

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680014270.1

[51] Int. Cl.

A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/403 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61K 31/4172 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 23 日

[11] 公开号 CN 101166527 A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

[22] 申请日 2006.4.26

[21] 申请号 200680014270.1

[30] 优先权

[32] 2005.4.27 [33] US [31] 60/675,730

[86] 国际申请 PCT/US2006/016024 2006.4.26

[87] 国际公布 WO2007/027225 英 2007.3.8

[85] 进入国家阶段日期 2007.10.26

[71] 申请人 艾尼纳制药公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 楚志良 詹姆斯·N·伦纳德

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司

代理人 孟 锐

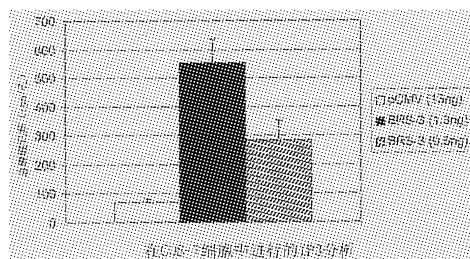
权利要求书 7 页 说明书 68 页 序列表 4 页
附图 2 页

[54] 发明名称

用于治疗肥胖症和糖尿病以及其相关病况和
用于治疗可通过增加血液 GLP-1 含量改善的
病况的组合疗法

[57] 摘要

本发明涉及一定量 BRS-3 激动剂与一定量二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 抑制剂的组合, 使得所述组合能提供降低个体体内血糖含量或增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用, 所述作用将大于单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用; 和所述组合用于治疗或预防肥胖症和糖尿病以及其相关病况和可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的用途。 本发明还涉及 G 蛋白耦合受体用于筛选 GLP-1 促分泌素的用途。



1. 一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂是以足以降低所述个体体内血糖含量的量投与。
3. 一种减轻体重的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂。
4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂是以足以增加所述个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。
5. 一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂是以足以增加所述个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。
7. 一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂。
8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂是以足以增加所述个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。
9. 一种增加血液 GLP-1 含量的方法，其包含向缺乏 GLP-1 的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂。
10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂是以足以增加所述个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。
11. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中糖尿病为 2 型糖尿病。
12. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述与糖尿病相关的病况选自由以下病况组成的群组：高血糖、葡萄糖耐受性异常、胰岛素抵抗、胰腺 β 细胞功能不全、肠内分泌细胞功能不全、糖尿、代谢性酸中毒、白内障、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性冠状动脉疾病、糖尿病性脑血管病、糖尿病性外周血管疾病、代谢综合症、高脂血症、动脉粥样硬化、中风、高血压和肥胖症。
13. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法，其中所述与肥胖症相关的病况选自由以下病况组成的群组：高血压、充血性心肌病、冠心病、中风、血脂异常、代谢综合症和 2 型糖尿病。

14. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法，其中所述可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况选自以下病况组成的群组：糖尿病、与糖尿病相关的病况、心肌梗塞、学习障碍、记忆障碍和神经退化性病症。
15. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法，其中所述可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况为选自以下病况组成的群组的神经退化性病症：由严重癫痫发作引起的兴奋毒性脑损伤、阿尔茨海默氏病（Alzheimer's disease）、帕金森病（Parkinson's disease）、亨廷顿病（Huntington's disease）、朊病毒相关疾病、中风、运动神经元病、学习或记忆障碍、创伤性脑损伤、脊髓损伤和周围神经病。
16. 根据权利要求 1 至 15 中任一权利要求所述的方法，其中所述个体为人类。
17. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物。
18. 一种根据权利要求 17 所述的组合物的剂型，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。
19. 一种根据权利要求 17 所述的组合物的剂型，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。
20. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物，其是用于通过疗法来治疗人体或动物体的方法中。
21. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物，其是用于通过疗法来治疗或预防人体或动物体的糖尿病或其相关病况的方法中。
22. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物，其是用于通过疗法来减轻人体或动物体体重的方法中。
23. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物，其是用于通过疗法来治疗或预防人体或动物体的肥胖症或其相关病况的方法中。
24. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物，其是用于通过疗法来治疗或预防人体或动物体的可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法中。
25. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物，其是用于通过疗法来治疗或预防人体或动物体 GLP-1 缺乏的方法中。
26. 根据权利要求 20 或 21 所述的组合物，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。
27. 根据权利要求 20 至 25 中任一权利要求所述的组合物，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。
28. 一种制备医药组合物的方法，所述方法包含将 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂以及

至少一种医药学上可接受的载剂混合。

29. 根据权利要求 28 所述的方法, 所述方法进一步包含制备所述医药组合物的剂型的步骤, 其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。
30. 根据权利要求 28 所述的方法, 所述方法进一步包含制备所述医药组合物的剂型的步骤, 其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。
31. 一种医药组合物, 其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂以及至少一种医药学上可接受的载剂。
32. 一种根据权利要求 31 所述的医药组合物的剂型, 其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。
33. 一种根据权利要求 31 所述的医药组合物的剂型, 其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。
34. 一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的根据权利要求 31 至 33 中任一权利要求所述的医药组合物。
35. 一种减轻体重的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的根据权利要求 31 至 33 中任一权利要求所述的医药组合物。
36. 一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的根据权利要求 31 至 33 中任一权利要求所述的医药组合物。
37. 一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的根据权利要求 31 至 33 中任一权利要求所述的医药组合物。
38. 一种增加血液 GLP-1 含量的方法, 其包含向缺乏 GLP-1 的个体投与治疗有效量的根据权利要求 31 至 33 中任一权利要求所述的医药组合物。
39. 根据权利要求 34 至 38 中任一权利要求所述的方法, 其中所述个体为人类。
40. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物的用途, 其是用于制备供治疗或预防糖尿病或其相关病况的药物。
41. 根据权利要求 40 所述的用途, 其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂是以足以降低血糖含量的量提供。
42. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物的用途, 其是用于制备供减轻体重的药物。

43. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物的用途，其是用于制备供治疗或预防肥胖症或其相关病况的药物。
44. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物的用途，其是用于制备供治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的药物。
45. 一种包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合物的用途，其是用于制备供治疗或预防 GLP-1 缺乏的药物。
46. 根据权利要求 40 至 45 中任一权利要求所述的用途，其中所述 BRS-3 激动剂和所述 DPP-IV 抑制剂为足以增加血液 GLP-1 含量的量。
47. 一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含以下步骤：

(a) 使测试化合物与表达 G 蛋白偶合受体的主体细胞或主体细胞膜接触，其中所述 G 蛋白偶合受体包含选自由以下序列组成的群组的氨基酸序列：

- (i) SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-335；
- (ii) SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-399；
- (iii) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-335；
- (iv) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-399；
- (v) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-335，其限制条件在于，所述受体在 SEQ ID NO:2 的 1 位氨基酸处不包含甲硫氨酸残基；
- (vi) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-399，其限制条件在于，所述受体在 SEQ ID NO:2 的 1 位氨基酸处不包含甲硫氨酸残基；
- (vii) 由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体的氨基酸序列，所述核苷酸序列为通过包含使用特异性引物 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 将人类 DNA 样本进行聚合酶链反应 (PCR) 的方法可获得的序列；
- (viii) 由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体的氨基酸序列，所述核苷酸序列在严格条件下与 SEQ ID NO: 1 的互补序列杂交；和
- (ix) (i) 到 (viii) 中任一种氨基酸序列的生物活性片段；和

(b) 测定所述测试化合物刺激所述受体功能性的能力，

其中所述测试化合物刺激所述受体功能性的能力将指示所述测试化合物为 GLP-1 促分泌素、或可用于减轻体重的化合物、或可用于预防或治疗可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述方法是用于鉴别 GLP-1 促分泌素。

49. 一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含根据权利要求 47 或 48 所述的方法的步骤，并且进一步包含：

(c) 使步骤 (b) 中刺激所述受体功能性的化合物在活体外与哺乳动物肠内分泌细胞接触；和

(d) 测定所述化合物是否刺激所述哺乳动物肠内分泌细胞分泌 GLP-1；

其中所述测试化合物刺激所述哺乳动物肠内分泌细胞分泌 GLP-1 的能力将指示所述测试化合物为 GLP-1 促分泌素、或可用于减轻体重的化合物、或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

50. 一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含根据权利要求 47 或 48 所述的方法的步骤，并且进一步包含：

(c) 将步骤 (b) 中刺激所述受体功能性的化合物投与哺乳动物；和

(d) 测定所述化合物是否增加所述哺乳动物体内的血液 GLP-1 含量；

其中所述测试化合物增加所述哺乳动物体内血液 GLP-1 含量的能力将指示所述测试化合物为 GLP-1 促分泌素、或可用于减轻体重的化合物、或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

51. 根据权利要求 50 所述的方法，其中所述哺乳动物为非人类哺乳动物。
52. 根据权利要求 47 至 51 中任一权利要求所述的方法，其中所述主体细胞包含表达载体，所述表达载体包含编码所述 G 蛋白偶合受体的聚核苷酸。
53. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述测定是通过测量第二信使的含量进行。
54. 根据权利要求 53 所述的方法，其中所述第二信使选自由以下物质组成的群组：环 AMP (cAMP)、环 GMP (cGMP)、1,4,5-三磷酸肌醇 (IP3)、二酰基甘油 (DAG)、MAP 激酶活性、MAPK/ERK 激酶激酶-1 (MEKK1) 活性和 Ca^{2+} 。
55. 根据权利要求 54 所述的方法，其中 cAMP 含量增加。
56. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述测定是通过使用黑素细胞分析或通过测量与包含所述 GPCR 的膜结合的 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 进行。
57. 一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含以下步骤：

(a) 在存在或不存在测试化合物的情况下，使 G 蛋白偶合受体与受体的视情况经标记的已知配体接触，其中所述 G 蛋白偶合受体包含选自由以下序列组成的群

组的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-335；

(ii) SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-399；

(iii) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-335；

(iv) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-399；

(v) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-335，其限制条件在于，所述受体在 SEQ ID NO:2 的 1 位氨基酸处不包含甲硫氨酸残基；

(vi) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-399，其限制条件在于，所述受体在 SEQ ID NO:2 的 1 位氨基酸处不包含甲硫氨酸残基；

(vii) 由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体的氨基酸序列，所述核苷酸序列为通过包含使用特异性引物 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 将人类 DNA 样本进行聚合酶链反应 (PCR) 的方法可获得的序列；

(viii) 由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体的氨基酸序列，所述核苷酸序列在严格条件下与 SEQ ID NO: 1 的互补序列杂交；和

(ix) (i) 到 (viii) 中任一种氨基酸序列的生物活性片段；和

(b) 检测所述已知配体与所述受体之间的复合体；和

(c) 测定是否所述复合体在存在所述测试化合物的情况下形成的量要比在不存在所述测试化合物的情况下形成的量少；

其中所述测定将指示所述测试化合物为 GLP-1 促分泌素、或可用于减轻体重的化合物、或可用于预防或治疗可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

58. 根据权利要求 57 所述的方法，其中所述方法是用于鉴别 GLP-1 促分泌素。

59. 一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含根据权利要求 57 或 58 所述的方法的步骤，并且进一步包含：

(d) 将步骤 (c) 中在存在时形成较少所述复合体的化合物在活体外与哺乳动物肠内分泌细胞接触；和

(e) 测定所述化合物是否刺激所述哺乳动物肠内分泌细胞分泌 GLP-1；

其中所述测试化合物刺激所述哺乳动物肠内分泌细胞分泌 GLP-1 的能力将指示所述测试化合物为 GLP-1 促分泌素、或可用于减轻体重的化合物、或可用于预防或治疗可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

60. 一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可

通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含根据权利要求 57 或 58 所述的方法的步骤，并且进一步包含：

(d) 将步骤 (c) 中在存在时形成较少所述复合体的化合物投与哺乳动物；和

(e) 测定所述化合物是否增加所述哺乳动物体内的血液 GLP-1 含量；

其中所述测试化合物增加所述哺乳动物体内血液 GLP-1 含量的能力将指示所述测试化合物为 GLP-1 促分泌素、或可用于减轻体重的化合物、或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

61. 根据权利要求 60 所述的方法，其中所述哺乳动物为非人类哺乳动物。
62. 根据权利要求 57 至 61 中任一权利要求所述的方法，其中所述受体为重组体。

用于治疗肥胖症和糖尿病以及其相关病况和用于治疗可通过增加 血液 GLP-1 含量改善的病况的组合疗法

技术领域

本发明涉及用于治疗或预防肥胖症和糖尿病以及其相关病况的组合物和方法。本发明还涉及用于增加哺乳动物体内血液 GLP-1 含量的组合物和方法。本发明还涉及使用 G 蛋白偶合受体筛选 GLP-1 促分泌素的方法。

背景技术

预期以下论述将有助于理解本发明，但不打算也不承认将其作为本发明的背景技术。

A.肥胖症和糖尿病

肥胖症是发达国家中最常见的代谢疾病。尽管公共卫生教育和倡议都已宣传其危害性，但其患病率仍在持续增长，在美国已有超过 30% 的成人肥胖并且超过 60% 的成人超重或肥胖。世界卫生组织预测，在全世界范围内，有超过十亿成人超重，其中至少有三亿肥胖。肥胖症会导致包括（但不限于）以下疾病的多种共病或显著增加罹患所述共病的风险：高血压、充血性心脏病、冠心病、中风、血脂异常、代谢综合症和 2 型糖尿病 [Bays, Obesity Research (2004) 12:11971211] 和早逝。对于作为能降低全世界肥胖症流行趋势的治疗选择的安全有效的抗肥胖药物的医药需求仍亟待满足。

