 1 である。特定の実施形態では、上記アゴニストは化合物 2 である。特定の実施形態では、上記アゴニストは化合物 3 である。

【0033】

いくつかの好ましい実施形態では、上記決定する工程または上記比較する工程は、上記 G P C R を含む膜への G T P γ S 結合の測定を通してである。特定の実施形態では、上記 G T P γ S は、 $[^3\ ^5\text{S}]$ で標識される。

【0034】

特定の実施形態では、上記決定する工程または上記比較する工程は、サイクリック A M P (c A M P)、サイクリック G M P (c G M P)、イノシトール三リン酸 (I P ₃)、ジアシルグリセロール (D A G)、M A P キナーゼ活性、および C a ²⁺ からなる群より選択されるセカンドメッセンジャーのレベルの測定を通してである。特定の好ましい実施形態では、上記セカンドメッセンジャーは c A M P である。特定の好ましい実施形態では、c A M P のレベルが上昇する。特定の実施形態では、c A M P の上記測定は、細胞全体のアデニルシクラーゼアッセイを用いて実施される。特定の実施形態では、c A M P の上記測定は、上記 G P C R を含む膜を用いて実施される。特定の実施形態では、上記セカンドメッセンジャーは M A P キナーゼ活性である。特定の実施形態では、M A P キナーゼ活性のレベルが上昇する。

【0035】

いくつかの好ましい実施形態では、上記決定する工程または上記比較する工程は、C R E レポーターアッセイを通してである。特定の実施形態では、上記レポーターはルシフェラーゼである。いくつかの実施形態では、上記レポーターは β - ガラクトシダーゼである。

【0036】

特定の実施形態では、上記決定する工程または上記比較する工程は、細胞内 I P ₃ の測定を通してである。

【0037】

特定の実施形態では、上記決定する工程または上記比較する工程は、細胞内 C a ²⁺ の

測定を通してである。

【0038】

特定の実施形態では、上記決定する工程または上記比較する工程は、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みの測定を通してである。

【0039】

特定の実施形態では、上記決定する工程または上記比較する工程は、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みの測定を通してである。

【0040】

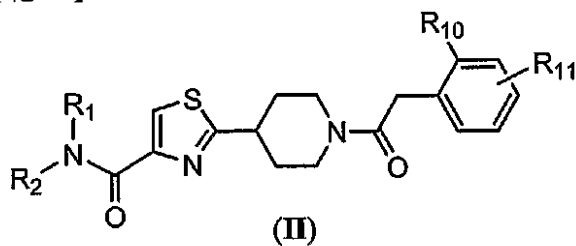
特定の好ましい実施形態では、上記決定する工程または上記比較する工程は、メラニン保有細胞アッセイの使用を通してである。

【0041】

第二の局面では、本発明は、以下の式 (I I) の化合物またはその薬学的に受容可能な塩を特徴とし：

【0042】

【化2】



ここで：

R_1 は、Hまたは C_{1-6} アルキルであり；

R_2 は、2-メチル-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル基である；または

R_1 および R_2 は、それらが結合する窒素と一緒にあって、3, 4-ジヒドロ-2H-キノリン-1-イル基を形成し；そして

R_{10} および R_{11} は、各々独立して、Hまたはハロゲンである

第三の局面では、本発明は、第一の局面の方法に従って同定されたGPCRのモジュレーターを特徴とする。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは胆汁酸ではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。

【0043】

本発明はまた、第一の局面の方法に従って同定可能なGPCRのモジュレーターを特徴とする。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。

【0044】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストおよびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、上記モジュレーターは部分アゴニストである。特定の実施形態では、上記モジュレーターは逆 (inverse) アゴニストである。特定の実施形態では、上記モジュレーターはアンタゴニストである。

【0045】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは好ましくはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

【0046】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満、または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイからなる群より選択されるアッセイを用いて決定される。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満の、EC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

【0047】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、GPCRに選択的である。

【0048】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1（「Compound 1」、表1を参照のこと）、化合物2（「Compound 2」、表1を参照のこと）、または化合物3（「Compound 3」、表1を参照のこと）である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

【0049】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能（bioavailable）である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35

%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0050】

いくつかの実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0051】

第四の局面では、本発明は、薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を調製する方法を特徴とし、この方法は、キャリアとRUP43 GPCRのモジュレーターとを混合する工程を包含し、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは部分アゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは逆アゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターはアンタゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは好ましくはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

【0052】

本発明はまた、薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を調製する方法を特徴とし、この方法は、RUP43 GPCRのモジュレーターを同定する工程であって、上記レセプターがGPR131アミノ酸配列を含む工程、次いでキャリアとこのモジュレーターとを混合する工程であって、このモジュレーターが、第一の局面に従った方法により同定可能である工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、好ましくはアゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは部分アゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは逆アゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターはアンタゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは好ましくはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

【0053】

特定の実施形態では、上記組成物は薬学的組成物である。特定の実施形態では、上記組成物は薬学的に受容可能である。

【0054】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつか

の実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイからなる群より選択されるアッセイを用いて決定される。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μM未満、1 μM未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μM未満の、上記アッセイにおいて9 μM未満の、上記アッセイにおいて8 μM未満の、上記アッセイにおいて7 μM未満の、上記アッセイにおいて6 μM未満の、上記アッセイにおいて5 μM未満の、上記アッセイにおいて4 μM未満の、上記アッセイにおいて3 μM未満の、上記アッセイにおいて2 μM未満の、上記アッセイにおいて1 μM未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満の、EC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～10 μMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

【0055】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、GPCRに選択的である。

【0056】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

【0057】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0058】

いくつかの実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0059】

第五の局面では、本発明は、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含み、この方法は、このレセプターとこの

レセプターのモジュレーターとを接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法により同定可能である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは部分アゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは逆アゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターはアンタゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは、好ましくはアゴニストである。10
特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを増加させる化合物である。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

【0060】

本発明はまた、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含み、この方法は、このレセプターをこのレセプターのモジュレーターと接触させる工程を包含し、このモジュレーターは、第一の局面の方法により同定可能である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合20
誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは部分アゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは逆アゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターはアンタゴニストである。特定の実施形態では、このモジュレーターは好ましくはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面30
による化合物である。

【0061】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペ40
チドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイからなる群より選択されるアッセイを用いて決定される。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて50

3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満の、 EC_{50} を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～10 μ Mの区間から選択される値未満の EC_{50} を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～1 μ Mの区間から選択される値未満の EC_{50} を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満の EC_{50} を有するアゴニストである。

10

【0062】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、GPCRに選択的である。

【0063】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

20

【0064】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

30

【0065】

いくつかの実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0066】

特定の実施形態では、上記接触させる工程は、このレセプターを含む膜へのこのモジュレーターの投与を包含する。

【0067】

特定の実施形態では、上記接触させる工程は、このモジュレーターを、このレセプターを含む細胞に投与することを含む。

40

【0068】

特定の実施形態では、上記接触させる工程は、このモジュレーターを、このレセプターを含む組織に投与することを含む。

【0069】

特定の実施形態では、上記接触させる工程は、このモジュレーターを、このレセプターを含む個体に投与することを含む。特定の実施形態では、このレセプターを含む個体へのモジュレーターの上記投与は、経口投与である。特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット

50

、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

【0070】

第六の局面では、本発明は、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含み、ここで上記調節は、上記調節を必要とする個体において血中グルコース濃度を低下させるためであり、この方法は、上記レセプターを該レセプターの治療有効量のモジュレーターと接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。

【0071】

本発明はまた、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含み、ここで上記調節は、上記調節を必要とする個体において代謝障害を予防または処置するためであり、この方法は、上記レセプターを該レセプターの治療有効量のモジュレーターと接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0072】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

【0073】

本発明はまた、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含み、ここで上記調節は、上記調節を必要とする個体において上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するためであり、この方法は、上記レセプターを該レセプターの治療有効量のモジュレーターと接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0074】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態で

10

20

30

40

50

は、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0075】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従った方法により同定可能である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

10

【0076】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはGPCRに選択的である。

20

【0077】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

【0078】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

30

【0079】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0080】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイからなる群より選択されるアッセイを用い

40

50

て決定される。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて $10\ \mu\text{M}$ 未満、 $1\ \mu\text{M}$ 未満、 $100\ \text{nM}$ 未満または $10\ \text{nM}$ 未満の EC_{50} を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて $10\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $9\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $8\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $7\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $6\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $5\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $4\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $3\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $2\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $1\ \mu\text{M}$ 未満の、上記アッセイにおいて $900\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $800\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $700\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $600\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $500\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $400\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $300\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $200\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $100\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $90\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $80\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $70\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $60\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $50\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $40\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $30\ \text{nM}$ 未満の、上記アッセイにおいて $20\ \text{nM}$ 未満の、または上記アッセイにおいて $10\ \text{nM}$ 未満の EC_{50} を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、 $10\ \text{nM} \sim 10\ \mu\text{M}$ の区間から選択される値未満の EC_{50} を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、 $10\ \text{nM} \sim 1\ \mu\text{M}$ の区間から選択される値未満の EC_{50} を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、 $10\ \text{nM} \sim 100\ \text{nM}$ の区間から選択される値未満の EC_{50} を有するアゴニストである。

10

20

30

40

50

【0081】

特定の実施形態では、上記接触させる工程は、上記個体への上記モジュレーターの経口投与を包含する。

【0082】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

【0083】

第七の局面では、本発明は、上記低下を必要とする個体において血中グルコース濃度を低下させる方法の特徴とし、この方法は、治療有効量の RUP43-GPCR のモジュレーターを上記レセプターと接触させる工程を包含し、上記 GPCR は GPR131 アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。

【0084】

本発明はさらに、哺乳動物中の血中グルコース濃度を低下させる方法の特徴とし、この方法は、上記低下を必要とする哺乳動物に RUP43-GPCR のモジュレーターを提供または投与する工程を包含し、上記 GPCR は GPR131 アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、 RUP43-GPCR アゴニストは GPR131-GPCR アゴニストであり、ここで、 GPR131-GPCR は内因性 RUP43-GPCR であることが理解される。

【0085】

本発明はまた、代謝障害の予防または処置を必要とする個体における代謝障害を予防または治療する方法の特徴とし、この方法は、治療有効量の RUP43-GPCR のモジュレーターを上記レセプターと接触させる工程を包含し、上記レセプターは GPR131 アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

(a) 糖尿病；

- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0086】

本発明はさらに、代謝障害を予防または処置する方法を特徴し、この方法は、上記予防または処置を必要とする哺乳動物にRUP43 GPCRのモジュレーターを投与する工程を包含し、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、RUP43 GPCRアゴニストはGPR131 GPCRアゴニストであり、ここで、GPR131 GPCRは内因性RUP43 GPCRであることが理解される。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0087】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

【0088】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする個体において上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法を特徴とし、この方法は、治療有効量のRUP43 GPCRのモジュレーターを上記レセプターと接触させる工程を包含し、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0089】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では

、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0090】

本発明はさらに、上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法を特徴とし、この方法は、上記予防または処置を必要とする哺乳動物にRUP43 GPCRのモジュレーターを提供または投与する工程を包含し、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、RUP43 GPCRアゴニストはGPR131 GPCRアゴニストであり、ここで、GPR131 GPCRは内因性RUP43 GPCRであることが理解される。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0091】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0092】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得た脂肪細胞におけるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得た骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

【0093】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはGPCRに選択的である。

【0094】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

【0095】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

10

【0096】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0097】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュ

20

30

40

50

レーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

【0098】

特定の実施形態では、上記接触させる工程は、上記個体への上記モジュレーターの経口投与を包含する。

【0099】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

10

【0100】

第八の局面では、本発明は、薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を特徴とし、該薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターを含むか、RUP43 GPCRのモジュレーターから本質的になるか、またはRUP43 GPCRのモジュレーターからなり、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。

【0101】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

20

【0102】

特定の実施形態では、上記組成物は薬学的組成物である。特定の実施形態では、この薬学的組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターを含む。特定の実施形態では、この薬学的組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターから本質的になる。特定の実施形態では、この薬学的組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターからなる。

30

【0103】

特定の実施形態では、上記組成物は、薬学的に受容可能である。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターを含む。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターから本質的になる。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターからなる。

40

【0104】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはGPCRに選択的である。

【0105】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

【0106】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少な

50

くとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0107】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0108】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

【0109】

第九の局面では、本発明は、血中グルコース濃度を低下させる方法の特徴とし、この方法は、上記低下を必要とする個体に、第八の局面の上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含する。

【0110】

本発明はまた、代謝障害を予防または処置する方法の特徴とし、この方法は、上記予防または処置を必要とする個体に、第八の局面の上記薬学的組成物または生理学的に受容可

10

20

30

40

50

能な組成物を提供または投与する工程を包含する。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0111】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

10

【0112】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法を特徴とし、この方法は、上記予防または処置を必要とする個体に、第八の局面の上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含する。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

20

【0113】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

30

40

【0114】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。

【0115】

特定の実施形態では、治療有効量の上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物は、上記個体に提供または投与される。

【0116】

特定の実施形態では、上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供する工程または投与する工程は経口的である。

50

【0117】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

【0118】

第十の局面では、本発明は、治療によるヒトまたは動物体の処置方法において使用するためのRUP43 GPCRのモジュレーターを特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。

10

【0119】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、ヒトまたは動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。

特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、ヒトまたは動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

20

【0120】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはGPCRに選択的である。

【0121】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

30

【0122】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

40

【0123】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0124】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつか

50

の実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μM未満、1 μM未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μM未満の、上記アッセイにおいて9 μM未満の、上記アッセイにおいて8 μM未満の、上記アッセイにおいて7 μM未満の、上記アッセイにおいて6 μM未満の、上記アッセイにおいて5 μM未満の、上記アッセイにおいて4 μM未満の、上記アッセイにおいて3 μM未満の、上記アッセイにおいて2 μM未満の、上記アッセイにおいて1 μM未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～10 μMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

【0125】

特定の実施形態では、上記動物は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である。ヒトまたは動物のうちでより好ましいのはヒトである。

【0126】

第十一の局面では、本発明は、治療によってヒトまたは動物体の血中グルコース濃度を低下させる方法において使用するためのRUP43 GPCRのモジュレーターを特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。

【0127】

本発明はまた、治療によってヒトまたは動物体における代謝障害を予防または処置する方法において使用するためのRUP43 GPCRのモジュレーターを特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0128】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、

糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

【0129】

本発明はまた、治療によってヒトまたは動物体における上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法において使用するためのRUP43 GPCRのモジュレーターを特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0130】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0131】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、ヒトまたは動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、ヒトまたは動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

【0132】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはGPCRに選択的である。

【0133】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

【0134】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

10

【0135】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0136】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 nM~1 μ Mの区間から選択され

20

30

40

50

る値未満の EC_{50} を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、 $10\text{ nM} \sim 100\text{ nM}$ の区間から選択される値未満の EC_{50} を有するアゴニストである。

【0137】

特定の実施形態では、上記動物は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である。ヒトまたは動物のうちでより好ましいのはヒトである。

【0138】

第十二の局面では、本発明は、血中グルコース濃度を低下させるための医薬の調製のために $RUP43$ $GPCR$ のモジュレーターを使用する方法を特徴とし、上記レセプターは $GPR131$ アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、 $RUP43$ $GPCR$ アゴニストは $GPR131$ $GPCR$ アゴニストであり、ここで、 $GPR131$ $GPCR$ は内因性 $RUP43$ $GPCR$ であることが理解される。 10

【0139】

本発明はまた、代謝障害の予防または処置のための医薬の調製のために $RUP43$ $GPCR$ のモジュレーターを使用する方法を特徴とし、上記レセプターは $GPR131$ アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、 $RUP43$ $GPCR$ アゴニストは $GPR131$ $GPCR$ アゴニストであり、ここで、 $GPR131$ $GPCR$ は内因性 $RUP43$ $GPCR$ であることが理解 20
される。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0140】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。 30

【0141】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置のための医薬の調製のために $RUP43$ $GPCR$ のモジュレーターを使用する方法を特徴とし、上記レセプターは $GPR131$ アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、 $RUP43$ $GPCR$ アゴニストは $GPR131$ $GPCR$ アゴニストであり、ここで、 $GPR131$ $GPCR$ は内因性 $RUP43$ $GPCR$ であることが理解される。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニ 40
ストである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および

(j) 末梢脈管疾患。

【0142】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0143】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、第一の局面の方法に従って同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、上記アゴニストは、第二の局面による化合物である。

【0144】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはGPCRに選択的である。

【0145】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

【0146】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0147】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0148】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μM未満、1 μM未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつか

の実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μM未満、1 μM未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μM未満の、上記アッセイにおいて9 μM未満の、上記アッセイにおいて8 μM未満の、上記アッセイにおいて7 μM未満の、上記アッセイにおいて6 μM未満の、上記アッセイにおいて5 μM未満の、上記アッセイにおいて4 μM未満の、上記アッセイにおいて3 μM未満の、上記アッセイにおいて2 μM未満の、上記アッセイにおいて1 μM未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～10 μMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

【0149】

第十三の局面では、本発明は、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、ここで、上記調節は、上記調節を必要とする個体において血中グルコースを低下させるためであり、この方法は、上記レセプターをこのレセプターの治療有効量のモジュレーターと接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を最初に実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。

【0150】

本発明はまた、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、ここで、上記調節は、上記調節を必要とする個体において代謝障害を予防または処置するためであり、この方法は、上記レセプターをこのレセプターの治療有効量のモジュレーターと接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を最初に実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0151】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

【0152】

本発明はまた、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、ここで、上記調節は、上記調節を必要とする個体において上昇した血中グルコースの合併症を予防または処置するためであり、この方法は、上記レセプターをこのレセプターの治療有効量のモジュレーターと接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を最初に実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0153】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0154】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、上記モジュレーターペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、第三の局面による。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。

【0155】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはGPCRに選択的である。

【0156】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは化合物3である。

【0157】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用能は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

10

【0158】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0159】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 nM~100 nMの区間から選択される値未満の

20

30

40

50

EC₅₀を有するアゴニストである。

【0160】

特定の実施形態では、上記接触させる工程は、上記個体への上記モジュレーターの経口投与を包含する。

【0161】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

10

【0162】

第十四の局面では、本発明は、血中グルコースの低下を必要とする個体において血中グルコースを低下させる方法の特徴とし、この方法は、治療有効量のRUP43GPCRのモジュレーターを上記レセプターと接触させる工程を包含し、上記GPCRは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を最初に実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。

【0163】

本発明はまた、代謝障害の予防または処置を必要とする個体において代謝障害を予防または処置する方法の特徴とし、この方法は、治療有効量のRUP43GPCRのモジュレーターを上記レセプターと接触させる工程を包含し、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を最初に実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

20

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0164】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

30

【0165】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする個体において上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法の特徴とし、この方法は、治療有効量のRUP43GPCRのモジュレーターを上記レセプターと接触させる工程を包含し、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を最初に実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

40

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；

50

- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0166】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

10

【0167】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記このモジュレーターは、第三の局面による。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。

20

【0168】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、GPCRに選択的である。

【0169】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物3である。

30

【0170】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

40

【0171】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0172】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 n

50

M～1 μMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 μM未満、1 μM未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μM未満の、上記アッセイにおいて9 μM未満の、上記アッセイにおいて8 μM未満の、上記アッセイにおいて7 μM未満の、上記アッセイにおいて6 μM未満の、上記アッセイにおいて5 μM未満の、上記アッセイにおいて4 μM未満の、上記アッセイにおいて3 μM未満の、上記アッセイにおいて2 μM未満の、上記アッセイにおいて1 μM未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～10 μMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

10

20

30

【0173】

特定の実施形態では、上記接触させる工程は、上記モジュレーターを上記個体に経口投与することを含む。

【0174】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

40

【0175】

第十五の局面では、本発明は、上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を特徴とし、この組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターを含むか、このモジュレーターから本質的になるか、またはこのモジュレーターからなり、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、第一の局面に従う方法を実施することにより同定される。

【0176】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激す

50

る化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、第三の局面による。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。

【0177】

特定の実施形態では、上記組成物は薬学的組成物である。特定の実施形態では、この薬学的組成物はRUP43 GPCRのモジュレーターを含む。特定の実施形態では、この薬学的組成物はRUP43 GPCRのモジュレーターから本質的になる。特定の実施形態では、この薬学的組成物はRUP43 GPCRのモジュレーターからなる。

10

【0178】

特定の実施形態では、上記組成物は生理学的に受容可能である。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターを含む。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターから本質的になる。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、RUP43 GPCRのモジュレーターからなる。

【0179】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、GPCRに選択的である。

【0180】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物3である。

20

【0181】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

30

【0182】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0183】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイ

40

50

において10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

10

20

【0184】

第十六の局面では、本発明はさらに、血中グルコース濃度を低下させる方法の特徴とし、この方法は、上記低下を必要とする個体に、第十五の局面の上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含する。

【0185】

本発明はまた、代謝障害を予防または処置する方法の特徴とし、この方法は、上記予防または処置を必要とする個体に、第十五の局面の上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含する。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

30

【0186】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

40

【0187】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法の特徴とし、この方法は、上記予防または処置を必要とする個体に、第十五の局面の上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含する。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；

50

- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0188】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

10

【0189】

特定の実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。

20

【0190】

特定の実施形態では、治療有効量の上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物が上記個体に提供または投与される。

【0191】

特定の実施形態では、上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供する工程または投与する工程は経口的である。

【0192】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

30

【0193】

第十七の局面では、本発明は、治療によるヒトまたは動物体の処置方法において使用するためのRUP43 GPCRのモジュレーターを特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、上記このモジュレーターは、第一の局面に従う方法を実施することにより同定される。

【0194】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記このモジュレーターは、第三の局面による。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。

40

【0195】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、GPCRに選択的である。

【0196】

50

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物 1 である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物 2 である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物 3 である。

【0197】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも 1 %、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、または少なくとも 45 % である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、または少なくとも 45 % である。

10

【0198】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0199】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M 未満、1 μ M 未満、100 nM 未満または 10 nM 未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM ~ 10 μ M の区間から選択される値未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM ~ 1 μ M の区間から選択される値未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM ~ 100 nM の区間から選択される値未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記 EC₅₀ は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号 2 もしくは配列番号 6 のアミノ酸配列を有する組換え RUP43 GPCR ポリペプチドを発現するトランスフェクトされた HEK293 細胞を用いて実施される細胞全体の cAMP アッセイ；および配列番号 2 もしくは配列番号 6 のアミノ酸配列を有する組換え RUP43 GPCR ポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 μ M 未満、1 μ M 未満、100 nM 未満または 10 nM 未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて 10 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 9 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 8 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 7 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 6 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 5 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 4 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 3 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 2 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 1 μ M 未満の、上記アッセイにおいて 900 nM 未満の、上記アッセイにおいて 800 nM 未満の、上記アッセイにおいて 700 nM 未満の、上記アッセイにおいて 600 nM 未満の、上記アッセイにおいて 500 nM 未満の、上記アッセイにおいて 400 nM 未満の、上記アッセイにおいて 300 nM 未満の、上記アッセイにおいて 200 nM 未満の、上記アッセイにおいて 100 nM 未満の、上記アッセイにおいて 90 nM 未満の、上記アッセイにおいて 80 nM 未満の、上記アッセイにおいて 70 nM 未満の、上記アッセイにおいて 60 nM 未満の、上記アッセイにおいて 50 nM 未満の、上記アッセイにおいて 40 nM 未満の、上記アッセイにおいて 30 nM 未満の、上記アッセイにおいて 20 nM 未満の、または上記アッセイにおいて 10 nM 未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM ~ 10 μ M の区間から選択される値未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM ~ 1 μ M の区間から選択される値未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM ~ 100 nM の区間から選択される値未満の EC₅₀ を有するアゴニストである。

20

30

40

50

【0200】

特定の実施形態では、上記動物は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である。ヒトまたは動物のうち、より好ましいのは、ヒトである。

【0201】

第十八の局面では、本発明は、治療によってヒトまたは動物体における血中グルコース濃度を低下させる方法において使用するためのRUP43 GPCRのモジュレーターを特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、上記このモジュレーターは、第一の局面に従う方法を実施することにより同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。

10

【0202】

本発明はまた、治療によってヒトまたは動物体における代謝障害を予防または処置する方法において使用するためのRUP43 GPCRのモジュレーターを特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、上記このモジュレーターは、第一の局面に従う方法を実施することにより同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

20

【0203】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

30

【0204】

本発明はまた、治療によってヒトまたは動物体において上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法において使用するための、RUP43 GPCRのモジュレーターを特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、第一の局面の方法に従う方法を実施することにより同定可能である。特定の実施形態では、上記このモジュレーターは、第一の局面に従う方法を実施することにより同定される。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

40

【0205】

50

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。 10

【0206】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記このモジュレーターは、第三の局面による。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。 20

【0207】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、GPCRに選択的である。

【0208】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物3である。

【0209】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。 30

【0210】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0211】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および 40 50

配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM～100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

【0212】

特定の実施形態では、上記動物は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である。ヒトまたは動物のうち、より好ましいのは、ヒトである。

【0213】

第十九の局面では、本発明は、血中グルコース濃度を低下させるための医薬の調製のためにRUP43 GPCRのモジュレーターを使用する方法を特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を最初に実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。

【0214】

本発明はまた、代謝障害の予防または処置のための医薬の調製のためにRUP43 GPCRのモジュレーターを使用する方法を特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0215】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特

定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

【0216】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置のための医薬の調製のためにRUP43 GPCRのモジュレーターを使用する方法を特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記方法は、第一の局面による方法を実施し、それによりこのモジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態では、このモジュレーターはアゴニストである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

10

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

20

【0217】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

30

【0218】

特定の実施形態では、このモジュレーターは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。特定の実施形態では、このモジュレーターはペプチドではない。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた脂肪細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、このモジュレーターは、哺乳動物から得られた骨格筋細胞によるグルコース取り込みを刺激する化合物である。特定の実施形態では、上記このモジュレーターは、第三の局面による。特定の実施形態では、上記モジュレーターは、アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストからなる群より選択される。特定の好ましい実施形態では、上記モジュレーターはアゴニストである。

40

【0219】

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、GPCRに選択的である。

【0220】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1、化合物2、または化合物3である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物1である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物2である。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、化合物3である。

【0221】

50

特定の実施形態では、上記モジュレーターは、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0222】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能なモジュレーターはさらに、血液-脳関門を越えることができる。

10

【0223】

いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。特定の実施形態では、上記EC₅₀は、以下からなる群より選択されるアッセイを用いて決定される：配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたHEK293細胞を用いて実施される細胞全体のcAMPアッセイ；および配列番号2もしくは配列番号6のアミノ酸配列を有する組換えRUP43 GPCRポリペプチドを発現するトランスフェクトされたメラニン保有細胞を用いて実施されるメラニン保有細胞アッセイ。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 μ M未満、1 μ M未満、100 nM未満または10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて10 μ M未満の、上記アッセイにおいて9 μ M未満の、上記アッセイにおいて8 μ M未満の、上記アッセイにおいて7 μ M未満の、上記アッセイにおいて6 μ M未満の、上記アッセイにおいて5 μ M未満の、上記アッセイにおいて4 μ M未満の、上記アッセイにおいて3 μ M未満の、上記アッセイにおいて2 μ M未満の、上記アッセイにおいて1 μ M未満の、上記アッセイにおいて900 nM未満の、上記アッセイにおいて800 nM未満の、上記アッセイにおいて700 nM未満の、上記アッセイにおいて600 nM未満の、上記アッセイにおいて500 nM未満の、上記アッセイにおいて400 nM未満の、上記アッセイにおいて300 nM未満の、上記アッセイにおいて200 nM未満の、上記アッセイにおいて100 nM未満の、上記アッセイにおいて90 nM未満の、上記アッセイにおいて80 nM未満の、上記アッセイにおいて70 nM未満の、上記アッセイにおいて60 nM未満の、上記アッセイにおいて50 nM未満の、上記アッセイにおいて40 nM未満の、上記アッセイにおいて30 nM未満の、上記アッセイにおいて20 nM未満の、または上記アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~10 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~1 μ Mの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。いくつかの実施形態では、上記モジュレーターは、上記アッセイにおいて、10 nM~100 nMの区間から選択される値未満のEC₅₀を有するアゴニストである。

20

30

40

【0224】

第二十の局面では、本発明は、上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を調製する方法を特徴とし、この方法は、第二の局面による化合物とキャリアとを混合する工程を包含する。

【0225】

50

特定の実施形態では、上記組成物は薬学的組成物である。特定の実施形態では、上記組成物は、生理学的に受容可能である。

【0226】

特定の実施形態では、上記化合物は経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

10

【0227】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0228】

第二十一の局面では、本発明は、上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を特徴とし、この組成物は、第二の局面による化合物を含むか、この化合物から本質的になるか、またはこの化合物からなる。

【0229】

特定の実施形態では、上記組成物は薬学的組成物である。特定の実施形態では、この薬学的組成物は、第二の局面による化合物を含む。特定の実施形態では、この薬学的組成物は、第二の局面による化合物から本質的になる。特定の実施形態では、この薬学的組成物は、第二の局面による化合物からなる。

20

【0230】

特定の実施形態では、上記組成物は生理学的に受容可能である。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、第二の局面による化合物を含む。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、第二の局面による化合物から本質的になる。特定の実施形態では、この生理学的に受容可能な組成物は、第二の局面による化合物からなる。

【0231】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

30

【0232】

特定の実施形態では、上記経口で生物学的に利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0233】

第二十二の局面では、本発明は、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含み、ここで、上記調節は、上記調節を必要とする個体における血中グルコースレベルを低下させるためであり、この方法は、上記レセプターを、治療有効量の第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物と接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二の局面による化合物との接触である。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物との接触である。

40

【0234】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実

50

施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0235】

特定の実施形態では、上記経口での生物学的利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0236】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

【0237】

第二十三の局面では、本発明は、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含み、ここで、上記調節は、上記調節を必要とする個体における代謝障害を予防または処置するためであり、この方法は、上記レセプターを、治療有効量の第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物と接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二の局面による化合物との接触である。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物との接触である。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0238】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

【0239】

本発明はまた、RUP43 GPCRの活性を調節する方法を特徴とし、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含み、ここで、上記調節は、上記調節を必要とする個体における上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するためであり、この方法は、上記レセプターを、治療有効量の第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物と接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二の局面による化合物との接触である。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物との接触である。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；

10

20

30

40

50

- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0240】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0241】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0242】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0243】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

【0244】

第二十四の局面では、本発明は、血中グルコース濃度の低下を必要とする個体において血中グルコース濃度を低下させる方法の特徴とし、この方法は、上記レセプターを、治療有効量の第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物をRUP43 GPCRと接触させる工程を包含し、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二の局面による化合物との接触である。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物との接触である。

【0245】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なく

とも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0246】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

10

【0247】

第二十五の局面では、本発明は、上記低減を必要とする個体において代謝障害を予防または処置する方法を特徴とし、この方法は、上記レセプターを、治療有効量の第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物と、RUP43 GPCRと接触させる工程を包含し、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二の局面による化合物との接触である。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物との接触である。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

20

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0248】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

30

【0249】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置を必要とする個体において上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置する方法を特徴とし、この方法は、上記レセプターを、治療有効量の第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物と、RUP43 GPCRと接触させる工程を包含し、上記レセプターはGPR131アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二の局面による化合物との接触である。特定の実施形態では、上記接触は、治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物との接触である。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

40

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；

50

- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0250】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0251】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0252】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0253】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

【0254】

第二十六の局面では、本発明は、血中グルコース濃度を低下させる方法の特徴とし、この方法は、上記低下を必要とする個体に第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含する。特定の実施形態では、上記化合物を提供または投与する工程は、第二の局面による化合物を提供または投与することである。特定の実施形態では、上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程は、第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与することである。

【0255】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0256】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0257】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

【0258】

第二十七の局面では、本発明は、代謝障害を処置する方法を特徴とし、この方法は、上記処置または予防を必要とする個体に、第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含する。特定の実施形態では、上記化合物を提供または投与する工程は、第二の局面による化合物を提供または投与することである。特定の実施形態では、上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程は、第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与することである。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0259】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

【0260】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症を処置する方法を特徴とし、この方法は、上記処置または予防を必要とする個体に、第二の局面による化合物または治療有効量の第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程を包含する。特定の実施形態では、上記化合物を提供または投与する工程は、第二の局面による化合物を提供または投与することである。特定の実施形態では、上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与する工程は、第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物を提供または投与することである。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

【0261】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

10

【0262】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

20

【0263】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0264】

特定の実施形態では、上記個体は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記個体は非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、非ヒト霊長類またはヒトである。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。最も好ましいのはヒトである。

【0265】

第二十八の局面では、本発明は、治療によるヒトまたは動物体の処置方法において使用するための第二の局面による化合物を特徴とする。

30

【0266】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

40

【0267】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0268】

特定の実施形態では、上記動物は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である。ヒトまたは動物のうち、より好ましいのは、ヒトである。

【0269】

第二十九の局面では、本発明は、治療によるヒトまたは動物体における血中グルコース濃度を低下させる方法において使用するための第二の局面による化合物を特徴とする。

50

【0270】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0271】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。 10

【0272】

特定の実施形態では、上記動物は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である。ヒトまたは動物のうち、より好ましいのは、ヒトである。

【0273】

第三十の局面では、本発明は、治療によるヒトまたは動物体における代謝障害の予防または処置の方法において使用するための第二の局面による化合物を特徴とする。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

20

【0274】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。 30

【0275】

本発明はまた、治療によるヒトまたは動物体における上昇した血中グルコース濃度の合併症の予防または処置の方法において使用するための第二の局面による化合物を特徴とする。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

40

【0276】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群Xである。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の 50

実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

【0277】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0278】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0279】

特定の実施形態では、上記動物は哺乳動物である。特定の実施形態では、上記哺乳動物は、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、または非ヒト霊長類である。ヒトまたは動物のうち、より好ましいのは、ヒトである。

【0280】

第三十一の局面では、本発明は、血中グルコース濃度の低減のための医薬の調製のために第二の局面による化合物を使用する方法を特徴とする。

【0281】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0282】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0283】

第三十二の局面では、本発明は、代謝障害の予防または処置のための医薬の調製のために第二の局面による化合物を使用する方法を特徴とする。特定の実施形態では、この代謝障害は、以下からなる群より選択される：

- (a) 糖尿病；
- (b) グルコース寛容減損；
- (c) インスリン抵抗性；および
- (d) 高インスリン血症。

【0284】

いくつかの実施形態では、糖尿病は1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態では、糖尿病は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は1型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害は2型糖尿病である。特定の実施形態では、この代謝障害はグルコース寛容減損である。特