在美国，2 型糖尿病的发生率为约 7% 并且占美国卫生保健总支出的 10%。此外，全世界 2 型糖尿病的发生率也在不断增加，因此，目前 2 型糖尿病已被认为是世界流行病。2 型糖尿病的特征在于空腹高血糖和餐后高血糖以及相对胰岛素不足。高血糖可能会引起长期微血管和大血管并发症，诸如肾病、神经病、视网膜病变和外周血管疾病。此外，2 型糖尿病还是一种经常伴有高脂血症、动脉粥样硬化和高血压的伴随病（comorbid disease）。高脂血症是因动脉粥样硬化而引起心血管疾病的主要风险因子。2 型糖尿病会引起显著的发病率和死亡率，给患者、其家庭和社会造成大量损失。

B.胰高血糖素样肽-1（GLP-1）

胰高血糖素样肽-1（GLP-1）是一种由胰高血糖素原翻译后修饰产生并且由消化肠道内分泌细胞所分泌的肠降血糖素激素。GLP-1 通过特异性 G 蛋白偶合受体（GPCR），即 GLP-1R 介导其作用。最佳将 GLP-1 形容为调控葡萄糖稳态（glucose homeostasis）的

激素。经证实, GLP-1 能够刺激葡萄糖依赖性胰岛素分泌并且增加胰腺 β 细胞群。还证实, GLP-1 能降低胃排空速率并促进饱腹感。GLP-1 肽激动剂对于控制 2 型糖尿病患者体内血糖的功效[例如参看 Nauck 等人 Drug News Perspect (2003) 16:413-422]以及其减轻体重的功效[Zander 等人, Lancet (2002) 359:824-830]都已于多项临床研究中得以证实。

另外, GLP-1 受体激动剂可用于防止心肌梗塞以及认知性病症和神经退化性病症。已在大鼠心肌梗塞模型中证实 GLP-1 的心脏保护作用[Bose 等人, Diabetes (2005) 54:146-151], 并且 GLP-1R 也已在啮齿动物模型中显示涉及学习和神经保护 [During 等人, Nat Med (2003) 9:1173-1179; 和 Greig 等人, Ann N Y Acad Sci (2004) 1035:290-315]。

某些病症(诸如 2 型糖尿病)是以 GLP-1 缺乏为特征[例如参看 Nauck 等人 Diabetes (2004) 53 Suppl 3:S190-196]。

当前的 GLP-1 肽激动剂因缺乏口服生物利用度而对患者的顺应性具有负面影响。而截至目前为止, 对于研发口服生物可用的 GLP-1R 非肽能小分子激动剂的尝试尚未取得成功[Mentlein, Expert Opin Investig Drugs (2005) 14:57-64]。一种引人关注的替代性方法为开发一种增加血液中内源 GLP-1 含量的口服活性组合物。

C. BRS-3

蛙皮素 (Bombesin) 是一种从青蛙皮肤分离的具有 14 个氨基酸的肽。蛙皮素受体亚型-3 (BRS-3) G 蛋白偶合受体 (BRS-3; 例如人 BRS-3, GenBank® 登记号第 AAA35604 号和其等位基因; 例如小鼠 BRS-3, GenBank® 登记号第 AY288423 号和其等位基因) 展现与胃释放肽受体 (GRP-R) 和神经激肽 B 受体 (NMB-R) 约 50% 同源, 并且其一起形成蛙皮素样受体组。BRS-3 在包括下丘脑和子宫的组织中选择性表达。BRS-3 活化会使胞内 1,4,5-三磷酸肌醇 (IP3) 积累增加, 这同 BRS-3 与 Gq 偶合相符。在近期的研究中, BRS-3 敲除小鼠发展肥胖症、糖尿病和高血压[Ohki-Hamazaki 等人 Nature (1997) 390:165-169]。

D. 二肽基肽酶 IV (DPP-IV)

二肽基肽酶 IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) 展现出对包括肽激素、神经肽和趋化因子的多种肽底物的催化活性。刺激葡萄糖依赖性胰岛素分泌且另外促进血糖稳态的肠降血糖素胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽 (GIP) 在 2 位丙氨酸处被 DPP-IV 迅速裂解, 从而导致其生物活性失活。药理学与遗传引起的 DPP-IV 活性减弱都与活体内肠降血糖素作用增强、胰岛素增加和血糖降低相关。经证实, 遗传引起的 DPP-IV 活性减弱将提供对肥胖症的抗性并且提高胰岛素敏感性。目前, 第二代 DPP-IV 抑制剂 LAF237 (Ahren 等人, J Clin Endocrinol Metab (2004) 89:2078-2084; 和 Villhauer 等人, J

Med Chem (2003) 46:2774-2789; 各所述文献的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中) 正处于针对 2 型糖尿病的 3 期临床试验阶段, 而其它的 DPP-IV 抑制剂都处于临床研发期。

由于肠降血糖素激素并非 DPP-IV 的唯一底物, 故对于其它内源性 DPP-IV 底物裂解的抑制可能会产生不合需要的副作用就值得担忧[例如参看 Chen 等人, J Biol Regul Homeost Agents (2004) 18:47-54; 所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中]。因此, 鉴别与实质降低 DPP-IV 抑制剂浓度相关的促进血糖稳态的活性将极为有利。

E. G 蛋白偶合受体

GPCR 共有共同的结构基元, 其具有七个含有 22 至 24 个疏水氨基酸的序列, 所述序列形成七个各自跨膜(每一跨越都以数字标识, 即, 跨膜-1(TM-1)、跨膜-2(TM-2)等)的 α 螺旋。跨膜螺旋是通过细胞膜外部或“胞外”侧的跨膜-2 与跨膜-3、跨膜-4 与跨膜-5 和跨膜-6 与跨膜-7 之间的氨基酸链接合(这些分别称为“胞外”区域 1、2 和 3(EC-1、EC-2 和 EC-3))。跨膜螺旋也是通过细胞膜内部或“胞内”侧的跨膜-1 与跨膜-2、跨膜-3 与跨膜-4 和跨膜-5 与跨膜-6 之间的氨基酸链接合(这些分别称为“胞内”区域 1、2 和 3(IC-1、IC-2 和 IC-3))。受体的“羧基”(“C”)端位于细胞内的胞内间隙中, 而受体的“氨基”(“N”)端位于细胞外部的胞外间隙中。

一般说来, 当激动剂与 G 蛋白偶合受体结合(通常称为受体的“活化”)时, 引起受体构象的改变, 其有助于胞内区域与胞内“G-蛋白”之间的偶合。据报导, GPCR 关于 G 蛋白是“混杂的”, 即 GPCR 可与一种以上的 G 蛋白相互作用。参看 Kenakin, T., 43 *Life Sciences* 1095 (1988)。尽管可能存在其它 G 蛋白, 但目前已鉴别出的 G 蛋白为 Gq、Gs、Gi、Gz 和 Go。经配体活化的 GPCR 与 G 蛋白的偶合会引发信号级联过程(称为“信号转导”)。在正常条件下, 信号转导最终将导致细胞活化或细胞抑制。

Gs 会刺激酶腺苷酰基环化酶。另一方面, Gi(与 Gz 和 Go)则会抑制腺苷酰基环化酶。腺苷酰基环化酶能催化 ATP 转化成 cAMP; 因此, 偶合 Gs 蛋白的活性 GPCR 与细胞 cAMP 含量增加有关。另一方面, 偶合 Gi(或 Gz、Go)蛋白的活性 GPCR 则与细胞 cAMP 含量降低有关。通常, 参看"Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission," 第 8 章, *From Neuron To Brain* (第 3 版) Nichols, J.G 等人编辑 Sinauer Associates, Inc. (1992)。因此, 可以利用检测 cAMP 的分析来确定候选化合物是否为例如 Gs 相关受体的激动剂(即, 所述化合物将增加 cAMP 的含量)。Gq 和 Go 都与酶磷脂酶 C 的活化相关, 而磷脂酶 C 又水解磷脂 PIP₂, 从而释放出两种胞内信使: 二酰基甘油(DAG)和 1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)。IP₃ 积累增加与 Gq-和 Go 相关受体的活化有关。通常, 参看"Indirect

Mechanisms of Synaptic Transmission," 第 8 章, From Neuron To Brain (第 3 版) Nichols, J.G 等人编辑 Sinauer Associates, Inc. (1992)。可以利用检测 IP3 积累的分析来确定候选化合物是否为例如 Gq-或 Go 相关受体的激动剂 (即, 所述化合物将增加 IP3 的含量)。还可以利用检测胞内游离钙含量的分析来确定候选化合物是否为例如 Gq 或 Go 相关受体的激动剂 (即, 所述化合物将增加胞内游离钙的含量)。

例如参看表 A (“N/A”: “不适用”)。

表 A

G 蛋白	活化 GPCR (即, 组成性活化或结合激动剂) 后对 cAMP 产量的影响	活化 GPCR (即, 组成性活化或结合激动剂) 后对 IP3 积累的影响	与反向激动剂接触后对 cAMP 产量的影响	与反向激动剂接触后对 IP3 积累的影响
Gs	增加	N/A	降低	N/A
Gi	降低	N/A	增加	N/A
Gz	降低	N/A	增加	N/A
Go	降低	增加	增加	降低
Gq	N/A	增加	N/A	降低

也存在似乎将数类 GPCR 与磷脂酶 C 路径耦合的混杂 G 蛋白 (诸如 *Ga15* 或 *Ga16*) [Offermanns & Simon, J Biol Chem (1995) 270:15175-80], 或经设计为使多种不同的 GPCR 与相同路径 (例如磷脂酶 C) 耦合的嵌合 G 蛋白[Milligan & Rees, Trends in Pharmaceutical Sciences (1999) 20:118-24]。可以利用检测胞内游离钙含量的分析来确定候选化合物是否为例如与磷脂酶 C 路径耦合的 GPCR 的激动剂 (即, 所述化合物将增加胞内游离钙的含量)。

在生理学条件下, GPCR 是以两种不同构象之间的平衡状态存在于细胞膜中: “非活性” 状态和 “活性” 状态。处于非活性状态的受体无法与胞内信号转导路径连接以引发信号转导, 从而引起生物反应。受体构象改变成活性状态将允许与转导路径连接 (通过 G 蛋白) 并产生生物反应。

可通过配体或化合物 (诸如药物) 使受体稳定于活性状态。最近的发现 (包括但不专门限于对受体氨基酸序列的修饰) 提供除配体或药物之外的方式以促进并稳定处于活性状态构象的受体。这些方式通过刺激配体与受体结合的作用而有效地使受体稳定于活性状态。由所述不依赖于配体的方式进行的稳定化作用被称为 “组成性受体活化作用”。在不存在配体的情况下展现活性的内源性受体被称为组成性活化内源性受体。

发明内容

本发明涉及一定量 BRS-3 激动剂与一定量二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 抑制剂的组合, 使得所述组合能够提供降低个体体内血糖含量的作用, 所述作用将大于单独所述量的 BRS-3 激动剂或所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用; 和所述组合用于治疗或预防糖尿病和其相关病况的用途。本发明另外涉及一定量 BRS-3 激动剂与一定量二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 抑制剂的组合, 因此所述组合能够提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用, 所述作用将大于单独所述量的 BRS-3 激动剂或所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用; 和所述组合用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况或增加缺乏 GLP-1 的个体体内血液 GLP-1 含量的用途。本发明还涉及使用 BRS-3 G 蛋白偶合受体筛选 GLP-1 促分泌素的方法。

第一方面, 本发明提供一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物, 所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中, BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以降低个体体内血糖含量的量投与。在某些实施例中, 所述血糖含量为高血糖含量。

本发明另外提供一种减轻体重的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物, 所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中, BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。在某些实施例中, 所述有需要的个体具有为 27 或更高的 BMI 值。在某些实施例中, 所述有需要的个体超重。在某些实施例中, 所述有需要的个体肥胖。

本发明另外提供一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物, 所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中, BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。

本发明另外提供一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物, 所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中, BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。

本发明另外提供一种增加血液 GLP-1 含量的方法, 其包含向缺乏 GLP-1 的个体投

与治疗有效量的组合物，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。

在某些实施例中，糖尿病为 2 型糖尿病。

在某些实施例中，所述与糖尿病相关的病况选自由以下病况组成的群组：高血糖、葡萄糖耐受性异常、胰岛素抵抗、胰腺 β 细胞功能不全、肠内分泌细胞功能不全、糖尿病、代谢性酸中毒、白内障、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性冠状动脉疾病、糖尿病性脑血管病、糖尿病性外周血管疾病、代谢综合症、高脂血症、动脉粥样硬化、中风、高血压和肥胖症。

在某些实施例中，与肥胖症相关的病况选自由以下病况组成的群组：高血压、充血性心肌病、静脉曲张、肺栓塞、冠心病、中风、原发性颅内高压、感觉异常性股痛、呼吸困难、阻塞性睡眠呼吸暂停、低通气综合症、皮克威克综合症 (Pickwickian syndrome)、哮喘、不能运动、退行性关节炎、下背痛、萎缩纹或“妊娠纹”、下肢静脉淤滞、淋巴水肿、蜂窝织炎、擦烂、疖、黑棘皮病、皮赘、胃食管返流病症、非酒精性脂肪肝/脂肪肝、胆结石、疝气、结肠癌、压力性尿失禁、肥胖相关性肾病、乳癌和子宫癌、抑郁和低自尊、生活质量不良、代谢综合症、2 型糖尿病、血脂异常、女性高雄激素血症、多囊卵巢综合症、痛经、不育症、妊娠并发症和男性性腺功能减退症。在某些实施例中，与肥胖症相关的病况选自由以下病况组成的群组：高血压、充血性心肌病、冠心病、中风、血脂异常、代谢综合症和 2 型糖尿病。

在某些实施例中，可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况选自由以下病况组成的群组：糖尿病、与糖尿病有关的病况、心肌梗塞、学习障碍、记忆障碍和神经退化性病症。

在某些实施例中，可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况为选自由以下病况组成的群组的神经退化性病症：由严重癫痫发作引起的兴奋毒性脑损伤、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease)、帕金森病 (Parkinson's disease)、亨廷顿病 (Huntington's disease)、朊病毒相关疾病、中风、运动神经元病、学习或记忆障碍、创伤性脑损伤、脊髓损伤和周围神经病。