定の実施形態では、この代謝障害はインスリン抵抗性である。特定の実施形態では、この代謝障害は高インスリン血症である。特定の実施形態では、この代謝障害は、この個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

【0285】

本発明はまた、上昇した血中グルコース濃度の合併症を予防または処置するための医薬の調製のために第二の局面による化合物を使用する方法を特徴とする。特定の実施形態では、この合併症は、以下からなる群より選択される：

- (a) 症候群 X；
- (b) アテローム性動脈硬化症；
- (c) アテローム性疾患；
- (d) 心臓病；
- (e) 高血圧症；
- (f) 発作；
- (g) ニューロパシー；
- (h) 網膜症；
- (i) 腎症；および
- (j) 末梢脈管疾患。

10

【0286】

心臓病としては、心不全、冠状動脈不全、冠状動脈疾患、および高血圧が挙げられるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、この合併症は症候群 X である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態では、この合併症はアテローム性疾患である。特定の実施形態では、この合併症は心臓病である。特定の実施形態では、この合併症は心不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈不全である。特定の実施形態では、この合併症は冠状動脈疾患である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧である。特定の実施形態では、この合併症は高血圧症である。特定の実施形態では、この合併症は発作である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は網膜症である。特定の実施形態では、この合併症はニューロパシーである。特定の実施形態では、この合併症は末梢脈管疾患である。特定の実施形態では、この合併症は多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態では、この合併症は高脂血症である。

20

30

【0287】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも 1 %、少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 15 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、または少なくとも 45 % である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 30 %、少なくとも 35 %、少なくとも 40 %、または少なくとも 45 % である。

【0288】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

40

【0289】

第三十三の局面では、本発明は、RUP43 GPCR を調節する方法を特徴とし、上記レセプターは、GPR131 アミノ酸配列を含み、この方法は、上記レセプターを、第二の局面による化合物または第二十一の局面による上記薬学的組成物もしくは生理学的に受容可能な組成物と接触させる工程を包含する。特定の実施形態では、上記接触は、第二の局面による化合物との接触である。特定の実施形態では、上記接触は、第二十一の局面による上記薬学的組成物または生理学的に受容可能な組成物との接触である。

【0290】

特定の実施形態では、上記化合物は、経口で生物学的に利用可能である。いくつかの実

50

施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。いくつかの実施形態では、上記経口での生物学的利用可能性は、腹腔内投与と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、または少なくとも45%である。

【0291】

特定の実施形態では、上記経口で利用可能な化合物はさらに、血液-脳関門を越えることができる。

【0292】

第三十四の局面では、本発明は、1以上の候補化合物をRUP43 GPCRに結合する化合物と同定する方法を特徴とし、このレセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、この方法は、(a)このレセプターを、この候補化合物の存在下または非存在下で、該レセプターの検出可能に標識されたGFCRの公知のリガンドと接触させる工程；および(b)上記標識されたリガンドの結合が、この候補化合物の存在下で阻害されるか否かを決定する工程を包含し；ここで、上記阻害は、この候補化合物が、RUP43 GPCRに結合する化合物であることを示す。

【0293】

特定の実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、以下からなる群より選択される：

- (a) 配列番号2のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号2のアミノ酸2-330；
- (c) RUP43 Gタンパク質共役レセプターが配列番号2のアミノ酸1位のメチオニン残基を含まない、配列番号2のアミノ酸2-330；
- (d) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、この核酸配列は、ヒトDNAサンプルについて、配列番号3のプライマーおよび配列番号4のプライマーを用いてPCRを行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；
- (e) 配列番号6のアミノ酸配列；
- (f) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、この核酸配列は、ヒトDNAサンプルについて、配列番号7のプライマーおよび配列番号8のプライマーを用いてPCRを行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；
- (g) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号2のアミノ酸配列；
- (h) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号2のアミノ酸2-330；
- (i) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されており、ただし、前記RUP43 Gタンパク質共役レセプターが配列番号2のアミノ酸1位のメチオニン残基を含まない、配列番号2のアミノ酸2-330；および
- (j) ストリンジェントな条件下で配列番号1の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列。

【0294】

特定の実施形態では、このRUP43 GPCRは組換え体である。特定の実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRを発現する宿主細胞またはこのGPCRを発現する宿主細胞の膜と接触させることを含む。特定の実施形態では、上記GPCRを発現する宿主細胞は、このレセプターをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

【0295】

いくつかの実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列である。いくつかの実施形態では、この G P R 1 3 1 アミノ酸配列は、配列番号 2 のアミノ酸配列の改変体である。いくつかの実施形態では、上記配列番号 2 のアミノ酸配列の改変体は、上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体または哺乳動物オルソログである。いくつかの実施形態では、上記配列番号 2 のアミノ酸配列の改変体は、上記アミノ酸配列または上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログの、非内因性の構成的に活性化された変異体である。特定の実施形態では、上記配列番号 2 のアミノ酸配列の改変体は、上記アミノ酸配列または上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログの生物学的に活性なフラグメントである。特定の実施形態では、配列番号 2 のアミノ酸配列または配列番号 2 のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログの上記生物学的に活性なフラグメントは、N 末端メチオニンのない、配列番号 2 のアミノ酸配列または配列番号 2 のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログである。特定の実施形態では、上記配列番号 2 のアミノ酸配列の改変体は、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98% または少なくとも約 99% 同一である。いくつかの実施形態では、上記配列番号 2 のアミノ酸配列の改変体は、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98% または少なくとも約 99% 同一である。

10

20

【0296】

特定の実施形態では、上記膜調製物は、Brinkman Polyttron[®]での細胞の均質化によって作製される。特定の実施形態では、上記膜調製物は、上記 polytron の各々 10~20 秒間の持続期間の 3 回のバーストを用いた均質化によって作製される。

【0297】

特定の実施形態では、上記候補化合物は抗体でもその誘導体でもない。

【0298】

特定の実施形態では、上記候補化合物はペプチドではない。

【0299】

特定の実施形態では、上記公知のリガンドは第二の局面による化合物である。

30

【0300】

特定の実施形態では、上記公知のリガンドは、第三の局面によるモジュレーターである。

【0301】

特定の実施形態では、上記公知のリガンドは、化合物 1、化合物 2、または化合物 3 である。特定の実施形態では、上記公知のリガンドは化合物 1 である。特定の実施形態では、上記公知のリガンドは化合物 2 である。特定の実施形態では、上記公知のリガンドは化合物 3 である。

【0302】

特定の実施形態では、上記公知のリガンドは、GPCR に特異的な抗体、またはこの抗体の抗原結合誘導体である。

40

【0303】

特定の実施形態では、上記標識は、以下からなる群より選択される：

- (a) 放射性同位体；
- (b) 酵素；および
- (c) 発蛍光団。

【0304】

特定の実施形態では、上記標識は放射性同位体である。特定の実施形態では、上記標識は、³H、¹⁴C、³⁵S、および ¹²⁵I からなる群より選択される。

50

【0305】

化合物1、化合物2、または化合物3は、以下の当該分野で公知の技術を用いて放射標識され得る。特定の実施形態では、化合物1、化合物2、または化合物3は、 ^3H または ^{14}C で放射標識される。

【0306】

他の実施形態では、上記方法は、標識された第一の公知のリガンドの結合の、この候補化合物による阻害レベルを、上記標識された第一の公知のリガンドの結合の、このGPCRに結合することが公知の第二のリガンドによる第二の阻害レベルに対して比較する工程をさらに包含する。

【0307】

第三十五の局面では、本発明は、RUP43 GPCRに結合するリガンドを決定するための方法の特徴とし、上記レセプターは、GPR131アミノ酸配列を含み、この方法は、以下の工程を包含する：試験リガンドを、上記レセプターと上記試験リガンドとの間の相互作用を許容する条件下で、上記レセプターを発現する宿主細胞または上記レセプターを発現する宿主細胞の膜と接触させる工程；および上記レセプターに結合したリガンドを検出する工程。

【0308】

特定の実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、以下からなる群より選択される：

- (a) 配列番号2のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号2のアミノ酸2-330；
- (c) RUP43 Gタンパク質共役レセプターが配列番号2のアミノ酸1位のメチオニン残基を含まない、配列番号2のアミノ酸2-330；
- (d) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、この核酸配列は、ヒトDNAサンプルについて、配列番号3のプライマーおよび配列番号4のプライマーを用いてPCRを行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；
- (e) 配列番号6のアミノ酸配列；
- (f) 核酸配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列であって、この核酸配列は、ヒトDNAサンプルについて、配列番号7のプライマーおよび配列番号8のプライマーを用いてPCRを行うことを含むプロセスによって入手可能である、アミノ酸配列；
- (g) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号2のアミノ酸配列；
- (h) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されている、配列番号2のアミノ酸2-330；
- (i) 配列番号2のアミノ酸223位のアラニンがリジンに置換されており、ただし、前記RUP43 Gタンパク質共役レセプターが配列番号2のアミノ酸1位のメチオニン残基を含まない、配列番号2のアミノ酸2-330；および
- (j) ストリンジェントな条件下で配列番号1の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされる、Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列。

【0309】

いくつかの実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、このGPR131アミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸配列の改変体である。いくつかの実施形態では、上記配列番号2のアミノ酸配列の改変体は、上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体または哺乳動物オルソログである。いくつかの実施形態では、上記配列番号2のアミノ酸配列の改変体は、上記アミノ酸配列または上記アミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物

10

20

30

40

50

オルソログの生物学的に活性なフラグメントである。特定の実施形態では、配列番号2のアミノ酸配列または配列番号2のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログの上記生物学的に活性なフラグメントは、N末端メチオニンのない、配列番号2のアミノ酸配列または配列番号2のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体もしくは哺乳動物オルソログである。特定の実施形態では、上記配列番号2のアミノ酸配列の改変体は、配列番号2のアミノ酸配列に対して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%同一である。いくつかの実施形態では、上記配列番号2のアミノ酸配列の改変体は、配列番号2のアミノ酸配列に対して、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%同一である。

【0310】

特定の実施形態では、このRUP43 GPCRは組換え体である。特定の実施形態では、上記接触させる工程は、このGPCRを発現する宿主細胞またはこのGPCRを発現する宿主細胞の膜と接触させることを含む。特定の実施形態では、上記GPCRを発現する宿主細胞は、このレセプターをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

【0311】

特定の実施形態では、上記試験リガンドは、抗体でもその抗原結合誘導体でもない。

【0312】

特定の実施形態では、上記試験リガンドはペプチドではない。

【0313】

特定の実施形態では、上記膜調製物は、Brinkman Polyttron0での細胞の均質化によって作製される。特定の実施形態では、上記膜調製物は、上記polyttronの各々10～20秒間の持続期間の3回のバーストを用いた均質化によって作製される。

【0314】

特定の実施形態では、上記試験リガンドは標識される。特定の実施形態では、上記標識は放射性同位体である。特定の実施形態では、上記標識は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、および ^{125}I からなる群より選択される。

【0315】

出願人は、本発明の実施形態のいずれから、あらゆる1以上の候補化合物を排除する権利を確保する。出願人はまた、本発明の実施形態のいずれから、あらゆる1以上のモジュレーターを排除する権利を確保する。出願人は、本発明の実施形態のいずれから、任意のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを排除する権利を確保する。出願人はさらに、あらゆる代謝障害または上昇した血中グルコース濃度のあらゆる合併症を排除する権利を確保する。本発明の代謝障害が、個々に、または任意の組合せのいずれにおいても、実施形態に含まれ得ることもまた明白に意図される。本発明の上昇した血中グルコース濃度の合併症が、個々に、または任意の組合せのいずれにおいても、実施形態に含まれ得ることもまた明白に意図される。

【0316】

本願を通して、種々の刊行物、特許および公開された特許出願が引用される。本願において参照されたこれらの刊行物、特許および公開された特許出願の開示は、それらの全体が本開示において参考として援用される。本明細書で出願人が刊行物、特許または公開された特許出願を引用したことは、出願人が上記刊行物、特許または公開された特許出願を先行技術として認めたということではない。

【0317】

当業者の範囲内にある、開示された発明の改変および拡張は、上記開示および特許請求

の範囲に含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0318】

(詳細な説明)

(定義)

レセプター周辺で発展してきた科学文献は、レセプターに対して種々の影響を有するリガンドを言及するために多数の用語を適応させた。明確さおよび一貫性のために、以下の定義が、本特許文書全体を通して用いられる。これらの定義がこれらの用語についての他の定義と矛盾しない程度まで、以下の定義が優先する：

「アゴニスト」は、レセプターに結合した際に細胞内応答を活性化する物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味するものとする。いくつかの実施形態では、アゴニストは、レセプターに結合する際に細胞内応答を活性化する（例えば、膜へのGTPγS結合を増強するかまたは細胞内cAMPレベルを上昇させる）ことが以前には公知でなかった物質である。いくつかの実施形態では、アゴニストは、レセプターに結合する際に、哺乳動物から得た脂肪細胞または骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを刺激することが以前には公知でなかった物質である。

10

【0319】

本明細書中で用いられるアミノ酸の略号を表Aに示す：

【0320】

【表1A】

20

表A

アラニン	ALA	A
アルギニン	ARG	R
アスパラギン	ASN	N
アスパラギン酸	ASP	D
システイン	CYS	C
グルタミン酸	GLU	E
グルタミン	GLN	Q
グリシン	GLY	G
ヒスチジン	HIS	H
イソロイシン	ILE	I
ロイシン	LEU	L
リジン	LYS	K
メチオニン	MET	M
フェニルアラニン	PHE	F
プロリン	PRO	P
セリン	SER	S
トレオニン	THR	T
トリプトファン	TRP	W
チロシン	TYR	Y
バリン	VAL	V

30

40

「アンタゴニスト」は、アゴニストと同じ部位でレセプターに競合的に結合するが、細胞内応答を活性化せず、それによってアゴニストにより誘発される細胞内応答を阻害し得る、物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味するものとする。アンタゴニストは、アゴニストの非存在下ではベースラインの細胞内応答を減少させない。いくつかの実施形態では、アンタゴニストは、レセプターに結合した際にアゴニストと競合して細胞応答を

50

阻害することが以前には公知でなかった物質である（例えば、細胞応答は、膜への G T P γ S 結合または細胞内 c A M P レベルの上昇である）。

【0321】

「抗体」は、本明細書中では、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を包含することが意図される。抗体はさらに、I g G、I g A、I g D、I g E、および I g M を包含することが意図される。抗体は、抗体全体（単鎖抗体の全体が挙げられる）およびそれらの抗原結合フラグメント（F a b、F a b'、F（a b）₂および F（a b'）₂が挙げられる）を包含する。抗体は、任意の動物期限であり得る。好ましくは、抗体は、ヒト、ネズミ（murine）、ウサギ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ラクダ、ロバ、ヒツジ、ウマまたはニワトリの抗体である。好ましくは、抗体は、 5×10^{-6} M 未満、 10^{-6} M 未満、 5×10^{-7} M 未満、 10^{-7} M 未満、 5×10^{-8} M 未満、 10^{-8} M 未満、 5×10^{-9} M 未満、 10^{-9} M 未満、 5×10^{-10} M 未満、 10^{-10} M 未満、 5×10^{-11} M 未満、 10^{-11} M 未満、 5×10^{-12} M 未満、 10^{-12} M 未満、 5×10^{-13} M 未満、 10^{-13} M 未満、 5×10^{-14} M 未満、 10^{-14} M 未満、 5×10^{-15} M 未満および 10^{-15} M 未満の解離定数すなわち K d 値を有する結合親和性を有する。本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法により調製され得る。抗体の誘導体は、抗原結合フラグメントを包含するがこれに限定されないことが意図される。

【0322】

G P C R のポリペプチドまたはアミノ酸配列の「生物学的に活性なフラグメント」とは、天然に存在する G P C R の構造的機能および生化学的機能を有する、このポリペプチドまたはアミノ酸配列のフラグメントを意味するものとする。特定の実施形態では、この生物学的に活性なフラグメントは、G タンパク質と共役する。特定の実施形態では、この生物学的に活性なフラグメントは、内因性リガンドに結合する。

【0323】

「候補化合物」とは、スクリーニング技術に従う分子（例えば、化合物であるがこれに限定されない）を意味するものとする。

【0324】

化学基、部分またはラジカル：

用語「C₁ - ₆ アルキル」とは、示した数の炭素を含む、直鎖または分枝鎖の炭素ラジカルを示す。例えば、いくつかの実施形態では、アルキルは、「C₁ - ₄ アルキル」であり、そしてこの基は 1 ~ 4 個の炭素を含み、なお他の実施形態では、アルキルは、「C₂ - ₆ アルキル」であり、そしてこの基は 2 ~ 6 個の炭素を含む。アルキルは、いくつかの実施形態では、1 ~ 3 個の炭素を含み、いくつかの実施形態では、1 ~ 2 個の炭素を含み、そしていくつかの実施形態では、1 個の炭素を含む。アルキルの例としては、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、sec-ブチル、n-ペンチル、iso-ペンチル、sec-ペンチル、neo-ペンチル、ヘキシル、iso-ヘキシル、sec-ヘキシル、neo-ヘキシルなどが挙げられるがこれらに限定されない。

【0325】

用語「ハロゲン」または「ハロ」は、フルオロ基、クロロ基、ブロモ基またはヨード基を示す。

【0326】

「コドン」とは、リン酸基に結合したヌクレオシド [アデノシン (A)、グアノシン (G)、シチジン (C)、ウリジン (U) およびチミジン (T)] を一般に含み、翻訳された場合にアミノ酸をコードする、3 ヌクレオチド（またはヌクレオチドの等価物）の群を意味するものとする。

【0327】

「組成物」とは、少なくとも 1 つの成分を含む物質を意味する。「薬学的組成物」とは、組成物の例である。

10

20

30

40

50

【0328】

「化合物の効力」とは、レセプターの機能を化合物が阻害または刺激する能力（すなわち、レセプター結合活性とは対照的に、シグナル伝達経路を活性化／阻害する能力）の尺度を意味するものとする。化合物の効力を検出する例示的な手段は、本特許文書の実施例の節に開示される。

【0329】

「を含む、から本質的になる、およびからなる」は、それらの標準的な意味に従って本明細書中で定義される。米国審査便覧（M. P. E. P.）に示される定義される意味は、当該分野における定義された意味よりも優先し、そして統制巡回連邦判例法（c o n t r o l l i n g F e d e r a l C i r c u i t c a s e l a w）に示される定義された意味は、米国審査便覧に示される意味よりも優先する。 10

【0330】

「構成的に活性なレセプター」とは、そのリガンドまたはその化学的等価物へのレセプターの結合によること以外の手段により活性状態で安定化されたレセプターを意味するものとする。構成的に活性なレセプターは、内因性であってもよく、または非内因性であってもよい。

【0331】

「構成的に活性化されたレセプター」とは、構成的に活性であるように改変された内因性レセプターを意味する。

【0332】

「構成的なレセプター活性化」とは、そのリガンドまたはその化学的等価物への結合なしでのレセプターの活性化を意味する。 20

【0333】

「接触」、または「接触する」とは、インビトロ系においてであろうとインビボ系においてであろうと、少なくとも2つの部分を合わせることを意味する。

【0334】

「減少する（d e c r e a s e）」は、測定可能な量での減少を指すために使用され、そして用語「低下する（r e d u c e）」、「低減する（d i m i n i s h）」、「下がる（l o w e r）」および「減る（l e s s e n）」と同義的に使用される。

【0335】

「上昇した血中グルコース濃度」とは、哺乳動物における、その哺乳動物にとっての正常な空腹時血中グルコース濃度よりも高い空腹時血中グルコース濃度を意味する。例として、正常ヒト空腹時血中グルコース濃度は、100mg/dl未満である。本明細書において使用される場合、上昇したヒト血中グルコース濃度は、100mg/dl以上の空腹時血中グルコース濃度である。例としてであり限定ではなく、上昇した血中グルコース濃度は、高グルコース血症を包含する。 30

【0336】

「内因性」とは、哺乳動物が天然に産生する物質を意味する。内因性に関して、例としてであり限定ではなく、用語「レセプター」は、哺乳動物（例としてであり限定ではなく、ヒト）によって天然に産生されたものを意味する。内因性は、遺伝子の対立遺伝子改変体ならびにそれにコードされた対立遺伝子のポリペプチド改変体を包含すると理解される。本明細書において使用される場合、「内因性GPCR」および「ネイティブGPCR」は、交換可能に使用される。対照的に、この状況における用語、非内因性は、哺乳動物（例としてであり限定ではなく、ヒト）によって天然に産生されないものを意味する。例としてであり限定ではなく、その内因性形態において構成的に活性でないが、操作される場合に構成的に活性になるレセプターは、最も好ましくは、本明細書において「非内因性の、構成的に活性化されたレセプター」と称される。 40

【0337】

「発現ベクター」は、本明細書において、上記発現ベクターについての適切な宿主細胞組換え体における、クローニングされたDNAの転写のためおよび転写されたmRNAの 50

翻訳のために必要とされるDNA配列として定義される。適切に構築された発現ベクターは、宿主細胞における自律的複製のための複製起点、選択マーカー、限定された数の有用な制限酵素部位、高コピー数となる可能性、および活性プロモーターを含む。転写されるべき上記クローニングされたDNAは、上記発現ベクター内で構成的にまたは条件的に活性なプロモーターに作動可能に結合されている。例示としてであり限定としてではなく、pCMVは発現ベクターである。

【0338】

「Gタンパク質共役レセプター融合タンパク質」および「GPCR融合タンパク質」は、本明細書において開示される本発明の状況において、各々、少なくとも1つのGタンパク質（最も好ましくは、このようなGタンパク質のαサブユニット（これは、GTPに結合するサブユニットである））に融合された、内因性の構成的に活性なGPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRを含む、非内因性タンパク質を意味する（好ましくは、Gタンパク質は、天然で内因性GPCRに結合するGタンパク質と同じ型である）。例としてであり限定としてではなく、内因性状態において、Gタンパク質「Gsα」が、GPCRに結合する優勢なGタンパク質である場合、特定のGPCRに基づくGPCR融合タンパク質は、Gsαに融合したGPCRを含む非内因性タンパク質であり；一部の環境では、以下に示すように、GPCRに融合され得る非優勢のGタンパク質である。Gタンパク質は、構成的に活性なGPCRのC末端に直接的に融合され得るか、またはそれら2つの間にスペーサーが存在し得る。

【0339】

「宿主細胞」は、それに組み込まれるベクター有し得る細胞を意味する。特定の実施形態において、ベクターは、発現ベクターである。例示的宿主細胞としては、293細胞、293T細胞、CHO細胞、MCB3901細胞、およびCOS-7細胞ならびにメラニン保有細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0340】

「予防または処置の必要がある」とは、本明細書において使用される場合、ヒトにおいては介護者（例えば、医師、看護師、ナースプラクティショナーなど）によって、動物（非ヒト哺乳動物が挙げられる）においては獣医によってなされる、個体もしくは動物が処置を必要とするかまたはその処置から利益を受けるという判断を指す。この判断は、介護者の専門的意見の領域であるが、個体または動物が病気であるか病気になり、結果として本発明の化合物によって処置可能な状態であるという知見を含む、種々の要因に基づいてなされる。

【0341】

本明細書において使用される場合、「個体」とは、哺乳動物（好ましくは、マウス、ラット、他のげっ歯類、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、または霊長類、最も好ましくはヒト）を含む、任意の動物を指す。

【0342】

「阻害」または「阻害する」とは、用語「反応（応答）」に関連して、化合物の非存在下に対して、化合物の存在下で、反応が減少または防止されることを意味する。

【0343】

「グルコース寛容減損（IGT）」は、本明細書において使用される場合、明白な2型糖尿病と正常なグルコース寛容（NGT）との中間であるインスリン抵抗性に関連する条件を示すことを意図される。IGTは、罹患した人物の食後グルコース反応が、食後2時間での血漿グルコースレベルによって評価される場合に異常であると決定される手順によって診断される。この試験において、測定された量のグルコースが患者に与えられ、血中グルコースレベルが、定期的な間隔（通常、最初の2時間は30分毎、その後1時間毎）で測定される。「正常」な、または非IGTの個体において、最初の2時間のグルコースレベルは、140mg/dl未満まで上昇し、次いで急速に低下する。IGT個体においては、血中グルコースレベルは、より高く上昇し、そしてよりゆっくりとした速度で落ちる。

10

20

30

40

50

【0344】

「インスリン抵抗性」は、本明細書において使用される場合、多くの方法のいずれかによって行われるインスリン抵抗性の通常の診断を包含することを意図される。上記方法としては、静脈内グルコース寛容試験または空腹時インスリンレベルの測定が挙げられるが、これらに制限されない。空腹時インスリンレベルとインスリン抵抗性の程度との間に強い相関が存在することは、周知である。したがって、高い空腹時インスリンレベルを、正常なグルコース寛容（NGT）個体がインスリン抵抗性を有することを同定する目的のため、インスリン抵抗性の代理のマーカーとして使用することができる。インスリン抵抗性の診断はまた、オイグリセミックグルコースクランプ試験を使用して行われ得る。

【0345】

「逆アゴニスト」は、レセプターの内因性形態または構成的に活性化された形態のいずれかに結合して、アゴニストの非存在下で観察されるそのレセプターのベースラインの細胞内応答を低下させる物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。

【0346】

「単離された」とは、物質がその本来の環境（例えば、それが天然に存在する場合、天然の環境）から取り出されていること意味する。例えば、生きた動物中に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然の系に共存する物質の一部もしくは全てから分離された同じポリヌクレオチドまたはDNAまたはポリペプチドは、単離されている。このようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であり得、および／またはこのようなポリヌクレオチドもしくはポリペプチドは、組成物の一部であり得る。そしてベクターもしくは組成物が天然の環境の一部にない場合、やはり単離されている。

【0347】

「リガンド」とは、GPCRに特異的に結合する分子を意味する。リガンドは、例えば、ポリペプチド、脂質、小分子、抗体であり得る。内因性リガンドは、ネイティブGPCRに対する内因性の天然リガンドである。リガンドは、GPCR「アンタゴニスト」、「アゴニスト」、「部分アゴニスト」、または「逆アゴニスト」などであり得る。

【0348】

本明細書において使用される場合、用語「調節する」または「改変する」は、特に活性、機能または分子の、量、質、または効果の増加または減少を指すことを意味する。例示であって限定ではなく、Gタンパク質共役レセプターのアゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、およびアンタゴニストは、そのレセプターのモジュレーターである。

【0349】

「部分アゴニスト」とは、それがレセプターに結合する場合、完全アゴニストが活性化するより少ない程度で細胞内応答を活性化する物質（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。

【0350】

「薬学的組成物」とは、少なくとも1種の活性成分を含有する組成物を意味する。これによって、この組成物は、哺乳動物（例えば、限定ではなく、ヒト）における特定の効果のある結果についての調査を受けることができる。当業者は、活性成分が当業者の必要性に基づく所望の効果のなる結果を有するか否かを決定するのに適切な技術を、理解および認識する。

【0351】

「ポリヌクレオチド」とは、1より多くのヌクレオチドの、短鎖形態もしくは二重鎖形態の、RNA配列、DNA配列、RNA/DNAハイブリッド配列を意味する。本発明のポリヌクレオチドは、任意の公知の方法によって（合成、組換え、エキソビボ生成、またはこれらの組み合わせ、および当該分野で公知の任意の精製方法を使用して）調製され得る。

【0352】

「ポリペプチド」は、ポリマーの長さに関係なく、アミノ酸のポリマーを指す。したが

10

20

30

40

50

って、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質は、ポリペプチドの定義に含まれる。この用語はまた、ポリペプチドの翻訳後修飾を特定化も排除もしない。例えば、グリコシル基、アセチル基、リン酸基、脂質基などの共有結合を含むポリペプチドは、明確に、用語ポリペプチドによって包含される。

【0353】

「プライマー」は、標的ヌクレオチド配列に相補的であり、標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズするために使用される、特定のオリゴヌクレオチド配列を示すために、本明細書において使用される。プライマーは、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、または逆転写酵素によって触媒されるヌクレオチド重合のための開始点として機能する。

【0354】

「精製された」、とは、他の化合物から分離された本発明のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドベクターを記載するために本明細書において使用される。他の化合物としては、他の核酸、炭水化物、脂質およびタンパク質（例えば、ポリヌクレオチドの合成に使用される酵素）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、サンプルの少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%または、少なくとも約99.5%が単一のポリヌクレオチド配列を含む場合、実質的に純粋である。いくつかの実施形態において、実質的に純粋なポリヌクレオチドは、代表的に、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは、約99.5%重量/重量のポリヌクレオチドサンプルを含む。

【0355】

同様に、用語精製されたとは、他の化合物から分離された本発明のポリペプチドを記載するために本明細書において使用される。他の化合物としては、核酸、脂質、炭水化物、および他のタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、ポリペプチドは、サンプルのポリペプチドの少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくは少なくとも約99.5%が単一のアミノ酸配列を有する場合、実質的に純粋である。いくつかの実施形態において、実質的に純粋なポリペプチドは、代表的に、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%もしくは約99.5%重量/重量のタンパク質サンプルを含む。

【0356】

同様に、用語精製されたとは、本発明のモジュレーターを記載するために本明細書において使用される。特定の実施形態において、実質的に純粋なモジュレーターは、代表的に、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくは少なくとも約99.5%重量/重量の上記モジュレーターの調製物を含む。特定の実施形態において、このモジュレーターは、任意の数から小数点以下第3位の範囲に及ぶ、90%と100%との間（例えば、少なくとも99.995%純粋）の「最低」純度を有する。

【0357】

さらに、本明細書において使用される場合、用語精製されたは、絶対的純度を必要とせず、むしろ相対的な定義であると意図される。

【0358】

「レセプター機能性」は、刺激を受容して細胞の効果（遺伝子転写の調節、イオン流の調節、触媒作用の実行、および/またはGタンパク質を介した調節性活性が挙げられるが、これらに限定されない）を調節する、レセプターの正常な働きを指す。

【0359】

「セカンドメッセンジャー」とは、レセプター活性化の結果として生じる細胞内応答を

10

20

30

40

50

意味する。セカンドメッセンジャーとしては、例えば、イノシトール三リン酸（ IP_3 ）、ジアシルグリセロール（DAG）、サイクリックAMP（cAMP）、サイクリックGMP（cGMP）、MAPキナーゼ活性、および Ca^{2+} が挙げられ得る。セカンドメッセンジャー応答は、レセプター活性化の決定に関して測定され得る。さらに、セカンドメッセンジャー応答は、候補化合物を（例えば、逆アゴニスト、部分アゴニスト、アゴニスト、およびアンタゴニストとして）同定するために測定され得る。

【0360】

「信号雑音比」とは、活性化、増幅または刺激に応じてシグナルが生成され、このシグナルが、バックグラウンドのノイズまたは非活性化、非増幅、非刺激に応じた基本レベルより上であることを意味する。

10

【0361】

「スパーサー」は、遺伝子（例えば、目的のGPCR）の最後のコドンもしくは最後のアミノ酸の後ろに位置するが、その目的のGタンパク質の開始コドンまたは開始領域の前に位置する、翻訳された数のアミノ酸を意味する。ここで、この翻訳された数のアミノ酸は、フレーム内に位置し、目的のGタンパク質の開始領域を有する。この翻訳されたアミノ酸の数は、1つ、2つ、3つ、4つなどであり得、12個までであり得る。

【0362】

「刺激」または「刺激する」とは、用語「応答」に関する場合、化合物の非存在下に対して化合物の存在下で応答が増加することを意味する。

【0363】

20

「被験体」とは、霊長類（ヒトおよびヒヒがあげられるが、これらに限定されない）、ならびにペット動物（例えば、イヌ、ネコ、ラットおよびマウスのような実験室動物）、ならびにウマ、ヒツジ、および牝ウシのような家畜を意味する。

【0364】

「治療有効量」とは、本明細書において使用される場合、研究者、獣医、医師または他の医療従事者によって探索されるべき、組織、系、動物、個体もしくはヒトにおいて生物学的または医学的な反応を誘発する、活性化化合物または薬学的因子の量を指す。上記反応としては、以下の1つ以上が挙げられる：（1）疾患の予防；例えば、その疾患、状態または障害を被る傾向にあり得るが、まだその疾患の病因または症候を経験または表していない個体における疾患、状態または障害の予防、（2）疾患の阻害；例えば、その疾患の病因または症候を経験または表していない個体における疾患、状態または障害の阻害（すなわち、病因および／または症候のさらなる発達の停止）、ならびに（3）疾患の改善；例えば、その疾患の病因または症候を経験または表していない個体における疾患、状態または障害の改善（すなわち、病因および／または症候の逆転）。

30

【0365】

本明細書において使用される用語としての「改変体」は、それぞれ参照ポリヌクレオチドまたは参照ポリペプチドとは異なるが本質的な特徴を保持する、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの代表的改変体は、別の参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なる。改変体のヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させていても、変化させていなくともよい。ポリペプチドの代表的改変体は、別の参照ポリペプチドとアミノ酸配列が異なる。改変体ポリペプチドと参照ポリペプチドとは、1つ以上の置換、付加、欠失の任意の組み合わせによって、アミノ酸配列が異なり得る。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの改変体は、対立遺伝子改変体のような天然に存在する改変体であり得るか、またはそれは、天然に存在することが知られていない改変体であり得る。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない改変体は、突然変異誘発または直接的合成によって作製され得る。

40

（導入）

以下のセクションの順序は、提示上の効果のために示されており、以下の開示または特許請求の範囲の限定として意図されてはおらず、解釈もされるべきでない。

50

(B. レセプター発現)

(1. 目的のGPCRポリペプチド)

本発明のRUP43 GPCRは、GPR131アミノ酸配列を含む。本明細書において使用される場合、「GPR131アミノ酸配列」は、配列番号2の内因性ヒトGPR131アミノ酸配列、および配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%同一な、改変体アミノ酸配列を包含することを意図される。言い換えると、配列番号2のアミノ酸配列の改変体を含むGPCRはまた、本方法に使用され得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得るGPCRは、配列番号2のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体を含み得る。特定の実施形態において、配列番号2のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体は、プライマー（配列番号3および配列番号4）を使用してヒトDNAサンプルにおいてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことによって得ることができる、内因性GPR131ヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、配列番号2のアミノ酸配列の対立遺伝子改変体は、配列番号3を含むプライマーおよび配列番号4を含むプライマーを使用してヒトDNAサンプルにおいてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行うことによって得ることができる、内因性GPR131ヌクレオチド配列によってコードされる。特定の実施形態において、ヒトDNAサンプルは、ヒトゲノムDNAである。特定の実施形態において、このプロセスは、RT-PCR（逆転写ポリメラーゼ連鎖反応）である。RT-PCR技術は、当業者に周知である。特定の実施形態において、ヒトcDNAサンプルは、ヒト単球またはヒトマクロファージのcDNAである。特定の実施形態において、ヒトcDNAサンプルは、ヒト脂肪細胞cDNAである。特定の実施形態において、ヒトcDNAサンプルは、ヒト骨格筋細胞cDNAである。特定の実施形態において、ヒトDNAサンプルは、提供される。特定の実施形態において、ヒトDNAサンプルは、販売元から得ることができる。特定の実施形態において、本方法に使用され得る改変体アミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸配列の哺乳動物オルソログである。例としてであり限定ではなく、ウサギ（例えば、GenBank（登録商標）登録番号BAC55237）、牝ウシ（例えば、GenBank（登録商標）登録番号NP_778219）、マウス（例えば、GenBank（登録商標）登録番号NP_778150）およびラット（例えば、GenBank（登録商標）登録番号NP_808797）のGPR131アミノ酸配列が、「GPR131アミノ酸配列」の範囲内として想定されることが理解される。本明細書において使用される場合「GPR131 GPCR」は、内因性RUP43 GPCRである；例としてであり限定ではなく、内因性ヒトRUP43 GPCRは、GenBank（登録商標）登録番号NM_170699のヒトGPR131（配列番号2と同一なアミノ酸配列を有する）およびその対立遺伝子改変体であり、内因性ウサギRUP43 GPCRは、GenBank（登録商標）登録番号BAC55237のウサギGPR131およびその対立遺伝子改変体であり、内因性牝ウシRUP43 GPCRは、GenBank（登録商標）登録番号NP_778219の牝ウシGPR131およびその対立遺伝子改変体であり、内因性マウスRUP43 GPCRは、GenBank（登録商標）登録番号NP_778150のマウスGPR131およびその対立遺伝子改変体であり、そして内因性ラットRUP43 GPCRは、GenBank（登録商標）登録番号NP_808797のラットGPR131およびその対立遺伝子改変体である。

【0366】

特定の実施形態において、本方法に使用され得るGPCRは、非内因性の、構成的に活性化された配列番号2、配列番号2の対立遺伝子、または配列番号2の哺乳動物オルソログのアミノ酸配列の変異体を含み得る。当該分野で公知であるように、構成的に活性化されたGPCRは、種々の方法を使用して作製され得る（例えば、PCT出願番号PCT/US98/07496、WO 98/46995として1998年10月22日に公開；および米国特許第6,555,339号を参照のこと；これらの各々の開示は、その全体が

本明細書において参考として援用される)。非内因性の、構成的に活性化された内因性 G P R 1 3 1 の変異体である、配列番号 2、配列番号 2 の対立遺伝子、もしくは配列番号 2 の哺乳動物オルソログのアミノ酸配列、または配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 % もしくは少なくとも約 9 9 % 同一なアミノ酸配列の生物学的に活性なフラグメントは、本方法に使用され得る。例としてであり限定ではなく、N 末端メチオニンまたは N 末端シグナルペプチドの欠失は、本方法に使用され得る生物学的に活性なフラグメントを提供することを想定される。さらなる例としてであり限定ではなく、本方法に使用され得る R U P 4 3 G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸 2 ~ 3 3 0 を含み得る (ただし、R U P 4 3 G タンパク質共役レセプターは、配列番号 2 のアミノ酸 1 位にメチオニン残基を含まない)。

10

【0367】

特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 % もしくは少なくとも約 9 9 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 % もしくは少なくとも約 9 9 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 7 5 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 8 5 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 1 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 2 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 3 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 4 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 6 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 7 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 8 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、本方法に使用され得る G P C R は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 9 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。配列番号 2 のアミノ酸配列と、例えば少なくとも 9 5 % 「同一な」アミノ酸配列を有することは、そのアミノ酸配列が配列番号 2 のアミノ酸配列と、配列番号 2 のアミノ酸配列の各 1 0 0 アミノ酸あたり 5 個までのアミノ酸変化を含み得ることを除いて同一であることを意味する。したがって、配列番号 2 に対して少なくとも 9 5 % 同一性を有するアミノ酸配列を得るために、その配列中の 5 % (1 0 0 のうち 5) までのアミノ酸残基が、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して別のアミノ酸によって挿入、欠失または置換され得る。これらの変更は、アミノ末端またはカルボキシル末端またはこれらの末端位置の間のいずれかにおいて、配列中の残基の中で個別にか、または配列内の 1 つ以上の連続する群においてかのいずれかで間隔を空けて、起こり得

20

30

40

50

る。

【0368】

いくつかの実施形態において、本方法に使用され得るGPR131アミノ酸配列は、フィルタに結合した配列番号1で示される配列を有するDNAに、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列に対して相補的な配列によってコードされる、Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列である。例としてであり限定ではなく、本方法に使用され得るGPR131アミノ酸配列は、配列番号1の相補体とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされた、Gタンパク質共役レセプターのアミノ酸配列である。ハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知である。好ましいストリンジェントな条件としては、以下：50%ホルムアミド、5×SSC (150mM NaCl、15mMクエン酸3ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5×Denhardt溶液、10%硫酸デキストラン、および20g/mlの変性せん断サケ精子DNAを含む溶液中での42℃での一晚のインキュベーションに続く、約65℃での0.1×SSC中でのフィルタの洗浄を含む。

【0369】

(a. 配列同一性)

クエリ配列 (例えば、配列番号2のアミノ酸配列) と検索 (interrogate) されるべき配列との間の最も良好に重複したマッチを決定するための好ましい方法はまた、グローバル配列アラインメントと称され、Brutlagら [Comp App Biosci (1990) 6:237-245; この開示は、その全体が本明細書により参考として援用される] のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定され得る。配列アラインメントにおいて、クエリ配列および検索配列は、両方ともアミノ酸配列である。このグローバル配列アラインメントの結果は、パーセント同一性である。FASTDBアミノ酸アラインメントで使用される好ましいパラメータは、以下である：マトリクス=PAM 0、k-tuple=2、ミスマッチペナルティ=1、連結ペナルティ=20、ランダム化グループ=25、長さ=0、カットオフスコア=1、ウィンドウサイズ=配列長、ギャップペナルティ=5、ギャップサイズペナルティ=0.05、ウィンドウサイズ=247または検索アミノ酸配列の長さ (短いほう)。

【0370】

内部の欠失ではなくN末端もしくはC末端欠失に起因して検索配列がクエリ配列よりも短い場合、結果 (パーセント同一性) は手動で補正されなければならない。なぜなら、FASTDBプログラムは、グローバルパーセント同一性を計算する場合、検索配列のN末端およびC末端の短縮を把握しないからである。N末端およびC末端で短縮された検索配列に関しては、クエリ配列に対して、パーセント同一性は、検索配列のN末端およびC末端である対応する検索配列残基にマッチ/整列しないクエリ配列の残基の数を、クエリ配列の全塩基のパーセンテージとして計算することによって、補正される。残基がマッチ/整列するか否かは、FASTDB配列アラインメントの結果によって決定される。次いで、このパーセンテージは、特定のパラメータを使用して上記のFASTDBプログラムによって計算されるパーセント同一性から引き算されて、最終のパーセント同一性スコアを達成する。この最終のパーセント同一性スコアは、本発明の目的のために使用されるものである。クエリ配列とマッチ/整列しない検索配列のN末端およびC末端に対する残基のみが、パーセント同一性スコアを手動で調節するために考慮される。つまり、検索配列の最も遠いN末端およびC末端残基の外側にあるクエリアミノ酸残基のみである。

【0371】

例えば、90アミノ酸残基の検索配列が、100残基のクエリ配列とアラインメントされて、パーセント同一性を決定する。検索配列のN末端に欠失が生じ、したがって、FASTDBアラインメントは、N末端の最初の残基をマッチ/整列しない。10個の対形成しない残基は、配列の10% (マッチしないN末端およびC末端における残基数/クエリ配列の残基の総数) を表し、したがって、10%がFASTDBプログラムによって計算されたパーセント同一性スコアから引き算される。残りの90残基が完全にマッチした場

合、最終パーセント同一性は、90%である。

【0372】

別の例では、90残基の検索配列が100残基のクエリ配列と比較される。今回は、欠失は内部であり、したがって検索配列のN末端もしくはC末端に、クエリとマッチ／整列しない残基は存在しない。この場合、FASTDBによって計算されたパーセント同一性は、手動で補正されない。やはり、被験配列のN末端およびC末端の外部の残基の位置のみが、FASTDBアラインメントで表示され、クエリ配列とマッチ／整列しない場合、手動で補正される。他の補正は、本発明の目的のために行われない。

【0373】

(b. 融合タンパク質)

特定の実施形態において、目的のポリペプチドは、融合タンパク質であり、例えば、親和性タグドメインまたはレポータードメインを含み得る。適切な親和性タグとしては、別の部分（通常、別のポリペプチド、最も通常には、抗体）に特異的に結合し得る任意のアミノ酸配列が挙げられる。適切な親和性タグとしては、当該分野で公知であるように、エピトープタグ（例えば、V5タグ、FLAGタグ、HAタグ（血球凝集素インフルエンザウイルス由来）、mycタグなど）が挙げられる。適切な親和性タグとしてはまた、当該分野で公知であるように、結合する基質が知られているドメイン（例えば、HIS、GSTおよびMBPタグ）、ならびに特定の結合パートナー（例えば、抗体、特にモノクローナル抗体）が利用可能な他のタンパク質由来のドメインが挙げられる。適切な親和性タグとしてはまた、適切な結合パートナー（例えば、IgG Fcレセプター）を使用して特異的に結合されて検出され得る、任意のタンパク質-タンパク質相互作用ドメイン（例えば、IgG Fc領域）が挙げられる。このような融合タンパク質が、代替的アミノ酸で欠失もしくは置換されたN末端メチオニン残基を有していたGPCRとインフレームで融合した異種N末端ドメイン（例えば、エピトープタグ）を含み得ることが、明らかに企図される。

【0374】

適切なレポータードメインとしては、ポリペプチドの存在を報告し得る任意のドメインが挙げられる。例えば、タグに特異的に結合する標識抗体を使用してポリペプチドの存在を報告するために、親和性タグが使用され得ることが認識されるが、発光レポータードメインが、より一般的に使用され得る。適切な発光レポータードメインとしては、ルシフェラーゼ（例えば、ホタル、*Vargula*、*Renilla reniformis*もしくは*Renilla muelleri*由来）、またはそれらの発光改変体が挙げられる。他の適切なレポータードメインとしては、蛍光タンパク質（例えば、クラゲ、サンゴおよび他の腔腸動物由来のもの、例えば、*Aequoria*、*Renilla*、*Ptilosarcus*、*Stylatula*種に由来するもの）、またはそれらの発光改変体が挙げられる。これらのレポータータンパク質の発光改変体は、当該分野で非常に周知であり、ネイティブレポータータンパク質と比較して、より明るくても、より暗くても、または異なる励起および／もしくは放射スペクトルを有してもよい。例えば、いくつかの改変体は、変更されて、もはや緑色には見えず、青色、シアン、黄色、増強された黄赤に見えてもよく（それぞれ、BFP、CFP、YFP、eYFPおよびRFPと称される）、当該分野で公知であるような他の放射スペクトルを有してもよい。他の適切なレポータードメインとしては、生化学的変化または色の変化を介してポリペプチドの存在を報告し得るドメインが挙げられ得る（例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、および分泌された胚アルカリホスファターゼ）。

【0375】

当該分野で公知であるように、親和性タグまたはレポータードメインは、目的のポリペプチドの任意の位置に存在し得る。しかし、ほとんどの実施形態において、これらは、目的のポリペプチドのC末端もしくはN末端に存在する。

【0376】

10

20

30

40

50

(2. 目的のGPCRポリペプチドをコードする核酸)

遺伝暗号および核酸を操作するための組換え技術は公知であり、そして目的のGPCRポリペプチドのアミノ酸配列が上記されているので、目的のGPCRポリペプチドをコードする核酸の設計および生成は、十分当業者の技術範囲内である。特定の実施形態において、標準的な組換えDNA技術法(Ausubelら, Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, Wiley & Sons, 1995; Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, (1989) Cold Spring Harbor, N. Y.)が使用される。例えば、GPCRをコードする配列は、GPCRをコードする配列のライブラリから、種々の組換え法(本明細書において記載する必要はない)のいずれか1つまたはその組み合わせを使用して、単離され得る。その後、タンパク質をコードする核酸配列におけるヌクレオチドの置換、欠失および／もしくは付加が、標準的な組換えDNA技術を使用してまた行われ得る。 10

【0377】

例えば、部位依存性突然変異誘発およびサブクローニングが、目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド中の核酸残基を導入／欠失／置換するために使用され得る。他の実施形態において、PCRが使用され得る。目的のポリペプチドをコードする核酸はまた、化学合成によって、オリゴヌクレオチドから全体的に生成され得る(例えば、Cellora, Science (2002) 297:1016-8)。

【0378】

20

いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドをコードする核酸のコドンは、特定の種の細胞、特に、哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ハムスター、非ヒト霊長類、またはヒト種)細胞における発現について、最適化される。いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドをコードする核酸のコドンは、特定の種(特に、両生類の種)の細胞における発現について、最適化される。

【0379】

(a. ベクター)

本発明は、本発明の核酸を含むベクター(「構築物」とも称される)をさらに提供する。本発明の多くの実施形態において、本発明の核酸配列は、配列が発現制御配列(例えば、プロモーターが挙げられる)に作動可能に連結された後、宿主細胞中で発現される。本発明の核酸はまた、代表的に、エピソームとしてかまたは宿主の染色体DNAの組み込まれた一部としてのいずれかで宿主細胞中で複製され得る、発現ベクター中に配置される。一般的に、発現ベクターは、選択マーカー(例えば、テトラサイクリンもしくはネオマイシン)を含み、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にする(例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと、これは、本明細書において参考として援用される)。ベクター(単一および二重発現カセットベクターを含む)は、当該分野で周知である(Ausubelら, Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, Wiley & Sons, 1995; Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, (1989) Cold Spring Harbor, N. Y.)。適切なベクターとしては、ウイルスベクター、プラスミド、コスミド、人工染色体(ヒト人工染色体、細菌人工染色体、酵母人工染色体など)、小型染色体などが挙げられる。レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターが使用され得る。 30 40

【0380】

種々の発現ベクターが、細胞で目的のポリペプチドを生成するために、当業者に利用可能である。1つの適切なベクターは、pCMVであり、これは特定の実施形態において使用される。このベクターは、1998年10月13日にAmerican Type Culture Collection(ATCC)(10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA)に、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の規定に基づいて寄託された。こ 50

のDNAは、ATCCによって試験され、生存が確認された。ATCCは、pCMVに、ATCC#203351の登録番号を割り当てた。

【0381】

本発明の核酸は、通常、目的の本発明のポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含む。しかし、特定の実施形態において、目的のポリペプチドの発現のための宿主細胞は真核生物細胞（例えば、ヒト細胞のような哺乳動物細胞）であり得るので、オープンリーディングフレームは、イントロンによって中断され得る。本発明の核酸は、代表的に、RNA安定性、翻訳効率などに関与し得る本発明の核酸の3'および5'未翻訳領域(UTR)に加えて含み得る、転写単位の一部である。本発明の核酸はまた、本発明の核酸に加えて、目的のポリペプチドの転写および発現に関するプロモーター、

10

【0382】

真核生物プロモーターは、ウイルスプロモーターおよび真核生物遺伝子由来のプロモーターを含む、真核生物宿主細胞で機能性である任意のプロモーターであり得る。例示的な真核生物プロモーターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：マウスメタロチオネインI遺伝子配列のプロモーター(Hamerら, J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288, 1982)；ヘルペスウイルスのTKプロモーター(McKnight, Cell 31:355-365, 1982)；SV40早期プロモーター(Benoistら, Nature (London) 290:304-310, 1981)；酵母gal1遺伝子配列プロモーター(Johnstonら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975, 1982)；Silverら, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:5951-5955, 1984)、CMVプロモーター、EF-1プロモーター、エクジソン反応性プロモーター、テトラサイクリン反応性プロモーターなど。ウイルスプロモーターは、特に関心のあるものであり得る。なぜなら、これらは、一般的に特に強力なプロモーターであるからである。特定の実施形態において、標的病原体のプロモーターであるプロモーターが使用される。本発明において使用するためのプロモーターは、それらが導入される細胞型（および／もしくは動物）において機能性であるように選択される。特定の実施形態において、プロモーターは、CMVプロモーターである。

20

【0383】

特定の実施形態において、本発明のベクターはまた、選択可能なマーカーの発現を提供し得る。適切なベクターおよび選択可能なマーカーは、当該分野で周知であり、そして以下において考察されている：Ausubelら(Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, Wiley & Sons, 1995)およびSambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版n, (2001) Cold Spring Harbor, N. Y.)。種々の異なる遺伝子が選択可能なマーカーとして利用されており、本発明のベクターにおいて選択可能なマーカーとして利用される特定の遺伝子は、便宜的に選択される。公知の選択可能なマーカー遺伝子としては、以下が挙げられる：チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子、CAD、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、アスパラギンシンターゼ遺伝子、抗生物質耐性遺伝子（例えば、tet^r、amp^r、Cmrもしくはcat、kan^rまたはneo^r（アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子）、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子など。

30

40

【0384】

上述のように、目的のポリペプチドは、親和性ドメインおよび／またはレポータードメインを含む融合タンパク質であり得る。レポーターもしくはタグとGPCR（例えば、GPCRのC末端もしくはN末端）との間に融合を作製するための方法は、十分に当業者の技術範囲内であり（例えば、McLeanら, Mol. Pharma. Mol. Pharmacol. 1999 56:1182-91；Ramsayら, Br. J. Pharm

50

acology, 2001, 315-323)、これ以上記載しない。このような融合タンパク質が、N末端メチオニン残基が代替的アミノ酸で欠失されたか置換されたかのいずれかであるGPCRとインフレームで融合した、異種N末端ドメイン(例えば、エピトープタグ)を含み得ることが明確に企図される。目的のポリペプチドがネイティブポリペプチドから最初に作製され得、次いで、上記のような適切なレポーター／タグに作動可能に連結されることが理解される。

【0385】

本発明の核酸はまた、目的のポリペプチドをコードする核酸の構築を促進するために、制限部位、複数のクローニング部位、プライマー結合部位、ライゲーション末端、組換え部位などを含み得る。

【0386】

(b. 宿主細胞)

本発明はさらに、本発明の核酸を含むベクターを含む宿主細胞を提供する。適切な宿主細胞としては、原核生物(例えば、細菌細胞(例えば、E. coli))ならびに真核生物細胞(例えば、動物細胞(例えば、昆虫、哺乳動物、魚類、両生類、鳥類、もしくは爬虫類の細胞)、植物細胞(例えば、トウモロコシもしくはシロイヌナズナ細胞)、または真菌細胞(例えば、S. cerevisiae細胞))が挙げられる。特定の実施形態において、目的のポリペプチドをコードする核酸の発現に適切な任意の細胞が、宿主細胞として使用され得る。通常、動物宿主細胞株が使用される例としては、以下である：サル腎臓細胞(COS細胞)、SV40によって形質転換されたサル腎臓CVI細胞(COS-7、ATCC CRL 1651)；ヒト胚腎臓細胞(HEK-293(「293」))、Grahamら、J. Gen Virol. 36:59(1977)；HEK-293T(「293T」)細胞；新生仔ハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO, UrlaubおよびChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216, (1980)；シリアンゴールデンハムスター細胞MCB3901(ATCC CRL-9595)；マウスセルトリー細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980))；サル腎臓細胞(CVI ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(HEL A、ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL 34)；バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75)；ヒト肝臓細胞(hep G2、HB 8065)；マウス乳腺腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL 51)；TRI細胞(Matherら、Annals N. Y. Acad. Sci 383:44-68(1982))；NIH/3T3細胞(ATCC CRL-1658)；およびマウスL細胞(ATCC CCL-1)。特定の実施形態において、メラニン保有細胞が使用される。メラニン保有細胞は、下等脊椎動物に見出される皮膚細胞である。関連する材料および方法は、米国特許第5,462,856号および同第6,051,386号の開示に従う。これらの特許の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される。さらなる細胞株は、当業者に明らかであり、種々の細胞株が、American Type Culture Collection(10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209)から利用可能である。

【0387】

(C. 候補化合物のスクリーニング)

(1. 一般的GPCRスクリーニングアッセイ技術)

Gタンパク質レセプターが活性になる場合、それは、Gタンパク質(例えば、Gq, Gs, Gi, Gz, Go)に結合して、GTPのGタンパク質への結合を刺激する。次いで、Gタンパク質は、GTPaseとして作用し、GTPをGDPへとゆっくりと加水分解する。これによって、レセプターは、通常の条件下で、脱活性化される。しかし、活性化したレセプターは、GDPをGTPへと変換し続ける。GTPの非加水分解性アナログで

10

20

30

40

50

ある $[^3\ ^5\text{S}]$ GTP γ S は、活性化されたレセプターを発現する膜への増強された結合をモニタリングするために使用され得る。リガンドの存在下および非存在下で膜への G タンパク質共役をモニタリングするために、 $[^3\ ^5\text{S}]$ GTP γ S が使用され得ることが報告されている。とりわけ当業者に周知であり、利用可能であるモニタリングの例は、T r a y n o r および N a h o r s k i によって 1995 年に報告された。このアッセイの好ましい使用は、候補化合物の初期スクリーニングのための使用である。なぜなら、この系は、特定の G タンパク質に関わらず、レセプターの細胞内ドメインと相互作用するあらゆる G タンパク質共役レセプターに対して、一般的に適用可能だからである。

【0388】

(2. 特異的 GPCR スクリーニングアッセイ技術)

10

一旦候補化合物が「一般的」G タンパク質共役レセプターアッセイ（すなわち、アゴニストもしくは逆アゴニストである化合物を選択するためのアッセイ）を使用して同定された場合、いくつかの実施形態において、化合物がレセプター部位で相互作用することを確認するためのさらなるスクリーニングが好ましい。例えば、「一般的」アッセイによって同定される化合物はレセプターに結合していなくともよいが、代わりに、細胞内ドメイン由来の G タンパク質に「結合しない」だけでもよい。

【0389】

(Gs, Gz および Gi)

Gs は、酵素アデニルシクラーゼを刺激する。Gi（および Gz および Go）は、一方で、アデニルシクラーゼを阻害する。アデニルシクラーゼは、ATP から cAMP への変換を触媒する。したがって、Gs タンパク質に結合する活性化された GPCR は、cAMP の細胞レベルの増加に関連する。一方、Gi（または Gz, Go）タンパク質に結合する活性化された GPCR は、cAMP の細胞レベルの減少に関連する。一般的に、「Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission」第 8 章, From Neuron To Brain (第 3 版) Nichols, J. G. ら編, Sinauer Associates, Inc. (1992) を参照のこと。従って、cAMP を検出するアッセイは、候補化合物（例えば、逆アゴニスト）がレセプターに対する（すなわち、このような化合物は、cAMP レベルを減少させる）ものか否かを決定するために利用され得る。当該分野で公知の cAMP を測定するための種々のアプローチが、利用され得る。いくつかの実施形態において、好ましいアプローチは、ELISA ベースの形式における抗 cAMP 抗体の使用に依存する。使用され得る別の型のアッセイは、全細胞セカンドメッセンジャーレポーターシステムアッセイである。遺伝子上のプロモーターは、特定の遺伝子がコードするタンパク質の発現を駆動する。サイクリック AMP は、cAMP 反応性 DNA 結合 G タンパク質、または cAMP 反応性エレメントと呼ばれる特定の部位でプロモーターに結合してその遺伝子の発現を駆動する転写因子 (CREB) への結合を促進することによって、遺伝子発現を駆動する。レポーター遺伝子の前に複数の cAMP 反応性エレメントを含むプロモーターを有するレポーターシステムが構築され得る（例えば、 β -ガラクトシダーゼもしくはルシフェラーゼ）。したがって、活性化された Gs 結合レセプターは、次に遺伝子およびレポータータンパク質の発現を活性化させる cAMP の蓄積を引き起こす。レポータータンパク質（例えば、 β -ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼは、次いで、標準的な生化学的アッセイを使用して検出され得る (Chen ら 1995)。

20

30

40

【0390】

(Go および Gq)

Gq および Go は、酵素ホスホリパーゼ C の活性化に関与する。これは次に、リン脂質 PIP_2 を加水分解し、2 つの細胞内メッセンジャー（ジアシルグリセロール (DAG) およびイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP_3)) を放出する。 IP_3 の蓄積の増加は、Gq 関連および Go 関連レセプターの活性化に関する。一般的に、「Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission」, 第 8 章, From Neuron To Brain (第 3 版) Nichols, J. G.

50

ら編, Sinauer Associates, Inc. (1992)を参照のこと。IP₃蓄積を検出するアッセイは、候補化合物が、例えば、Gq関連およびGo関連レセプターの逆アゴニストである（すなわち、このような化合物は、IP₃のレベルを減少させる）か否かを決定するために使用され得る。Gq関連レセプターはまた、APIレポーターアッセイを使用して調べられ得る。このアッセイにおいては、Gq依存性ホスホリパーゼCは、APIエレメントを含む遺伝子の活性化を引き起こし、したがって、活性化されたGq関連レセプターは、このような遺伝子の発現の増加を証明し、それによってその逆アゴニストは、このような発現の減少を証明し、そしてアゴニストは、このような発現の増加を証明する。このような検出のための市販のアッセイが利用可能である。

【0391】

10

（3. GPCR融合タンパク質）

逆アゴニストもしくはアゴニストの直接同定のための候補化合物のスクリーニングに使用するための、内因性の、構成的に活性なGPCRまたは非内因性の、構成的に活性化されたGPCRの使用は、興味深いスクリーニングの課題を提供する。ここで、定義によると、レセプターは、それに結合する内因性リガンドの非存在下でもなお活性である。したがって、このような化合物が逆アゴニストもしくはアゴニストであり得るか、またはこのようなレセプターに何の影響も有さないか否かについて理解することを可能にするために、例えば、候補化合物の存在下での非内因性レセプターと、その化合物の非存在下での非内因性レセプターとを区別するため、いくつかの実施形態において、利用されるアプローチがそのような区別を増強し得ることが好ましい。いくつかの実施形態において、好ましいアプローチは、GPCR融合タンパク質の使用である。

20

【0392】

一般的に、上記のアッセイ技術（および当業者に公知の他の技術）を使用して非内因性GPCRが構成的に活性化されたことが一旦決定されると、内因性GPCRに結合する優勢なGタンパク質を決定することが可能である。Gタンパク質のGPCRへの結合は、評価され得るシグナル伝達経路を提供する。いくつかの実施形態において、哺乳動物発現系を使用してスクリーニングを行うことが好ましい。したがって、系は、その中に内因性Gタンパク質を有することが予測される。したがって、定義されるように、このような系においては、非内因性の、構成的に活性化されたGPCRは、継続的にシグナル伝達される。いくつかの実施形態において、このシグナルが、例えばレセプターに対する逆アゴニストの存在下で、特にスクリーニングの状況下で、レセプターが逆アゴニストと接触する場合にそのレセプター間で、より容易に区別できる可能性が高まるように、増強されることが好ましい。

30

【0393】

GPCR融合タンパク質は、非内因性GPCRとのGタンパク質の結合の効力を増強することが意図される。GPCR融合タンパク質は、内因性の、構成的に活性なGPCRまたは非内因性の、構成的に活性化されたGPCRのいずれかによってスクリーニングするために好まれ得る。なぜなら、このようなアプローチは、このようなスクリーニング技術において生成されるシグナルを増加させるからである。これは、顕著な「信号対雑音」比を促進するために重要である。このような明らかな比は、本明細書において開示される候補化合物のスクリーニングのために好ましい。

40

【0394】

GPCR融合タンパク質の発現に有用な構築物の構築は、当業者の範囲内である。市販の発現ベクターおよび発現系は、研究者の特定の必要性に適合し得る種々のアプローチを提供する。このようなGPCR融合タンパク質構築物の構築における重要な基準としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：GPCR配列およびGタンパク質配列の両方がフレーム内であること（好ましくは、内因性GPCRについての配列は、Gタンパク質配列の上流である）、およびGPCRの「停止」コドンが、GPCRの発現の際にGタンパク質もまた発現され得るように、削除もしくは置き換えられていること。GPCRはGタンパク質に直接的に結合され得るか、または2つの間にスペーサー残基が存在し得

50

る（好ましくは、約 12 以下であるが、この数は当業者によって容易に確認され得る）。便宜上、スパーサーを使用することが好ましい。いくつかの実施形態において、GPCR 融合タンパク質構築物の作製前に非内因性 GPCR に結合する G タンパク質が同定されることが好ましい。同定されている G タンパク質は数個しか存在しないため、G タンパク質の配列を含む構築物（すなわち、ユニバーサル G タンパク質構築物、実施例 5（a）参照）が、その中への内因性 GPCR 配列の挿入のために利用可能であることが好ましい。このことは、異なる配列を有する種々の異なる内因性 GPCR の大規模スクリーニングの状況で、さらなる有効性を提供する。

【0395】

上記のように、Gi、Gz および Go に結合する活性化された GPCR は、cAMP の形成を阻害することが予測され、これらの型の GPCR 負荷に基づくアッセイを作製する〔すなわち、cAMP シグナルは、活性化により減少し、したがって、例えばアゴニスト（これは、さらにこのシグナルを減少させる）負荷の、直接的同定を行わせる〕。本明細書において開示されるように、これらの型のレセプターに関して、存続可能なシクラーゼベースのアッセイを確立する目的で、GPCR の内因性 G タンパク質に基づかない GPCR 融合タンパク質を生成する可能性があることが確認された。したがって、例えば、内因性 Gi 結合レセプターは、Gs タンパク質に融合され得る。このような融合構築物は、発現されると、内因性 GPCR が、例えば、「天然の」Gi タンパク質よりも Gs に結合することを、「駆動」または「強制」し、その結果シクラーゼベースのアッセイが確立され得る。したがって、Gi、Gz および Go 結合レセプターに関しては、いくつかの実施形態において、GPCR 融合タンパク質が使用されて、アッセイがアデニルシクラーゼ活性の検出に基づく場合、融合構築物は Gs（または、酵素アデニルシクラーゼの形成を刺激する等価な G タンパク質）により確立されることが好ましい。

【0396】

【表 2】

表 B

G タンパク質	GPCR の活性化による cAMP 産生における効果 (すなわち、構成的活性またはアゴニスト結合)	GPCR の活性化による IP ₃ 蓄積における効果 (すなわち、構成的活性またはアゴニスト結合)	逆アゴニストとの接触による cAMP 産生における効果	逆アゴニストとの接触による IP ₃ 蓄積における効果
Gs	増加	N/A	減少	N/A
Gi	減少	N/A	増加	N/A
Gz	減少	N/A	増加	N/A
Go	減少	増加	増加	減少
Gq	N/A	増加	N/A	減少

同等に有効であるのは、Gs、Gi、Gz または Go タンパク質に融合された Gq タンパク質を使用する G タンパク質融合構築物である。いくつかの実施形態において、好ましい融合構築物は、G タンパク質の α サブユニット（「G α q」）の最初の 6 アミノ酸が欠失されており、G α q の C 末端における最後の 5 アミノ酸が目的の G タンパク質の G α の対応するアミノ酸に置き換えられている、Gq タンパク質によって達成され得る。例えば、融合構築物は、Gi タンパク質に融合された Gq（6 アミノ酸欠失）を有し得る。これによって「Gq/Gi 融合構築物」が得られる。この融合構築物は、内因性 Gi 結合レセプターをその非内因性 G タンパク質（Gq）に結合させ、その結果セカンドメッセンジャー（例えば、イノシトール三リン酸もしくはジアシルグリセロール）を、cAMP 産生の代わりに測定し得る。

【0397】

（標的 Gi 結合 GPCR とシグナルエンハンサー Gs 結合 GPCR との同時トランスフ

ェクション (cAMP ベースのアッセイ))

G i 結合レセプターは、アデニリルシクラーゼを阻害し、それによって cAMP 産生のレベルを減少させることが知られている。このことは、cAMP レベルの評価をやりがいのあるものとさせ得る。特定の実施形態において、活性によって優先的に G i に結合するレセプターの活性化の指標としての cAMP の産生の減少の測定に有効な技術は、シグナルエンハンサー (例えば、活性化によって G s に優先的に結合する非内因性の、構成的に活性化されたレセプター (例えば、TSHR-A623I ; 下記参照)) と G i 結合 GPCR との同時トランスフェクションによって達成され得る。明らかであるように、G s 結合レセプターの活性化は、cAMP の産生の増加に基づいて決定され得る。G i 結合レセプターの活性化は、cAMP の産生の減少をもたらす。したがって、これらの「対照的」影響を有利に活用する同時トランスフェクションアプローチが意図される。例えば、非内因性の、構成的に活性化された G s 結合レセプター (「シグナルエンハンサー」) と発現ベクター単独との同時トランスフェクションは、ベースライン cAMP シグナルを提供する (すなわち、G i 結合レセプターは cAMP レベルを減少させるが、この「減少」は、構成的に活性化された G s 結合シグナルエンハンサーによって確立された cAMP レベルの実質的な増加と関連する)。従って、シグナルエンハンサーと「標的」レセプターとの同時トランスフェクションによって、G i 結合標的レセプターの逆アゴニストは、測定された cAMP シグナルを増加させ、一方 G i 結合標的レセプターのアゴニストは、このシグナルを減少させる。

10

20

【0398】

このアプローチを使用して直接的に同定される候補化合物は、これらがシグナル増強レセプターを標的しないことを確実にするために、独立に評価されるべきである (これは、同時トランスフェクションされたレセプターに対してスクリーニングする前もしくは後に行われ得る)。

【0399】

(D. 医薬品化学)

(候補化合物)

当該分野で公知の任意の分子は、本発明の GPCR の活性を調節 (増加もしくは減少) するその能力について試験され得る。活性を調節する化合物を同定するため、候補化合物は、レセプターを発現する細胞に直接的に提供され得る。

30

【0400】

本発明のこの実施形態は、レセプターの量もしくは活性を調節 (例えば、阻害、アンタゴナイズ、またはアゴナイズ) する分子の化学ライブラリをスクリーニングするために非常に適している。化学ライブラリは、ペプチドライブラリ、ペプチド模倣物ライブラリ、化学的に合成されたライブラリ、組換え (例えば、ファージディスプレイ) ライブラリ、およびインビトロ翻訳ベースのライブラリ、他の非ペプチド性合成有機物ライブラリなどであり得る。本発明のこの実施形態はまた、生物学的物質 (血漿および組織抽出物が挙げられるが、これらに限定されない) を含む内因性候補化合物をスクリーニングするため、および生物学的活性を有することが公知である内因性化合物のライブラリをスクリーニングするために非常に適している。