在某些实施例中，个体为人类。

第二方面，本发明提供一种组合物，其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物

的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

在某些实施例中，个体为人类。

第三方面，本发明提供一种通过疗法治疗人体或动物体的方法中使用的组合物，其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

本发明另外提供一种通过疗法治疗或预防人体或动物体的糖尿病或其相关病况的方法中使用的组合物，其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

本发明另外提供一种通过疗法减轻人体或动物体体重的方法中使用的组合物，其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

本发明另外提供一种通过疗法治疗或预防人体或动物体的肥胖症或其相关病况的方法中使用的组合物，其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

本发明另外提供一种通过疗法治疗或预防人体或动物体的可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法中使用的组合物，其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

本发明另外提供一种通过疗法治疗或预防人体或动物体 GLP-1 缺乏的方法中使用的组合物，其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

在某些实施例中，个体为人类。

第四方面，本发明提供一种制备医药组合物的方法，所述方法包含将 BRS-3 激动剂与 DPP-IV 抑制剂以及至少一种医药学上可接受的载剂混合，或基本上由所述步骤组成。在某些实施例中，本发明进一步包含制备所述医药组合物的一种剂型的步骤，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。在某些实施例中，本发明进一步包含制备所述医药组合物的一种剂型的步骤，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

在某些实施例中，个体为人类。

第五方面，本发明提供一种医药组合物，其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂以及至少一种医药学上可接受的载剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述医药组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。在某些实施例中，本发明涉及所述医药组合物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

在某些实施例中，个体为人类。

第六方面，本发明提供一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的根据第五方面的医药组合物。在某些实施例中，BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以降低个体体内血糖含量的量投与。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。在某些实施例中，BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。

本发明另外提供一种减轻体重的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的根据第五方面的医药组合物。在某些实施例中，BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。在某些实施例中，所述有需要的个体具有为 27 或更高的 BMI 值。在某些实施例中，所述有需要的个体超重。在某些实施例中，所述有需要的个体肥胖。

本发明另外提供一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的根据第五方面的医药组合物。在某些实施例中，BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。

本发明另外提供一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法，其

包含向有需要的个体投与治疗有效量的根据第五方面的医药组合物。在某些实施例中，BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。

本发明另外提供一种增加血液 GLP-1 含量的方法，其包含向缺乏 GLP-1 的个体投与治疗有效量的根据第五方面的医药组合物。在某些实施例中，BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量投与。

在某些实施例中，个体为人类。

第七方面，本发明提供组合物于制造供治疗或预防糖尿病或其相关病况的药物的用途，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述药物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以降低个体体内血糖含量的量。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。在某些实施例中，本发明涉及所述药物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

本发明另外提供组合物于制造供减轻体重的药物的用途，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述药物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

本发明另外提供组合物于制造供治疗或预防肥胖症或其相关病况的药物的用途，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述药物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

本发明另外提供组合物于制造供治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的药物的用途，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述药物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

本发明另外提供组合物于制造供治疗或预防 GLP-1 缺乏的药物的用途，所述组合物包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成。在某些实施例中，本发明涉及所述药物的一种剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以增加个体体内血液 GLP-1 含量的量。

在某些实施例中，个体为人类。

第八方面，本发明提供一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含以下

步骤:

(a) 使测试化合物与表达 G 蛋白偶合受体的主体细胞 (host cell) 或主体细胞膜接触, 其中所述 G 蛋白偶合受体包含选自由以下序列组成的群组的氨基酸序列:

(i) SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-335;

(ii) SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-399;

(iii) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-335;

(iv) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-399;

(v) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-335, 其限制条件在于, 受体在 SEQ ID NO:2 的 1 位氨基酸处不包含甲硫氨酸残基;

(vi) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-399, 其限制条件在于, 受体在 SEQ ID NO:2 的 1 位氨基酸处不包含甲硫氨酸残基;

(vii) 由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体的氨基酸序列, 所述核苷酸序列为通过包含使用特异性引物 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 将人类 DNA 样本进行聚合酶链反应 (PCR) 的方法可获得的序列;

(viii) 由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体的氨基酸序列, 所述核苷酸序列在严格条件下与 SEQ ID NO: 1 的互补序列杂交; 和

(ix) (i) 到 (viii) 中任一种氨基酸序列的生物活性片段; 和

(b) 测定测试化合物刺激受体功能性的能力;

其中所述测试化合物刺激受体功能的能力将指示测试化合物为 GLP-1 促分泌素, 或可用于减轻体重的化合物, 或可用于预防或治疗可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

在某些实施例中, 所述方法为鉴别 GLP-1 促分泌素的方法。

在某些实施例中, 所述方法为鉴别可用于减轻体重的化合物的方法。

在某些实施例中, 所述方法为鉴别可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法。

本发明另外提供一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法, 其包含所述第八方面的步骤 (a) 和 (b), 并且进一步包含:

(c) 使步骤 (b) 中刺激受体功能的化合物在活体外与哺乳动物肠内分泌细胞接触; 和

(d) 测定所述化合物是否刺激所述哺乳动物肠内分泌细胞分泌 GLP-1;

其中所述测试化合物刺激所述哺乳动物肠内分泌细胞分泌 GLP-1 的能力将指示测试化合物为 GLP-1 促分泌素,或可用于减轻体重的化合物,或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。在某些实施例中,哺乳动物肠内分泌细胞为 GLUTag 内分泌 L 细胞系。

本发明另外提供一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法,其包含所述第八方面的步骤 (a) 和 (b), 并且进一步包含:

(c) 将步骤 (b) 中刺激受体功能的化合物投与哺乳动物; 和

(d) 测定所述化合物是否增加所述哺乳动物体内的血液 GLP-1 含量; 其中所述测试化合物增加所述哺乳动物体内血液 GLP-1 含量的能力将指示所述测试化合物为 GLP-1 促分泌素,或可用于减轻体重的化合物,或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。在某些实施例中,哺乳动物为非人类哺乳动物。

在某些实施例中,经鉴别的 GLP-1 促分泌素,或经鉴别的可用于减轻体重的化合物,或经鉴别的可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物为受体激动剂。在一些实施例中,所述激动剂为部分激动剂。

在某些实施例中,受体与 G 蛋白偶合。在某些实施例中,所述 G 蛋白为 Gq。

在某些实施例中,所述方法为 RT-PCR (反转录聚合酶链反应)。RT-PCR 技术为所属领域技术人员众所周知。

在某些实施例中,人类 DNA 样本为人类 cDNA。在某些实施例中,cDNA 是来自表达 BRS-3 的人类组织。在一些实施例中,所述表达 BRS-3 的人类组织为下丘脑或子宫。

在某些实施例中,严格杂交条件包含在 42°C 下于包含 50%甲酰胺、5×SSC (150 mM NaCl、15 mM 柠檬酸三钠)、50 mM 磷酸钠 (pH 7.6))、5× Denhardt 溶液、10%硫酸葡聚糖和 20 µg/ml 变性的已剪切的鲑鱼精 DNA 的溶液中杂交,随后在 65°C 下于包含 0.1×SSC 的溶液中进行洗涤。杂交技术已为所属领域技术人员众所周知。

在某些实施例中,由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体展现出选自由增加胞内 IP3 含量和结合已知的 BRS-3 配体组成的群组的生物活性,所述核苷酸序列在严格条件下与 SEQ ID NO:1 的互补序列杂交。在某些实施例中,所编码的 G 蛋白偶合受体将增加胞内 IP3 含量并且结合已知的 BRS-3 配体。

在一些实施例中,G 蛋白偶合受体为包含 G 蛋白的融合蛋白的部分。制造 GPCR:G 融合蛋白构筑体的技术已为所属领域技术人员众所周知 (例如参看国际专利申请案 WO 02/42461)。

在一些实施例中，G 蛋白偶合受体为重组体。

在某些实施例中，主体细胞包含表达载体，所述表达载体包含编码 G 蛋白偶合受体的聚核苷酸。在一些实施例中，表达载体为 pCMV。根据国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约（Budapest Treaty）的规定，于 1998 年 10 月 13 日将本载体保藏于美国典型培养物保存中心（American Type Culture Collection, ATCC）。DNA 经 ATCC 测试并确定可行。ATCC 赋予 pCMA 以下保藏编号：ATCC #203351。其它适当的表达载体将易于为所属领域技术人员显而易见，并且广泛多种表达载体在市面有售（例如，购自 Clontech, Palo Alto, CA；Stratagene, La Jolla, CA；和 Invitrogen, Carlsbad, CA）。

本发明的适当主体细胞包括能够表达本发明的 G 蛋白偶合受体的任何真核细胞。真核细胞可以为动物细胞（例如，昆虫、哺乳动物、鱼类、两栖动物、鸟类或爬行动物细胞）、植物细胞（例如玉米或鼠耳芥（*Arabidopsis*）细胞）或真菌细胞（例如酿酒酵母（*S. cerevisiae*）细胞）。在一些实施例中，主体细胞为哺乳动物细胞。示范性哺乳动物细胞包括（但不限于）：猴肾细胞（COS 细胞）、经 SV40 转化的猴肾 CVI 细胞（COS-7, ATCC CRL 1651）、人胚肾细胞（HEK-293 [“293”], Graham 等人 J. Gen Virol. 36:59 (1977))、人胚肾细胞（HEK-293T [“293T”], 最初称为 293tsA1609neo, DuBridge 等人 Mol Cell Biol 7:379 -387 (1987))、幼仓鼠肾细胞（BHK, ATCC CCL 10）、中国仓鼠卵巢细胞（CHO, Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216, (1980))、叙利亚（Syrian）金仓鼠细胞 MCB3901（ATCC CRL-9595）、小鼠 Sertoli 细胞（TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))、猴肾细胞（CVI ATCC CCL 70）、非洲绿猴肾细胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）、人宫颈癌细胞（HELA, ATCC CCL 2）、狗肾细胞（MDCK, ATCC CCL 34）、Buffalo 大鼠肝细胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）、人肺细胞（W138, ATCC CCL 75）、人肝细胞（hep G2, HB 8065）、小鼠乳腺肿瘤（MMT 060562, ATCC CCL 51）、TRI 细胞（Mather 等人, Annals N. Y. Acad. Sci 383:44-68 (1982))、NIH/3T3 细胞（ATCC CRL-1658）和小鼠 L 细胞（ATCC CCL-1）。在一些实施例中，哺乳动物主体细胞选自由 293、293T、CHO、MCB3901 和 COS-7 组成的群组。在某些实施例中，使用黑素细胞。在一些实施例中，主体细胞为昆虫细胞（例如，草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*）昆虫 Sf9 细胞（ATCC CRL-1711））。在一些实施例中，主体细胞为真菌细胞（例如酿酒酵母细胞）。在一些实施例中，主体细胞为肠内分泌细胞。在一些实施例中，肠内分泌细胞为 GLUTag 内分泌 L 细胞系。其它适当的主体细胞将易于为所属领域技术人员显而易见，并且广泛多种细胞系都是从美国典型培养物保存中心（10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209）获得。

在某些实施例中,所述测定与 G 蛋白偶合受体与 Gq 偶合相符。

在一些实施例中,所述测定与 G 蛋白偶合受体经由混杂 G 蛋白(诸如 Ga15 或 Ga16)与磷脂酶 C 路径偶合相符。混杂 G 蛋白已为所属领域技术人员众所周知[例如参看 Offermanns 等人, J Biol Chem (1995) 270:15175-15180]。在一些实施例中,所述测定与 G 蛋白偶合受体经由嵌合 G 蛋白例如与磷脂酶 C 路径偶合相符。嵌合 G 蛋白已为所属领域技术人员众所周知[例如参看 Milligan 等人, Trends in Pharmaceutical Sciences (1999) 20:118-124; 和 WO 02/42461]。

在一些实施例中,所述测定是通过测量第二信使的含量进行。

在一些实施例中,所述测定是通过测量选自由以下物质组成的群组的第二信使的含量进行:环 AMP(cAMP)、环 GMP(cGMP)、1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)、二酰基甘油(DAG)、MAP 激酶活性、MAPK/ERK 激酶激酶-1(MEKK1)活性和 Ca^{2+} 。在一些优选实施例中,第二信使为 IP3。在某些优选实施例中,胞内 IP3 含量增加。在一些优选实施例中,第二信使为 Ca^{2+} 。在某些优选实施例中,胞内 Ca^{2+} 含量增加。在一些实施例中,所述 Ca^{2+} 的测量是通过 FLIPR 进行。

在某些实施例中,所述测定是使用包含 G 蛋白偶合受体的膜进行。

在某些实施例中,所述测定是通过使用黑素细胞分析进行。在一些优选实施例中,色素分散水平增加。

在一些实施例中,所述测定是通过测量胞内 IP3 含量升高所介导的活性进行。在一些实施例中,所述活性为刺激 GLP-1 分泌。

在一些实施例中,所述测定是通过 AP1-报告基因分析进行。在一些实施例中,所述测定是通过 SRF-报告基因分析进行。在一些实施例中,所述报告基因为荧光素酶。在一些实施例中,所述报告基因为 β -半乳糖苷酶。在某些实施例中,荧光素酶活性水平或 β -半乳糖苷酶活性水平增加。

在一些实施例中,所述测定是通过测量与包含 G 蛋白偶合受体的膜结合的 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 进行。在一些优选实施例中,所述 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 经 [^{35}S] 标记。在一些优选实施例中,所述与包含 GPCR 的膜结合的 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 增加。

在一些实施例中,候选化合物为小分子。在一些实施例中,候选化合物为小分子,其限制条件为所述小分子不为多肽。在一些实施例中,候选化合物为小分子,其限制条件为所述小分子不为抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,候选化合物为小分子,其限制条件为所述小分子不为脂质。在一些实施例中,候选化合物为小分子,其限制条件为所述小分子不为多肽或脂质。在一些实施例中,候选化合物为多肽。在一些实施例

中，候选化合物为多肽，其限制条件为所述多肽不为抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中，候选化合物为脂质。在一些实施例中，候选化合物不为抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中，候选化合物为抗体或其抗原结合片段。

在一些实施例中，所述方法进一步包含合成 GLP-1 促分泌素或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

在一些实施例中，所述方法进一步包含：视情况测定 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的结构；和提供所述 GLP-1 促分泌素或所述可用于减轻体重的化合物或所述可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物，或提供所述 GLP-1 促分泌素或所述可用于减轻体重的化合物或所述可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的名称或结构。

在一些实施例中，所述方法进一步包含：视情况测定 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的结构；视情况提供所述 GLP-1 促分泌素或所述可用于减轻体重的化合物或所述可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的名称或结构；和制备或合成所述 GLP-1 促分泌素或所述可用于减轻体重的化合物或所述可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

第九方面，本发明提供一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含以下步骤：

(a) 在存在或不存在测试化合物的情况下，使 G 蛋白偶合受体与受体的视情况经标记的已知配体接触，其中所述 G 蛋白偶合受体包含选自由以下序列组成的群组的氨基酸序列：

(i) SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-335；

(ii) SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-399；

(iii) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-335；

(iv) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-399；

(v) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-335，其限制条件在于，受体在 SEQ ID NO:2 的 1 位氨基酸处不包含甲硫氨酸残基；

(vi) SEQ ID NO:2 的氨基酸 2-399，其限制条件在于，受体在 SEQ ID NO:2 的 1 位氨基酸处不包含甲硫氨酸残基；

(vii) 由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体的氨基酸序列, 所述核苷酸序列为通过包含使用特异性引物 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 将人类 DNA 样本进行聚合酶链反应 (PCR) 的方法可获得的序列;

(viii) 由包含核苷酸序列的聚核苷酸编码的 G 蛋白偶合受体的氨基酸序列, 所述核苷酸序列在严格条件下与 SEQ ID NO: 1 的互补序列杂交; 和

(ix) (i) 到 (viii) 中任一种氨基酸序列的生物活性片段; 和

(b) 检测所述已知配体与所述受体之间所形成的复合体; 和

(c) 确定较少所述复合体是在存在测试化合物的情况下形成还是在不存在测试化合物的情况下形成;

其中所述确定将指示测试化合物为 GLP-1 促分泌素, 或可用于减轻体重的化合物, 或可用于预防或治疗可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。

在某些实施例中, 所述方法为鉴别 GLP-1 促分泌素的方法。

在某些实施例中, 所述方法为鉴别可用于减轻体重的化合物的方法。

在某些实施例中, 所述方法为鉴别可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法。

在某些实施例中, 已知配体选自由以下化合物组成的群组: 化合物 1、化合物 2、化合物 3、化合物 4、化合物 5、化合物 6、化合物 7、化合物 8、化合物 9、化合物 10、化合物 11、化合物 12、化合物 13、化合物 14、化合物 15、化合物 16、化合物 17、化合物 18、化合物 19、化合物 20、化合物 21、化合物 22、化合物 23、化合物 24、化合物 25、化合物 26、化合物 27、化合物 28、化合物 29、化合物 30、化合物 31、化合物 32、化合物 33 和化合物 34。

在某些实施例中, 视情况经标记的已知配体为经标记的已知配体。在某些实施例中, 经标记的已知配体为放射性标记的已知配体。所属领域技术人员众所周知用于放射性标记化合物的技术, 诸如用于标记本发明的 G 蛋白偶合受体的已知配体的技术。例如参看国际申请案 WO 04/065380。

所属领域技术人员众所周知用于检测 G 蛋白偶合受体与已知为 G 蛋白偶合受体的配体的化合物的之间所形成的复合体的技术。例如参看国际申请案 WO 04/065380。

本发明另外提供一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法, 其包含所述第九方面的步骤 (a) 到 (c), 并且进一步包含:

(d) 将步骤 (c) 中在存在时形成较少所述复合体的化合物在活体外与哺乳动物肠

内分泌细胞接触；和

(e) 测定所述化合物是否刺激所述哺乳动物肠内分泌细胞分泌 GLP-1；

其中所述测试化合物刺激所述哺乳动物肠内分泌细胞分泌 GLP-1 的能力将指示测试化合物为 GLP-1 促分泌素，或可用于减轻体重的化合物，或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。在某些实施例中，哺乳动物肠内分泌细胞为 GLUTag 内分泌 L 细胞系。

本发明另外提供一种用于鉴别 GLP-1 促分泌素或可用于减轻体重的化合物或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物的方法，其包含所述第九方面的步骤 (a) 到 (c)，并且进一步包含：

(d) 将步骤 (c) 中在存在时形成较少所述复合体的化合物投与哺乳动物；和

(e) 测定所述化合物是否增加所述哺乳动物体内的血液 GLP-1 含量；其中所述测试化合物增加所述哺乳动物体内血液 GLP-1 含量的能力将指示所述测试化合物为 GLP-1 促分泌素，或可用于减轻体重的化合物，或可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的化合物。在某些实施例中，哺乳动物为非人类哺乳动物。

在某些实施例中，所述受体为重组体。

本申请案主张通过美国邮政快递 (U.S. Express mail) 和美国专利与商标局 (United States Patent and Trademark Office) 于所述日期申请的以下临时申请案的优先权：2005 年 4 月 27 日申请的美国临时案第 60/675,730 号。前述申请案的公开内容是以全文引用的方式并入本文中。

附图说明

本发明将结合随附图式进行说明，其中：

图 1 展示 BRS-3 使胞内 IP3 积累增加。参看实例 9。

图 2 展示 GLUTag 细胞中 BRS-3 的表达情况。参看实例 10。

具体实施方式

本发明涉及用于治疗或预防糖尿病和其相关病况的某些化合物的组合或其医药学上可接受的盐。本发明还涉及用于减轻体重的某些化合物的组合或其医药学上可接受的盐。本发明另外涉及用于治疗或预防肥胖症和其相关病况的某些化合物的组合或其医药学上可接受的盐。本发明另外涉及用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的某些化合物的组合或其医药学上可接受的盐。本发明另外涉及使用本发明的 G 蛋白偶合受体筛选作为 GLP-1 促分泌素的测试化合物的方法。申请者已发现，BRS-3 是由哺

乳动物产生 GLP-1 的内分泌 L 细胞表达。BRS-3 为 GLP-1 促分泌素受体。BRS-3 激动剂为 GLP-1 促分泌素。

通过使用本发明 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合，可能以实质低于目前预期用于糖尿病和其相关病况疗法中的 DPP-IV 抑制剂的剂量来治疗或预防糖尿病和其相关病况，从而减少可能与抑制 DPP-IV 活性相关的不合需要的副作用。通过使用本发明 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合，可能以实质低于目前预期用于减轻体重的 DPP-IV 抑制剂的剂量来减轻体重，从而减少可能与抑制 DPP-IV 活性相关的不合需要的副作用。通过使用本发明 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合，可能以实质低于目前预期用于肥胖症和其相关病况疗法中的 DPP-IV 抑制剂的剂量来治疗或预防肥胖症和其相关病况，从而减少可能与抑制 DPP-IV 活性相关的不合需要的副作用。通过使用本发明 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合，可能以实质低于目前预期用于可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的疗法中 DPP-IV 抑制剂的剂量来治疗或预防所述病况，从而减少可能与抑制 DPP-IV 活性相关的不合需要的副作用。此外，通过使用本发明 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合，可能以实质低于目前预期用于糖尿病或肥胖症和其相关病况疗法中的 BRS-3 激动剂的剂量来治疗或预防糖尿病或肥胖症和其相关病况，从而减少所发现的任何可能与 BRS-3 受体活化相关的不合需要的副作用。本发明提供一种降低个体体内血糖含量的超出预期且有利的新颖方法。本发明另外提供一种增加个体体内血液 GLP-1 含量的超出预期且有利的新颖方法。本发明另外提供一种筛选作为 GLP-1 促分泌素的测试化合物的超出预期且有利的新颖方法。

如本文所使用的术语“配体”应意谓与 GPCR 特异性结合的分子。举例来说，配体可能为多肽、脂质、小分子和抗体。内源性配体是作为天然 GPCR 的内源性天然配体的配体。配体可能为 GPCR “拮抗剂”、“激动剂”、“部分激动剂”或“反向激动剂”等。

如本文所使用的术语“激动剂”应意谓由于与 GPCR 结合而活化 GPCR 从而引起由 GPCR 所介导的胞内反应的试剂（例如，配体、候选化合物）。

如本文所使用的术语“部分激动剂”应意谓，由于与 GPCR 结合而活化 GPCR 从而引起由 GPCR 所介导的胞内反应，但比完全激动剂所引起的反应范围或程度低的试剂（例如，配体、候选化合物）。

术语“拮抗剂”应意谓，在与激动剂或部分激动剂大致相同的位点处与 GPCR 结合且优选竞争性结合，但不活化由 GPCR 的活性形式所引发的胞内反应且可由此抑制由激动剂或部分激动剂所引起的胞内反应的试剂（例如配体、候选化合物）。在不存在激动剂或部分激动剂的情况下，拮抗剂通常不会降低基线胞内反应。

术语“反向激动剂”应意谓与 GPCR 结合并且抑制受体活性形式所引发的基线胞内反应，使其低于在不存在激动剂或部分激动剂时所观察到的正常基线活性水平的试剂（例如配体、候选化合物）。

如本文所使用的术语“BRS-3 激动剂”是指与 BRS-3 受体结合并且充当激动剂的化合物。

如本文所使用的术语“选择性 BRS-3 激动剂”是指对于 BRS-3 受体具有优于一个或一个以上密切相关的受体（诸如胃释放肽受体（GRP-R）或神经激肽 B 受体（NMB-R））的选择性的 BRS-3 激动剂。

如本文所使用的术语“DPP-IV 抑制剂”是指与 DPP-IV 结合并且抑制 DPP-IV 二肽基肽酶活性的化合物。

如本文所使用的术语“选择性 DPP-IV 抑制剂”是指对 DPP-IV 具有优于密切相关的肽酶的选择性的 DPP-IV 抑制剂，所述紧密相关的肽酶诸如后脯氨酸裂解酶（PPCE）、二肽基肽酶 II（DPP-II）、二肽基肽酶 8（DPP-8）和二肽基肽酶 9（DPP-9）中的一种或一种以上肽酶。

术语“血糖含量”或“血液 GLP-1 含量”应分别意谓血糖浓度或血液 GLP-1 浓度。在某些实施例中，血液 GLP-1 含量为血液中生物活性 GLP-1 的含量，其中对 GLP-1R 具有激动剂活性的 GLP-1 具有生物学活性。在某些实施例中，血糖含量或血液 GLP-1 含量为血浆葡萄糖含量或血浆 GLP-1 含量。

术语“高血糖含量”应意谓诸如可见于临床上证实具有不适当基础和餐后高血糖的个体或诸如可见于经历口服葡萄糖耐受性试验（oGTT）的个体中的高血糖含量。

如本文所使用的术语“个体”应指哺乳动物，包括（但不限于）小鼠、大鼠、兔、猪、狗、猫、非人类灵长类动物和人类，更优选小鼠或大鼠，最优选人类。

如本文所使用的术语“需要预防或治疗”是指由护理人员（例如，在人类的情况下为医师、护士、护理从业人员；在非人类哺乳动物的情况下为兽医）所作的关于个体需要治疗或将从治疗获益的判断。

术语“治疗有效量”或“治疗有效剂量”意欲意谓将引起所需的生物学或医疗反应的药物量。在某些实施例中，治疗有效量为在小鼠 oGTT 分析中能产生大于 30% 的 AUC 抑制的药物量。

术语“治疗无效量”或“治疗无效剂量”意欲意谓小于药物的治疗有效量的药物量。在某些实施例中，治疗无效量为在小鼠 oGTT 分析中产生小于或等于 30% 的 AUC 抑制的药物量。

术语“预防有效的量”是指预防需预防的生物学或医疗事件发生或降低其发生的风险的药物量。在许多情况中，预防有效的量与治疗有效量相同。

术语“组合物”应意谓包含至少一种组分的物质。

术语“活性成分”应意谓能对疾病的诊断、治愈、减轻、治疗或预防提供药理学活性或其它直接作用的任何组分。

术语“医药组合物”应意谓包含至少一种活性成分的组合物，其中所述组合物可用于研究哺乳动物体内的特定、有效成果。

术语“剂型”应意谓制备和分散药物的物理形式，诸如片剂、胶囊或可注射物。

根据体重的 WHO 分类，将如本文所使用的术语“肥胖症”定义为体重指数（BMI）为 30.0 或更高[Kopelman, Nature (2000) 404:635-643; 所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中]。

术语“与肥胖症相关的病况”意欲包括（但不限于）高血压、充血性心肌病、静脉曲张、肺栓塞、冠心病、中风、原发性颅内高压、感觉异常性股痛、呼吸困难、阻塞性睡眠呼吸暂停、低通气综合症、皮克威克综合症、哮喘、不能运动、退行性关节炎、下背痛、萎缩纹或“妊娠纹”、下肢静脉淤滞、淋巴水肿、蜂窝织炎、擦烂、疔、黑棘皮病、皮赘、胃食管返流病症、非酒精性脂肪肝/脂肪肝、胆结石、疝气、结肠癌、压力性尿失禁、肥胖相关性肾病、乳癌和子宫癌、抑郁和低自尊、生活质量不良、代谢综合症、2 型糖尿病、血脂异常、女性高雄激素血症、多囊卵巢综合症、痛经、不育症、妊娠并发症和男性性腺功能减退症，其中应了解，与肥胖症相关的病况可独立地或以任何组合的形式包括在实施例中。

如本文所使用的术语“超重”定义为体重指数（BMI）为 27-29.9。

如本文所使用的术语“糖尿病”涵盖胰岛素依赖性糖尿病（也称为 1 型糖尿病）和非胰岛素依赖性糖尿病（也称为 2 型糖尿病）。

术语“与糖尿病相关的病况”意欲包括（但不限于）高血糖、葡萄糖耐受性异常、胰岛素抵抗、胰腺 β 细胞功能不全、肠内分泌细胞功能不全、糖尿、代谢性酸中毒、白内障、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性冠状动脉疾病、糖尿病性脑血管病、糖尿病性外周血管疾病、代谢综合症、高脂血症、动脉粥样硬化、中风、高血压和肥胖症，其中应了解，与糖尿病相关的病况可独立地或以任何组合的形式包括在实施例中。