40

【0401】

いくつかの実施形態において、候補化合物の直接同定は、コンビナトリアルケミストリ技術を介して生成される化合物とあわせて行われ、これによって、数千の化合物は、このような分析のために無作為に調製される。候補化合物は、化学ライブラリのメンバーであり得る。これは、任意の都合よい数の個別のメンバーを含み得る。メンバーは、例えば、何十何百何千何百万の適切な化合物、例えば、ペプチド、ペプトイドおよび他のオリゴマー化合物 (環状もしくは直鎖状)、ならびにテンプレートベースの小分子 (例えば、ベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ピアリアル、炭素環式化合物および多環式化合物 (例えば、ナフタレン、フェノチアジン、アクリジン、ステロイドなど)、炭水化物、ならびにアミノ酸誘導体)、ジヒドロピリジン、ベンズヒドリル、ならびに複素環 (例えば、トリジ

50

ン、インドール、チアゾリジンなど)である。引用した数および列挙した化合物の型は、例示であって限定ではない。好ましい化学ライブラリは、低分子量かつ潜在的な治療因子である化学化合物を含む。

【0402】

例示的な化学ライブラリは、数箇所の供給元 (ArQule、Tripos/Pan Labs、ChemDesign、Pharmacopoeia) から市販されている。いくつかの場合、これらの化学ライブラリは、メンバー化合物が固定されている基材上のライブラリの各メンバーの識別表示をコードし、したがって有効なモジュレーターである分子の直接的かつ即時的な同定を可能にする、コンビナトリアル方法を使用して生成される。したがって、多くのコンビナトリアルアプローチにおいて、化合物のプレート上の位置は、化合物の組成を特定する。また、一例では、単一のプレート位置が1~20の化学物質を有し得、これらは目的の相互作用物を含むウェルへの投与によってスクリーニングされ得る。したがって、調節が検出される場合、ずっと少数の相互作用対が活性の調節に関してアッセイされ得る。このような方法によって、多くの候補分子がスクリーニングされ得る。

10

【0403】

使用のための多くの多様なライブラリは、当該分野で公知であり、本発明に従って試験される化合物を提供するために使用され得る。あるいは、ライブラリは、標準的な方法を使用して構築され得る。さらに、より一般的には、構造的に制約された、有機物の多様な (例えば、非ペプチド) ライブラリが、また使用され得る。例として、ベンゾジアゼピンライブラリが使用され得る (例えば、Buninら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712を参照のこと)。

20

【0404】

本発明の別の実施形態において、コンビナトリアルケミストリは、本発明のGPCRのモジュレーターを同定するために使用され得る。コンビナトリアルケミストリは、数十万の化合物を含むライブラリを作製し得る。化合物の多くは、構造的に類似している。ハイスループットスクリーニングプログラムは、これらの巨大なライブラリを、既知の標的に対する親和性についてスクリーニングし得るが、より小規模であるが最大の化学的多様性を提供するライブラリを実現する、新規のアプローチが開発された (例えば、Matter, 1997, Journal of Medicinal Chemistry 40:1219-1229を参照のこと)。

30

【0405】

コンビナトリアルケミストリの1つの方法である親和性フィンガープリンティングは、規定のタンパク質のパネルに対する結合親和性について個別の小分子のライブラリを試験するために以前に使用されている。スクリーニングによって得られるフィンガープリントは、目的の他のタンパク質もしくはレセプター (本発明においては、本発明のレセプター) に対する個々のライブラリメンバーの親和性を予測するために使用される。フィンガープリントは、目的のタンパク質と反応することが知られている他の化合物から得られるフィンガープリントと比較されて、ライブラリ化合物が同様に反応し得るか否かを予測する。例えば、大きなライブラリ中の全てのリガンドを複合体もしくはタンパク質成分との相互作用に関して試験するのではなく、その活性を有することが知られている他の化合物と類似するフィンガープリントを有するリガンドのみが試験され得る。(例えば、Kauvarら, 1995, Chemistry and Biology 2:107-118; Kauvar, 1995, Affinity fingerprinting, Pharmaceutical Manufacturing International. 8:25-28; ならびにKauvar, Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, D. Kurtz. L. StankerおよびJ. H. Skerritt編, 1995, AOAC:Washington, D. C., 305-312を参照のこと)。

40

50

【0406】

(モジュレーターとして同定される候補化合物)

一般的に、このようなスクリーニングの結果は、独特のコア構造を有する化合物である。その後、これらの化合物は、好ましいコア構造の周りでさらなる化学的修飾に供されて、その医薬特性をさらに増強され得る。このような技術は、当業者に公知であり、本特許文献においては詳細を扱わない。

【0407】

特定の実施形態において、上記の同定されたモジュレーターは、バイオアベイラビリティがある。薬物の経口バイオアベイラビリティを予測するための、当業者に利用可能な多くの計算機的アプローチが開発されている (Oomsら, *Biochim Biophys Acta* (2002) 1587:118-25; Clark & Groote nhuis, *Curr Opin Drug Discov Devel* (2002) 5:382-90; Chengら, *J Comput Chem* (2002) 23:172-83; Norinder & Haeblerlein, *Adv Drug Deliv Rev* (2002) 54:291-313; Matterら, *Comb Chem High Throughput Screen* (2001) 4:453-75; Podlogar & Muegge, *Curr Top Med Chem* (2001) 1:257-75; これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される)。さらに、陽電子断層撮影法 (PET) は、多数のグループによって、薬物分布の直接的測定を得るために、成功裏に使用されている (薬物の経口投与後の哺乳動物の体における (非ヒト霊長類の体およびヒトの体を含む)、経口バイオアベイラビリティの評価を含む) [Nodaら, *J Nucl Med* (2003) 44:105-8; Gulyasら, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2002) 29:1031-8; Kanervaら, *Psychopharmacology* (1999) 145:76-81; これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。また、実施例25を含む下記参照。

【0408】

特定の実施形態において、上記のバイオアベイラビリティのある同定されたモジュレーターは、さらに、血液脳関門を横切ることができる。当業者に利用可能な多数の計算機的アプローチが、血液脳関門の透過を予測するために開発されている (Oomsら, *Biochim Biophys Acta* (2002) 1587:118-25; Clark & Groote nhuis, *Curr Opin Drug Discov Devel* (2002) 5:382-90; Chengら, *J Comput Chem* (2002) 23:172-83; Norinder & Haeblerlein, *Adv Drug Deliv Rev* (2002) 54:291-313; Matterら, *Comb Chem High Throughput Screen* (2001) 4:453-75; Podlogar & Muegge, *Curr Top Med Chem* (2001) 1:257-75; これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される)。多くのインビトロ法が、薬物の血液脳関門透過性を予測するために開発されている [Lohmannら, *J Drug Target* (2002) 10:263-76; Hansenら, *J Pharm Biomed Anal* (2002) 27:945-58; Otisら, *J Pharmacol Toxicol Methods* (2001) 45:71-7; Dehouckら, *J Neurochem* (1990) 54:1798-801; これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。さらに、多くの方法が、血液脳関門を横切る薬物送達を増強するために開発されている [Scherermann, *Vascul Pharmacol* (2002) 38:349-54; Pardridge, *Arch Neurol* (2002) 59:35-40; Pardridge, *Neuron* (2002) 36:555-8; これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。最後に、陽電子断層撮影法 (PET) は、多くのグループによって、哺乳動物の体 (非ヒト霊長

類の体およびヒトの体を含む)における、薬物分布(脳内を含む)の直接測定を得るために成功裏に使用されている[Nodaら, J Nucl Med (2003) 44:105-8; Gulyasら, Eur J Nucl Med Mol Imaging (2002) 29:1031-8; Kanervaら, Psychopharmacology (1999) 145:76-81; これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。また、実施例26を含む下記参照。

【0409】

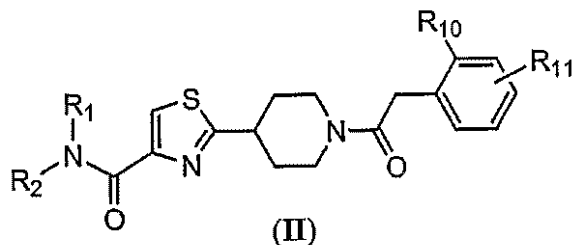
(E. 本発明の化合物)

本発明の1つの局面は、式(II)の化合物:

【0410】

10

【化3】



または、その薬学的に受容可能な塩に関し、

20

ここで、

R₁ は、HまたはC₁-6アルキルであり;

R₂ は、2-メチル-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル基であるか; または、

R₁ および R₂ は、それらが結合する窒素と一緒にあって、3, 4-ジヒドロ-2H-キノリン-1-イル基を形成し; そして

R₁₀ および R₁₁ は、各々独立して、Hまたはハロゲンである。

【0411】

(F. 本発明の化合物を生成するための合成方法)

(本発明の化合物の調製—一般的合成方法)

30

本発明の新規化合物は、種々の合成方法に従って容易に調製され得る。これらの合成方法の全ては、当業者によく知られている。本発明の化合物の調製のために特定の方法としては、下記のスキーム1~3に記載される方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0412】

新規の2-ピペリジン-4-イル-チアゾールの中間体(AD)は、スキーム1に示されるように調製され得る。窒素のところで適切な保護基(すなわち、PG)によって保護されたチオアミド(AA)は、3-ハロ-2-オキソプロピオン酸(AB)とのハンチ様反応を介して環化され、カルボン酸のところで保護されて、ジ-保護化2-ピペリジン-4-イル-チアゾール(AC)を生じる。一般的に、2つの保護基は異なっている。環化のための適切な溶媒としては、例えば、アルコール(例えば、メタノール、エタノールおよびプロパノール)、低級ハロゲン化炭素(例えば、ジクロロメタン、ジクロロエタンおよびクロロホルム)、DMFなどが挙げられる。環化のための反応温度は、およそ室温からおよそ使用される溶媒の沸点までの範囲であり得る。一般的に、この温度範囲は、約50℃~約90℃である。

40

【0413】

チオアミド(AA)のための適切な保護基としては、t-ブチルカルバメート(BOC)、ベンジルカルバメート(Cbz)、p-メトキシベンジルカルバメート(Moz)などが挙げられる。種々の方法が、チオアミド(AA)の窒素を保護するために使用され得る。例えば、t-ブチルカルバメート基は、種々の試薬(例えば、(BOC)₂O)と適切な塩基(例えば、NaOH、KOHもしくはMe₄NOH)を使用して、適切な溶媒中

50

(THF、CH₃CN、DMF、EtOH、MeOH、H₂O、もしくはそれらの混合物)で、約0℃～約50℃の温度で導入され得る。

【0414】

3-ハロ-2-オキソ-プロピオン酸(AB)のための適切な保護基としては、アルキルエステル(例えば、メチル、エチル、プロピルおよびt-ブチル)、置換メチルエステル(例えば、メトキシメチル、メトキシエトキシメチルおよびベンジルオキシメチル)、必要に応じて置換されたベンジルエステル(例えば、ベンジル、4-メトキシベンジル、および2,6-ジメトキシベンジル)などが挙げられる。1つの特定の有用な保護化3-ハロ-2-オキソ-プロピオン酸(AB)は、3-ブロモ-2-オキソ-プロピオン酸エチルエステルであり、これはまた一般的に、エチルブロモピルベートとも称される。

10

【0415】

多岐に渡る合成的変換に適切な他の代表的な保護基は、GreeneおよびWuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第3版, John Wiley & Sons, New York, 1999に開示されている(この開示は、その全体が本明細書において参考として援用される)。

【0416】

便宜上、2-ピペリジン-4-イル-チアゾール(AC)における2つの保護基が選択され、そして、1つの保護基は、他の保護基に実質的に影響することなく実質的に除去され得る。この型の方法は、直交保護(orthogonal protection)と称される。1つの例としては、BOC基により窒素を保護し、カルボン酸をメチルエステルもしくはエチルエステルとして保護することが挙げられる。この例において、BOC基は、エステル基に実質的に影響することなく酸性条件下で除去され得る。あるいは、BOC基は、塩基性条件下で実質的に加水分解されないので、エステルがBOC基に実質的に影響することなく除去され得る。多くの直交保護スキームが当該分野で公知であり、本明細書において適用され得る。

20

【0417】

その後、スキーム1に示されるように、2-ピペリジン-4-イル-チアゾール(AC)のための窒素保護基は除去され(すなわち、脱保護され)、一方カルボン酸保護は実質的に維持されて、一般的中間体(AD)を生じる。この場合、窒素がBOC基によって保護される場合、酸、および必要に応じて適切な溶媒の存在下で、有効な切断が達成され得る。適切な酸としては、HCl(水性もしくは無水)、HBr(水性もしくは無水)、H₂SO₄、トリフルオロ酢酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。存在する場合、適切な溶媒としては、エステル溶媒(例えば、酢酸エチル)、アルキルアルコール(例えば、メタノール、エタノール、i-プロパノール、n-プロパノールおよびn-ブタノール)、エーテル溶媒(例えば、テトラヒドロフランおよびジオキサン)など、ならびにこれらの混合物が挙げられる。必要に応じて、スカベンジャーが添加されて、遊離カチオンを捕捉し得る。適切なスカベンジャーとしては、チオフェノール、アニソール、チオアニソール、チオクレゾール、クレゾール、硫化メチルなどが挙げられる。2-ピペリジン-4-イル-チアゾール(AC)中の窒素の脱保護のための反応温度範囲は、約-20℃～およそ使用される溶媒の沸点の範囲であり得る。一般的に、温度範囲は、約-10℃～約50℃である。

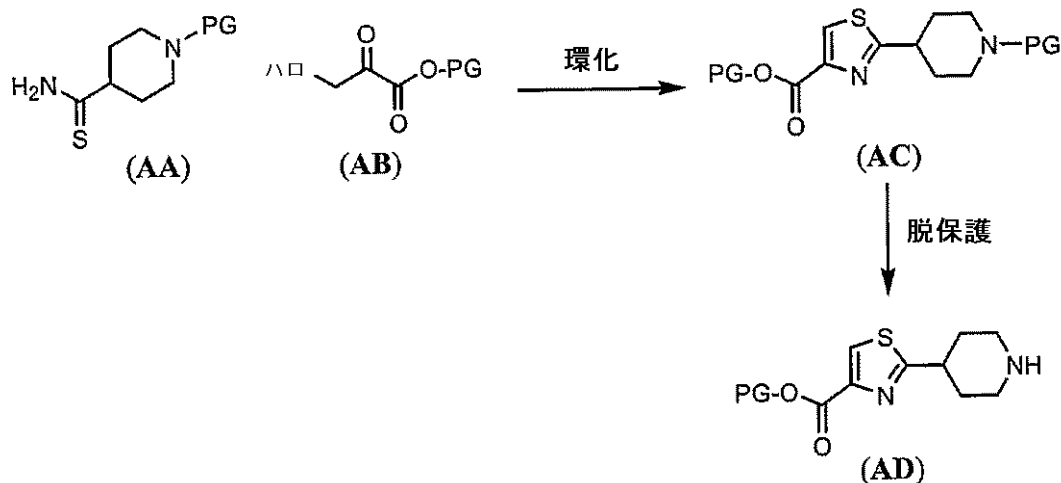
30

40

【0418】

【化 4】

スキーム 1



10

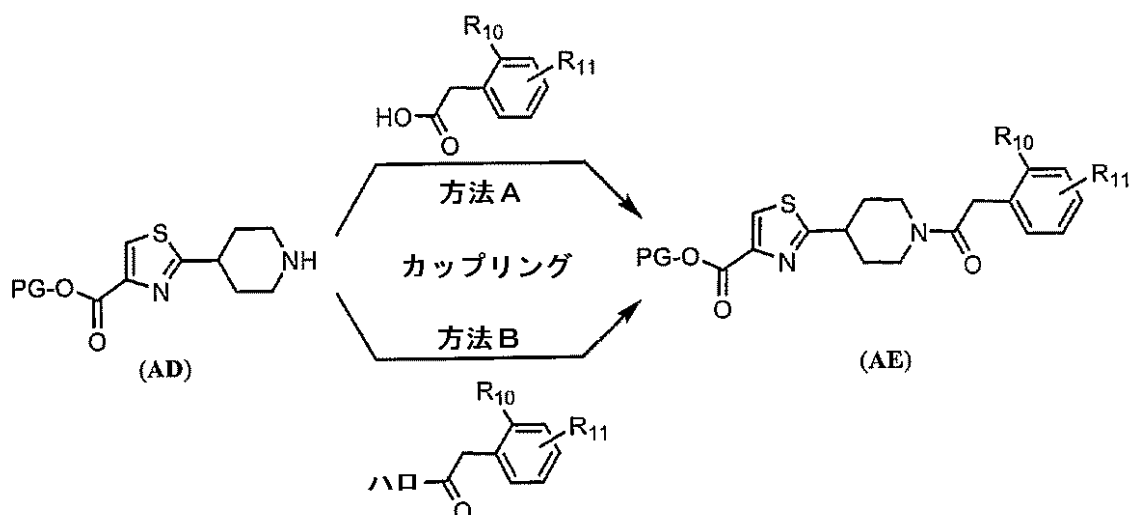
中間体 (A D) は、スキーム 2、方法 A に示されるように、脱水縮合剤および塩基を有するかもしれない不活性溶媒の存在下でカルボン酸に結合されて、アミド (A E) を提供する。適切な脱水縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸 (E D C · H C l)、プロモート r i s-ピロリドン-ホスニウムヘキサフルオロリン酸 (P y B r o P)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸 (H A T U)、1-シクロヘキシル-3-メチルポリスチレン-カルボジイミドなどが挙げられる。適切な塩基としては、第四級アミン (例えば、N, N-ジイソプロピル-エチルアミン、N-メチルモルホリン、およびトリエチルアミン) が挙げられる。適切な不活性溶媒としては、低級ハロゲン化炭素溶媒 (好ましくは、ジクロロメタン、ジクロロエタン、およびクロロホルム)、エーテル溶媒 (例えば、テトラヒドロフランおよびジオキサン)、ニトリル溶媒 (例えば、アセトニトリル)、アミド溶媒 (例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、および N, N-ジメチルアセトアミド)、またはこれらの混合物が挙げられる。必要に応じて、上記結合反応において他の試薬が使用され得、そしてこれらの試薬としては、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (H O B T)、H O B T-6-カルボキサミドメチルポリスチレン、1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (H O A T) などが挙げられる。適切な反応温度は、約 -25℃ ~ 約 60℃、および約 0℃ ~ 約 35℃ の範囲である。

30

【0419】

【化 5】

スキーム 2



10

あるいはアミド (AE) が、スキーム 2、方法 B に示されるように、酸ハロゲン化物を使用して、塩基および不活性溶媒の存在下で、中間体 (AD) とのアミド化反応によって得られ得る。適切な酸ハロゲン化物としては、酸塩化物もしくは酸臭化物が挙げられる。適切な塩基としては、アルカリ金属炭酸塩 (例えば、炭酸ナトリウムおよび炭酸カリウム)、アルカリ金属炭酸水素塩 (例えば、炭酸水素ナトリウムおよび炭酸水素カリウム)、アルカリ水酸化物 (例えば、水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウム)、第四級アミン (例えば、N, N-ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、および N-メチルモルホリン)、ならびに芳香族アミン (例えば、ピリジン、イミダゾール、およびポリ (4-ビニルピリジン)) が挙げられる。適切な不活性溶媒としては、低級酸ハロゲン化物溶媒 (例えば、ジクロロメタン、ジクロロエタン、およびクロロホルム)、エーテル溶媒 (例えば、テトラヒドロフランおよびジオキサン)、アミド溶媒 (例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、および N, N-ジメチルアセトアミド)、および芳香族溶媒 (例えば、トルエン、ベンゼン、およびピリジン) が挙げられる。適切な反応温度は、約 -25℃ ~ 約 55℃、好ましくは約 -5℃ ~ 約 40℃ の範囲である。

20

30

【0420】

アミド (AE) 中の保護された酸基は、除去されて、スキーム 3 に示されるように、対応するカルボン酸を生じる。カルボン酸を脱保護するために適切な方法は、当業者に公知である。例えば、アルキルエステル (例えば、メチル、エチル、および n-プロピル) は、塩基および適切な溶媒の存在下での加水分解を介して、カルボン酸に変換され得る。適切な塩基としては、アルカリ金属炭酸塩 (例えば、炭酸ナトリウムおよび炭酸カリウム)、アルカリ金属炭酸水素塩 (例えば、炭酸水素ナトリウムおよび炭酸水素カリウム)、およびアルカリ水酸化物 (例えば、水酸化リチウム、水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウム) が挙げられる。脱保護のための適切な溶媒としては、アルキルアルコール (例えば、メタノール、エタノール、i-プロパノール、n-プロパノールおよび n-ブタノール)、エーテル溶媒 (例えば、テトラヒドロフランおよびジオキサン) など、ならびにこれらの混合物が挙げられ、好ましくは、加水分解は、H₂O の存在下で行われる。アミド (AE) 中の酸基の脱保護のための反応温度は、およそ室温 ~ およそ使用される溶媒の沸点の範囲であり得る。一般的に、温度範囲は、約 50℃ ~ 約 90℃ である。エステルのための他の脱保護法および他のさらなる適切な保護基は、Greene および Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第 3 版, John Wiley & Sons, New York, 1999 (上記) に記載されている。カルボン酸 (AF) は、メチルー (2-メチルー 4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル)-アミンまたは 1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノ

40

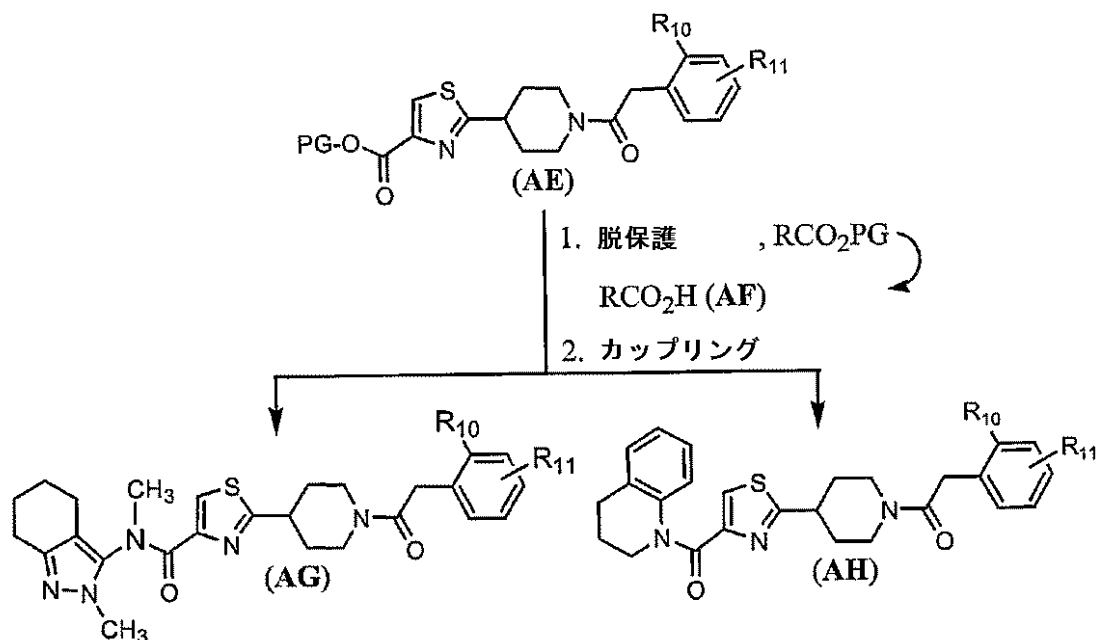
50

リンのいずれかに結合されて、式 (A G) および式 (A H) の化合物をそれぞれ生じる。一般的に、結合は、脱水縮合剤および塩基を有するかもしくは有さない不活性溶媒の存在下で実行され得るか、または塩基および不活性溶媒の存在下で、カルボン酸 (A F) から生成される酸ハロゲン化物を使用するアミド化反応によって実行され得る。各々の方法は、上記スキーム 2 に記載されるとおりである。

【0421】

【化6】

スキーム 3

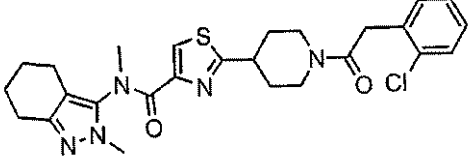
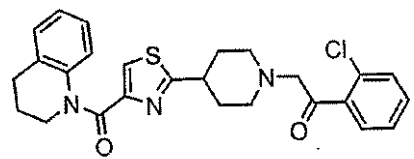
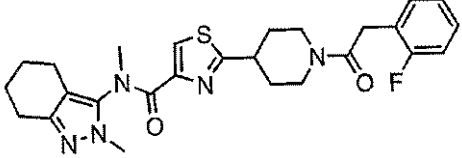


本発明のいくつかの実施形態は、以下に示されるような表 1 に例示される化合物を包含する。

【0422】

【表 3】

表 1

化合物番号	構造	化学名
1		2-[1-[2-(2-クロロ-フェニル)-アセチル]-ピペリジン-4-イル]-チアゾール-4-カルボン酸メチル-(2-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル)-アミド
2		2-(2-クロロ-フェニル)-1-[4-[4-(3,4-ジヒドロ-2H-キノリン-1-カルボニル)-チアゾール-2-イル]-ピペリジン-1-イル]-エタノン
3		2-[1-[2-(2-フルオロ-フェニル)-アセチル]-ピペリジン-4-イル]-チアゾール-4-カルボン酸メチル-(2-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル)-アミド

(G. 薬学的組成物)

本発明は、処置（または予防）を必要とする個体に、治療有効量の本発明のモジュレーターを投与することによる処置（および予防）方法を提供する〔また、例えばPCT出願番号PCT/IB02/01461（2002年8月29日にWO 02/066505として公開）を参照のこと；これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される〕。好ましい局面において、上記モジュレーターは、アゴニストである、好ましい局面において、上記モジュレーターは、実質的に精製されている。上記個体は、好ましくは、動物であり（牝ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、非ヒト霊長類、ネコ、イヌ、ウサギ、ラット、マウスなどのような動物が挙げられるが、これらに限定されない）、好ましくは、哺乳動物であり、最も好ましくは、ヒトである。

【0423】

本発明のモジュレーターは、非ヒト動物〔下記の実施例を参照のこと〕および／またはヒトに、単独で、または薬学的もしくは生理学的に受容可能な組成物中（ここで、これらは、当業者に公知の適切なキャリアもしくは賦形剤技術と混合されている）において、投与され得る。適切な薬学的に受容可能なキャリアは、当業者に利用可能である。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版

10

20

30

40

50

, 1980, Mack Publishing Co., (Osloら編)を参照のこと。

【0424】

次いで、薬学的もしくは生理学的に受容可能な組成物が、治療有効用量で提供される。治療有効用量とは、本明細書において記載される方法によって、限定ではなく例証的に決定されるような、障害の症状または生理学的状態の予防または改善をもたらすに十分なモジュレーターの量を指す。ここで、障害の症状または生理学的状態の予防または改善としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血中グルコース濃度の低下、特定の代謝障害（例えば、インスリン抵抗性、グルコース寛容減損および糖尿病）の予防または処置、ならびに、上昇した血中グルコース濃度の合併症（アテローム性動脈硬化症、心臓疾患、発作、高血圧症および末梢血管疾患）の予防または処置。

10

【0425】

本発明のモジュレーターが単独または他の薬学的もしくは生理学的に受容可能な化合物と組み合わせて提供され得ることが、明確に考慮される。本発明の障害を処置するための他の化合物は、当該分野で現在周知である（ここで本発明の障害を処置としては、血中グルコース濃度の低下、特定の代謝障害（例えば、インスリン抵抗性、グルコース寛容減損および糖尿病）の予防または処置、ならびに、上昇した血中グルコース濃度の合併症（アテローム性動脈硬化症、心臓疾患、発作、高血圧症および末梢血管疾患）の予防または処置が挙げられるが、これらに限定されない）。本発明の1つの局面は、本明細書において開示される実施形態に従う使用を包含し、さらに以下からなる群より選択される1つ以上の因子を包含する：スルホニル尿素（例えば、グリベンクラミド、グリピジド、グリクラジド、グリメピリド）、メグリチニド（例えば、レパグリニド（repaglinide）、ナテグリニド）、ピグアナイド（例えば、メトホルミン）、 α -グルコシダーゼインヒビター（例えば、アカルボース、エパルレスタット、ミグリトール、ボグリボース）、チザオリジンジオン（thiazolidinedione）（例えば、ロシグリタゾン（rosiglitazone）、ピオグリタゾン）、インスリンアナログ（例えば、インスリンリスプロ、インスリンアスパルト（aspart）、インスリングルアルギン（glargine））、クロミウムピコリネート／ピオチン、および生物学的因子（例えば、アディポネクチンもしくはそのC末端球状ドメインを含むフラグメント、またはアディポネクチンもしくはそのフラグメントのマルチマー、またはアディポネクチンレセプター AdipoR1もしくはAdipoR2のアゴニスト（好ましくは、このアゴニストは、経口的にバイオアベイラビリティがある））。さらに、本発明のモジュレーター（例えば、本発明のアゴニストおよび部分アゴニスト）が、単独またはホスホジエステラーゼ（PDE）インヒビター（4型cAMP特異的PDE（PDE4）に選択的なインヒビター（例えば、ロフルミラスト（roflumilast））；PDE4Bに選択的なインヒビター；およびPDE4B2に選択的なインヒビターを含む）と組み合わせて提供され得ることが、明らかに企図される。

20

30

【0426】

特定の実施形態において、代謝障害は、グルコース寛容減損、インスリン抵抗性、高インスリン血症、および糖尿病からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、糖尿病は、1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態において、糖尿病は、2型糖尿病である。特定の実施形態において、代謝障害は、糖尿病である。特定の実施形態において、代謝障害は、1型糖尿病である。特定の実施形態において、代謝障害は、2型糖尿病である。特定の実施形態において、代謝障害は、グルコース寛容減損である。特定の実施形態において、代謝障害は、インスリン抵抗性である。特定の実施形態において、代謝障害は、高インスリン血症である。特定の実施形態において、代謝障害は、個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。

40

【0427】

特定の実施形態において、上昇した血中グルコース濃度の合併症は、以下からなる群より選択される：症候群X、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心臓疾患、高血

50

圧症、発作、ニューロパシー、網膜症、腎症、および末梢血管疾患。心臓疾患としては、心不全、冠動脈不全、冠動脈疾患、および高血圧が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、合併症は、症候群 X である。特定の実施形態において、合併症は、アテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態において、合併症は、アテローム性疾患である。特定の実施形態において、合併症は、心臓疾患である。特定の実施形態において、合併症は、心不全である。特定の実施形態において、合併症は、冠動脈不全である。特定の実施形態において、合併症は、冠動脈疾患である。特定の実施形態において、合併症は、高血圧である。特定の実施形態において、合併症は、高血圧症である。特定の実施形態において、合併症は、発作である。特定の実施形態において、合併症は、ニューロパシーである。特定の実施形態において、合併症は、網膜症である。特定の実施形態において、合併症は、腎症である。特定の実施形態において、合併症は、末梢血管疾患である。特定の実施形態において、合併症は、多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態において、合併症は、高脂血症である。

10

【0428】

(投与経路)

適切な投与経路としては、当該分野で公知の方法を使用する、経口投与、経鼻投与、直腸投与、経粘膜投与、経皮投与または腸管投与、非経口送達（筋肉内注射、皮下注射、髄内注射）、ならびに髄腔内注入、直接心室内注入、静脈内注入、腹腔内注入、鼻腔内注入、肺内注入（吸入）または眼内注入が挙げられる。他の特定の好ましい投与経路は、エアロゾルおよび貯蔵（*depo*t）処方である。本発明の医薬の徐放性処方物（特に貯蔵）は、明確に企図される。特定の実施形態において、投与経路は、経口である。

20

【0429】

(組成物／処方物)

本発明に従う使用のための薬学的もしくは生理学的に受容可能な組成物および医薬は、1つ以上の生理学的に受容可能なキャリア（賦形剤および補助剤を包含する）を使用して、従来の様式で処方され得る。適切な処方は、選択される投与経路に依存する。

【0430】

本明細書において記載される特定の医薬は、薬学的もしくは生理学的に受容可能なキャリアおよび少なくとも1種の本発明のモジュレーターを含む。注射のためには、本発明の薬剤は、水溶液中、好ましくは生理学的に適合性の緩衝液（例えば、ハンクス液、リンゲル液、または生理食塩水緩衝液（例えば、リン酸もしくは重炭酸緩衝液））中に処方され得る。経粘膜投与のためには、透過されるべき障壁に適切な浸透剤が処方物中に使用され得る。このような浸透剤は、一般的に当該分野で公知である。

30

【0431】

経口摂取され得る薬学的もしくは生理学的に受容可能な調製物としては、ゼラチンから作製される押し込みばめカプセル、ならびにゼラチンおよび可塑化剤（例えば、グリセロールもしくはソルビトール）から作製される軟性の封入カプセルが挙げられる。押し込みばめカプセルは、充填剤（例えば、ラクトース）、結合剤（例えば、デンプン）および／または滑沢剤（例えば、滑石もしくはステアリン酸マグネシウム）、ならびに必要な応じて安定剤との混合物中に、活性成分を含み得る。軟性カプセルにおいて、活性化合物は、適切な液体（例えば、脂肪油、流動パラフィンまたは液体ポリエチレングリコール）中に溶解または懸濁され得る。さらに、安定剤が添加され得る。経口投与のための全ての処方物は、このような投与に適切な投薬中にあるはずである。

40

【0432】

口腔投与のためには、組成物は、従来の様式で処方された錠剤またはロゼンジの形態を取り得る。

【0433】

吸入投与のためには、本発明に従う使用のための化合物は、噴霧器用の加圧式包装からの適切なガス噴霧剤（例えば、二酸化炭素）を使用したエアロゾルスプレー提示の形態で、従来どおりに送達される。加圧式エアロゾルの場合、投薬単位は、定量を送達するため

50

のバルブを提供することによって決定され得る。吸入器もしくは注入器に使用するための、例えばゼラチンの、カプセルおよびカートリッジは、化合物と適切な粉末ベース（例えば、ラクトースもしくはデンプン）との粉末ミックスを含有するように処方され得る。