术语“可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况”意欲包括（但不限于）糖尿病、与糖尿病相关的病况、心肌梗塞、学习障碍、记忆障碍和神经退化性病症，其中应了解，

可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况可独立地或以任何组合的形式包括在实施例 中。

如本文所使用的术语“动脉粥样硬化”是指以含有胆固醇和脂质的动脉粥样硬化斑 块沉积于大动脉和中动脉壁最内层上为特征的血管疾病形式。

如本文中并且根据 Adult Treatment Panel III (ATP III; National Institutes of Health: Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Executive Summary; Bethesda, Md., National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, 2001 (NIH pub. No 01-3670)) 中所定义, 术语“代谢综合症”是当个体满 足与肥胖症、高甘油三酯血症、低 HDL 胆固醇、高血压和高空腹血糖相关的五条标准 中的三条或三条以上时发生。

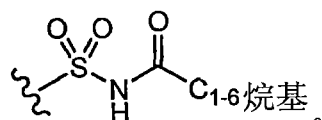
术语“神经退化性病症”意欲包括(但不限于)由严重癫痫发作引起的兴奋毒性脑 损伤、阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病、朊病毒相关疾病、中风、运动神经元病、 学习或记忆障碍、创伤性脑损伤、脊髓损伤和周围神经病。

化学基团

术语“C₁₋₅ 酰基”表示与羰基连接的 C₁₋₅ 烷基, 其中烷基的定义与本文所述的定义 相同; 一些实例包括(但不限于)乙酰基、丙酰基、正丁酰基、异丁酰基、仲丁酰基、 叔丁酰基(即, 特戊酰基)、戊酰基等。

术语“C₁₋₅ 酰氧基”表示与氧原子连接的酰基, 其中酰基具有与本文所述相同的定 义; 一些实例包括(但不限于)乙酰氧基、丙酰氧基、丁酰氧基、异丁酰氧基、仲丁酰 氧基、叔丁酰氧基等。

术语“C₁₋₆ 酰基磺酰胺”是指与磺酰胺的氮直接连接的 C₁₋₆ 酰基, 其中 C₁₋₆ 酰基和 磺酰胺的定义与如本文所述的含义相同, 并且 C₁₋₆ 酰基磺酰胺可以通过下式表示:



本发明的一些实施例为酰基磺酰胺为 C₁₋₅ 酰基磺酰胺时的情形, 一些实施例为 C₁₋₄ 酰基磺酰胺, 一些实施例为 C₁₋₃ 酰基磺酰胺, 并且一些实施例为 C₁₋₂ 酰基磺酰胺。酰基 磺酰胺的实例包括(但不限于)乙酰基氨磺酰基[-S(=O)₂NHC(=O)Me]、丙酰基氨磺酰基 [-S(=O)₂NHC(=O)Et]、异丁酰基氨磺酰基、丁酰基氨磺酰基、2-甲基丁酰基氨磺酰基、 3-甲基-丁酰基氨磺酰基、2,2-二甲基-丙酰基氨磺酰基、戊酰基氨磺酰基、2-甲基-戊酰基

氨磺酰基、3-甲基-戊酰基氨磺酰基、4-甲基-戊酰基氨磺酰基等。

术语“C₂₋₆ 烯基”表示含有 2 到 6 个碳的基团，其中存在至少一个碳碳双键，一些实施例具有 2 到 4 个碳，一些实施例具有 2 到 3 个碳，并且一些实施例具有 2 个碳。术语“烯基”包含 E 与 Z 异构体。此外，术语“烯基”还包括二烯基和三烯基。因此，如果存在一个以上双键，那么所述键可能全为 E 或 Z，或为 E 与 Z 的混合物。烯基的实例包括乙烯基、烯丙基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、2,4-己二烯基等。

如本文所使用的术语“C₁₋₄ 烷基”是指与氧原子直接连接的如本文所定义的烷基。实例包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基等。

术语“C₁₋₈ 烷基”表示含有 1 到 8 个碳的直链或支链碳基，一些实施例具有 1 到 6 个碳，一些实施例具有 1 到 3 个碳，并且一些实施例具有 1 或 2 个碳。烷基的实例包括（但不限于）甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、叔戊基、新戊基、1-甲基丁基[即，-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃]、2-甲基丁基[即 -CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃]、正己基等。

术语“C₁₋₄ 烷基甲酰胺基”或“C₁₋₄ 烷基甲酰胺”表示与酰胺基氮连接的单个 C₁₋₄ 烷基，其中烷基具有与本文所见相同的定义。C₁₋₅ 烷基甲酰胺基可以下式表示：



实例包括（但不限于）N-甲基甲酰胺、N-乙基甲酰胺、N-正丙基甲酰胺、N-异丙基甲酰胺、N-正丁基甲酰胺、N-仲丁基甲酰胺、N-异丁基甲酰胺、N-叔丁基甲酰胺等。

术语“C₁₋₃ 亚烷基”是指 C₁₋₃ 二价直链碳基。在一些实施例中，C₁₋₃ 亚烷基是指例如 -CH₂-、-CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH₂-等。在一些实施例中，C₁₋₃ 亚烷基是指 -CH-、-CHCH₂-、-CHCH₂CH₂-等，其中这些实例一般与“A”相关。

术语“C₁₋₄ 烷基亚磺酰基”表示与式-S(O)-的亚磺基连接的 C₁₋₄ 烷基，其中所述烷基具有与本文所述相同的定义。实例包括（但不限于）甲基亚磺酰基、乙基亚磺酰基、正丙基亚磺酰基、异丙基亚磺酰基、正丁基亚磺酰基、仲丁基亚磺酰基、异丁基亚磺酰基、叔丁基等。

术语“C₁₋₄烷基磺酰胺”是指以下基团：



其中 C₁₋₄ 烷基具有与本文所述相同的定义。

术语“C₁₋₄ 烷基磺酰基”表示与式-S(O)₂-的磺基连接的 C₁₋₄ 烷基，其中所述烷基具有与本文所述相同的定义。实例包括（但不限于）甲基磺酰基、乙基磺酰基、正丙基磺酰基、异丙基磺酰基、正丁基磺酰基、仲丁基磺酰基、异丁基磺酰基、叔丁基等。

术语“C₁₋₄ 烷基硫基”表示与式-S-的硫基连接的 C₁₋₄ 烷基，其中所述烷基具有与本文所述相同的定义。实例包括（但不限于）甲硫基（即，CH₃S-）、乙硫基、正丙基硫基、异丙基硫基、正丁基硫基、仲丁基硫基、异丁基硫基、叔丁基等。

术语“C₁₋₄ 烷基硫代甲酰胺”表示下式的硫代酰胺：



其中 C₁₋₄ 烷基具有与本文所述相同的定义。

术语“C₁₋₄ 烷基硫脒基”表示式-NC(S)N-的基团，其中两个氮原子中的一个经相同或不同的 C₁₋₄ 烷基取代，并且烷基具有与本文所述相同的定义。烷基硫脒基的实例包括（但不限于）CH₃NHC(S)NH-、NH₂C(S)NCH₃-、(CH₃)₂N(S)NH-、(CH₃)₂N(S)NH-、(CH₃)₂N(S)NCH₃-、CH₃CH₂NHC(S)NH-、CH₃CH₂NHC(S)NCH₃-等。

术语“C₁₋₄ 烷脒基”表示式-NC(O)N-的基团，其中两个氮原子中的一个经相同或不同的 C₁₋₄ 烷基取代，其中烷基具有与本文所述相同的定义。烷脒基的实例包括（但不限于）CH₃NHC(O)NH-、NH₂C(O)NCH₃-、(CH₃)₂N(O)NH-、(CH₃)₂N(O)NH-、(CH₃)₂N(O)NCH₃-、CH₃CH₂NHC(O)NH-、CH₃CH₂NHC(O)NCH₃-等。

术语“C₂₋₆ 炔基”表示含有 2 到 6 个碳和至少一个碳碳三键的基团，一些实施例具有 2 到 4 个碳，一些实施例具有 2 到 3 个碳，并且一些实施例具有 2 个碳。炔基的实例包括（但不限于）乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、4-己炔基、5-

己炔基等。术语“炔基”还包括二炔基和三炔基。

术语“氨基”表示基团-NH₂。

术语“C₁₋₄ 烷基氨基”表示与氨基连接的一个烷基，其中烷基具有与本文所述相同的含义。一些实例包括（但不限于）甲氨基、乙氨基、正丙氨基、异丙氨基、正丁氨基、仲丁氨基、异丁氨基、叔丁氨基等。一些实施例为“C₁₋₂ 烷基氨基”。

术语“芳基”表示含有 6 到 10 个环碳的芳香环基团。实例包括苯基和萘基。

术语“芳烷基”定义为经芳基进一步取代的 C₁₋₄ 亚烷基，诸如-CH₂-、-CH₂CH₂-等。“芳烷基”的实例包括苯甲基、苯乙基等。

术语“芳基甲酰胺基”表示与酰胺基氮连接的单一芳基，其中芳基具有于本文中所见相同的定义。实例为 N-苯基甲酰胺。

术语“芳基脲基”表示基团-NC(O)N-，其中一个氮原子经芳基取代。

术语“苯甲基”表示基团-CH₂C₆H₅。

术语“C₁₋₆ 烷氧基羰基”是指羧酸的 C₁₋₆ 烷基酯，其中烷基如本文所定义。在一些实施例中，C₁₋₆ 烷氧基羰基与氮原子链接并且一起形成氨基甲酸酯基（例如 N-COO-C₁₋₆ 烷基）。在一些实施例中，C₁₋₆ 烷氧基羰基为酯（例如，-COO-C₁₋₆ 烷基）。实例包括（但不限于）甲氧羰基、乙氧羰基、丙氧羰基、异丙氧羰基、丁氧羰基、仲丁氧羰基、异丁氧羰基、叔丁氧羰基、正戊氧羰基、异戊氧羰基、叔戊氧羰基、新戊氧羰基、正己氧羰基等。

术语“甲酰胺”是指基团-CONH₂。

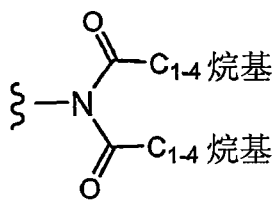
术语“羧基”表示-CO₂H 基团，也称作羧酸基团。

术语“氰基”表示基团-CN。

术语“C₃₋₇ 环烯基”表示含有 3 到 6 个环碳与至少一个双键的非芳香环基团，一些实施例含有 3 至 5 个碳，一些实施例含有 3 至 4 个碳。实例包括环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基等。

术语“C₃₋₇ 环烷基”表示含有 3 至 6 个碳的饱和环基，一些实施例含有 3 至 5 个碳，一些实施例含有 3 至 4 个碳。实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基等。

术语“C₄₋₈ 二酰基氨基”表示与两个本文所定义的酰基链接的氨基，其中所述酰基可能相同或不同，诸如：



C₄₋₈ 二酰基氨基的实例包括（但不限于）二乙酰基氨基、二丙酰基氨基、乙酰基丙酰基氨基等。

术语“C₂₋₈ 二烷基氨基”表示经相同或不同的两个烷基取代的氨基，其中烷基具有与本文所述相同的定义。一些实例包括（但不限于）二甲氨基、甲基乙基氨基、二乙氨基、甲基丙基氨基、甲基异丙基氨基、乙基丙基氨基、乙基异丙基氨基、二丙氨基、丙基异丙基氨基等。一些实施例为“C₂₋₄ 二烷基氨基。”

术语“C₁₋₄ 二烷基甲酰胺基”或“C₁₋₄ 二烷基甲酰胺”表示与酰胺基连接的相同或不同的两个烷基，其中所述烷基具有与本文所述相同的定义。C₁₋₄ 二烷基甲酰胺基可以下式表示：



其中 C₁₋₄ 烷基具有与本文所述相同的定义。二烷基甲酰胺的实例包括（但不限于）N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基-N-乙基甲酰胺、N,N-二乙基甲酰胺、N-甲基-N-异丙基甲酰胺等。

术语“C₂₋₆ 二烷基磺酰胺基”是指下文所示的以下基团中的一种：



其中 C₁₋₃ 烷基具有与本文所述相同的定义，例如（但不限于）甲基、乙基、正丙基、异丙基等。

术语“C₂₋₆ 二烷基硫代甲酰胺基”或“C₂₋₆ 二烷基硫代甲酰胺”表示与硫酰胺基连接的相同或不同的两个烷基，其中所述烷基具有与本文所述相同的定义。C₁₋₄ 二烷基硫

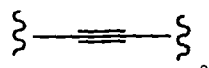
代甲酰胺基可以下述基团表示：



二烷基硫代甲酰胺的实例包括（但不限于）N,N-二甲基硫代甲酰胺、N-甲基-N-乙基硫代甲酰胺等。

术语“C₂₋₆ 二烷基磺酰胺基”是指与如本文所定义的两个 C₁₋₃ 烷基磺酰基键接的氨基。

术语“亚乙炔基”是指如下式所示的碳碳三键基团：



术语“甲酰基”是指基团-CHO。

术语“C₁₋₄ 卤烷氧基”表示与氧原子直接连接的如本文所定义的卤烷基。实例包括（但不限于）二氟甲氧基、三氟甲氧基、2,2,2-三氟乙氧基、五氟乙氧基等。

术语“C₁₋₄ 卤烷基”表示本文所定义的 C₁₋₄ 烷基，其中所述烷基经一个卤素取代直到经全取代，且经全取代的 C₁₋₄ 卤烷基可以式 C_nL_{2n+1} 表示，其中 L 为卤素，且“n”为 1、2、3 或 4；当存在一个以上卤素时，此时其可能相同或不同并且选自由下列基团组成的群组：F、Cl、Br 和 I，优选 F。C₁₋₄ 卤烷基的实例包括（但不限于）氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯二氟甲基、2,2,2-三氟乙基、五氟乙基等。

术语“C₁₋₄ 卤烷基甲酰胺”表示本文所定义的烷基甲酰胺基团，其中所述烷基经一个卤素取代直到经全取代，经全取代的卤烷基可由式 C_nL_{2n+1} 表示，其中 L 为卤素，且“n”为 1、2、3 或 4。当存在一个以上卤素时，其可能相同或不同并且选自由下列基团组成的群组：F、Cl、Br 和 I，优选 F。。

术语“C₁₋₄ 卤烷基亚磺酰基”表示与式-S(O)-的亚磺基连接的卤烷基，其中所述卤烷基具有与本文所述相同的定义。实例包括（但不限于）三氟甲基亚磺酰基、2,2,2-三氟乙基亚磺酰基、2,2-二氟乙基亚磺酰基等。

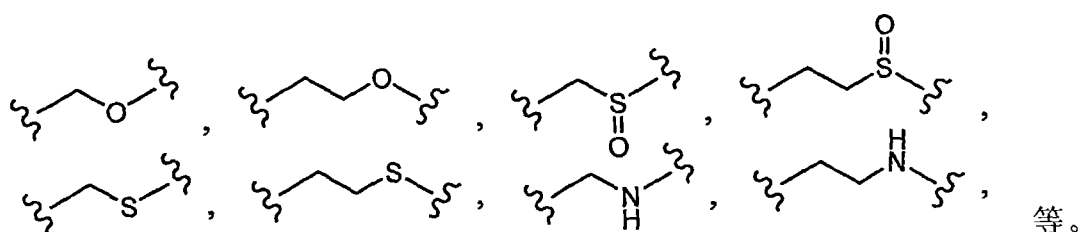
术语“C₁₋₄ 卤烷基磺酰基”表示与式-S(O)₂-的磺基连接的卤烷基，其中所述卤烷基具有与本文所述相同的定义。实例包括（但不限于）三氟甲基磺酰基、2,2,2-三氟乙基磺

酰基、2,2-二氟乙基磺酰基等。

术语“**C₁₋₄ 卤烷硫基**”表示与硫直接连接的卤烷基，其中所述卤烷基具有与本文所述相同的含义实例包括（但不限于）三氟甲硫基（即，CF₃S-）、1,1-二氟乙硫基、2,2,2-三氟乙硫基等。

术语“**卤素**”或“**卤基**”表示氟基、氯基、溴基或碘基。

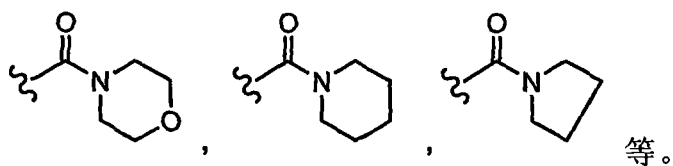
术语“**C₁₋₂ 杂亚烷基**”是指与选自 O、S、S(O)、S(O)₂ 和 NH 的杂原子键接的 C₁₋₂ 亚烷基。一些代表性实例包括（但不限于）下式的基团：



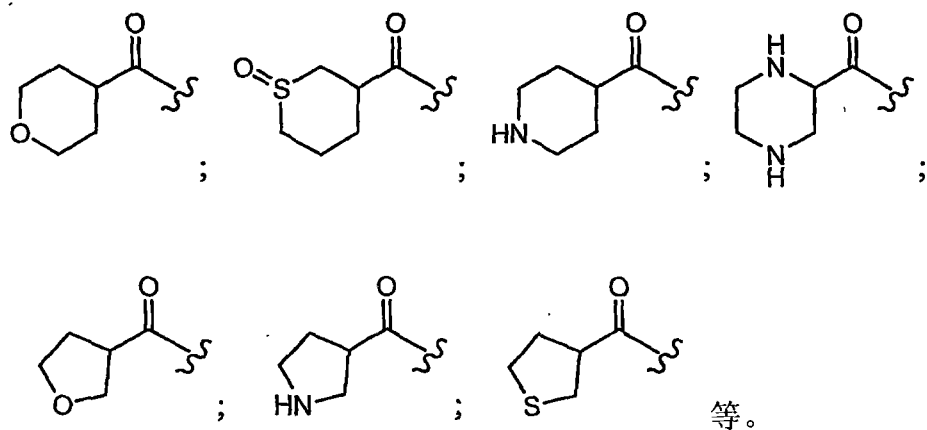
术语“**杂芳基**”表示芳香环系统，其可为单环、两个稠环或三个稠环，且其中至少一个环碳经选自（但不限于）O、S 和 N 组成的群组的杂原子置换，其中 N 可视情况经 H、C₁₋₄ 酰基或 C₁₋₄ 烷基取代。杂芳基的实例包括（但不限于）吡啶基、苯并呋喃基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基、三嗪基、喹啉基、苯并噁唑、苯并噻唑、1*H*-苯并咪唑、异喹啉、喹唑啉等。在一些实施例中，所述杂芳基原子为 O、S、NH，实例包括（但不限于）吡咯、吲哚等。

术语“**杂环**”表示非芳香族碳环（即，如本文定义的环境基或环烯基），其中一个、二个或三个环碳经选自（但不限于）O、S、N 组成的群组的杂原子置换；其中 N 可视情况经 H、C₁₋₄ 酰基或 C₁₋₄ 烷基取代，并且环碳原子视情况经氧或硫氧取代，因此形成羰基或硫羰基。杂环基为含 3 元、4 元、5 元、6 元或 7 元的环。杂环基的实例包括（但不限于）吡丙啶-1-基、吡丙啶-2-基、吡丁啶-1-基、吡丁啶-2-基、吡丁啶-3-基、哌啶-1-基、哌啶-4-基、吗啉-4-基、哌嗪-1-基、哌嗪-4-基、吡咯烷-1-基、吡咯烷-3-基、[1,3]-二氧戊环-2-基等。

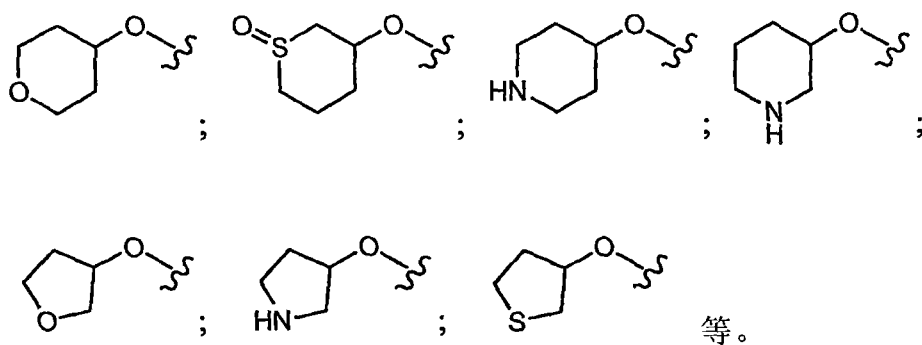
术语“**杂环羰基**”表示与羰基（即，C=O）的碳直接键接的如本文所定义的杂环基。在一些实施例中，杂环基的环氮与羰基键接形成酰胺。实例包括（但不限于）：



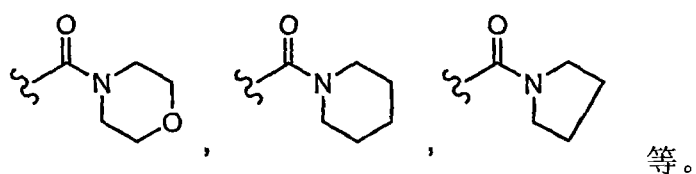
在一些实施例中，环碳与羰基键接形成酮基。实例包括（但不限于）：



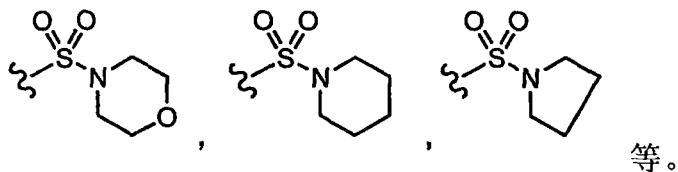
术语“杂环氧基”是指与氧原子直接键接的如本文所定义的杂环基。实例包括以下基团：



术语“杂环甲酰胺基”表示具有环氮的如本文所定义的杂环基，其中所述环氮与羰基直接键接形成酰胺。实例包括（但不限于）：



术语“杂环磺酰基”表示具有环氮的如本文所定义的杂环基，其中所述环氮与 SO_2 基团直接键接形成磺酰胺。实例包括（但不限于）：

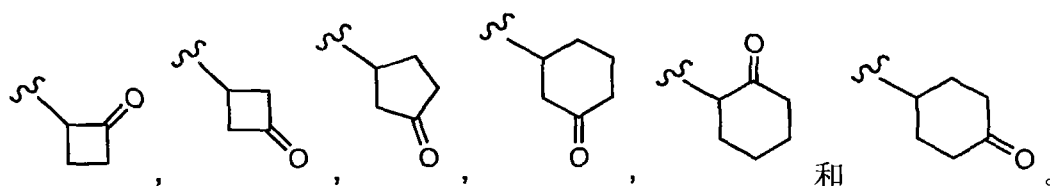


术语“羟基”是指 $-\text{OH}$ 基团。

术语“羟基氨基”是指 $-\text{NHOH}$ 基团。

术语“硝基”是指 $-\text{NO}_2$ 基团。

术语“ C_{4-7} 氧代环烷基”是指如本文所定义的 C_{4-7} 环烷基，其中所述环碳中的一个经羰基置换。 C_{4-7} 氧代环烷基的实例包括（但不限于）2-氧代-环丁基、3-氧代-环丁基、3-氧代-环戊基、4-氧代-环己基等并且可以分别以下列结构表示：

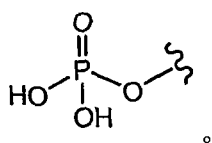


术语“全氟烷基”表示式 $-\text{C}_n\text{F}_{2n+1}$ 的基团；换句话说，全氟烷基为如本文所定义的烷基，其中所述烷基经氟原子全取代且因此可视为卤烷基的子集。全氟烷基的实例包括 CF_3 、 CF_2CF_3 、 $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CF}(\text{CF}_3)_2$ 、 $\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{CF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)_2$ 、 $\text{CF}(\text{CF}_3)\text{CF}_2\text{CF}_3$ 等。

术语“苯氧基”是指 $-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-$ 基团。

术语“苯基”是指 $-\text{C}_6\text{H}_5-$ 基团。

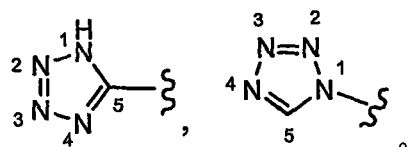
术语“膦酰基氧基”是指具有以下化学结构的基团：



术语“磺酰胺”是指 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 基团。

术语“磺酸”是指-SO₃H 基团。

术语“四唑基”是指下式的五元杂芳基：



在一些实施例中，四唑基分别在 1 位或 5 位处分别经选自以下基团组成的群组的基团进一步取代：C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 卤烷基和 C₁₋₃ 烷氧基。

术语“硫醇”表示-SH 基团。

术语“**Apa**”是指氨基-3-苯基丙酸。

术语“GLP-1 促分泌素”应意谓促进细胞（例如肠内分泌细胞）分泌 GLP-1 的试剂（例如，化合物）。

术语“内源性”应意谓哺乳动物自然产生的物质。

术语“G 蛋白偶合受体的生物活性片段”应意谓具有自然产生的 GPCR 的结构和生化功能的 GPCR 的片段。在某些实施例中，生物活性片段与 G 蛋白偶合。在某些实施例中，生物活性片段与 GPCR 的已知配体结合。

术语“引物”在本文中用于表示与目标核苷酸序列互补并且用于与所述目标核苷酸序列杂交的特异性寡核苷酸序列。引物可充当由 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶或反转录酶所催化的核苷酸聚合反应的起点。

术语“表达载体”应意谓在关于所述表达载体的适当主体细胞重组体中克隆 DNA 转录和经转录 mRNA 翻译所需的 DNA 序列。适当构建的表达载体应含有在主体细胞中自主复制的复制原点、可选择标记、有限数量的有有限制性酶位点、潜在的高拷贝数和活性启动子。待转录的克隆 DNA 在表达载体内与组成性或条件性活化的启动子可操作地连接。

术语“候选化合物”或“测试化合物”应意谓可用于筛选的化合物（例如且不限于，化学化合物）。

术语“接触”应意谓将至少两个部分集合在一起。

术语“调节”或“修饰”应该是指增加或降低特定活性、功能或分子的量、质量或作用。出于说明而非限制的目的，G 蛋白偶合受体的激动剂、部分激动剂、反向激动剂和拮抗剂为所述受体的调节剂。

术语“小分子”应意谓分子量小于约 10,000 克/摩尔的化合物，包括肽、肽模拟物、氨基酸、氨基酸类似物、聚核苷酸、聚核苷酸类似物、核苷酸、核苷酸类似物、有机化合物或无机化合物（即，包括杂有机化合物或有机金属化合物）和其盐、酯和其它医药学上可接受的形式。在某些优选实施例中，小分子为分子量小于约 5,000 克/摩尔的有机或无机化合物。在某些优选实施例中，小分子为分子量小于约 1,000 克/摩尔的有机或无机化合物。在某些优选实施例中，小分子为分子量小于约 500 克/摩尔的有机或无机化合物。

术语“聚核苷酸”应该是指具有一个以上核苷酸的单链或双链形式的 RNA、DNA 或 RNA/DNA 混合序列。本发明的聚核苷酸可以通过包括合成、重组、离体产生或其组合的任何已知的方法以及利用所属领域已知的任何纯化方法制备。