【0434】

化合物は、注入（例えば、ボーラス注射または持続的注入）による非経口投与のために処方され得る。注入のための処方物は、例えば、アンプル用、もしくは保存料を添加された複数用量容器用の、単位投薬で提示され得る。この組成物は、水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、または乳濁液のような形態を取り得、そして懸濁剤、安定剤、および／または分散剤のような処方剤を含み得る。

【0435】

非経口投与のための薬学的もしくは生理学的に受容可能な処方物としては、水溶性形態の活性化合物の水溶液が挙げられる。水性懸濁液は、懸濁液の粘性を増加させる物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストラン）を含み得る。必要に応じて、懸濁液はまた、適切な安定剤または化合物の安定性を増加させる因子を含み、高濃度の溶液の調製を可能にし得る。

【0436】

あるいは、活性成分は、使用前に、適切なビヒクル（無菌の発熱物質非含有水）と構成するための、粉末または凍結乾燥形態であり得る。

【0437】

これまでに記載された処方物に加えて、化合物はまた、貯蔵調製物として処方され得る。このような長期作用処方物は、埋め込み（例えば、皮下もしくは筋肉内）または筋肉内注射によって投与され得る。したがって、例えば、化合物は、適切なポリマー材料または疎水性材料を用いて、例えば、受容可能な油中の乳濁液としてか、またはイオン交換樹脂としてか、または溶解しにくい誘導体（例えば、溶解しにくい可溶性の塩）として、処方され得る。

【0438】

特定の実施形態において、化合物は、制御放出系を介して送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが使用され得る（Langer, 上記; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201-240; Buchwaldら, 1980, Surgery 88: 507-516; Sauddekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574-579）。別の実施形態において、ポリマー材料が使用され得る（Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise編, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall編, Wiley, New York, 1984; RangerおよびPeppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; Levyら., 1985, Science 228: 190-192; Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25: 351-356; Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71: 858-863）。他の制御放出系は、Langer (1990, Science 249: 1527-1533) による概説において考察される。

【0439】

さらに、化合物は、徐放系（例えば、治療剤を含有する固体の疎水性ポリマーの半透過性マトリックス）を使用して送達され得る。種々の徐放性材料が確立されており、当業者に周知である。徐放性カプセルは、その化学的性質に依存して、数週間～100日以上まで化合物を放出する。

【0440】

治療試薬の化学的性質および生物学的安定性に依存して、モジュレーター安定化のためのさらなる方法が利用され得る。

10

20

30

40

50

【0441】

薬学的もしくは生理学的に受容可能な組成物はまた、適切な固相またはゲル相のキャリアまたは賦形剤を含み得る。このようなキャリアまたは賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチンおよびポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0442】

（有効投薬量）

本発明における使用に適切な薬学的もしくは生理学的に受容可能な組成物としては、活性成分が、それらの意図される目的を達成するための有効量で含有されている組成物が挙げられる。さらに具体的には、治療有効量は、処置されるべき被験体の現存する症状の発生を予防するか、またはその症状を改善するのに有効な量を意味する。有効量の決定は、特に本明細書において提供される詳細な開示を考慮すると、当業者の能力の範囲内である。

10

【0443】

本発明の方法で使用される任意の化合物について、治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初に推定され得る。例えば、用量は、動物モデルにおいて、細胞のグルコース取り込みを刺激すること、特定の代謝障害を予防もしくは処置すること、または上昇したグルコース濃度の合併症を予防もしくは処置することが示される、濃度点または濃度範囲を含むか、または包含する、循環濃度範囲を達成するように処方され得る〔インビトロアッセイおよびインビボ動物モデルについての以下の実施例を参照のこと〕。このような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。

20

【0444】

治療有効用量とは、患者の症状の改善をもたらす化合物の量をいう。このような化合物の毒性および治療効力は、細胞培養物または実験動物における、例えば、LD₅₀（試験集団の50%が致死となる用量）およびED₅₀（試験集団の50%における治療有効用量）を決定するための、標準的薬学的手順によって決定され得る。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、これはLD₅₀とED₅₀との間の比として表現され得る。高い治療指数を示す化合物が好ましい。

【0445】

これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおける使用のための投薬量範囲を処方するのに使用され得る。このような化合物の投薬量は、好ましくは、ED₅₀を含む、毒性がほとんどないか全くない循環濃度の範囲内にある。投薬量は、利用される投薬形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変動し得る。正確な処方、投与経路および投薬量は、個々の医師によって、患者の状態を考慮して選択され得る（例えば、Fingler, 1975, 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, 第1章を参照のこと）。

30

【0446】

投薬量および投薬間隔は、特定の状況に依存して、個別に調節されて、本発明の障害を予防または処置するのに十分な、活性化合物の血漿レベルを提供し得る。これらの効果を達成するのに必要な投薬量は、個別の特徴および投与経路に依存する。

40

【0447】

投薬間隔はまた、最小有効濃度に関する値を使用して決定され得る。化合物は、時間の10～90%の間、好ましくは30～99%の間、そして最も好ましくは50～90%の間、最小有効濃度を超える血漿レベルを維持するレジメンを使用して投与されるべきである。局所投与または選択的取り込みの場合、薬物の有効局所濃度は、血漿濃度に関連しなくともよい。

【0448】

投与される組成物の量は、当然ながら、処置される被験体、被験体の体重、苦痛の重傷度、投与様式、および処方医の判断に依存する。

【0449】

50

所望の結果を達成するための毎日もしくは定期的な基本に基づいて投与され得る本発明のモジュレーターの量についての好ましい投薬量範囲は、 $0.1 \sim 100 \text{ mg/kg}$ 体重である。他の好ましい投薬量範囲は、 $0.1 \sim 30 \text{ mg/kg}$ 体重である。他の好ましい投薬量範囲は、 $0.1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ 体重である。他の好ましい投薬量範囲は、 $0.1 \sim 3.0 \text{ mg/kg}$ 体重である。当然ながら、これらの毎日投薬量は、一日の過程の間に定期的に少量で送達または投与され得る。これらの投薬範囲は、好ましい範囲というだけであり、本発明の限定を意味しないことに注意すること。上記所望の結果としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血中グルコース濃度の低下、特定の代謝障害（例えば、インスリン抵抗性、グルコース寛容減損、および糖尿病）の予防もしくは処置、ならびに上昇した血中グルコース濃度の合併症（例えば、アテローム性動脈硬化症、心臓疾患、発作、高血圧症、および末梢血管疾患）の予防もしくは処置。 10

【0450】

（H. 処置方法）

本発明は、とりわけ、以下に挙げられる方法に関するが、これらに限定されない：血中グルコース濃度を低下させる方法、特定の代謝障害（例えば、インスリン抵抗性および糖尿病）を予防もしくは処置する方法、ならびに上昇した血中グルコース濃度の合併症（例えば、アテローム性動脈硬化症、心臓疾患、発作、高血圧症、および末梢血管疾患）を予防もしくは処置する方法。上記方法は、このような処置を必要とする個体に本発明のモジュレーターを提供する工程を包含する。特定の実施形態において、モジュレーターは、アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレーターは、経口的にバイオアベイラビリティがある。いくつかの実施形態において、この経口的にバイオアベイラビリティがあるモジュレーターは、さらに血液脳関門を横切ることができる。特定の実施形態において、モジュレーターは、薬学的もしくは生理学的に受容可能な組成物中において個体に提供される。特定の実施形態において、モジュレーターは、薬学的組成物中において個体に提供される。特定の実施形態において、モジュレーターは、生理学的に受容可能な組成物中において個体に提供される。特定の実施形態において、モジュレーターは、経口的に摂取される薬学的もしくは生理学的に受容可能な組成物中において個体に提供される。特定の実施形態において、上記個体は、非ヒト哺乳動物である。特定の実施形態において、上記個体は、哺乳動物である。特定の実施形態において、上記個体または哺乳動物は、ヒトである。 20 30

【0451】

特定の実施形態において、代謝障害は、グルコース寛容減損、インスリン抵抗性、高インスリン血症、および糖尿病からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、糖尿病は、1型糖尿病である。特定の好ましい実施形態において、糖尿病は、2型糖尿病である。特定の実施形態において、代謝障害は、糖尿病である。特定の実施形態において、代謝障害は、1型糖尿病である。特定の実施形態において、代謝障害は、2型糖尿病である。特定の実施形態において、代謝障害は、グルコース寛容減損である。特定の実施形態において、代謝障害は、インスリン抵抗性である。特定の実施形態において、代謝障害は、高インスリン血症である。特定の実施形態において、代謝障害は、個体における上昇した血中グルコース濃度に関連する。 40

【0452】

特定の実施形態において、上昇した血中グルコース濃度の合併症は、以下からなる群より選択される：症候群X、アテローム性動脈硬化症、アテローム性疾患、心臓疾患、高血圧症、発作、ニューロパシー、網膜症、腎症、および末梢血管疾患。心臓疾患としては、心不全、冠動脈不全、冠動脈疾患、および高血圧が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、合併症は、症候群Xである。特定の実施形態において、合併症は、アテローム性動脈硬化症である。特定の実施形態において、合併症は、アテローム性疾患である。特定の実施形態において、合併症は、心臓疾患である。特定の実施形態において、合併症は、心不全である。特定の実施形態において、合併症は、冠動脈不全である。特定の実施形態において、合併症は、冠動脈疾患である。特定の実施形態において、 50

合併症は、高血圧である。特定の実施形態において、合併症は、高血圧症である。特定の実施形態において、合併症は、発作である。特定の実施形態において、合併症は、ニューロパシーである。特定の実施形態において、合併症は、網膜症である。特定の実施形態において、合併症は、ニューロパシーである。特定の実施形態において、合併症は、末梢血管疾患である。特定の実施形態において合併症は、多嚢胞性卵巣症候群である。特定の実施形態において、合併症は、高脂血症である。

【0453】

(I. 他の有用性)

RUP43レセプター機能を調節（すなわち、増加、減少またはブロック）する因子は、候補化合物とRUP43レセプターとを接触させ、そしてRUP43レセプター機能に対する候補化合物の効果を決定することによって同定され得る。RUP43レセプターの機能を調節する化合物の選択性は、RUP43レセプターに対するその効果を他のGタンパク質共役レセプターに対するその効果と比較することによって、評価され得る。例であり限定ではなく、内因性RUP43レセプターのモジュレーターは、同じ種に由来する1つ以上の他の内因性Gタンパク質共役レセプターと比較して、選択的であることが示され得る。例であり限定ではなく、内因性RUP43レセプターのアゴニストは、このアゴニストの内因性RUP43レセプターに対するEC50が、同じ種に由来する1つ以上の他の内因性Gタンパク質共役レセプターに対するアゴニストのEC50に対して少なくとも100倍低い場合、選択的RUP43アゴニストであることが示され得る。RUP43レセプター機能を調節する化合物の同定に続いて、このような候補化合物は、それらの活性を確認もしくは定量するために、他のアッセイ（インビトロモデルが挙げられるが、これらに限定されない）においてさらに試験され得る。RUP43レセプター機能のモジュレーターは、正常または異常なRUP43レセプター機能が関与する疾患および生理学的状態の処置において、治療上有用である。

【0454】

RUP43レセプターのリガンドである因子は、候補化合物をRUP43レセプターと接触させ、そして候補化合物がRUP43レセプターに結合するか否かを決定することによって同定され得る。RUP43レセプターに結合する化合物の選択性は、RUP43レセプターに対するその結合を、他のレセプターに対するその結合と比較することによって、評価され得る。例であり限定ではなく、内因性RUP43レセプターのリガンドは、同じ種由来の1つ以上の他の内因性Gタンパク質共役レセプターと比較して、選択的であることが示され得る。RUP43レセプター機能のモジュレーターであるリガンドは、正常または異常なRUP43レセプター機能が関与する疾患および生理学的状態の処置において、治療上有用である。

【0455】

本発明はまた、モジュレーターまたはRUP43レセプターのリガンドとして同定された、本発明の化合物の放射性同位体標識バージョンに関する。この放射性同位体標識バージョンは、組織サンプル（ヒトを含む）中のRUP43レセプターを局在化および定量化するため、ならびに放射性同位体標識化合物の結合阻害によってRUP43レセプターリガンドを同定するため、放射線画像化だけでなく、インビトロとインビボとの両方におけるアッセイにおいても有用である。このような放射性同位体標識化合物を含む新規のRUP43レセプターアッセイを開発することは、本発明のさらなる目的である。

【0456】

本発明は、モジュレーターまたはRUP43レセプターのリガンドとして同定された、本発明の化合物の放射性同位体標識バージョンを包含する。

【0457】

本発明はまた、RUP43レセプターに結合したリガンドを検出するために有用な、試験リガンドの放射性同位体標識バージョンに関する。いくつかの実施形態において、本発明は、RUP43レセプターに結合したリガンドを検出するために有用な上記放射性標識試験リガンドのライブラリを、明確に企図する。特定の実施形態において、上記ライブラ

りは、少なくとも約 10^1 個、少なくとも約 10^2 個、少なくとも約 10^3 個、少なくとも約 10^5 個または少なくとも約 10^6 個の上記放射性標識試験化合物を含む。このような放射性同位体標識試験リガンドを含む新規の RUP43 レセプターアッセイを開発することは、本発明のさらなる目的である。

【0458】

いくつかの実施形態において、化合物の放射性同位体標識バージョンは、1つ以上の原子が、天然に代表的に見出される（すなわち、天然に存在する）原子量もしくは質量数と異なる原子量もしくは質量数を有する原子によって置き換えられているか置換されているという事実を除いて、上記化合物と同一である。本発明の化合物に取り込まれ得る適切な放射性核種としては、 ^2H （ジュウテリウム）、 ^3H （トリチウム）、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{15}N 、 ^{16}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 および ^{131}I が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の放射性標識化合物に取り込まれる放射性核種は、放射性標識化合物の特定の用途に依存する。例えば、インビトロ RUP43 レセプター標識および競合アッセイに関して、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{82}Br 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S を取り込む化合物が、一般的に最も有用である。放射線画像化用途のためには、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br または ^{77}Br が、一般的に最も有用である。いくつかの実施形態において、放射性核種は、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^{82}Br からなる群より選択される。

10

20

【0459】

放射性同位体を有機化合物へ取り込むための合成方法は、本発明の化合物に対して利用可能であり、当該分野で周知である。これらの合成方法（例えば、活性レベルのトリチウムを標的分子に取り込むこと）は、以下のとおりである：

- A. トリチウムガスによる触媒的還元—この手順は、通常、高い比放射能の生成物を生じ、ハロゲン化されているかもしくは不飽和の前駆物質を必要とする。
- B. 水素化ホウ素ナトリウム [^3H] による還元—この手順は、より費用がかからず、還元性の官能基（例えば、アルデヒド、ケトン、ラクトン、エステルなど）を含有する前駆体を必要とする。
- C. 水素化アルミニウムリチウム [^3H] による還元—この手順は、ほぼ理論どおりの比放射能にある生成物を提供する。これはまた、還元性官能基（例えば、アルデヒド、ケトン、ラクトン、エステルなど）を含有する前駆体を必要とする。
- D. トリチウムガス暴露標識—この手順は、適切な触媒の存在下で、交換可能なプロトンを含む前駆体をトリチウムガスに暴露する工程を包含する。
- E. N-ヨウ化メチル [^3H] を使用するメチル化—この手順は、高い比放射能のヨウ化メチル (^3H) で適切な前駆体を処理することによって、O-メチルまたはN-メチル (^3H) 生成物を調製するために通常利用される。この方法は、一般的に、高い比放射能（例えば、約 $70 \sim 90 \text{ Ci/mmole}$ ）を可能にする。

30

【0460】

活性レベルの ^{125}I を標的分子に取り込むための合成方法は、以下を包含する：

40

- A. サンドマイヤー反応および類似の反応—この手順は、アリールもしくはヘテロアリールアミンをジアゾニウム塩（例えば、テトラフルオロホウ酸塩）に変換し、次いで Na^{125}I を使用して ^{125}I 標識化合物に変換する。代表的方法は、Zhu, D. —G. および共同研究者 (J. Org. Chem. 2002, 67, 943–948) によって報告された。
- B. フェノールのオルト ^{125}I ヨウ素化—この手順は、Collier, T. L. および共同研究者 (J. Labeled Compd Radiopharm. 1999, 42, S264–S266) に報告されるように、フェノールのオルト位における ^{125}I の取り込みを可能にする。
- C. ^{125}I —による臭化アリールおよび臭化ヘテロアリールの交換—この方法は、一般

50

的に2工程プロセスである。第一の工程は、臭化アリールもしくは臭化ヘテロアリールの、対応するトリアルキルスズ中間体への変換である。この変換には、トリアルキルスズハライドもしくはヘキサアルキルニスズ〔例えば、 $(\text{CH}_3)_3\text{SnSn}(\text{CH}_3)_3$ 〕の存在下で、例えば、Pdに触媒される反応〔すなわち、 $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ 〕を使用するか、またはアリールリチウムもしくはヘテロアリールリチウムを介する。代表的手順は、Bas, M. - D. および共同研究者 (J. Labeled Compd Radiopharm. 2001, 44, S280-S282) によって報告された。

【0461】

いくつかの実施形態において、化合物の放射性同位体標識バージョンは、上記化合物と同一である（放射性核種を含有する1つ以上の置換基の付加を除く）。いくつかのさらなる実施形態において、化合物はポリペプチドである。いくつかのさらなる実施形態において、化合物は、抗体またはそれらの抗原結合フラグメントである。いくつかのさらなる実施形態において、上記抗体は、モノクローナルである。適切な上記放射性核種としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない： ^2H （ジュウテリウム）、 ^3H （トリチウム）、 ^{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 および ^{131}I 。本発明の放射性標識化合物に取り込まれる放射性核種は、その放射線標識化合物の特定の用途に依存する。例えば、インビトロRUP43レセプター標識および競合アッセイのためには、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{82}Br 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S を取り込む化合物が一般的に最も有用である。放射性画像化用途のためには、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br もしくは ^{77}Br が一般的に最も有用である。いくつかの実施形態において、放射性核種は、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^{82}Br からなる群より選択される。

【0462】

放射性核種を含む1つ以上の置換基を付加するための方法は、当業者の技術範囲内であり、そしてこれらの方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：酵素法による放射性同位体ヨウ素の付加 [Marchalonick JJ, Biochemical Journal (1969) 113:299-305; Thorell JI および Johansson BG, Biochimica et Biophysica Acta (1969) 251:363-9; これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される]、ならびに、またはクロラミン-T/ヨードゲン/ヨードビーズ法 (Chloramine-T/Iodogen/Iodobead method) による [Hunter WM および Greenwood FC, Nature (1962) 194:495-6; Greenwood FC ら, Biochemical Journal (1963) 89:114-23; これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される]。

【0463】

開示されたレセプターおよび方法の他の用途は、特に、本特許文献の精査に基づいて、当業者に明らかになる。

【実施例】

【0464】

以下の実施例は、本発明の説明の目的のために提示され、限定のためではない。特定の核酸配列およびアミノ酸配列が本明細書において開示されるが、当業者は、これらの配列に軽微な改変を行いながら、下記の報告と同一または実質的に類似の結果を達成する能力があると考えられる。このような改変アプローチは、本開示の範囲内であるとみなされる。

【0465】

以下の実施例は、説明の目的のために提供され、限定の手段としては提供されない。当業者は、本明細書における開示に基づいて、等価なアッセイおよび方法を設計することがで

10

20

30

40

50

きる。これら全ては、本発明の一部を形成する。

【0466】

本発明の主題に関連し、当業者に周知である組換えDNA技術は、例えば、以下に見出され得る：Maniatis Tら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory; 米国特許第6,399,373号; およびPCT出願第PCT/IB02/01461号(WO 02/066505として、2002年8月29日に公開); これらの各々の開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される。

【0467】

(実施例1)

(ヒトGPCRの全長クローニング)

(内因性ヒトRUP43 (配列番号1および2))

全長内因性ヒトRUP43 (GPR131、例えば、GenBank (登録商標) 登録番号NM_170699) をコードするポリヌクレオチド配列は、本明細書において記載されるようにクローニングされ得る。配列番号1は、内因性ヒトRUP43 (GPR131) ポリヌクレオチドをコードする配列であり、本明細書において記載されるようにクローニングされ得る。配列番号2は、対応するコードされた内因性ヒトRUP43 (GPR131) ポリペプチドである。

【0468】

全長内因性ヒトRUP43は、Platinum PCR SuperMix (Invitrogen カタログ番号11306-016) および以下の特異的プライマー:

5'-GACAAAGCATGACGCCCAACAGCAGCTGGCGAG-3' (5'-プライマー; 配列番号3)、および

5'-CTTGAATTAGTTCAAGTCCAGGTCGACACTGCG-3' (3'-プライマー; 配列番号4)

を使用して、ヒトDNAをテンプレートとしたPCRによってクローニングされる。このヒトDNAは、ゲノムDNAまたはcDNAであり得る。使用されるサイクル条件は、95℃で40秒間、60℃で50秒間、および72℃で1分間を25サイクルである。1.0 kbのPCR産物を、pCRII-TOPOTM ベクター (Invitrogen) にクローニングする。

【0469】

(HA/V5His二重タグ化内因性ヒトRUP43 (配列番号5および6))

全長内因性ヒトRUP43 (GPR131) ポリペプチド (N末端メチオニンを欠く) およびN末端HAエピトープタグとC末端に置かれたV5Hisエピトープタグとをコードするポリヌクレオチドを、本明細書において記載されるようにクローニングした。「HA」エピトープタグは、アミノ酸配列MYPYDVPDYAを含む。「V5」は、アミノ酸配列GKPIPNPLLGLDSTを含む。「His」は、アミノ酸配列HHHHHHを含む。配列番号5は、内因性ヒトRUP43 (GPR131) ポリヌクレオチドをコードし、5'末端HAエピトープタグと3'末端V5Hisエピトープタグとを有する配列 (N末端メチオニンをコードするコドンを含む) である。配列番号6は、対応するコードされたHA/V5His二重タグ化RUP43 ポリペプチドである。

【0470】

PCRを、ESTクローン (IMAGE #5221127、GenBank (登録商標) 登録番号BC033625) をテンプレートとして用い、そしてpfuポリメラーゼ (Stratagene) を用い、製造者によって提供される、10% DMSO、0.25Mの各プライマー、および0.5mMの各4種のヌクレオチドを補充された緩衝液系を使用して行った。サイクル条件は、95℃で40秒間、60℃で50秒間、および72℃で1分40間を25サイクルである。5' PCRプライマーは、HindIII部位を組み込み、以下の配列を有した:

5'-GACAAAGCTTGACGCCCAACAGCAGCTGGCGAG-3' (配

10

20

30

40

50

列番号 7)

3' PCRプライマーは、EcoRI部位を組み込み、以下の配列を有した：

5' - C T T G A A T T C G T T C A A G T C C A G G T C G A C A C T G C - 3' (配列番号 8)。

【0471】

1. 0 kbのPCR産物を、HindIIIおよびEcoRIで消化し、5' HA / 3' V5His二重タグ化pCMV発現ベクター中にクローニングした。

【0472】

(実施例 2)

(非内因性、構成的に活性化されたヒトRUP43の調製)

当業者は、核酸配列の変異のための技術を選択する能力を有すると考えられる。以下に提示されるのは、非内因性バージョンのヒトGPCRを作製するために利用され得るアプローチである。本明細書において開示される内因性ヒトRUP43 (GPR131) のための変異は保存プロリン (または、それらの内因性構成的置換) 残基 (GPCRのTM6領域に位置する、TM6 / IC3界面近く) に対してN末端の第16番アミノ酸 (GPCRのIC3領域に位置する) が、好ましくはヒスチジンアミノ酸、アルギニンアミノ酸、またはリジンアミノ酸に、最も好ましくはリジンアミノ酸残基に変異されるアルゴリズム的アプローチに基づく。

【0473】

限定のためでなく説明のために、内因性ヒトRUP43 (GPR131) の非内因性の、構成的に活性化されたバージョンは、配列番号2のアミノ酸223位のアラニンを、好ましくはリジンに変異させることによって作製され得る。

【0474】

(1. Transformer Site-DirectedTM 突然変異誘発)

非内因性ヒトGPCRの調製は、ヒトGPCRにおいて、特に、Transformer Site-DirectedTM Mutagenesis Kit (Clontech) を使用して、製造者の指示書に従って、達成され得る。2つの突然変異誘発性プライマー、最も好ましくは、リジン変異を引き起こすリジン突然変異誘発オリゴヌクレオチドおよび選択マーカオリゴヌクレオチドが利用される。便宜上、ヒトGPCRに組み込まれるべきコドン変異はまた、標準的な形態で注記される。

【0475】

(2. QuikChangeTM Site-DirectedTM 突然変異誘発)

非内因性ヒトGPCRの調製はまた、QuikChangeTM Site-DirectedTM Mutagenesis Kit (Stratagene、製造者の指示書に従う) を使用して達成され得る。内因性GPCRは、好ましくは、テンプレートとして使用され、そして2つの突然変異誘発プライマー、同じく最も好ましくは、リジン突然変異誘発オリゴヌクレオチドおよび選択マーカオリゴヌクレオチド (キットに含まれる) が利用される。便宜上、新規のヒトGPCRに組み込まれるコドン変異およびそれぞれのオリゴヌクレオチドは、標準的な形態で注記される。

【0476】

(実施例 3)

(レセプター発現)

タンパク質の発現のために種々の細胞が当該分野で利用可能であるが、哺乳動物細胞またはメラニン保有細胞は、利用されるのに最も好ましい。この主な理由は、実用性によって断定される。すなわち、例えば、GPCRの発現のための酵母細胞の利用は、おそらく、このプロトコルへ、哺乳動物系のために進化したレセプター結合、遺伝的機構および分泌経路を含まない可能性のある非哺乳動物細胞 (酵母の場合は事実含まない) を導入するので、非哺乳動物細胞から得られた結果は、潜在的に有用であるが、哺乳動物細胞もしくはメラニン保有細胞から得られる結果ほど好ましくないからである。哺乳動物細胞のうち、CHO細胞、COS-7細胞、MCB3901細胞、293細胞および293T細胞

10

20

30

40

50

は、特に好ましいが、利用される特定の哺乳動物細胞は、当業者の特定の必要性によって決められ得る。いくつかの実施形態において、哺乳動物由来の脂肪細胞または骨格筋細胞が使用され得る。実施例10に含まれるメラニン保有細胞に関する下記を参照のこと。

【0477】

(a. 一過性トランスフェクション)

第1日目、 6×10^6 / 10 cmディッシュの293細胞がプレートされる。第2日目、2つの反応チューブが調製される（各チューブについていう割合は、プレートあたりである）：チューブAは、0.5 mlの無血清DMEM（Gibco BRL）中で4 µgのDNA（例えば、pCMVベクター；レセプターcDNAを有するpCMVベクターなど）を混合することによって調製される；チューブBは、0.5 ml無血清DMEM中で24 µlのリポフェクタミン（Gibco BRL）を混合することによって調製される。チューブAおよびBを転倒混和（数回）し、続いて室温で30～45分間インキュベーションする。この混合物を、「トランスフェクション混合物」と呼ぶ。プレートされた293細胞を1×PBSで洗浄し、続いて5 mlの無血清DMEMで洗浄する。1 mlのトランスフェクション混合物を細胞に添加し、続いて37℃、5%CO₂で4時間インキュベーションする。このトランスフェクション混合物を吸引によって除去し、続いて10 mlのDMEM/10%ウシ胎仔血清を添加する。細胞を37℃、5%CO₂でインキュベートし、48時間後、細胞を分析のために利用した。

10

【0478】

(b. 安定細胞株)

約 1.2×10^6 個の293細胞を15 cmの組織培養プレートにプレートする。10%のウシ胎仔血清および1%のピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、ならびに抗生物質を含有するDME高グルコース培地中で増殖させる。293細胞のプレーティングの24時間後（または約80%コンフルエントまでにして）、この細胞を、12 µgのDNA（例えば、レセプターcDNAを有するpCMVベクター）を用いてトランスフェクトする。この12 µgのDNAを、60 µlのリポフェクタミンおよび2 mlの血清を含まないDME高グルコース培地と合わせる。この培地を、プレートから吸引し、そして細胞を、血清を含まない培地で一回洗浄し、DNA、リポフェクタミンおよび培地混合物を添加して、10 mlの血清を含まない培地にプレートする。37℃で4～5時間のインキュベーション後、培地を吸引して、25 mlの血清含有培地を加える。トランスフェクションの24時間後、この培地を再度吸引し、血清を含む新鮮な培地を加える。トランスフェクションの48時間後、この培地を吸引し、最終濃度でゲネチシン（G418薬物）を含有する血清を含む培地を加える。約 1.2×10^6 の293細胞を15 cmの組織培養プレートにプレートする。10%のウシ胎仔血清および1%のピルビン酸ナトリウム、L-グルタミン、ならびに抗生物質を含有するDME高グルコース培地中で増殖させる。293細胞のプレーティングの24時間後（または約80%コンフルエントまでにして）、この細胞を、12 µgのDNA（例えば、レセプターcDNAを有するpCMVベクター）を用いてトランスフェクトする。この12 µgのDNAを、60 µlのリポフェクタミンおよび2 mlの血清を含まないDME高グルコース培地と合わせる。この培地を、プレートから吸引し、そして細胞を、血清を含まない培地で一回洗浄する。DNA、リポフェクタミンおよび培地混合物を添加して、10 mlの血清を含まない培地にプレートする。37℃で4～5時間のインキュベーション後、培地を吸引して、25 mlの血清含有培地を加える。トランスフェクションの24時間後、この培地を再度吸引し、血清を含む新鮮な培地を加える。トランスフェクションの48時間後、この培地を吸引し、500 µg/mlの最終濃度でゲネチシン（G418薬物）を含有する血清を含む培地を加える。トランスフェクトした細胞は、ここでG418耐性遺伝子を含む陽性にトランスフェクトされた細胞について、選択を受ける。選択が起こる場合、培地を4～5日ごとに交換する。選択の間、細胞を安定なプールを生成するように増殖させるか、または安定なクローン選択のために分ける。

20

30

40

【0479】

50

(実施例4)

(GPCR活性化の決定のためのアッセイ)

ヒトGPCRの活性化の評価のために種々のアプローチが利用可能である。以下は、例証であり、当業者は、当業者の必要性にとって特に有益なこれらの技術を決定する能力を有すると考えられる。

【0480】

(1. 膜結合アッセイ: [^{3} ^{5} S] GTP γ Sアッセイ)

Gタンパク質共役レセプターがその活性状態にある場合、リガンド結合または構成的活性のいずれかの結果として、レセプターはGタンパク質へ結合してGDPの放出およびGタンパク質へのGTPのその後の結合を刺激する。Gタンパク質レセプター複合体の α サブユニットはGTPaseとして作用し、そしてGTPをGDPへとゆっくりと加水分解する。ここで、レセプターは、通常脱活性化される。活性化レセプターは、GDPをGTPと交換し続ける。非加水分解性GTPアナログ、[^{3} ^{5} S] GTP γ Sは、活性化レセプターを発現する膜への[^{3} ^{5} S] GTP γ Sの増強された結合を実証するために利用され得る。活性化を測定するために[^{3} ^{5} S] GTP γ S結合を使用する利点は、以下である: (a) 全Gタンパク質共役レセプターに対して全般的に利用可能であること; (b) 膜表面に近接しており、細胞内カスケードに影響を与える分子を拾う可能性がより低くなること。

10

【0481】

このアッセイは、Gタンパク質共役レセプターの能力を利用して、関連するレセプターを発現する膜への[^{3} ^{5} S] GTP γ S結合を刺激する。したがって、このアッセイは、内因性GPCRおよび非内因性の、構成的に活性化されたGPCRに対する候補化合物をスクリーニングするための直接同定法で使用され得る。このアッセイは、一般的であり、そして、全Gタンパク質共役レセプターにおける創薬に対する用途を有する。

20

【0482】

[^{3} ^{5} S] GTP γ Sアッセイは、20mMのHEPESおよび1mMと約20mMとの間(この量は、結果の最適化のために調節され得るが、20mMが好ましい)のMgCl₂ (pH7.4)、約0.3と約1.2nMとの間の[^{3} ^{5} S] GTP γ Sを有する結合緩衝液(この量は、結果の最適化のために調節され得るが、1.2が好ましい)、および12.5~75 μ gの膜タンパク質(例えば、Gs融合タンパク質を発現する293細胞; この量は最適化のために調節され得る)、および10 μ MのGDP(この量は最適化のために変更され得る)中で、1時間インキュベートされる。次いで、コムギ胚芽凝集素ビーズ(25 μ l; Amersham)を添加し、そしてこの混合物をさらに30分間室温でインキュベートする。次いで、このチューブを1500 $\times$ gで5分間、室温で遠心分離し、次いでシンチレーションカウンターで計数する。

30

【0483】

(2. アデニルシクラーゼ)

細胞ベースのアッセイのために設計されたFlash PlateTM アデニルシクラーゼキット(New England Nuclear; カタログ番号SMP004A)を、粗細胞膜との使用のために改変し得る。Flash Plateウェルは、cAMPを認識する特異的抗体をまた含有するシンチラントコーティングを含有し得る。ウェル中で生成されたcAMPは、cAMP抗体への放射活性cAMPトレーサの結合についての直接競合によって定量化され得る。以下は、レセプターを発現する全細胞におけるcAMPレベルにおける測定の変化についての簡単なプロトコールとして役立つ。

40

【0484】

トランスフェクトされた細胞を一過性トランスフェクションの約24時間後に収集する。培地を慎重に吸引し、廃棄する。10mlのPBSを各々の細胞のディッシュに穏やかに添加し、続いて慎重に吸引する。1mlのSigma細胞解離緩衝液および3mlのPBSを各プレートに添加する。細胞をプレートからピペットで除き、この細胞懸濁液を50mlコニカル遠沈管中に回収する。細胞を、1,100rpmで5分間、室温で遠心分

50

離する。この細胞ペレットを適切な容量のPBS（約3ml／プレート）に慎重に再懸濁する。次いで、細胞を、血球計を使用して計数し、さらなるPBSを添加して、（約50μl／ウェルの最終容量で）適切な数の細胞を得る。