术语“多肽”应指与聚合物长度无关的氨基酸的聚合物。因此，多肽的定义中包括肽、寡肽和蛋白质。这一术语不特指或排除多肽的表达后修饰。举例来说，术语多肽特别涵盖包括共价连接糖基、乙酰基、磷酸基、脂质基团等的多肽。

在本文中，术语“抗体”意欲涵盖单克隆抗体和多克隆抗体。

术语“第二信使”应意谓由受体活化所产生的胞内反应。第二信使可以包括例如 1,4,5-三磷酸肌醇 (IP3)、二酰基甘油 (DAG)、环 AMP (cAMP)、环 GMP (cGMP)、MAP 激酶活性、MAPK/EPK 激酶激酶-1 (MEKK1) 活性和 Ca^{2+} 。可以测量第二信使反应以测定受体的活化。

术语“受体功能”应指受体接收刺激物且调节细胞内作用的正常运作，其包括（但不限于）调控基因转录、调控离子的流入或流出、实现催化反应和/或通过 G 蛋白调节活性（诸如引起第二信使反应）。

术语“刺激”联系术语“反应”或“受体功能”应意谓在存在化合物的情况下受体的反应或功能增加，这与不存在所述化合物的情况相反。

术语“抑制”联系术语“反应”或“受体功能”应意谓在存在化合物的情况下受体的反应或功能降低或受阻，这与不存在所述化合物的情况相反。

当提供值的范围时，应了解介于所述范围的上限和下限之间的每一居中值（除非另作清楚说明，否则精确到下限单位的十分之一）和任何其它所述值或所述范围中的居中值都涵盖于本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括于所述较小范围中，且也涵盖于本发明中，其从属于所述范围中的任何特定排除的界限。当所述范围包括两个界限中的一个或两个时，排除那些所包括界限的一个或两个界限的范围也包括于本发明中。

BRS-3 激动剂

优选 BRS-3 为哺乳动物 BRS-3。更优选 BRS-3 为啮齿动物或灵长类动物的 BRS-3。最优选 BRS-3 为人类 BRS-3。

可用于本发明的新颖治疗组合中的 BRS-3 激动剂的种类包括对 BRS-3 受体展现可接受地高亲和力的化合物。BRS-3 激动剂或医药学上可接受的盐可能为任何激动剂，更优选为选择性 BRS-3 激动剂。

BRS-3 激动剂的实例描述于 Weber 等人, J Med Chem (2003) 46:1918-1930 中；所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中。

BRS-3 激动剂的实例还描述于 Mantey 等人, J Pharmacol Exp Ther (2004) 310:1161-1169 中；所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中。

BRS-3 激动剂的实例还描述于 Boyle 等人, J Peptide Sci (2005) 11:136-141 中；所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中。

BRS-3 激动剂的实例还描述于 Lammerich 等人, Br J Pharmacol (2003) 138:1431-1440 中；所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中。

一方面，BRS-3 激动剂选自表 B 中左边一栏。

一方面，BRS-3 激动剂选自化合物 1、化合物 2、化合物 3、化合物 4、化合物 5、化合物 6、化合物 7、化合物 8、化合物 9、化合物 10、化合物 11、化合物 12、化合物 13、化合物 14、化合物 15、化合物 16、化合物 17、化合物 18、化合物 19、化合物 20、化合物 21、化合物 22、化合物 23、化合物 24、化合物 25、化合物 26 和化合物 27；这些化合物可见于 Boyle 等人, J Peptide Sci (2005) 11:136-141 中，其中将这些化合物描述为选择性 BRS-3 激动剂。

一方面，BRS-3 激动剂选自化合物 28、化合物 29 和化合物 30；这些化合物可见于 Mantey 等人, J Pharmacol Exp Ther (2004) 310:1161-1169 中，其中将这些化合物描述为选择性 BRS-3 激动剂。

一方面，BRS-3 激动剂选自化合物 31、化合物 32 和化合物 33；这些化合物可见于 Boyle 等人, J Peptide Sci (2005) 11:136-141 中，其中将这些化合物描述为选择性 BRS-3 激动剂。

一方面，BRS-3 激动剂为化合物 34；这一化合物可见于 Mantey 等人, J Pharmacol Exp Ther (2004) 310:1161-1169 中，其中将所述化合物描述为对 BRS-3 的选择性并不优于对 GRP-R 和 NMB-R 的选择性的非选择性 BRS-3 激动剂。

在本发明的一个方面中，任一种或一种以上 BRS-3 激动剂都可以从本发明的任何实

施例中排除。

在本发明的一个方面中，BRS-3 激动剂具有小于约 10 μ M、小于约 1 μ M、小于约 100 nM、小于约 75 nM、小于约 50 nM、小于约 25 nM、小于约 20 nM、小于约 15 nM、小于约 10 nM、小于约 5 nM、小于约 4 nM、小于约 3 nM、小于约 2 nM 或小于约 1 nM 的 EC₅₀ 值。优选 BRS-3 激动剂具有小于约 50 nM、小于约 25 nM、小于约 20 nM、小于约 15 nM、小于约 10 nM、小于约 5 nM、小于约 4 nM、小于约 3 nM、小于约 2 nM 或小于约 1 nM 的 EC₅₀ 值。

在本发明的一个方面中，BRS-3 激动剂为选择性 BRS-3 激动剂，其中所述选择性 BRS-3 激动剂对 BRS-3 的选择性比对胃释放肽受体 (GRP-R) 或神经激肽 B 受体 (NMB-R) 的选择性高至少约 10 倍，更优选高至少约 100 倍。在本发明的一个方面中，BRS-3 激动剂为选择性 BRS-3 激动剂，其中所述选择性 BRS-3 激动剂对 BRS-3 的选择性比对胃释放肽受体 (GRP-R) 和神经激肽 B 受体 (NMB-R) 的选择性高至少约 10 倍，更优选高至少约 100 倍。

在本发明的一个方面中，BRS-3 激动剂具口服活性。

在本发明的一个方面中，BRS-3 激动剂为人类 BRS-3 激动剂。

DPP-IV 抑制剂

可用于本发明的新颖治疗组合中的 DPP-IV 抑制剂的种类包括对 DPP-IV 展现可接受地高亲和力的化合物。DPP-IV 抑制剂或医药学上可接受的盐可能为任何 DPP-IV 抑制剂，更优选为选择性二肽基肽酶抑制剂并且最优选为选择性 DPP-IV 抑制剂。

DPP-IV 抑制剂的实例描述于 Villhauer 等人, J Med Chem (2003) 46:2774-2789, 关于 LAF237; Ahren 等人, J Clin Endocrinol Metab (2004) 89:2078-2084; Villhauer 等人, J Med Chem (2002) 45:2362-2365, 关于 NVP-DPP728; Ahren 等人, Diabetes Care (2002) 25:869-875, 关于 NVP-DPP728; Peters 等人, Bioorg Med Chem Lett (2004) 14:1491-1493; Caldwell 等人, Bioorg Med Chem Lett (2004) 14:1265-1268; Edmondson 等人, Bioorg Med Chem Lett (2004) 14:5151-5155; 和 Abe 等人, J Nat Prod (2004) 67:999-1004 中; 各所述文献的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。

DPP-IV 的特定实例包括 (但不限于) 二肽衍生物或二肽模拟物, 诸如, 如例如美国专利第 6,303,661 号中所述的丙氨酸-吡咯烷、异亮氨酸-噻唑烷和假底物 N-缬氨酰丙氨酰基 O-苯甲酰基羟胺, 所述专利的公开内容是以全文引用的方式并入本文中。

DPP-IV 抑制剂的实例可见于美国专利第 6,812,350 号、第 6,803,357 号、第 6,710,040 号、第 6,617,340 号、第 6,699,871 号、第 6,573,287 号、第 6,432,969 号、第 6,395,767

号、第 6,303,661 号、第 6,242,422 号、第 6,166,063 号中，各所述专利的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。DPP-IV 抑制剂的实例可见于美国专利申请案第 2004242898 号、第 2004180925 号、第 2004110817 号、第 2004106656 号、第 2003232788 号、第 2003216450 号、第 2003134802 号、第 2003125304 号、第 2003130281 号、第 2003119738 号、第 2003100563 号、第 2003119750 号、第 2003130199 号、第 2002183367 号、第 2002049164 号、第 2002006899 号中，各所述专利的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。

DPP-IV 抑制剂的实例可见于国际申请案 WO 04/103993、WO 04/103276、WO 04/99134、WO 04/87053、WO 04/76434、WO 04/76433、WO 04/69162、WO 04/64778、WO 04/71454、WO 04/69162、WO 04/67509、WO 04/58266、WO 04/52850、WO 04/50022、WO 04/50658、WO 04/32836、WO 04/46106、WO 04/43940、WO 04/41795、WO 04/37169、WO 04/37181、WO 03/101958、WO 04/14860、WO 04/07468、WO 04/04661、WO 03/82817、WO 03/72528、WO 03/57666、WO 03/57144、WO 03/40174、WO 03/37327、WO 03/35067、WO 03/35057、WO 03/22871、WO 03/15775、WO 03/04498、WO 03/02530、WO 03/02596、WO 03/02595、WO 03/02593、WO 03/02553、WO 03/02531、WO 03/00181、WO 03/00180、WO 03/00250、WO 02/83109、WO 02/83128、WO 02/76450、WO 02/51836、WO 02/34900、WO 01/96295、WO 01/81337、WO 01/81304、WO 01/68603、WO 01/34594、WO 00/34241、WO 00/23421、WO 99/67278、WO 99/61431、WO 98/19998、WO 97/40832、EP 1480961、EP 1469873、EP 1465891、EP 1450794、EP 1446116、EP 1412357、EP 1399420、EP 1399471、EP 1399470、EP 1399469、EP 1399433、EP 1406873、EP 1406622、EP 1406872、EP 1399154、EP 1377288、EP 1385508、EP 1354882、EP 1304327、EP 1296974、EP 1280797、EP 1282600、EP 1261586、EP 1215207、EP 1228061、EP 1137635、EP 1123272、EP 1082314、CA 2433090、DE 19828113、DE 19823831、DE 19616486、DE 10256264、DE 10143840、JP 2004244412、JP 2004026820、JP 2003300977、JP 2004521149、JP 2004530729、JP 2004525179、JP 2004525929、JP 2004503531、JP 2003535034、JP 2003531204、JP 2003531191、JP 2003531118、JP 2003524591、JP 2002531547、JP 2002527504、JP 2002516318、JP 2001510442、JP 2000511559、JP 2000191616 中，各所述申请案的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。

在本发明的一个方面中，DPP-IV 抑制剂为缬氨酸-吡咯烷[Deacon 等人, Diabetes (1998) 47:764769；所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中]。

在本发明的一个方面中，DPP-IV 抑制剂为 3-(L-异亮氨酰基)噻唑烷（异亮氨酸-噻

唑烷)。异亮氨酸-噻唑烷可见于 JP 2001510442、WO 97/40832、US 6,303,661 和 DE 19616486 中,各所述专利的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。异亮氨酸-噻唑烷被描述为具口服活性和选择性的 DPP-IV 抑制剂[Pederson 等人, Diabetes (1998) 47:1253-1258, 所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中]。

在本发明的一个方面中, DPP-IV 抑制剂为 1-[2-[5-氰基吡啶-2-基)氨基]乙氨基]乙酰基-2-氰基-(S)-吡咯烷 (NVP-DPP728)。NVP-DPP728 可见于 WO 98/19998 和 JP 2000511559 中,各所述专利的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。NVP-DPP728 被描述为具口服活性和选择性的 DPP-IV 抑制剂[Villhauer 等人, J Med Chem (2002) 45:2362-2365]。

在本发明的一个方面中, DPP-IV 抑制剂为 3(R)-氨基-1-[3-(三氟甲基)-5,6,7,8-四氢[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡嗪-7-基]-4-(2,4,5-三氟苯基)丁-1-酮 (MK-0431)。MK-0431 可见于 EP 1412357、WO 03/04498、US 6,699,871 和 US 2003100563 中,各所述专利的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。MK-0431 被描述为具口服活性和选择性的 DPP-IV 抑制剂[Weber 等人, Diabetes (2004) 53(增补版 2):A151, 633-P (摘要), 所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中]。

在本发明的一个方面中, DPP-IV 抑制剂为(1-[[3-羟基-1-金刚烷基)氨基]乙酰基]-2-氰基-(S)-吡咯烷 (LAF237)。LAF237 可见于 US 6,166,063、WO 00/34241、EP 1137635 和 JP 2002531547 中,各所述专利的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。LAF237 被描述为具口服活性和选择性的 DPP-IV 抑制剂[Villhauer 等人, J Med Chem (2003) 46:2774-2789]。

在本发明的一个方面中, DPP-IV 抑制剂为(1S,3S,5S)-2-[2(S)-氨基-2-(3-羟基金刚烷-1-基)乙酰基]-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-腈 (BMS-477118)。

在本发明的一个方面中, DPP-IV 抑制剂选自表 8 中的右边一栏。

在本发明的一个方面中,任一种或一种以上 DPP-IV 抑制剂都可以从本发明的任何实施例中排除。

在本发明的一个方面中, DPP-IV 抑制剂具有小于约 10 μ M、小于约 1 μ M、小于约 100 nM、小于约 75 nM、小于约 50 nM、小于约 25 nM、小于约 20 nM、小于约 15 nM、小于约 10 nM、小于约 5 nM、小于约 4 nM、小于约 3 nM、小于约 2 nM 或小于约 1 nM 的 IC₅₀ 值。优选 DPP-IV 抑制剂具有小于约 50 nM、小于约 25 nM、小于约 20 nM、小于约 15 nM、小于约 10 nM、小于约 5 nM、小于约 4 nM、小于约 3 nM、小于约 2 nM 或小于约 1 nM 的 IC₅₀ 值。