【0485】

cAMP標準および検出緩衝液（11mlの検出緩衝液に対して1μCiのトレーサー^[125I]cAMP（50μl）を含む）を、製造者の指示書に従って調製し、維持する。アッセイ緩衝液を、スクリーニングのために新たに調製し、そしてこれは、50μlの刺激緩衝液、3μlの試験化合物（12M最終アッセイ濃度）および50μlの細胞を含む。アッセイ緩衝液を、使用するまで氷上に保存する。このアッセイは、好ましくは、例えば、96ウェルプレートで行われ、適切なウェルに50μlのcAMP標準を添加し、続いてH-11およびH12のウェルに50μlのPBSAを添加することによって開始する。全てのウェルに50μlの刺激緩衝液を添加する。DMSO（または選択された候補化合物）を、3μlの化合物溶液を分注し得るピンツールを使用して適切なウェルに添加し、試験化合物の最終アッセイ濃度を12μM、および総アッセイ容量を100μlとする。次いで、細胞をウェルに添加し、室温で60分間インキュベートする。次いで、cAMPトレーサーを含有する100μlの検出ミックスをウェルに添加する。次いで、プレートをさらに2時間インキュベートし、続いて、Wallac MicroBetaシンチレーションカウンターで計数する。次いで、cAMP／ウェルの値を、各アッセイプレート内に含まれる標準cAMP曲線から外挿する。

【0486】

（3. Gi結合標的GPCRについての細胞ベースのcAMP）

TSHRは、活性の際にcAMPの蓄積を引き起こすGs結合GPCRである。TSHRは、アミノ酸残基623を変異すること（すなわち、アラニン残基をイソロイシン残基に変更すること）によって構成的に活性化される。Gi結合レセプターは、アデニリルシクラーゼを阻害し、それによってcAMP生成のレベルを低下させると予測され、cAMPレベルの評価をやりがいのあるものにさせ得る。Gi結合レセプターの活性化の指標としてcAMPの生成の低下を測定するために有効な技術は、最も好ましくは、非内因性の、構成的に活性化されたTSHR（TSHR-A623I）（もしくは、内因性の、構成的に活性なGs結合レセプター）を、「シグナルエンハンサー」として、cAMPレベルのベースラインを確立するためのGiに連結された標的GPCRとともに同時トランスフェクションすることによって達成され得る。Gi結合レセプターの非内因性バージョンの生成において、標的GPCRのこの非内因性バージョンは、次にシグナルエンハンサーとともに同時トランスフェクトされる。スクリーニングに使用され得るのは、この物質である。本発明者らは、cAMPアッセイが使用される場合、シグナルを効率的に生成するためにこのようなアプローチを使用する。いくつかの実施形態において、このアプローチは、好ましくは、Gi結合レセプターに対する候補化合物の直接的同定に使用される。Gi結合GPCRについては、このアプローチが使用される場合、標的GPCRの逆アゴニストはcAMPシグナルを増大させ、そしてアゴニストはcAMPシグナルを減少させるということに留意すること。

【0487】

第1日目において、 2×10^4 の293細胞／ウェルをプレートする。第2日目、2つの反応チューブを調製する（各チューブについて従うその割合は、プレートあたりである）：チューブAを、1.2ml無血清DMEM（Irvine Scientific, Irvine, CA）中で、哺乳動物細胞にトランスフェクトされた2μgの各レセプターのDNA（全部で4μgのDNA（例えば、pCMVベクター；変異されたTSHR（TSHR-A623I）；TSHR-A623IおよびGPCRなどを有するpCMVベクター）を混合することによって調製する；チューブBを、1.2ml無血清DMEM中で、120μlのリポフェクタミン（Gibco BRL）を混合することによって調製する。次いで、チューブAおよびBを転倒混和し（数回）、その後室温で30～45分間インキュベートする。この混合物を、「トランスフェクション混合物」と呼ぶ。プレート

した293細胞を1×PBSで洗浄し、続いて10mlの無血清DMEMを添加する。次いで2.4mlのトランスフェクション混合物を細胞に添加し、続いて4時間、37℃/5%CO₂にてインキュベーションする。次いでトランスフェクション混合物を吸引によって取り出し、その後25mlのDMEM/10%ウシ胎仔血清を添加する。次いで細胞を、37℃/5%CO₂にてインキュベーションする。24時間のインキュベーションの後、次いで細胞を回収し、そして分析に使用する。

【0488】

Flash PlateTM アデニリルシクラーゼキット (New England Nuclear; カタログ番号 SMP004A) は、細胞ベースのアッセイのために設計されているが、このキットは、当業者の必要性に依存して粗形質膜用に改変され得る。Flash Plate ウェルは、シンチラントコーティングを含み、このコーティングはまた、cAMPを認識する特異的抗体を含む。ウェル内で生成されたcAMPは、放射性cAMPトレーサーのcAMP抗体への結合に関する直接的競合によって定量化され得る。以下は、そのレセプターを発現する全細胞における、cAMPレベルの変化の測定のための短いプロトコールとして役立つ。

10

【0489】

トランスフェクションされた細胞を、一過性トランスフェクションのおよそ24時間後に回収する。培地を慎重に吸引し、廃棄する。10mlのPBSを各細胞のディッシュに穏やかに添加し、続いて慎重に吸引する。1mlのSigma細胞解離緩衝液および3mlのPBSを、各プレートに添加する。細胞を、プレートからピペットで取り出し、この細胞懸濁液を、50mlのコニカル遠沈管に回収する。次いで、細胞を、室温、1,100rpmで5分間遠心分離する。細胞ペレットを、適切な容量のPBS(約3ml/プレート)中に慎重に再懸濁する。次いで、細胞を血球計を使用して計数し、さらなるPBSを添加して適切な数の細胞(約50μl/ウェルの最終容量)とする。

20

【0490】

製造者の使用説明書に従って、cAMP標準および検出緩衝液(11mlの検出緩衝液に対して1μCiのトレーサー [¹²⁵I] cAMP(50μlを含む))を調製し、維持する。アッセイ緩衝液は、スクリーニングのために新たに調製すべきであり、そして50μlの刺激緩衝液、3μlの試験化合物(12μMの最終アッセイ濃度)および50μlの細胞を含むべきである。アッセイ緩衝液は、使用まで保存され得る。50μlのcAMP標準を適切なウェルに添加し、続いて50μlのPBSEAをウェルH-11およびH-12に添加することによって、アッセイを開始し得る。50μlの刺激緩衝液を全てのウェルに添加する。選択された化合物(例えば、TSH)を、3μlの化合物溶液を分注し得るピンツールを使用して、適切なウェルに添加する(12μMの試験化合物および100μlの全アッセイ容量の最終アッセイ濃度)。次いで、細胞をウェルに添加し、室温で60分間インキュベートする。次に、トレーサーcAMPを含有する100μlの検出ミックスをウェルに添加する。プレートを次いでさらに2時間インキュベートし、その後Wallac MicroBetaシンチレーションカウンターで計数した。次いで、cAMP/ウェルの値を、各アッセイプレート内に含まれる標準cAMP曲線から外挿する。

30

【0491】

40

(4. レポーターベースのアッセイ)

(CRE-Lucレポーターアッセイ (Gs関連レセプター))

293細胞および293T細胞を、2×10⁴細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートにプレートし、製造者の使用説明書に従って、リポフェクタミン試薬(BRL)を使用してトランスフェクトした。各々6ウェルのトランスフェクションについて、以下のようにDNA/脂質混合物を調製する: 100μlのDMEM中の260ngのプラスミドDNAを、100μlのDMEM中の2μlの脂質とともに穏やかに混合する(この260ngのプラスミドDNAは、200ngの8xCRE-Lucレセプタープラスミド、50ngの内因性レセプターもしくは非内因性レセプターを含むpCMVまたはpCMV単独、および10ngのGPRS発現プラスミド(pCDNA3 (Invitrogen))

50

中のGPRS)から構成される。この8xCRE-Lucレセプタープラスミドを、以下のように調製した：ベクターSRIF- β -galを、p β gal-Basicベクター(Clontech)中のBgIV-HindIII部位においてラットソマトスタチンプロモーター(-71/+51)をクローニングすることによって得た。8コピーのcAMP反応エレメントを、アデノウイルステンプレートAdpCF126CCRE8からのPCRによって得て(Suzukiら, Hum Gene Ther (1996) 7:1883-1893を参照のこと；この開示は、その全体が本明細書において参考として援用される)、SRIF- β -galベクター中にKpn-BgIV部位においてクローニングし、8xCRE- β -galレセプターベクターを得た。8xCRE-Lucレセプタープラスミドを、8xCRE- β -galレセプターベクター中の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を、pGL3-basicベクター(Promega)中のHindIII-BamHI部位から得られるルシフェラーゼ遺伝子で置き換えることによって生成した。室温でのインキュベーションの30分後、DNA/脂質混合物を400 μ lのDMEMで希釈し、そしてこの100 μ lの希釈混合液を、各ウェルに添加する。10%FCSを含む100 μ lのDMEMを、細胞培養インキュベーター内での4時間のインキュベーションの後、各ウェルに添加する。翌日、トランスフェクトされた細胞を、200 μ l/ウェルの10%FCSを含むDMEMで交換し、8時間後、ウェルを一回PBSで洗浄した後、100 μ l/ウェルのフェノールレッドを含まないDMEMと交換する。翌日、LucLiteTMレセプター遺伝子アッセイキット(Packard)を使用して、製造者の使用説明書に従ってルシフェラーゼ活性を測定し、1450 MicroBetaTMシンチレーションおよび発光カウンター(Wallac)で読み取る。

【0492】

(b. AP1レセプターアッセイ(Gq関連レセプター))

Gq刺激を検出する方法は、Gq依存性ホスホリパーゼCの、そのプロモーター中にAP1エレメントを含む遺伝子の活性化を引き起こすという公知の性質に依存する。PathdetectTM AP-1 cis-Reporting System(Stratagene, カタログ番号219073)を、リン酸カルシウム沈殿物の成分が410ngのpAP1-Luc、80ngのpCMV-レセプター発現プラスミド、および20ngのCMV-SEAPであったことを除いて、CREBレセプターアッセイに関する上記のプロトコールに従って使用し得る。

【0493】

(c. SRF-Lucレセプターアッセイ(Gq関連レセプター))

Gq刺激を検出する方法は、Gq依存性ホスホリパーゼCが、そのプロモーター中に血清反応因子を含む遺伝子の活性化を引き起こすという公知の性質に依存する。PathdetectTM SRF-Luc-Reporting System(Stratagene)を、例えば、COS7細胞でのGq結合活性についてのアッセイに使用し得る。細胞を、製造者の使用説明書に従ってMammalian TransfectionTM

Kit(Stratagene, カタログ番号200285)を使用して、このシステムのプラスミド構成要素および内因性もしくは非内因性GPCRをコードする指示された発現プラスミドでトランスフェクトする。簡単にいうと、410ngのSRF-Luc、80ngのpCMV-レセプター発現プラスミド、および20ngのCMV-SEAP(分泌性アルカリホスファターゼ発現プラスミド；アルカリホスファターゼ活性は、サンプル間でのトランスフェクション効率の変動を制御するために、トランスフェクトされた細胞の培地中で測定される)を、製造者の使用説明書に従ってリン酸カルシウム沈殿物中に混合する。沈殿物の半分を、96ウェルプレートの3つのウェルに等分し、細胞を無血清培地中に24時間保存する。最後の5時間、細胞を、例えば1 μ Mの試験化合物とともに、インキュベートする。次いで、細胞を溶解し、LucLiteTMキット(Packard, カタログ番号6016911)および「Trilux 1450 Microbeta」液体シンチレーションおよび発光カウンター(Wallac)を使用して、製造者の使用説明書に従ってルシフェラーゼ活性についてアッセイする。データは、Graph

Pad PrismTM 2.0a (GraphPad Software Inc.) を使用して分析し得る。

【0494】

(細胞内IP3蓄積アッセイ (Gq関連レセプター))

第1日目、レセプター (内因性もしくは非内因性) を含む細胞を、24ウェルプレートに、通常 1×10^5 細胞/ウェル (その数は最適化され得る) で配置し得る。第2日目、最初に $50 \mu\text{l}$ の無血清DMEM/ウェル中の $0.25 \mu\text{g}$ のDNAと $50 \mu\text{l}$ の無血清DMEM/ウェル中の $2 \mu\text{l}$ のリポフェクタミンとを混合することによって細胞をトランスフェクトし得る。この溶液を、穏やかに混合し、室温で15~30分間インキュベートする。細胞を 0.5 ml のPBSで洗浄し、 $400 \mu\text{l}$ の無血清培地をトランスフェクション培地と混合して、細胞を添加する。次いで、3~4時間、 $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ で細胞をインキュベートし、そしてトランスフェクション培地を除去して 1 ml /ウェルの通常の増殖培地で置き換える。第3日目、細胞を³H-myoinositolで標識する。簡単にいうと、培地を除去し、細胞を 0.5 ml のPBSで洗浄する。次いで、1ウェルあたり 0.5 ml のイノシトール非含有/無血清培地 (GIBCO BRL) を、 $0.25 \mu\text{Ci}$ の³H-myoinositol/ウェルとともに添加し、細胞を、16~18時間、 $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ でインキュベートする。第4日目、 0.5 ml のPBSで細胞を洗浄し、イノシトール非含有/無血清培地を含有する 0.45 ml のアッセイ培地に、 $10 \mu\text{M}$ のパーズリン、 10 mM の塩化リチウムを添加するか、または 0.4 ml のアッセイ培地および $50 \mu\text{l}$ の $10 \times$ ケタンセリン (ket) を最終濃度 $10 \mu\text{M}$ とする。次いで、細胞を30分間 37°C でインキュベートする。次に細胞を 0.5 ml のPBSで洗浄し、 $200 \mu\text{l}$ の新鮮な/氷冷された停止溶液 (1 M KOH ; 18 mM のホウ酸Na; 3.8 mM のEDTA) /ウェルを添加した。溶液を、氷上で5~10分間または細胞が溶解するまで保存し、 $200 \mu\text{l}$ の新鮮な/氷冷された中性化溶液 ($7.5\% \text{ HCL}$) によって中性化する。溶解物を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し、 1 ml のクロロホルム/メタノール (1:2) /チューブを添加する。この溶液を15秒間ボルテックスし、上相をBio-rad AG1-X8TM アニオン交換樹脂 ($100 \sim 200$ メッシュ) に付与する。最初に、この樹脂を水 (1:1.25 W/V) で洗浄し、 0.9 ml の上相をカラムにロードする。このカラムを 10 ml の 5 mM myoinositol および 10 ml の 5 mM ホウ酸Na/ 60 mM のギ酸Naで洗浄する。イノシトールトリリン酸を、 2 ml の 0.1 M ギ酸/ 1 M のギ酸アンモニウムを含む 10 ml のシンチレーションカクテルを含有するシンチレーションバイアルに溶出する。このカラムを 10 ml の 0.1 M ギ酸/ 3 M ギ酸アンモニウムで洗浄することによって再生し、 ddH_2O で2回リンスし、水中で 4°C で保存する。

【0495】

(実施例5)

(融合タンパク質調製)

(a. GPCR:Gs融合構築物)

GPCR-Gタンパク質融合構築物の設計を、以下のように達成し得る: ラットGタンパク質Gsα (長鎖形態; Itoh, H. ら, 83 PNAS 3776 (1986)) の5'末端および3'末端の両方を、その上にHindIII (5'-AAGCTT-3') 配列を含むように操作する。正しい配列 (隣接するHindIII配列を含む) の確認に続いて、その配列全体を、ベクターのHindIII制限部位を使用してサブクローニングすることによってpcDNA3.1 (-) (Invitrogen, カタログ番号V795-20) にシャトルする。Gsα配列の正確な向きを、pcDNA3.1 (-) へのサブクローニング後に決定する。次いで、HindIII配列においてラットGsα遺伝子を含むこの改変されたpcDNA3.1 (-) を検証する。このベクターは、ここで、「汎用」Gsαタンパク質ベクターとして利用可能である。pcDNA3.1 (-) ベクターは、HindIII部位の上流に種々の周知の制限部位を含み、したがってGsタンパク質の上流に、内因性の、構成的に活性なGPCRのコード配列を挿入する能力を

都合よく提供する。この同じアプローチを、他の「汎用」Gタンパク質ベクターを生成するために利用し得、そして当然ながら、当業者に公知の他の市販もしくは所有されているベクターを使用し得る。重要な基準は、GPCRについての配列が、Gタンパク質の配列の上流およびフレーム内にあることである。

【0496】

(Gq (6アミノ酸欠失) / Gi融合構築物)

Gq (del) / Gi融合構築物の設計を、以下のように達成し得る：GαqサブユニットのN末端の6アミノ酸 (アミノ酸2～7、配列TLESIMを有する) を欠失させ、C末端の5アミノ酸 (配列EYNLVを有する) を、Gαiタンパク質の対応するアミノ酸 (配列DCGLFを有する) で置き換える。この融合構築物を、以下のプライマー：

10

5' - g a t c A A G C T T C C A T G G C G T G C T G C C T G A G C G A G G A G - 3' (配列番号9)、および

5' - g a t c G G A T C C T T A G A A C A G G C C G C A G T C C T T C A G G T T C A G C T G C A G G A T G G T G - 3' (配列番号10)

ならびに血球凝集素タグを有するマウスGαq野生型バージョンを含むプラスミド63313をテンプレートとして使用するPCRによって得る。小文字のヌクレオチドは、スパーサーとして含まれる。

【0497】

Taq Plus Precision DNAポリメラーゼ (Stratagene) を以下のサイクルによる増幅のために使用する：工程2～4の35回繰り返し：95℃で2分間；95℃で20秒間；56℃で20秒間；72℃で2分間；および72℃で7分間。PCR産物を、pCRII-TOPOベクター (Invitrogen) 中にクローニングし、ABI Big Dye Terminatorキット (P. E. Biosystems) を使用して配列決定する。融合構築物の配列を含むTOPOクローン由来のインサートを、2工程クローニングプロセスによって発現ベクターpcDNA3.1 (+) 中HindIII / BamHI部位にシャトルする。PCT出願番号PCT / US 02 / 05625 (2002年9月6日にWO 02 068600として公開) もまた参照のこと (この開示は、本明細書によりその全体が参考として援用される)。

20

【0498】

(実施例6 [³⁵S] GTPγSアッセイ)

30

(A. 膜調製)

いくつかの実施形態において、目的の、候補化合物を (例えば、逆アゴニスト、アゴニストもしくはアンタゴニスト) として同定することに使用するための標的GPCRを含む膜を、好ましくは、以下のように調製する：

(a. 材料)

「膜擦過緩衝液 (Membrane Scrape Buffer)」は、20mMのHEPESおよび10mMのEDTAから構成される (pH 7.4)；「膜洗浄緩衝液」は、20mMのHEPESおよび0.1mMのEDTAから構成される (pH 7.4)；「結合緩衝液」は、20mMのHEPES、100mMのNaClおよび10mMのMgCl₂ から構成される (pH 7.4)。

40

【0499】

(b. 手順)

全ての材料を、手順の間ずっと氷上で保存する。最初に、コンフルエントな細胞単層から培地を吸引し、その後10mlの冷PBSでリンスし、続いて吸引する。その後、5mlの膜擦過緩衝液を掻き取った細胞に添加する；続いて、細胞抽出物を50mlの遠沈管に移す (20,000rpmで17分間、4℃で遠心分離)。その後、上清を吸引し、ペレットを30mlの膜洗浄緩衝液で再懸濁し、続いて20,000rpmで17分間、4℃で遠心分離する。次いで、上清を吸引し、ペレットを結合緩衝液に再懸濁する。次に、Brinkman PolyttronTM ホモジナイザーを使用してこれをホモジナイズする (懸濁液中の全ての物質がつぶれるまで15～20秒間)。これを、本明細書におい

50

て、「膜タンパク質」と呼ぶ。

【0500】

(ブラッドフォードタンパク質アッセイ)

ホモジナイズに続いて、ブラッドフォードタンパク質アッセイを使用して膜のタンパク質濃度を決定する。(タンパク質は、約 1.5 mg/ml に希釈され、アリコートにされて、後の使用のために凍結され得る (-80°C) ; 凍結する場合、使用のためのプロトコールは以下である: アッセイの日、凍結膜タンパク質を室温で解凍し、その後ボルテックスし、次いで、Polytronによって約 $12 \times 1,000 \text{ rpm}$ で約 $5 \sim 10$ 秒間ホモジナイズする。複数の調製のためには、異なる調製物のホモジナイズ間でホモジナイザーを徹底的にきれいにすべきであることに注意すること)

10

(a. 材料)

結合緩衝液(上記のとおり); ブラッドフォード染色試薬; ブラッドフォードタンパク質標準を、製造者の使用説明書に従って使用する(Biorad, カタログ番号 500-0006)。

【0501】

(b. 手順)

2つのチューブを調製する。1つは膜を含み、1つはコントロールとして「ブランク」である。各々は、 $800 \mu\text{l}$ の結合緩衝液を含む。その後、 $10 \mu\text{l}$ のブラッドフォードタンパク質標準 (1 mg/ml) を各チューブに添加し、次いで $10 \mu\text{l}$ の膜タンパク質を1つのチューブにのみ添加する(ブランクではない)。その後、 $200 \mu\text{l}$ のブラッド

20

フォード染色試薬を各チューブに添加し、その後各々をボルテックスする。5分後、チューブを再度ボルテックスし、中の物質をキュベットに移す。キュベットを CECIL 3041 分光光度計で、波長 595 nm にて読み取る。

【0502】

(同定アッセイ)

(a. 材料)

GDP緩衝液は、 37.5 ml の結合緩衝液および 2 mg の GDP (Sigma, カタログ番号 G-7127) から構成され、結合緩衝液で連続希釈され、 $0.2 \mu\text{M}$ の GDP とされた(各ウェルにおける GDP の最終濃度は、 0.1 M の GDP); 候補化合物を含む各ウェルは、 $100 \mu\text{l}$ の GDP 緩衝液(最終濃度、 0.1 M の GDP)、結合緩衝液中の膜タンパク質 $50 \mu\text{l}$ 、ならびに結合緩衝液中の $[^3\text{H}] \text{GTP} \gamma \text{S}$ (0.6 nM)、 $50 \mu\text{l}$ ($2.5 \mu\text{l}$ $[^3\text{H}] \text{GTP} \gamma \text{S} / 10 \text{ ml}$ の結合緩衝液) から構成される、 $200 \mu\text{l}$ の最終容量を有する。

30

【0503】

(b. 手順)

候補化合物を、好ましくは、96ウェルプレート形式(これらは、 -80°C で凍結され得る)を使用してスクリーニングする。膜タンパク質(もしくは、コントロールとして、標的GPCR以外の発現ベクターを含む膜)を、懸濁するまで短時間ホモジナイズする。次いで、上記のブラッドフォードタンパク質アッセイを使用してタンパク質濃度を決定する。膜タンパク質(およびコントロール)を、次に結合緩衝液中において 0.25 mg/ml に希釈する(最終アッセイ濃度、 $12.5 \mu\text{g/ウェル}$)。その後、 $100 \mu\text{l}$ の GDP 緩衝液を、Wallac ScintistripTM (Wallac) の各ウェルに添加した。次いで、 $5 \mu\text{l}$ のピンツールを使用して、そのようなウェルに $5 \mu\text{l}$ の候補化合物を移送する(すなわち、 $200 \mu\text{l}$ の総アッセイ容量中 $5 \mu\text{l}$ は、 $1:40$ 比であり、したがって候補化合物の最終スクリーニング濃度は、 $10 \mu\text{M}$ である)。やはり、汚染を避けるため、各移送工程の後に、ピンツールを3つのレザバ(水($1 \times$)、エタノール($1 \times$)および水($2 \times$))を含む)内でリンスしなければならない。過剰の液体を各リンスの後でツールから振り落とし、紙およびキムワイプで乾燥させる。その後、 $50 \mu\text{l}$ の膜タンパク質を各ウェルに添加し(標的GPCRを含まない、膜を含むコントロールウェルもまた利用した)、 $5 \sim 10$ 分間室温であらかじめインキュベートする。その後、5

40

50

0 μ l の結合緩衝液中の [^{3} ^{5} S] GTP γ S (0.6 nM) を各ウェルに添加し、その後、振盪機で60分間室温でインキュベートする（再び、この実施例において、プレートはホイルで覆った）。次いで、プレートを4000RPMで15分間、22℃でスピンのことによってアッセイを停止する。次いで、このプレートを、8チャンネルマニフォールドで吸引し、プレートカバーでシールする。次いで、このプレートをWallac 1450で「Prot. #37」の設定を使用して読み取る（製造者の使用説明書どおり）。

【0504】

（実施例7）

（CYCLIC AMPアッセイ）

候補化合物を（例えば、逆アゴニスト、アゴニストもしくはアンタゴニストとして）同定するための別のアッセイアプローチを、シクラーゼベースのアッセイを利用することによって達成する。直接同定に加えて、このアッセイアプローチは、独立のアプローチとして利用されて、上記の実施例6に示される [^{3} ^{5} S] GTP γ S アプローチからの結果の確認を提供し得る。

10

【0505】

好ましくは、改変Flash PlateTM アデニリルシクラーゼキット（New England Nuclear；カタログ番号SMP004A）を、内因性もしくは非内因性の、構成的に活性化されたGPCRに対する逆アゴニストおよびアゴニストとして候補化合物を直接的に同定するために、以下のプロトコルに従って利用する。

20

【0506】

トランスフェクトされた細胞をトランスフェクションの約3日後に回収する。懸濁された細胞を20mMのHEPES（pH7.4）および10mMのMgCl₂を含む緩衝液中でホモジナイズすることによって、膜を調製する。ホモジナイズを、Brinkman PolytronTMを使用して氷上で約10秒間行う。得られたホモジネートを、49,000×gで15分間、4℃で遠心分離する。次いで、得られたペレットを、20mMのHEPES（pH7.4）および0.1mMのEDTAを含む緩衝液中で再懸濁し、10秒間ホモジナイズし、続いて49,000×gで15分間、4℃で遠心分離する。得られたペレットを次に-80℃で使用まで保存する。直接同定スクリーニングの日、膜ペレットを室温でゆっくりと融解し、20mMのHEPES（pH7.4）および10mMのMgCl₂を含む緩衝液中で再懸濁して、0.60mg/mlの最終タンパク質濃度を得る（再懸濁された膜は、使用まで氷上に置く）。

30

【0507】

cAMP標準および検出緩衝液（11mlの検出緩衝液に対して2 μ Ciのトレーサー [^{1} ^{2} ^{5} I] cAMP（100 μ l）を含む）を、製造者の使用説明書に従って調製し、維持する。アッセイ緩衝液を、スクリーニングのために新たに調製し、これは以下を含有した：20mMのHEPES（pH7.4）、10mMのMgCl₂、20mMのホスホクレアチン（Sigma）、0.1単位/mlのクレアチンホスホキナーゼ（Sigma）、50 μ MのGTP（Sigma）、および0.2mMのATP（Sigma）；アッセイ緩衝液を、次いで、使用するまで氷上で保存した。

40

【0508】

好ましくは、例えば、96ウェルプレートのウェルに候補化合物（3 μ l/ウェル；12 μ Mの最終アッセイ濃度）を、40 μ lの膜タンパク質（30 μ g/ウェル）および50 μ lのアッセイ緩衝液とともに添加する。次いで、この混合物を、室温で30分間、穏やかに振盪しながらインキュベートした。

【0509】

インキュベーション後、100 μ lの検出緩衝液を各ウェルに添加し、2～24時間インキュベーションする。次いで、プレートをWallac MicroBetaTM プレートリーダーで、「Prot. #31」を使用して計数する（製造者の使用説明書に従う）。

50

【0510】

例示のためであって限定のためではなく、得られた例示的スクリーニングアッセイプレート（96ウェル形式）結果を図1に示す。各バーは、各ウェルにおける異なる化合物についての結果を示す。「標的GPCR」は、GPR131と無関係な、内因性の、構成的に活性なGs結合GPCRのGsα融合タンパク質構築物である。図1に示される結果はまた、各プレートの平均結果の標準偏差を提供し（「m」）、そしてその平均プラス、一次スクリーニングから、「リード」として逆アゴニストを選択するための2つの任意優先（arbitrary preference）は、少なくともその平均プレート反応マイナス2標準偏差までパーセント反応を低下させる候補化合物の選択に参与する。逆に、一次スクリーニングからの「リード」としてのアゴニストの選択のための任意優先は、少なくともその平均プレート反応プラス2標準偏差までパーセント反応を増大させる候補化合物の選択に関する。これらの選択プロセスに基づいて、その後のウェルの候補化合物を、ウェルA2およびG9それぞれの上記内因性GPCRに対する推定逆アゴニスト（化合物A）および推定アゴニスト（化合物B）として直接的に同定した。図1を参照のこと。明瞭化のため、これらの化合物を、このGPCRに対する内因性リガンドの知識なしに、直接的に同定した。化合物の結合親和性ではなくレセプター機能に基づくアッセイ技術に注目することによって、このレセプター（化合物A）の機能活性を減少し得、かつレセプター（化合物B）の機能活性を増加し得る化合物を確認することが可能である。

10

【0511】

(実施例8)

20

（細胞内カルシウム濃度を測定するためのFluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR) アッセイ)

標的レセプター（実験的）およびpCMV（ネガティブコントロール）を安定にトランスフェクトしたそれぞれのクローン株由来の細胞を、ポリ-Dーリジン前処理された96ウェルプレート（Becton-Dickinson, #356640）中に 5.5×10^4 細胞/ウェルで、完全培養培地（DMEM、10%のFBS、2mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウムを含む）とともに、翌日のアッセイのために播種する。Fluo4-AM（Molecular Probe, #F14202）インキュベーション緩衝液ストックを調製するため、1mgのFluo4-AMを467μlのDMSOおよび467μlのプLOORONIC酸（Pluoronic acid）（Molecular Probe, #P3000）に溶解し、-20℃で1ヶ月保存し得る1mMのストック溶液を得る。Fluo4-AMは、蛍光カルシウム指標色素である。

30

【0512】

候補化合物を、洗浄緩衝液中で調製する（1×HBSS/2.5mM Probenicid/20mM HEPES、pH7.4）。

【0513】

アッセイ時、培養培地をウェルから除去し、100μlの4μMのFluo4-AM/2.5mM Probenicid（Sigma, #P8761）/20mM HEPES/完全培地（pH7.4）を使用して細胞をロードする。37℃/5%CO₂でのインキュベーションを60分間進める。

40

【0514】

1時間のインキュベーションの後、Fluo4-AMインキュベーション緩衝液を除去し、100μlの洗浄緩衝液で細胞を2回洗浄する。各ウェルに、100μlの洗浄緩衝液を残す。プレートをインキュベーターに、37℃/5%CO₂で、60分間戻す。

【0515】

FLIPR（Fluorometric Imaging Plate Reader; Molecular Device）を、50μlの候補化合物を30秒間添加して、さらに150秒間、候補化合物によって誘発される細胞内カルシウム濃度（[Ca²⁺]）の一過性の変化を記録するようにプログラムする。FLIPRソフトウェアを使用して、全体的な蛍光変化の計数をアゴニスト活性を決定するために使用する。機器のソフトウ

50

ェアは、蛍光の読みを標準化して、初期読み取り値を等しく 0 にする。

【0516】

いくつかの実施形態において、標的レセプターを含む細胞は、Gα15、Gα16もしくはキメラGq/Giαユニットをさらに含む。

【0517】

上記は、安定にトランスフェクトされた細胞を使用する、アゴニスト活性についてのFLIPRアッセイを提供するが、当業者は、アンタゴニスト活性を特徴付けるために、このアッセイを容易に改変し得る。当業者はまた、一過性にトランスフェクトされた細胞が代替的に使用され得ることを容易に理解する。

【0518】

10

(実施例9)

(MAPキナーゼアッセイ)

MAPキナーゼ(マイトジェン活性化キナーゼ)をモニタリングして、レセプター活性化を評価し得る。MAPキナーゼは、いくつかのアプローチによって検出され得る。1つのアプローチは、リン酸化状態(非リン酸化(不活性)もしくはリン酸化(活性)のいずれか)の評価に基づく。リン酸化タンパク質は、SDS-PAGEにおけるよりゆっくりとした移動度を有し、したがって、ウェスタンブロッティングを使用して未刺激タンパク質と比較され得る。あるいは、リン酸化タンパク質に対する抗体特異性が利用可能である(New England Biolabs)。これは、リン酸化キナーゼの増加を検出するために使用され得る。いずれの方法においても、細胞を試験化合物で刺激し、次いで20 Laemmli緩衝液で抽出する。可溶性分画をSDS-PAGEゲルに付与し、タンパク質を、ニトロセルロースもしくはImmobilinに電気泳動的に移送する。標準的なウェスタンブロット技術によって免疫反応性バンドを検出する。可視的シグナルもしくは化学発光性シグナルをフィルムに記録し、デンシトメトリーによって定量化し得る。

20

【0519】

別のアプローチは、リン酸化アッセイを介するMAPキナーゼ活性の評価に基づく。細胞を試験化合物によって刺激し、可溶性の抽出物を調製する。抽出物を、30℃で10分間、 γ - ^{32} P-ATP、ATP再生システム、およびMAPキナーゼのための特異的基質(例えば、インスリンによって調節されるリン酸化された熱および酸安定性タンパク質、もしくはPHAS-I)とともにインキュベートする。この反応をH₃PO₄の添加によって終了させ、サンプルを氷上に移送する。アリコートをし、Whatman P81クロマトグラフィー紙上にスポットし、これは、リン酸化タンパク質を保持する。クロマトグラフィー紙を洗浄し、 ^{32} Pについての計数は、液体シンチレーションカウンターである。あるいは、細胞抽出物を、 γ - ^{32} P-ATP、ATP再生システム、およびストレプトアビジンによってフィルター支持体に結合されるビオチン化ミエリン塩基性タンパク質とともにインキュベートする。ミエリン塩基性タンパク質は、活性化MAPキナーゼに対する基質である。リン酸化反応を10分間30℃で行う。次いで、フィルターを介して抽出物を吸引し得る。これは、リン酸化ミエリン塩基性タンパク質を保持する。フィルターを洗浄し、液体シンチレーション計数によって ^{32} Pについて計数する。

30

【0520】

40

(実施例10)

(メラニン保有細胞技術)

メラニン保有細胞は、下等脊椎動物において見出される皮膚細胞である。これらは、メラノソームと称される色素性のオルガネラを含む。メラニン保有細胞は、Gタンパク質共役レセプター(GPCR)活性化によって微小管ネットワークに沿って、これらのメラノソームを再分布させ得る。これらの色素移動の結果は、細胞の明らかな明化もしくは暗化である。メラニン保有細胞において、Gi結合レセプターの活性化から生じる細胞内cAMPの減少したレベルは、細胞の中央にメラノソームを移動させ、色の劇的な明化をもたらす。そして、cAMPレベルが上昇する場合、Gs結合レセプターの活性化に続いて、メラノソームは、再分散され、細胞は再度暗く見える。Gq結合レセプターの活性化から

50

生じるジアシルグリセロールの増加したレベルもまた、この再分散を誘導し得る。さらに、この技術はまた、特定のレセプターチロシナーゼの研究に適切である。メラニン保有細胞の反応は、レセプター活性化の数分以内に起こり、単純で、強力な色の変化を生じる。この反応は、従来の吸光マイクロプレートリーダーもしくは適度なビデオ画像化システムを使用して容易に検出され得る。他の皮膚細胞と異なり、メラニン保有細胞は神経冠に由来し、シグナル伝達タンパク質の全補体を発現するように見える。特に、細胞は、極度に広い範囲のGタンパク質を発現し、したがってほぼ全てのGPCR機能的に発現し得る。

【0521】

メラニン保有細胞を利用して、GPCRに対する化合物（天然リガンドを含む）を同定し得る。この方法は、特定の刺激に反応してそれらの色素を分散もしくは凝集させ得、そしてGPCRについてコードする外因性クローンを発現する色素細胞株に試験細胞を導入することによって実行され得る。刺激薬（例えば、メラトニン）は、GPCRの活性化が色素分散を誘導する場合に試験細胞内に色素が凝集される、色素沈着の初期状態を設定する。しかし、刺激薬で細胞を刺激してGPCRの活性化の場合に色素が分散する色素沈着の初期状態に設定することは、色素凝集を誘導する。試験細胞を、次に化学化合物に接触させ、細胞内の色素沈着が色素の初期状態から色素沈着に変更されるか否かを決定する。GPCRに結合する候補化合物（リガンドが挙げられるが、これらに限定されない）に起因する色素細胞の分散は、ペトリ皿上で暗く見える。一方色素の凝集により、細胞は明るく見える。

10

20

【0522】

材料および方法は、米国特許第5,462,856号および同第6,051,386号の開示に従って行われる。これらの特許の開示は、本明細書によりその全体が参考として援用される。

【0523】

細胞を、例えば96ウェルプレートにプレートする（プレートあたり1レセプター）。トランスフェクションの48時間後、各プレートの細胞の半分を10nMのメラトニンで処理する。メラトニンは、メラニン保有細胞中の内因性Gi結合レセプターを活性化し、それらの細胞がその色素を凝集するようにさせる。残り半分の細胞を、無血清培地0.7X L-15（Gibco）に移送する。1時間後、無血清培地中の細胞は色素分散状態のままであり、一方メラトニン処理細胞は、色素凝集状態である。この点で、細胞をある容量反応の試験候補化合物で処理する。プレートされたGPCRが試験／候補化合物に結合する場合、メラニン保有細胞は化合物に反応して色変化を受けると予測される。レセプターがGsもしくはGq結合レセプターのいずれかであった場合、メラトニン凝集型メラニン保有細胞は、色素分散を受ける。対照的に、レセプターがGi結合レセプターである場合、色素分散した細胞は、容量依存的な色素凝集を受けると予測される。

30

【0524】

（実施例11）

（ヒトおよびマウスRUP43の組織分布）

ヒトおよびマウス脂肪細胞および骨格筋細胞によるRUP43の発現を、RT-PCRによって調べた。ヒト白血球サブセットによるRUP43の発現を、TaqMan RT-PCRによって調べた。

40

【0525】

（a.）

ヒト前脂肪細胞をBiowhitakerから購入し、未分化のままにさせたか、文化に供したかのいずれかとした。ヒトの分化した脂肪細胞を、Zen Bioから購入した。RNAを、これらの未分化ヒト脂肪細胞および分化したヒト脂肪細胞から調製し、cDNAに変換した。次いで、RT-PCRを行い、以下の特異的プライマーを使用してRUP43の発現を調べた：

5'-CTACCTGTACCTCGAAGTCTA-3'（センスプライマー；配列

50

番号 1 1)、および

5' - A G T G G C G G G C G C T G C T C A T - 3' (アンチセンスプライマー; 配列番号 1 2)

使用したサイクル条件は、94℃で2分間、94℃で15秒間、55℃で30秒間、および72℃で1分間で、最後の3つの工程について35サイクルであった。分化したヒト脂肪細胞によって、そしてより低い程度でヒト前脂肪細胞によって、RUP43が内因性に発現されていたことを見出した(図2A)。

【0526】

(b.)

ヒト皮下脂肪(「Sub Q」)および内臓脂肪によるRUP43の発現を、上記(a.)のようにRT-PCRで調べた。19~35の範囲のBMIを有する10人の個体から、皮下脂肪サンプルを得た。19~45の範囲のBMIを有する8人の個体から、内臓脂肪サンプルを得た。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のRT-PCRを使用して、サンプルローディングが同等であることを示した。ヒトRUP43が、皮下脂肪および内臓脂肪の両方において内因性に発現されていることを見出した(図2B)。

【0527】

(c.)

マウス3T3L1細胞を、未分化のままにしたか、分化に供した。未分化3T3L1細胞、分化した3T3L1細胞、またはマウス骨格筋細胞からRNAを調製した。RNAからcDNAへの変換を、逆転写酵素の存在下(「+」)もしくは非存在下(「-」; ネガティブコントロール)のいずれかでを行った。次いで、RT-PCRを行い、以下の特異的プライマーを用いてRUP43の発現を調べた:

5' - T G A G C T G T C G G C C A T T C C C A T - 3' (センスプライマー; 配列番号 1 3)、および

5' - G A T T G T C C C T C T T G G C T C T T C - 3' (アンチセンスプライマー; 配列番号 1 4)

使用したサイクル条件は、94℃で2分間、94℃で15秒間、55℃で30秒間、および72℃で1分間で、最後の3つの工程について35サイクルであった。分化したマウス3T3L1脂肪細胞によって、そしてより低い程度でマウス未分化3T3L1脂肪細胞によって、RUP43が発現されていたことを見出した。RUP43がマウス骨格筋細胞によって内因性に発現されていたことをまた見出した(図2C)。

【0528】

(d.)

ヒト骨格筋細胞を、Cambrexから得た。RNAを骨格筋細胞から調製し、cDNAに変換した。ポジティブコントロールとして、Biowhitakerから得たヒト脂肪細胞から上記(a.)のように調製したcDNAを使用した。(a.)に記載するように、RT-PCRを行った。RUP43が、骨格筋細胞によって、そして既に(a.)で示したように脂肪細胞によって、内因性に発現されていたことを見出した(図2D)。

【0529】

(実施例 1 2)

(脂肪細胞分化)

(マウス3T3L1細胞の分化)

3 T 3 L 1 増殖培地	1 0 0 0 m l
D M E M	1 0 0 0 m l
1 0 % B C S	1 0 0 m l
L - グルタミン、2 0 0 m M	1 0 m l
P / S	1 0 m l

3 T 3 L 1 通常培地	1 0 0 0 m l
----------------	-------------

10

20

30

40

50

DMEM	1 0 0 0 m l
1 0 % FBS	1 0 0 m l
L-グルタミン、2 0 0 m M	1 0 m l
P/S	1 0 m l

3 T 3 L 1 誘導培地	1 0 0 0 m l
DMEM	1 0 0 0 m l
1 0 % FBS	1 0 0 m l
L-グルタミン、2 0 0 m M	1 0 m l
P/S	1 0 m l
インスリン (1 0 m g / m l)	1 m l
IBMax (1 0 m g / m l)	1 1 . 1 m l
デキサメタゾン (1 0 m g / m l)	3 2 8 μ l

10

3 T 3 L 1 インスリンのみの培地	1 0 0 0 m l
DMEM	1 0 0 0 m l
1 0 % FBS	1 0 0 m l
L-グルタミン、2 0 0 m M	1 0 m l
P/S	1 0 m l
インスリン (1 0 m g / m l)	1 m l

20

DMEM:HYQ DEM/高グルコース, SH30081.01, 500ml、SH30081.02、1000ml
 BCS:仔ウシ血清、Hyclone SH30073.03
 FBS:ウシ胎仔血清、Hyclone SH30071.03
 L-グルタミン、200mm、100×、Hyclone SH40003-11
 ペニシリン-ストレプトマイシン、100mM Hyclone SV30010
 トリプシン、HYQ、0.05% 1×、SH30236.01 100ml
 HYQ DPBS/改変、1×、SH30028.02 50ml

30

3 T 3 L 1 細胞を、50%コンフルエントで播種し、その結果、培養物は翌日に完全にコンフルエントになった。2日後、細胞は100%コンフルエントに達し、誘導培地を添加した。2~5日後、細胞をインスリンのみの培地へと交換した。誘導の2~5日後、細胞を通常培地に2日間戻し、3 T 3 L 1 の脂肪細胞への分化のプロセスを完了した。

【0530】

(b. ヒト前脂肪細胞の分化)

Cambrexから購入したヒト前脂肪細胞を、24ウェルプレートに、 1×10^6 細胞/ウェルで播種した。2日後、細胞が100%コンフルエントに達した場合、Cambrexから購入した誘導培地を添加した。細胞を誘導培地中で10日間培養し、それによって、初代ヒト前脂肪細胞の脂肪細胞への分化のプロセスを完了した。

40

【0531】

(実施例13)

(ヒト骨格筋細胞の分化)

ヒト初代未分化骨格筋細胞を、Cambrexから購入したSKGM-2培地で培養した。骨格筋芽細胞培養物が50~70%コンフルエントに達した場合、SKGM-2培地を除去し、融合培地(2%ウマ血清を補充したDMEM-F12)を添加した。

【0532】

融合培地中での細胞の培養を、(隔日で融合培地を交換しながら)4~7日間または筋管芽培養物全体にわたって観察されるまで継続した。

【0533】

50

得られた分化した培養物が多核（3より多くの核）化した筋管を含むことを観察した。

【0534】

筋管を長期の培養期間を必要とするアッセイにおいて使用すべき場合、融合培地を除去し、SKGM-2培地と交換した。最高の性能のため、SKGM-2培地を隔日で交換し、培養物を2～3週間維持した。筋管培養物を、分化後2週間までに最も良好に使用した。

【0535】

（実施例14）

（内因性RUP43はGsに結合する）

RUP43によるGs結合を、内因性のヒト、マウスもしくはラットのRUP43でトランスフェクトされたHEK293細胞におけるcAMPの細胞内レベルと、偽トランスフェクトされたHEK293細胞（「pCMV」）とを比較することによって調べた。細胞内cAMPレベルの決定を、トレーサーとしての¹²⁵I（NEX130）とともにPerkin Elmer Flashplate Kit（SMP004B）を使用したシクラーゼアッセイによって、実質的に製造者の使用説明書のとおりに行った。

【0536】

HEK293細胞を 1.2×10^7 の密度でプレートし、そして一晩接着させた。次いで、HEK293細胞を、pCMV単独もしくは内因性のヒト、マウスもしくはラットのRUP43をコードするポリヌクレオチドを含むpCMVで、リポフェクタミン（120g/15cmディッシュ）を使用してトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、一晩回復させた。アッセイのために、トランスフェクトした細胞を回収し、flashplateのウェルに、 1×10^6 細胞の最終細胞数で添加した。これらを接着させ、次いで2時間トレーサーに供した。次に全てのウェルを吸引し、プレートをマイクロプレートリーダー（Wallac 1450 microbetaカウンター）で読み取った。RUP43でトランスフェクトしたHEK293細胞の細胞内レベルは、偽トランスフェクト細胞よりも有意に高かった。このことは、RUP43が検出可能なレベルの構成的Gs結合を表すことを示す（図3）。

【0537】

（実施例15）

（RUP43のアゴニストとしての化合物1の同定）

（材料）

ATCCから得たHEK293細胞を全てのアッセイにおいて使用した。培養培地は、10%ウシ胎仔血清（Gibco, BRL）を補充した90mlのDMEMから構成された。アデニリルシクラーゼ活性化Flashplate（登録商標）アッセイを使用して、直接cAMP [¹²⁵I] 検出システムによりサイクリックAMP測定値を決定した。

【0538】

（一過性トランスフェクションおよび全細胞シクラーゼFlashplateアッセイ）

HEK293細胞（ 5×10^5 細胞/ml）を15cmディッシュにプレートした。翌日、FuGENE 6試薬（Roche Applied Science）を製造者が示唆するように使用して、細胞をトランスフェクトした。簡単にいうと、OptiMEM（Gibco, BRL）およびFuGENE 6試薬から構成されるトランスフェクション混合物を、一緒に混合して、室温で5分間インキュベートさせた。2μgの内因性ヒトRUP43レセプタープラスミド（トランスフェクト）、もしくは2μgの空（empty）pCMVベクター（偽）を含む別々のチューブに、トランスフェクション試薬を滴下し、そして15分間室温でインキュベートさせた。DNA/トランスフェクション混合物を、各それぞれのプレートに滴下し、37℃、95/5%O₂/CO₂で維持された加湿インキュベーターにおいて一晩インキュベートした。翌日、培地を通常の増殖培地と交換し、細胞を一晩インキュベートした。

【0539】

3日目、細胞をPBSで一回リンスし、非酵素性細胞解離緩衝液（Gibco, BRL）を使用してプレートから剥離させ、そしてcAMPの測定のため、 2×10^6 細胞/mlでアッセイ刺激緩衝液中（登録商標）（Perkin Elmer）で再懸濁した。化合物1もしくはビヒクルを刺激緩衝液で2×所望の最終濃度で連続希釈した。化合物1およびビヒクル（50 μ L/ウェル）を、96ウェルFlashplate（登録商標）（Perkin Elmer）のそれぞれのウェルに添加した。トランスフェクト細胞または偽細胞を各ウェルに分注し（50 μ L/ウェル）、室温で、プレート形の振盪機上で1時間インキュベートさせた。検出緩衝液（登録商標）（Perkin Elmer, 100 μ L）を各ウェルに添加し、穏やかに攪拌しながら2時間室温でインキュベートした。2時間のインキュベーションの最後に、プレートを吸引し、Wallac 1450 microbetaカウンターを使用してcAMPレベルを決定した。 10

【0540】

化合物1が、容量依存的な様式で、内因性ヒトRUP43でトランスフェクトされたHEK293細胞において特異的に細胞内cAMPを増加させたが、偽トランスフェクト細胞においては増加させなかったことを見出した。このことは、化合物1を、RUP43のアゴニストであると同定する（図4）。

【0541】

（実施例16）

（RUP43のアゴニストとしての化合物2の同定）

メラニン保有細胞技術（実施例10、上記）を使用して、化合物2が内因性ヒトRUP43のアゴニストであることを見出した（図5）。簡単にいうと、コンフルエントなフラスコ（T-185 cm^2 フラスコ）から、トリプシン（0.7×）を使用してメラニン保有細胞を回収し、エレクトロポレーションによってトランスフェクトした。内因性ヒトRUP43をコードするポリヌクレオチド（30 μ g）を、メラニン保有細胞のトランスフェクションのために使用した。エレクトロポレーションの後、非生存細胞および細片を除去するために、細胞をフラスコ中で約3～4時間予めプレートした。完了後、次にフラスコをトリプシン処理し、アッセイのため、3つ組で384ポリ-Dーリジンウェルコーティングしたプレートにプレートした。トランスフェクションの48時間後、アッセイプレートを分光光度計で読んだ（吸光度 T_0 ）。次いで、連続希釈した化合物#2とともに細胞を1時間インキュベートし（100 μ M–51.2 pM、5倍希釈、0.5% DMSO最終）、再度読んだ（吸光度 T_{60} ）。3つ組の吸光度データを分析し、%コントロール反応として示し、ポジティブコントロールウェル（200）およびネガティブコントロールウェル（100）と比較した。曲線の高さは、コントロールのおよそ92%であり、EC50 = 0.212 μ Mであった。 20 30

【0542】

（実施例17）

（インビトログルコース取り込みアッセイ）

インビトログルコース取り込みアッセイをここに記載されるように行った。

【0543】

（緩衝液および試薬） 40

飢餓培地：DMEM/0.5% BSAを含む高グルコース

KRPH緩衝液：

5 mM NaHPO_4 、pH 7.4（KRPH緩衝液は各回に新たに作製）

20 mM HEPES、pH 7.4

1 mM MgSO_4

1 mM CaCl_2

136 mM NaCl

4.7 mM KCl

1% BSA

2-デオキシグルコース（DOG）：ストック100 mM：水中16.4 mg/ml（ 50

4℃で1～2週間保存)

各ウェルに、1 μ Ci [^{3} H] - 2-D O Gを含む1 μ lおよび1 μ l 冷ストック 2-D O Gおよび2 ml のK R P Hを添加

サイトカラシンB (C y t o B) : ストック (95%エタノール中10 mM) : -20℃に保つ

C y t o Bを10 μ M最終で使用し、キャリア媒介性取り込みをブロックする。最後にまたこの濃度を使用して反応を停止させる。停止緩衝液は、P B S + 10 μ M C y t o B (「P B S」) である

1% T r i t o n - X : これは可溶化緩衝液である

細胞を24ウェルプレートにプレートする

10

(手順)

1. 少なくとも2時間、細胞を飢餓状態にする

2. 細胞をK R P H緩衝液で2回洗浄し、2 ml のK R P Hをウェルに添加する

3. 細胞を、20分間、インスリンおよび／もしくは試験化合物で処理するか、またはビヒクルで処理する (コントロール)

4. 20分後、緩衝液をウェルから吸引し、直ちに1 ml のK R P H緩衝液 + 2-D O Gを添加する。C y t o B処理細胞については、C y t o Bを取り込みアッセイ前に5分間添加する

5. 4分後、ウェルから緩衝液を吸引し、そして3 ml の冷P B Sを添加する。アッセイを完了した後、各ウェルにおいて細胞を冷P B Sで2回洗浄する。停止P B Sを完全に吸引し、次いで700 μ l の1% T r i t o n Xを添加する。37℃のインキュベーターに30分おく

20

6. 全溶解液のC P Mを計数する。C P M / ウェルを計算する

C y t o B値をインスリンおよび／もしくは試験化合物で処理された細胞、ならびにビヒクルで処理された細胞 (コントロール) の各々について得られた値から引き算する。

【0544】

(実施例18)

(化合物2は、マウス3 T 3 L 1 脂肪細胞におけるグルコース取り込みを刺激する)

分化したマウス3 T 3 L 1 脂肪細胞を、種々の時間、50 μ Mの化合物2で処理した。その後、実施例17に従ってグルコース取り込みを決定した。図6より、化合物2が3 T 3 L 1 脂肪細胞におけるグルコース取り込みを刺激したことは明らかである。この結果は、R U P 4 3 アゴニストが、高グルコース血症におけるインスリンで制御できないグルコースレベルを調節するための魅力的な候補であることを示す。刺激されたグルコース取り込みの迅速な時間経過は、血中グルコース濃度を低下させるために、R U P 4 3 アゴニストは現在利用可能な薬物よりも、より迅速な治療効果を提供し得ることを示唆する。

30

【0545】

(実施例19)

(化合物2は、マウス3 T 3 L 1 脂肪細胞におけるインスリン刺激性グルコース取り込みを増強する)

分化したマウス3 T 3 L 1 脂肪細胞を、化合物2あり (「化合物2」)、またはなし (「コントロール」) で、無血清培地において3時間処理した。次いで、3 T 3 L 1 細胞を新鮮なK R P H緩衝液で2回洗浄し、そして種々の濃度のインスリンで20分間処理した。インスリンによる処理後、実施例17に従ってグルコース取り込みを決定した。図7より、化合物2が3 T 3 L 1 脂肪細胞におけるインスリン刺激性グルコース取り込みを増強したことは明らかである。この結果は、R U P 4 3 アゴニストがインスリン効力を増加し、それによって最大のグルコース取り込みを達成するのに必要とされるインスリン濃度を低下させ得ることを示す。

40

【0546】

(実施例20)

(化合物2は、ヒト初代ヒト脂肪細胞におけるグルコース取り込みを刺激する)

50

ヒト前脂肪細胞 (C a m b r e x) を脂肪細胞へと分化させた。この分化させた初代ヒト脂肪細胞を、50 μ M の化合物 2 ありもしくはなしで、3 時間無血清培地中で処理した。次いで、ヒト脂肪細胞を新鮮な K R P H 緩衝液で 2 回洗浄し、100 nM インスリンありまたはなしで、20 分間処理した。インスリンありまたはなしでの処理の後、グルコース取り込みを実施例 17 に従って決定した。図 8 より、化合物 2 が初代ヒト脂肪細胞におけるグルコース取り込みを刺激したことは明らかである。図 8 より、化合物 2 が初代ヒト脂肪細胞におけるインスリン刺激性グルコース取り込みを増強したことがまた明らかである。顕著なことに、マウス 3 T 3 L 1 細胞に関して観察されたように、R U P 4 3 アゴニストは、インスリンの非存在下で初代ヒト脂肪細胞におけるグルコース取り込みを刺激し得、そして R U P 4 3 刺激性グルコース取り込みのレベルは、インスリン刺激性グルコース取り込みのレベルに匹敵する。

10

【0547】

(実施例 21)

(化合物 2 はラット L 6 筋芽細胞におけるグルコース取り込みを刺激する)

ラット骨格筋 L 6 筋芽細胞を A T C C から得て、24 ウェルプレートでコンフルエントまで増殖させた。

【0548】

(a.)

コンフルエントな L 6 細胞を、種々の濃度の化合物 2 ありまたはなしで、無血清培地中で 3 時間処理した。次いで、L 6 細胞を K R P H 緩衝液で 2 回洗浄した。化合物 2 で処理した L 6 細胞を、K R P H 緩衝液とともに 20 分間インキュベートし；化合物 2 で処理しなかった L 6 細胞を、10 nM もしくは 100 nM のインスリンとともに 20 分間インキュベートした。インスリンありもしくはなしでの処理の後、グルコース取り込みを実施例 17 に従って決定した。図 9 A より、化合物 2 がラット L 6 筋芽細胞におけるグルコース取り込みを増強したことは明らかである。R U P 4 3 アゴニストは、ラット L 6 筋芽細胞において、インスリンより多くのグルコース取り込みを刺激した。骨格筋細胞は、インビボにおけるグルコース処理の 80 % に関与し、得られた結果は、R U P 4 3 アゴニストが、インビボにおいてインスリンより良好なグルコース処理を提供するための、魅力的な候補であることを示す。

20

【0549】

(b.)

コンフルエントな L 6 筋芽細胞を、50 μ M の化合物 2 で、種々の時間処理した。各処理期間の終わりに、グルコース取り込みを実施例 17 に従って決定した。結果は、R U P 4 3 アゴニストが 20 分 (インスリンの時間枠と同様の時間枠) 以内に骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを刺激し得ることを示す (図 9 B)。この結果は、R U P 4 3 アゴニストが、インスリンに匹敵する短い時間内でインビボにおけるグルコースレベルを調節するための、魅力的な候補であることを示す。

30

【0550】

(実施例 22)

(化合物 2 は、ラット L 6 筋芽細胞におけるインスリン刺激性グルコース取り込みを増強する)

40

コンフルエントなラット L 6 筋芽細胞を、50 μ M の化合物 2 ありまたはなしで、3 時間無血清培地中で処理した。次いで、L 6 細胞を新鮮な K R P H 緩衝液で 2 回洗浄した。次に、L 6 細胞を、100 nM インスリンありまたはなしで、20 分間処理した。インスリンありまたはなしでの処理の後、グルコース取り込みを実施例 17 に従って決定した。図 10 より、脂肪細胞について観察された結果と同様に、化合物 2 がラット L 6 筋芽細胞におけるインスリン刺激性グルコース取り込みを増強したことは明らかである。この結果は、R U P 4 3 アゴニストがインスリン効力を増加し、それによって最大のグルコース取り込みを達成するのに必要とされるインスリン濃度を低下させ得ることをさらに示す。したがって、R U P 4 3 は、高インスリン血症を原因とする、インスリン抵抗性に関する問

50

題を被る個体にとっての魅力的な治療選択肢であることを示している。

【0551】

(実施例23)

(化合物2は、初代ヒト骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを刺激する)

Cambrexから得られた初代ヒト骨格筋細胞を50%コンフルエントまで増殖させ、次に誘導培地での5~7日間の培養により分化させた。分化した初代ヒト骨格筋細胞を次に増殖倍値に7~10日間移した。

【0552】

(a.)

分化したヒト骨格筋細胞を、種々の濃度の化合物2ありまたはなしで、無血清培地中で3時間処理した。化合物2ありもしくはなしでの処理の後、細胞を新鮮なKRPH緩衝液で2回洗浄した。次いで、化合物2で処理したL6細胞を、KRPH緩衝液とともに20分間インキュベートし；化合物2で処理しなかったL6細胞を、10nMもしくは100nMのインスリンとともに20分間インキュベートした。インスリンありもしくはなしでの処理の後、グルコース取り込みを実施例17に従って決定した。図11Aより、RUP43アゴニストが、インスリンの非存在下で、かつインスリンよりも効率的に、ヒト骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを調節し得ることは明らかである。得られた結果は、RUP43アゴニストが、グルコース処理の80%が起こるヒト骨格筋細胞におけるグルコース取り込みの刺激に有効であることを示す。この結果は、RUP43アゴニストが、インスリン作用に対して無反応性の高グルコース血症におけるグルコースレベルを制御するための、魅力的な候補であることを示す。

【0553】

(b.)

分化したヒト骨格筋細胞を、50μMの化合物2で、種々の時間処理した。各処理期間の終わりに、グルコース取り込みを実施例17に従って決定した。得られた結果を図11Bに提示する。RUP43アゴニストに対して観察されたヒト骨格筋細胞におけるグルコース取り込みの迅速な刺激は、RUP43アゴニストが、インビボにおいてグルコースレベルを直接的に、かつ短い時間内に調節するための、魅力的な候補であることを示す。

【0554】

(実施例24)

(経口バイオアベイラビリティ)

経口バイオアベイラビリティを直接的に評価するための物理化学分析アプローチが、当業者に周知であり、使用され得る〔例えば、限定ではなく以下を参照のこと：Wong PCら，Cardiovasc Drug Rev (2002) 20:137-52；およびBuchan Pら，Headache (2002) 補遺2:S54-62；これらの各々の開示は、その全体が本明細書において参考として援用される〕。さらなる例示のためであって限定のためではなく、上記代替的アプローチは、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計〔Chavez-Eng CMら，J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2002) 767:117-29；Jetter Aら，Clin Pharmacol Ther (2002) 71:21-9；Zimmerman JJら，J Clin Pharmacol (1999) 39:1155-61；およびBarrish Aら，Rapid Commun Mass Spectrom (1996) 10:1033-7；これらの各々の開示は、その全体が本明細書において参考として援用される〕。近年、陽電子断層撮影法(PET)が、薬物の経口投与後の哺乳動物の体における薬物分布の直接測定値(経口バイオアベイラビリティを含む)を得るために、うまく使用されている〔Gulyasら，Eur J Nucl Med Mol Imaging (2002) 29:1031-8；この開示は、本明細書によってその全体が参考として援用される〕。

【0555】

あるいは、例として、例示のためであって限定のためではなく、実施例26のマウスモ

デルを介して、開発されたインビボデータに基づく。モジュレーターは、 $0.1 \text{ mg kg}^{-1} \sim 100 \text{ mg kg}^{-1}$ の範囲の用量での経口 (oral gavage) で投与される。モジュレーターの効果は、用量依存性であり、腹腔内投与後の効果に匹敵することが示されている。ここで、この効果は、血中グルコース濃度を低下させる (実施例 26)。経口投与を介する有益な効果である減少の、最大の半分を達成するために必要とされるモジュレーターの用量は、腹腔内投与を介する有益な効果である減少の、最大の半分を達成するために必要とされるモジュレーターの用量に匹敵する。例示のため、上記経口用量が、上記腹腔内用量の 2 倍である場合、モジュレーターの経口バイオアベイラビリティは、50% である。より一般的には、上記経口用量が $\theta \text{ mg kg}^{-1}$ であり、そして上記腹腔内用量が $\rho \text{ mg kg}^{-1}$ である場合、パーセンテージとしてのこのモジュレーターの経口バイオアベイラビリティは、 $[(\rho / \theta) \times 100]$ である。

10

【0556】

(実施例 25)

(血液脳関門モデル)

本発明の化合物の血液脳関門を横切る能力を、脳由来の細胞を使用して決定し得る。想定される 1 つの方法は、例示のためであって限定のためではなく、脳毛細管内皮細胞および星状細胞の共培養物を使用する。Dehouck ら [J Neurochem (1990) 54:1798-801; 本明細書によって、その全体が参考として援用される] の血液/脳関門モデルを使用することである。

【0557】

ウシ毛細管内皮 (BBCE) 細胞を単離し、Meresse ら [J Neurochem (1989) 53:1363-1371; 本明細書によって、その全体が参考として援用される] に記載されるように特徴付ける。簡単にいうと、ウシ脳の半球からの単離後、機械的ホモジネーションにより、微小血管を、ウシ角膜内皮によって分泌された細胞外マトリックスでコーティングされたディッシュに播種する。播種の 5 日後、第 1 の内皮細胞は毛細管から移動し、微小コロニーを形成し始める。このコロニーが十分に大きくなった場合、5 つの最も大きな島をトリプシン処理し、35 mm 径のゼラチンコーティングされたディッシュ上に、15% 仔ウシ血清 (Seromed)、3 mM グルタミン、50 $\mu\text{g/ml}$ のゲンタマイシン、2.5 $\mu\text{g/ml}$ のアンホテリシン B (Fungizone)、およびウシ線維芽細胞成長因子 (1 ng/ml、隔日で添加) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) の存在下で播種する (1 クローン/ディッシュ)。1 つの 35 mm 径ディッシュ由来の内皮細胞を、コンフルエントな状態で回収し、60 mm 径のゼラチンコーティングされたディッシュに播種する。6~8 日後、コンフルエントな細胞を 1:20 の分割比で継代培養する。継代第 3 代の細胞 (約 100 ディッシュ) を液体窒素中に保存する。

20

30

【0558】

星状細胞の初代培養を新生仔ラットの大脳から作製する。髄膜を除去した後、脳組織を、Booher および Sensenbrenner [Neurobiology (1972) 2:97-105; 本明細書によって、その全体が参考として援用される] によって記載されるように、穏やかにナイロンシーブに通す。10% ウシ胎仔血清 (Seromed)、2 mM グルタミン、および 50 $\mu\text{g/ml}$ のゲンタマイシンを補充された DMEM を、大脳組織の解離および星状細胞の発達のために使用する。

40

【0559】

培養プレートインサート (Millicell-CM; 孔サイズ 0.4 μm ; 直径、30 mm; Millicipore) を、Bornstein [Lab Invest (1958) 7:134-139; 本明細書によって、その全体が参考として援用される] の方法の改変によって調製されるラット尾部コラーゲンで、両側からコーティングする。

【0560】

星状細胞を、フィルターを裏返しに用いて底部側に、 2.5×10^5 細胞/ml の濃度でプレートする。8 日後、フィルターを適切に配置し、週に 2 回培地を交換する。播種の

50

3 週後、星状細胞の培養物は安定化する。次いで、継代第 3 代で凍結された B B C E 細胞を、60 mm 径のゼラチンコーティングされたディッシュ上で再培養する。コンフルエントな細胞をトリプシン処理し、フィルターの上側に 4×10^5 細胞の濃度でプレートする。共培養のために使用される培地は、15%ウシ血清、2 mM グルタミン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のゲンタマイシンおよび $1 \text{ ng}/\text{ml}$ の、隔日で添加されるウシ線維芽細胞成長因子を補充された DMEM である。これらの条件下で、B B C E 細胞は、8 日以内にコンフルエントな単層を形成する。

【0561】

培養プレートを 6 ウェルプレートに設定し、上部チャンバーに 2 ml の緩衝液を添加し、そして 2 ml をインサートを含むプレートに添加する。この 6 ウェルプレートを、37℃の浸透する水浴に配置する。上部チャンバーに本発明の化合物を添加し、100 μl を下部チャンバーから種々の時点で除去する。特定の実施形態においては、試験化合物を放射性標識する。特定の実施形態においては、この放射性標識は、 ^3H もしくは ^{14}C である。いくつかの実施形態において、最終時点は約 20 分、約 30 分、約 40 分、約 50 分、約 60 分、約 70 分、約 80 分、約 90 分。下部チャンバーに存在する全試験化合物のパーセンテージを、種々の時点で決定する。ロイシンは、透過性のポジティブコントロールとして使用される。イヌリンは、透過性のネガティブコントロールとして使用される。

10

【0562】

特定の実施形態において、最終時点での下部チャンバーにおける本発明の化合物の、少なくとも約 10%、少なくとも約 20%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、または少なくとも約 90% の測定は、本発明の化合物が血液脳関門を横切ることができるという指標である。

20

【0563】

(実施例 26)

(ラットにおけるグルコースホメオスタシスに対する RUP43 アゴニストのインビボ効果)

(A. ラットにおける経口ブドウ糖負荷試験 (oGTT))

10 週齢の雄性 Zucker 糖尿病脂肪性 (ZDF) ラット (Charles River) を、18 時間絶食させ、無作為に群に分け ($n=11$)、RUP43 アゴニストを種々の用量で受容させるか、またはコントロールの、インスリン感受性を増加させることが公知であるロシグリタゾン (rosiglitazone) (RSG、 $10 \text{ mg}/\text{kg}$) で処理する。RUP43 アゴニストを腹腔内に送達する。RSG を腹腔内に送達する。好ましい RUP43 アゴニストの用量は、 $0.1 \sim 100 \text{ mg}/\text{kg}$ である。他の好ましい用量は、以下からなる群より選択される： $0.1 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $0.3 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $1.0 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $3.0 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $10 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $30 \text{ mg}/\text{kg}$ および $100 \text{ mg}/\text{kg}$ 。プラシーボ群にはビヒクルを投与する。

30

【0564】

試験化合物およびコントロール RSG の投与の 30 分後、 $2 \text{ g}/\text{kg}$ 用量で、ラットにデキストロースを経口投与する。Glucometer Elite XL (Bayer) を使用して、種々の時点で血中グルコースレベルを決定する。デキストロース投与の時点として「0 分」として取ると、例示的な時点は -30 分、0 分、30 分、60 分、90 分、および 120 分である。平均グルコース濃度を、各処置群の 11 匹の動物から平均する。これらの結果は、ラットにおいて、グルコース負荷の後、RUP43 アゴニストが用量依存的な様式で血中グルコースレベルを低下させることを実証し得る。

40

【0565】

あるいは、本明細書において記載される経口ブドウ糖負荷試験は、RUP43 アゴニスト、RSG または ビヒクル の 7 回の毎日投与の直後にラットにおいて実施される。

【0566】

50

本明細書において記載される経口ブドウ糖負荷試験が種々の動物（例えば、マウス、ウサギ）においてもまた実施され得ることが、明確に企図される。

【0567】

（B. ZDFラットのRUP43アゴニスト対する急性応答）

10週齢の雄性Zucker糖尿病脂肪性（ZDF）ラット（Charles River）を、無作為に群に分け（ $n=6$ ）、ビヒクル（腹腔内）、RUP43アゴニスト（腹腔内）、またはロシジタゾン（RSG、 10 mg/kg 、腹腔内）を受容させた。RUP43アゴニストの好ましい用量は、 $0.1\sim100\text{ mg/kg}$ である。他の好ましい用量は、以下からなる群より選択される： 0.1 mg/kg 、 0.3 mg/kg 、 1.0 mg/kg 、 3.0 mg/kg 、 10 mg/kg 、 30 mg/kg および 100 mg/kg 。化合物投与の後、食物を除去し、そして種々の時点で血中グルコースレベルを決定する。グルコースレベル決定の例示的時間は、0時間、1時間、2時間、3時間および4時間であり、そして毎日1週間までである。各時点での血中グルコースレベルの低下は、元のグルコースレベルのパーセンテージとして表現され、各群について6動物から平均する。これらの動物は、 $300\sim400\text{ mg/dl}$ の血中グルコースレベル（給餌状態）を有する。これは、非糖尿病の野生型動物よりも有意に高い。RUP43アゴニストもしくはRSGによる処理は、ビヒクルコントロールに対してグルコースレベルの有意な低下を示し得る。これらのデータは、RUP43アゴニストが糖尿病動物におけるグルコースホメオスタシスを改善するという効力を有することを実証し得る。

10

【0568】

20

あるいは、ラットは、血中グルコースレベルが7日間毎日決定される直後に、RUP43アゴニスト、RSGまたはビヒクルを用いて、7日間毎日注射される。

【0569】

本明細書において記載される急性応答試験が種々の動物（例えば、マウス、ウサギ）においてもまた実施され得ることが、明確に企図される。

【0570】

（実施例27）

（本発明の化合物の合成）

（実施例27A：2-〔1-〔2-（2-クロロフェニル）-アセチル〕-ピペリジン-4-イル〕-チアゾール-4-カルボン酸メチル 2-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル〕-アミド）

30

（2-ピペリジン-4-イル-チアゾール-4-カルボン酸エチルエステル二臭化水素酸塩）

30 mLのEtOH中のtert-ブチル-4-（アミノカルボチオイル）テトラヒドロピリジン-1（2H）-カルボキシレート（ 2.0 g 、 8.2 mmol ）およびエチルブロモピルベート（ 1.6 g 、 8.2 mmol ）の溶液を、 80°C で4時間攪拌した。その後、この混合物を室温に冷却し、そして48%のHBr（ 1.0 mL 、 14 mmol ）を充填した。この反応混合物をさらに1時間攪拌し、次いで濃縮して油状の固体とした。ジエチルエーテルで粉砕して 3.0 g （91%）の褐色個体を得た。 $^1\text{H NMR}$ （ 400 MHz 、 $\text{DMSO}-d_6$ ） δ 9.02（br s, 1H），8.77（br s, 1H），8.46（s, 1H），7.01（br s, 1H），4.29（q, $J=7.1\text{ Hz}$, 2H），3.44-3.33（m, 3H），3.02（q, $J=11.7\text{ Hz}$, 2H），2.19（d, $J=13.2\text{ Hz}$, 2H），1.97-1.88（m, 2H），1.29（t, $J=7.0\text{ Hz}$, 3H）。 $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}+\text{H}$ についてのMS：計算値241、観察値241。

40

【0571】

（2-〔1-〔2-（2-クロロフェニル）-アセチル〕-ピペリジン-4-イル〕-チアゾール-4-カルボン酸エチルエステル）

30 mLの CH_2Cl_2 中の2-ピペリジン-4-イル-チアゾール-4-カルボン酸エチルエステル二臭化水素酸塩（ 1.0 g 、 3.2 mmol ）、2-クロロフェニル酢酸

50

(0.55 g、3.2 mmol)、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (1.4 g、3.5 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (diisopropylethylamine) (3.0 mL、17 mmol) の溶液を、40℃で8時間攪拌した。その後、30 mLのCH₂Cl₂で粗混合物を希釈し、1 Mクエン酸 (3×50 mL) で洗浄し、NaHCO₃ 水溶液 (1×30 mL) で飽和させ、NaCl 水溶液 (1×30 mL) で飽和させた。得られた有機層をMgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して褐色の油状物とした。EtOAc:ヘキサン (3:1) によるシリカゲル上での精製により、0.94 g (75%) の淡褐色の油状物を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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, 1H), 4.42 (q, J=7.2 Hz, 2H), 3.99-3.95 (m, 1H), 3.88 (d, ABパターン, J_{AB}=16.0 Hz, 1H), 3.83 (d, ABパターン, 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)。C₁₉H₂₁ClN₂O₃S+HについてのMS: 計算値393、観察値393。

【0572】

(2-{1-[2-(2-クロロフェニル)-アセチル]-ピペリジン-4-イル}-チアゾール-4-カルボン酸)

20 mLのMeOH中の2-{1-[2-(2-クロロフェニル)-アセチル]-ピペリジン-4-イル}-チアゾール-4-カルボン酸エチルエステル (0.94 g, 2.4 mmol) を、1 M NaOH (20 mL、20 mmol) で希釈し、60℃で4時間攪拌した。その後、粗混合物を濃縮し、MeOH溶媒を除去した。次いで、この水性の塩基性溶液をCH₂Cl₂ (2×25 mL) で洗浄し、5 MのHClでpH=1に酸性化した。得られた酸性の水溶液を、CH₂Cl₂ (3×25 mL) で抽出した。有機層を合わせ、MgSO₄で乾燥させ、濾過し、濃縮して、0.51 g (58%) の白色の泡沫状の固体を得た。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パターン, J_{AB}=16.0 Hz, 1H), 3.82 (d, ABパターン, J_{AB}=16.0 Hz, 1H), 3.38-3.31 (m, 1H), 3.25 (apparent, J=11.8 Hz, 1H), 2.79 (apparent, 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)。C₁₇H₁₇ClN₂O₃S+HについてのMS: 計算値365、観察値365。

【0573】

(2-{1-[2-(2-クロロフェニル)-アセチル]-ピペリジン-4-イル}-チアゾール-4-カルボン酸メチル-(2-メチル-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル)-アミドジヒドロ二塩酸塩)

10 mLのCH₂Cl₂中のN, 1-ジメチル-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-1H-インダゾール-3-アミン (23 mg, 0.14 mmol), O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (75 mg, 0.20 mmol) および2-{1-[2-(2-クロロフェニル)-アセチル]-ピペリジン-4-イル}-チアゾール-4-カルボン酸 (50 mg, 0.14 mmol) の溶液を、40℃pで8時間攪拌した。その後、粗混合物を20 mLのCH₂Cl₂で希釈し、1 Mのクエン酸 (3×30 mL) で洗浄し、NaHCO₃ 水溶液 (1×30 mL) で飽和させ、NaCl 溶液 (1×30 mL) で飽和させた。得ら

れた有機層をMgSO₄で乾燥させ、濃縮して、黄色の油状物を得た。勾配HPLC（アセトニトリル-水、0.1%TFAによる）により精製し、二塩酸塩に変換して56 mg（70%）の白色固体を得た。¹H NMR（400MHz, CD₃OD）δ 8.28（d, J=8.8Hz, 1H）, 7.43-7.41（m, 1H）, 7.30-7.26（m, 3H）, 4.50（t, J=11.8Hz, 1H）, 4.09-4.03（m, 1H）, 3.98-3.91（m, 2H）, 3.83（d, J=12.8Hz, 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）。C₂₆H₃₀ClN₅O₂S+HについてのMS：計算値512、観察値512。

10

【0574】

（実施例27B：2-（2-クロロフェニル）-1-〔4-〔4-（3,4-ジヒドロ-2H-キノリン-1-カルボニル）-チアゾール-2-イル〕-ピペリジン-1-イル〕-エタノン）

実施例29Aと同様の一般的手順によって、1,2,3,4-テトラヒドロキノリンから2-（2-クロロフェニル）-1-〔4-〔4-（3,4-ジヒドロ-2H-キノリン-1-カルボニル）-チアゾール-2-イル〕-ピペリジン-1-イル〕-エタノンを黄色の油状物として得た。¹H NMR（400MHz, CD₃OD）δ 7.78（s, 1H）, 7.42-7.40（m, 1H）, 7.30-7.24（m, 3H）, 7.18（d, J=7.6Hz, 1H）, 7.03（t, J=7.4Hz, 1H）, 6.91（t, J=7.6Hz, 1H）, 6.72（br s, 1H）, 4.28（d, J=12.8Hz, 1H）, 3.94-3.81（m, 5H）, 3.30-3.20（m, 2H）, 2.98-2.91（m, 1H）, 2.83（t, J=6.4Hz, 2H）, 2.04（四重項, J=6.6Hz, 2H）, 1.99-1.93（br m, 2H）, 1.60-1.51（m, 2H）。C₂₆H₂₆ClN₃O₂S+HについてのMS：計算値480、観察値480。

20

【0575】

（実施例27C：2-〔1-〔2-（2-フルオロフェニル）-アセチル〕-ピペリジン-4-イル〕-チアゾール-4-カルボン酸メチル-（2-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル）-アミド）

30

実施例29Aと同様の一般的手順によって、2-〔1-〔2-（2-フルオロフェニル）-アセチル〕-ピペリジン-4-イル〕-チアゾール-4-カルボン酸から2-〔1-〔2-（2-フルオロフェニル）-アセチル〕-ピペリジン-4-イル〕-チアゾール-4-カルボン酸メチル-（2-メチル-4,5,6,7-テトラヒドロ-2H-インダゾール-3-イル）-アミドを白色固体として得た。¹H NMR（400MHz, CDCl₃）δ 7.71（d, J=10.4Hz, 1H）, 7.30（t, J=7.6Hz, 1H）, 7.26-7.22（m, 1H）, 7.11（t, J=7.4Hz, 1H）, 7.05（t, J=9.0Hz, 1H）, 4.47（appart, J=13.6Hz, 1H）, 3.90-3.79（m, 1H）, 3.74（s, 2H）, 3.63（d, J=4.4Hz, 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, 5.7Hz, 1H）, 1.99-1.88（m, 3H）, 1.79-1.72（m, 1H）, 1.64-1.38（m, 5H）。C₂₆H₃₀FN₅O₂S+HについてのMS：計算値496、観察値496。

40

【図面の簡単な説明】

【0576】

【図1】例示のためであって限定のためではなく、図1は、RUP43に関連のない、内因性の構成的に活性なGs共役GPCRのGsα融合タンパク質構築物である「標的レセプター」に対する候補化合物の一次スクリーニングの結果を示す。「化合物A」についての結果をウェルA2に提供する。「化合物B」についての結果をウェルG9に提供する。

50

(実施例 7 を参照のこと。)

【図 2 A】脂肪細胞および骨格筋細胞による R U P 4 3 発現の R T - P C R 分析。ヒト脂肪細胞およびマウス脂肪細胞は、R U P 4 3 を発現する。ヒト骨格筋細胞およびマウス骨格筋細胞は、R U P 4 3 を発現する。(実施例 1 1 を参照のこと。)

【図 2 B】脂肪細胞および骨格筋細胞による R U P 4 3 発現の R T - P C R 分析。ヒト脂肪細胞およびマウス脂肪細胞は、R U P 4 3 を発現する。ヒト骨格筋細胞およびマウス骨格筋細胞は、R U P 4 3 を発現する。(実施例 1 1 を参照のこと。)

【図 2 C】脂肪細胞および骨格筋細胞による R U P 4 3 発現の R T - P C R 分析。ヒト脂肪細胞およびマウス脂肪細胞は、R U P 4 3 を発現する。ヒト骨格筋細胞およびマウス骨格筋細胞は、R U P 4 3 を発現する。(実施例 1 1 を参照のこと。)

10

【図 2 D】脂肪細胞および骨格筋細胞による R U P 4 3 発現の R T - P C R 分析。ヒト脂肪細胞およびマウス脂肪細胞は、R U P 4 3 を発現する。ヒト骨格筋細胞およびマウス骨格筋細胞は、R U P 4 3 を発現する。(実施例 1 1 を参照のこと。)

【図 3】内因性 R U P 4 3 は、G s に共役する。(実施例 1 4 を参照のこと。)

【図 4】R U P 4 3 のアゴニストとしての化合物 1 の同定。(実施例 1 5 を参照のこと。)

【図 5】R U P 4 3 のアゴニストとしての化合物 2 の同定。(実施例 1 6 を参照のこと。)

【図 6】化合物 2 は、化合物 2 によるマウス 3 T 3 L 1 脂肪細胞におけるグルコース取り込みを刺激する。(実施例 1 8 を参照のこと。)

20

【図 7】化合物 2 は、マウス 3 T 3 L 1 脂肪細胞におけるインスリンによって刺激されたグルコース取り込みを増強する。(実施例 1 9 を参照のこと。)

【図 8】化合物 2 は、初代ヒト脂肪細胞におけるグルコース取り込みを刺激する。(実施例 2 0 を参照のこと。)

【図 9 A】化合物 2 は、ラット L 6 筋芽細胞におけるグルコース取り込みを刺激する。(実施例 2 1 を参照のこと。)

【図 9 B】化合物 2 は、ラット L 6 筋芽細胞におけるグルコース取り込みを刺激する。(実施例 2 1 を参照のこと。)

【図 1 0】化合物 2 は、ラット L 6 筋芽細胞におけるインスリンによって刺激されたグルコース取り込みを増強する。(実施例 2 2 を参照のこと。)

30

【図 1 1 A】化合物 2 は、初代ヒト骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを刺激する。(実施例 2 3 を参照のこと。)

【図 1 1 B】化合物 2 は、初代ヒト骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを刺激する。(実施例 2 3 を参照のこと。)

【図 1】

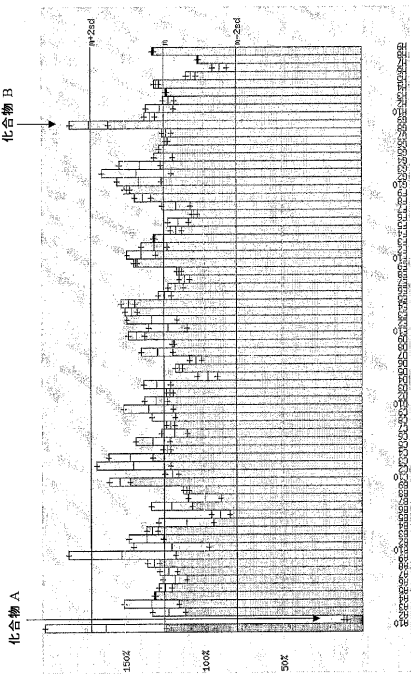
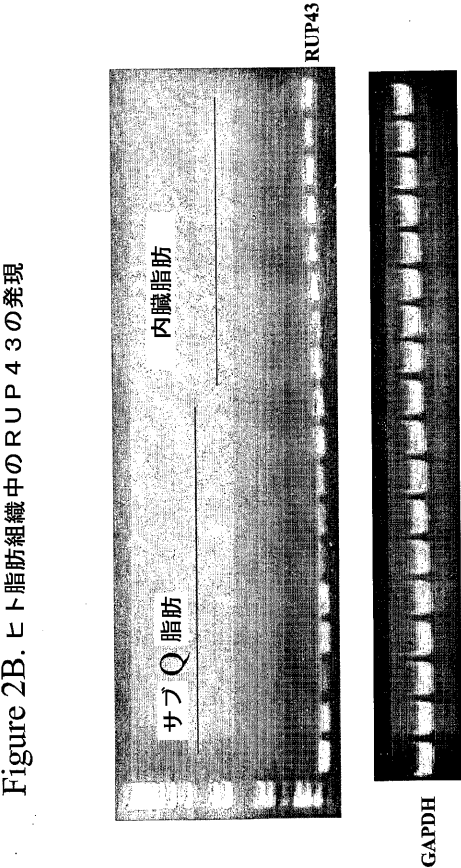


Figure 1

【図 2 B】

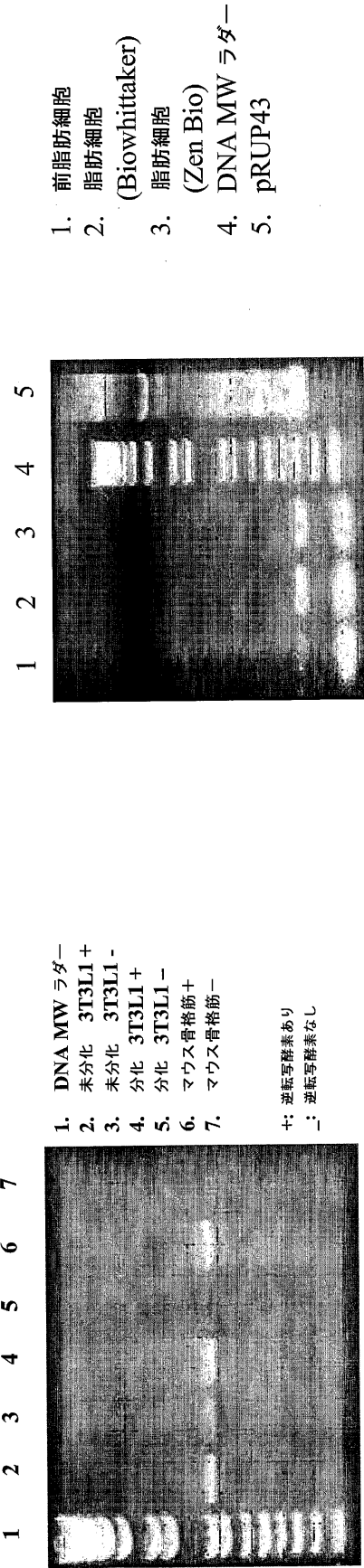


【図 2 A】

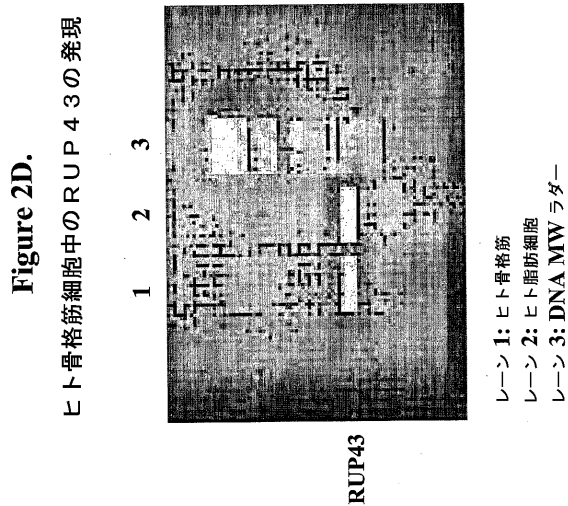
Figure 2A. 初代ヒト脂肪細胞中のRUP43の発現

【図 2 C】

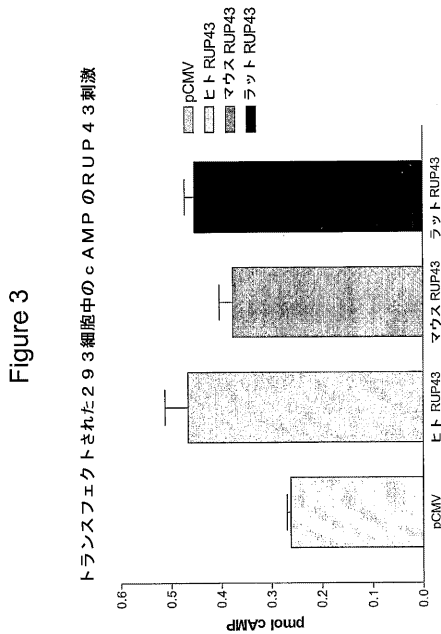
Figure 2C. マウス3T3L1脂肪細胞およびマウス骨格筋細胞中のRUP43の発現



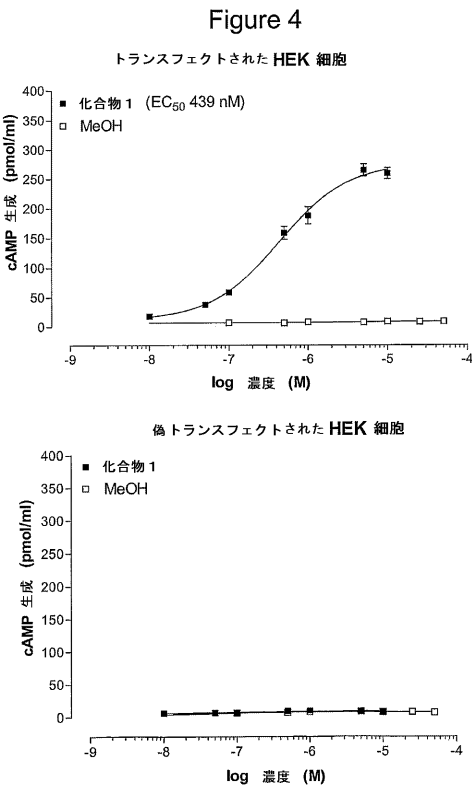
【 図 2 D 】



【 図 3 】

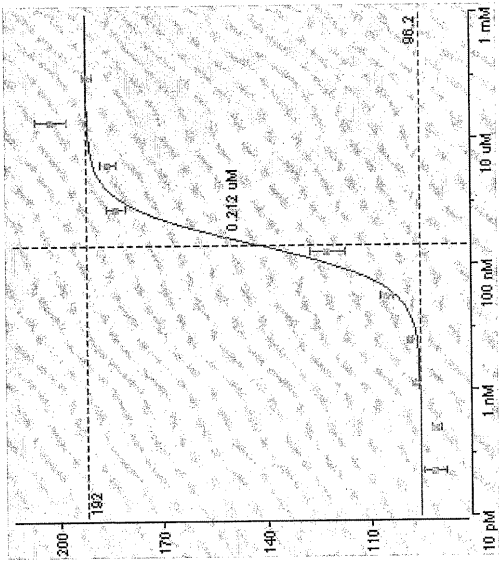


【 図 4 】

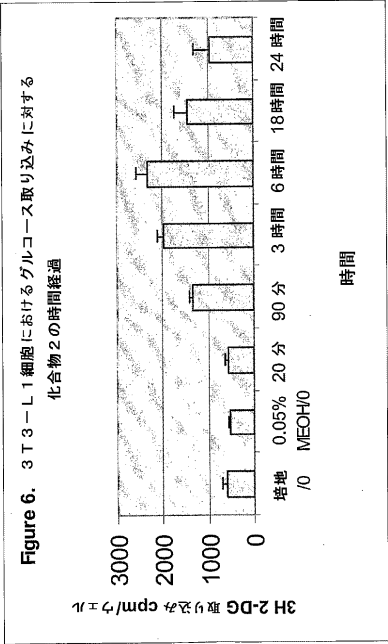


【 図 5 】

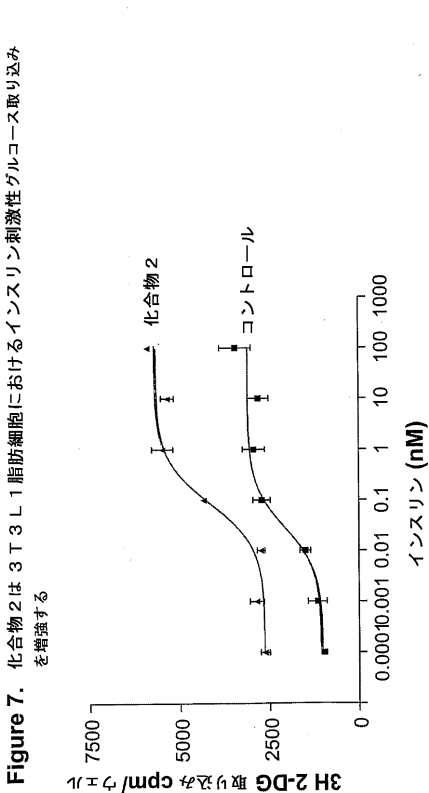
Figure 5. RUP43に対する化合物2の用量反応



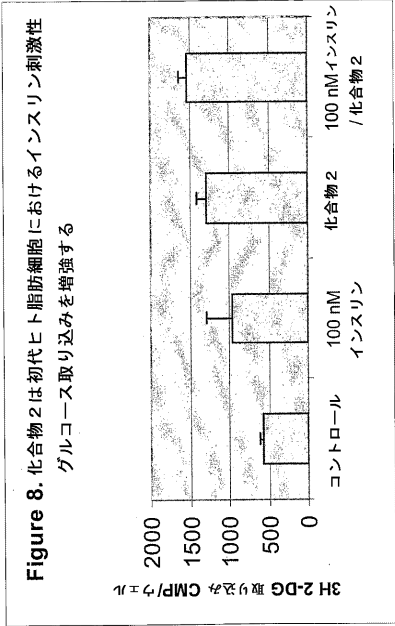
【図 6】



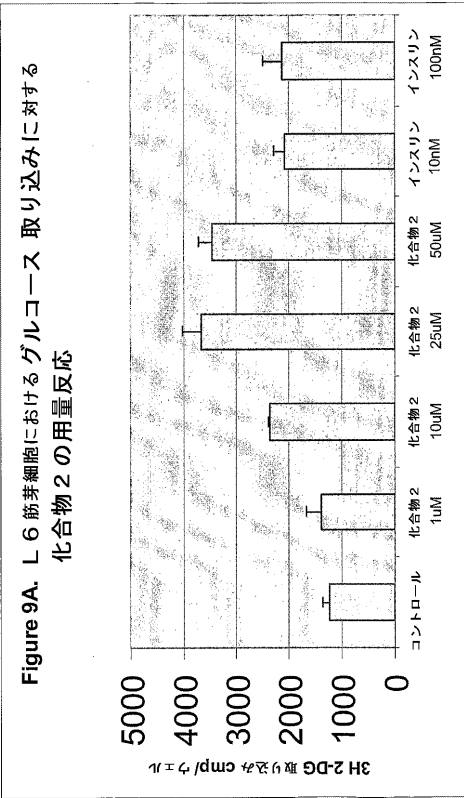
【図 7】



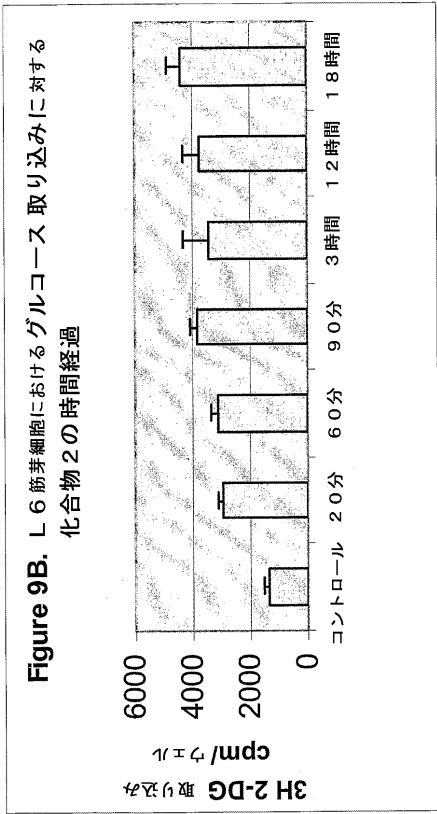
【図 8】



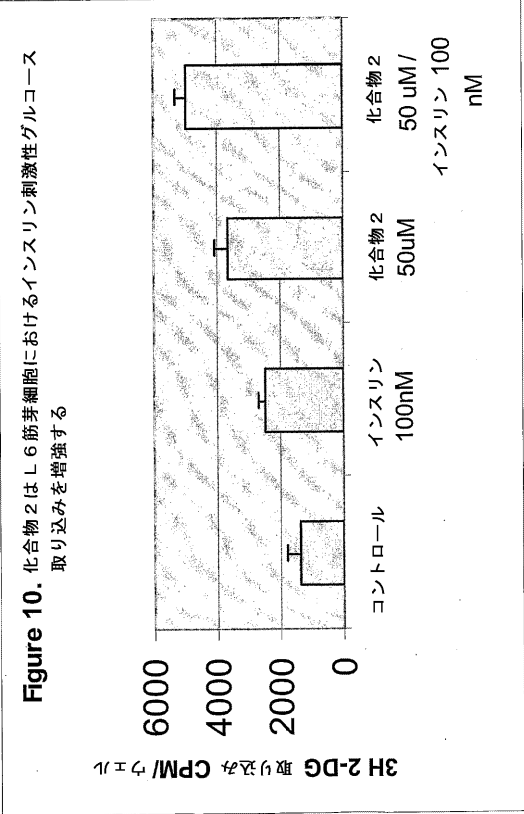
【図 9 A】



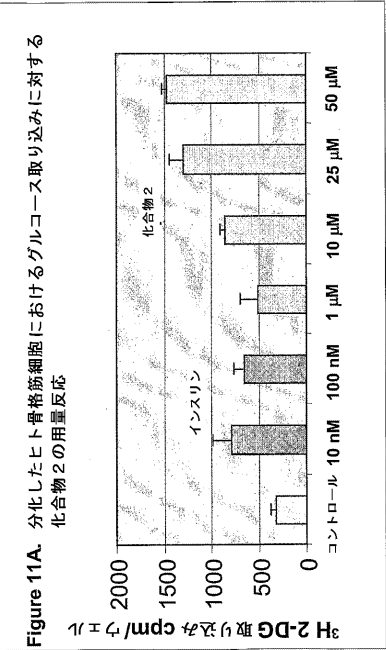
【図 9 B】



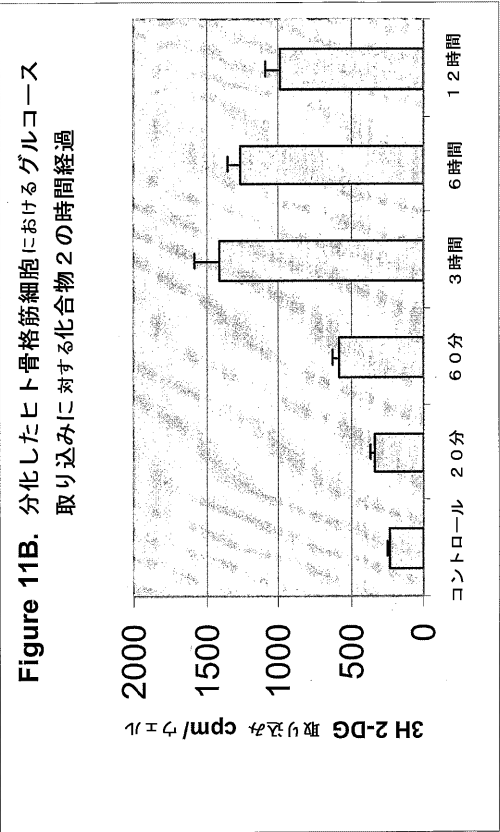
【図 1 0】



【図 1 1 A】



【図 1 1 B】



【配列表】

2007532135000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International application No
G01N33/566 G01N33/68 C07D417/04 A61K45/06 A61K31/427 A61K31/4439		PCT/US2005/012447
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07D A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAWAMATA YUJI ET AL: "A G protein-coupled receptor responsive to bile acids" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 278, no. 11, 14 March 2003 (2003-03-14), pages 9435-9440, XP002248225 ISSN: 0021-9258 cited in the application abstract; figures 1-3 page 9435, right-hand column, paragraph 3 - page 9436, left-hand column, paragraph 3 ----- -/--	1-5, 14-23, 26,28, 31,34, 36-38, 44-48, 60,62, 63,65, 67-69, 83,86, 89,92, 98,99, 132-135, 137-140
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 March 2006		Date of mailing of the international search report 23/03/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jenn, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2005/012447

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 378 749 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD; TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 7 January 2004 (2004-01-07) cited in the application abstract; claims 1-14,23,25,27,47,55,60; sequences 1,5	1-5, 7-11, 13-23, 25-38, 41-54, 57-69, 72-78, 81-99, 102,103, 132-135, 137-140
A	GROS ROBERT ET AL: "Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor." ENDOCRINOLOGY, vol. 144, no. 6, June 2003 (2003-06), pages 2242-2252, XP002368248 ISSN: 0013-7227 abstract	1-140
P,X	CA 2 514 547 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 12 August 2004 (2004-08-12) abstract; claims 1,18,21,23; sequence 2	1-5, 7-11, 13-23, 25-38, 41-54, 57-69, 72-78, 81-99, 102,103, 132-135, 137-140
P,X	WO 2004/058750 A (METRIS THERAPEUTICS LIMITED; KNOX, PETER; O'SULLIVAN, MICHELE; LENTFER) 15 July 2004 (2004-07-15) abstract; claims 1,30,32 page 44; compound 03737 page 47; compound 01112 page 54; compound 00375	24,39, 55,70, 79,100, 106,113, 122,125, 130

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/012447

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

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-17, 26-50, 59-62, 83-103, 108-121 and 132-140 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International application No

PCT/US2005/012447

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1378749	A	07-01-2004	WO 02084286 A1	24-10-2002
			US 2004171067 A1	02-09-2004
CA 2514547	A1	12-08-2004	EP 1591120 A1	02-11-2005
			WO 2004067008 A1	12-08-2004
WO 2004058750	A	15-07-2004	AU 2003290335 A1	22-07-2004
			AU 2003294143 A1	22-07-2004
			CA 2511506 A1	15-07-2004
			EP 1581528 A1	05-10-2005
			WO 2004058751 A1	15-07-2004

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	31/454	(2006.01)	A 6 1 K 31/454	4 C 0 8 6
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P	9/08	(2006.01)	A 6 1 P 9/08	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P	13/00	(2006.01)	A 6 1 P 13/00	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K 14/705	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 ウェップ, ロバート アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 9, サンディエゴ, サリックス ロード 7 6 2 5
- (72)発明者 ウネット, デイビッド ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, サイプレス テラス プレイ ス 1 1 4 2 2
- (72)発明者 ガトリン, ジョエル イー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 6, サンディエゴ, ヒラリー ドライブ 9 3 2 4, アpartment 5 2 0 5
- (72)発明者 コノリー, ダニエル ティー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 7 5, ソラナ ビーチ, サウス ヘリックス アベニュー 2 3 9

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB50 BB51 DA13 FB08
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA20 DA02 EA04 GA13 HA14
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ62 QR77 QR80 QS36 QX07
4C063 AA03 BB02 CC62 DD10 EE01
4C084 AA17 NA14 ZA332 ZA362 ZA392 ZA422 ZA452 ZA812 ZC352
4C086 AA01 AA02 AA03 BC82 GA07 GA10
4H045 BA10 CA40 DA50 EA20 EA50 FA74