在本发明的一个方面中，DPP-IV 抑制剂为选择性 DPP-IV 抑制剂，其中所述选择性 DPP-IV 抑制剂对人血浆 DPP-IV 的选择性是对 PPCE、DPP-II、DPP-8 和 DPP-9 中一种或一种以上的选择性的至少约 10 倍高，更优选至少约 100 倍高，并且最优选至少约 1000 倍高。

在本发明的一个方面中，DPP-IV 抑制剂具口服活性。

在本发明的一个方面中，DPP-IV 抑制剂为人 DPP-IV 抑制剂。

BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合

出于说明而非限制的目的，通过从表 B 的左边一栏中选择 BRS-3 激动剂并且从表 B 的右边一栏中选择 DPP-IV 抑制剂从而提供本发明 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的示范性组合。显然可以预期，通过从表 B 中左边一栏选择 BRS-3 激动剂并且从表 B 中右边一栏选择 DPP-IV 抑制剂而提供的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的每一个别组合都为在本发明范畴内的单独实施例。

表 B

BRS-3 激动剂	DPP-IV 抑制剂
N1-{(1R)-2-(1H-3-吡啶基)-1-[1-(2-苯乙基)氨甲酰基]乙基}-(2S)-2-[1-(2-(4-氯苯基)乙基)甲酰胺基]戊烷二酰胺 (化合物 1)	缬氨酸-吡咯烷
N1-{(1R)-2-(1H-3-吡啶基)-1-[1-(2-苯乙基)氨甲酰基]乙基}-(2S)-2-[(1H-2-吡啶基甲基)甲酰胺基]戊烷二酰胺 (化合物 2)	3-(L-异亮氨酰基)噻唑烷 (异亮氨酸-噻唑烷)
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(1S)-1-(苯甲基甲酰胺基)乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 3)	1-[2-[5-氰基吡啶-2-基]氨基]乙氨基]乙酰基-2-氰基-(S)-吡咯烷 (NVP-DPP728)
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(1S)-1-((4-氯苯基)-甲酰胺基)乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 4)	3(R)-氨基-1-[3-(三氟甲基)-5,6,7,8-四氢[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡嗪-7-基]-4-(2,4,5-三氟苯基)丁-1-酮 (MK-0431)
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(1S)-1-((1,3-苯并二氧杂环戊烯-5-基甲基)甲酰胺基)乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 5)	(1-[[3-羟基-1-金刚烷基]氨基]乙酰基)-2-氰基-(S)-吡咯烷 (LAF237)
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(1S)-1-((3-吡啶基)甲基甲酰胺基)乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 6)	(1S,3S,5S)-2-[2(S)-氨基-2-(3-羟基金刚烷-1-基)乙酰基]-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3-腈 (BMS-477118)

N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(1S)-1-((1,2,3,4-四氢-1-异喹啉基)甲基甲酰胺基)乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 7)	[1-[2(S)-氨基-3-甲基丁酰基]吡咯烷-2(R)-基]硼酸 (PT-100)
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(1S)-1-((1H2-吡啶基)甲基甲酰胺基)乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 8)	GSK-823093
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(苯甲基)氨基]甲基甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 9)	PSN-9301
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(4-氯苯甲基)氨基]-甲基甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 10)	T-6666
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(3-吡啶基)甲氨基]-甲基甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 11)	SYR-322
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[1-(2-苯乙基)氨基]-甲基甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 12)	SYR-619
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[1-苯甲基氨基]乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 13)	CR-14023
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[1-((4-氯苯甲基)氨基)乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 14)	CR-14025
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[1-(1-(2-苯乙基)氨基)乙基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 15)	CR-14240
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{{N'-(苯甲酰基)肼基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 16)	CR-13651
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{{N'-(4-氯苯甲酰基)-肼基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 17)	TS-021
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{{N'-(2-(3-吡啶基)乙酰基)肼基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 18)	GRC-8200
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{{N'-(2-(1,2,3,4-四氢-1-异喹啉基)乙酰基)肼基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 19)	GRC-8116
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{{N'-(2-(1H-2-吡啶基)乙酰基)肼基]甲酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 20)	FE107542
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{{N'-(苯基亚甲基)-肼基]甲酰胺基}	4(S)-氟-1-[2-[1-(2-羟基乙酰基)-4-甲基

基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 21)	哌啶-4-基氨基]乙酰基]吡咯烷-2(S)-脒 富马酸盐
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[N'-(呋喃-2-基亚甲基)胍基]甲 酰胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 22)	6-[2-[2-[2(S)-氰基吡啶-1-基]-2-氧代 乙氨基]乙氨基]吡啶-3-脒二盐酸盐
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[N'-(苯甲基)胍基]甲酰胺 基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 23)	N-(5-氯吡啶-2-基)-2-[4-[1-[2-(4-氰基噻 唑烷-3-基)-2-氧代乙基]胍基]哌啶-1- 基]乙酰胺三(三氟乙酸盐)
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[N'-(4-氯苯甲基)胍基]甲酰胺 基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 24)	反-4-[2-[4(R)-氰基噻唑烷-3-基]-2-氧代 乙氨基]-N,N-二甲基环己烷甲酰胺盐 酸盐
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[N'-(2-呋喃基甲基)胍基]甲酰 胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 25)	反-1-[2-[4-(1,3-二氧代-2,3-二氢-1H-异 吡啶-2-基)环己氨基]乙酰基]吡咯烷 -2(S)-脒盐酸盐
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[4-苯基哌嗪基]甲基]甲酰胺 基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 26)	4,4-二氟-1-[2-[外-8-(2-噻唑基)-8-氮杂 双环[3.2.1]辛-3-基氨基]乙酰基]吡咯烷 -2(S)-脒
N1-(2-苯乙基)-(2R)-2-{[(4-苯基哌啶基)甲基]甲酰 胺基}-3-(1H-3-吡啶基)丙酰胺 (化合物 27)	外-3-[2-[8-(2-噻唑基)-8-氮杂双环 [3.2.1]辛-3-基氨基]乙酰基]噻唑烷 -4(R)-脒
[D-Tyr ⁶ , (R)-Apa ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]蛙皮素(6-14) (化合物 28)	3(R)-氨基-1-(8-氯-1,2,3,4-四氢吡嗪并 [1,2-a]苯并咪唑-2-基)-4-(2,5-二氟苯 基)丁-1-酮三氟乙酸盐
[D-Tyr ⁶ , (S)-Apa ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]蛙皮素(6-14) (化合物 29)	3(R)-氨基-4-(2,5-二氟苯基)-1-[2-(4-氟 苯基)-4,5,6,7-四氢噻唑并[4,5-c]吡啶 -5-基]丁-1-酮
[D-Tyr ⁶ -Apa ¹¹ -4Cl, Phe ¹³ , Nle ¹⁴]蛙皮素(6-14) (化合物 30)	2-[4-[2-[3(R)-氨基-4-(2-氟苯基)丁酰 基]-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-基甲酰胺基 甲基]苯基]乙酸
Ac-Phe-Trp-Ala-His(τBzl)-Nip-Gly-Arg-NH ₂ (化合物 31)	1-(2-苯并噻唑基)-1-[1-[(2S,3aS,7aS)-全 氢吡啶-2- 基]羰基]吡咯烷-2(S)-基]甲酮盐酸盐
Ac-Phe-Trp-Ala-His(τBzl)-βAla-His-Arg-NH ₂ (化合物 32)	反-N-[4-[1(S)-氨基-2-[3(S)-氟吡咯烷-1- 基]-2-氧代乙基]环己基]-2,4-二氟苯磺 酰胺
Ac-Phe-Trp-Ala-Val-βAla-His-Arg-Trp-NH ₂ (化合物 33)	(1S,3S,5S)-2-[2(S)-氨基-4,4-二甲基戊 酰基]-2-氮杂双环[3.1.0]己烷-3(S)-脒 三氟乙酸盐
[D-Tyr ⁶ , βAla ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]蛙皮素(6-14) (化合物 34)	2-[7-(2-丁炔基)-1-(2-苯乙基)-8-(1-哌嗪 基)黄嘌呤-3-基]-N-(2-丙炔基)乙酰胺 盐酸盐

此外, 本发明的化合物(包括表 B 中所述的化合物)涵盖其所有医药学上可接受的盐、溶剂化物和水合物。例如参看 Berge 等人 (1977), Journal of Pharmaceutical Sciences

66:1-19; 和 Polymorphism in Pharmaceutical Solids (1999) Brittain 编, Marcel Dekker, Inc.; 各所述文献的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中。

当涉及上文所述的组合疗法时, 本发明的化合物可以任何适当的方式投与。适当的投药途径包括使用所属领域已知的方法经口、经鼻、经直肠、透粘膜、透皮或经肠投与, 不经肠传递, 包括肌肉内、皮下、髓内注射, 以及鞘内、直接脑室内、静脉内、腹膜内、鼻内、肺内(吸入)或眼内注射。其它适当的投药途径为气雾剂和储槽式调配物。特别涵盖本发明药物的持续释放调配物, 尤其储槽式调配物。在某些优选实施例中, 本发明的化合物是经口投与。可以将本发明的化合物制成固体或液体形式, 诸如片剂、胶囊、散剂、糖浆、酏剂等, 气雾剂、无菌溶液、悬浮液或乳液等。在某些实施例中, BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂中的一种或两种是经口投与。

适于经口投与的调配物除可以为固体片剂和胶囊调配物外, 还可以为水溶液和悬浮液的形式。水溶液和悬浮液可以由无菌粉末或颗粒制备。可以将化合物溶解于水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇、玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、苯甲醇、氯化钠和/或各种缓冲液中。所属领域中众所周知其它佐剂。

应了解, BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂可以组合制剂的形式提供以同时、独立或依次用于治疗或预防糖尿病或其相关病况。所述组合制剂可例如为双包装的形式。

因此, 还应了解, 本发明涵盖同时、独立或依次用于预防或治疗糖尿病或其相关病况的产物, 其包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂作为组合制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂作为组合制剂组成。

可以通过将 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂一起或独立地与如本文所述的医药学上可接受的载剂、赋形剂、粘合剂、稀释剂等混合, 并且经口或不经口投与医药组合物形式的混合物, 来制备包含 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或基本上由 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组成的本发明的组合。

因此, 还应了解, BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂或医药组合物可以独立剂型或以单一剂型投与。

还应了解, 当 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为独立剂型时, BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂可通过不同途径投与。

独立或组合的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的医药组合物可以通过所属领域众所周知的方法制备, 例如借助常规混合、溶解、制粒、糖衣丸制造、研磨、乳化、封装、截留、冻干方法或喷雾干燥法制备。

根据本发明的医药组合物可以常规方式使用一种或一种以上包含赋形剂和助剂的

医药学上可接受的载剂调配,所述载剂有助于将活性化合物加工成能够在医药学上使用的制剂。适当的医药学上可接受的载剂都为所属领域技术人员可用[例如参看 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Gennaro 等人编), 第 20 版, 2000, Lippincott Williams & Wilkins; 和 Handbook of Pharmaceutical Excipients (Rowe 等人编), 第 4 版, 2003, Pharmaceutical Press; 各所述文献的公开内容都是以全文引用的方式并入本文中]。适当的调配物将视所选择的投药途径而定。术语“载剂”材料或“赋形剂”材料在本文中意谓任何物质,其本身并不是治疗剂,而是用作载剂和/或稀释剂和/或佐剂,或媒剂以将治疗剂传递到个体,或加到医药组合物中以改良其加工或储存特性,或允许或促进组合物在离散物品中形成剂量单位,诸如适于经口投与的胶囊或片剂。出于说明而非限制的目的,赋形剂可包括稀释剂、崩解剂、粘合剂、胶粘剂、润湿剂、聚合物、润滑剂、助流剂、加入以掩蔽或抵消令人不快的味道或气味的物质、调味剂、染料、芳香剂和加入以改良组合物外观的物质。可接受的赋形剂包括硬脂酸、硬脂酸镁、氧化镁、磷酸和硫酸的钠盐和钙盐、碳酸镁、滑石、明胶、阿拉伯胶、藻酸钠、果胶、糊精、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、蔗糖、淀粉、明胶、纤维素材料(诸如烷酸纤维素酯和纤维素烷酯)、低熔点蜡可可脂或粉末、聚合物(诸如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇和聚乙二醇)和其它医药学上可接受的材料。可将医药组合物的组分封装或压片以用于常规投药。

医药学上可接受是指,关于组合物、调配物、稳定性、患者接受度和生物利用度,患者从药理学/毒理学的角度且医药生产药剂师从物理/化学的角度认为可接受的特性和/或物质。

当 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为独立剂型时,应了解,用于 BRS-3 激动剂调配的医药学上可接受的载剂无需与用于 DPP-IV 抑制剂调配的医药学上可接受的载剂相同。

糖衣核具有适当的包衣。为此,可以使用浓糖溶液,其可视情况含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和适当的有机溶剂或溶剂混合物。还可将染料或颜料加到片剂或糖衣丸包衣中以鉴别或表征不同的活性化合物剂量组合。

可口服使用的医药组合物包括由明胶制得的推入配合胶囊,和由明胶和增塑剂(诸如甘油或山梨糖醇)制得的软质密封胶囊。推入配合胶囊可含有活性成分与填充剂(诸如乳糖)、粘合剂(诸如淀粉)和/或润滑剂(诸如滑石或硬脂酸镁)和视情况增溶剂的混合物。就软质胶囊来说,可以将活性化合物溶解或悬浮于适当的液体中,所述液体诸如脂肪油、液体石蜡、液体聚乙二醇、聚氧乙烯(cremophor)、Capmul、中链或长链甘

油单酯、甘油二酯或甘油三酯。还可将增溶剂加到这些调配物中。

此外，可以使用持续释放系统传递 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂。各种持续释放的材料已经确定并且为所属领域技术人员众所周知。尤其优选持续释放的片剂或胶囊。举例来说，可以使用时间延迟的材料，诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。还可通过美国专利第 4,256,108 号、第 4,166,452 号和第 4,265,874 号中所述的技术包覆剂型从而形成用于受控释放的渗透治疗片剂。

特别预期，本发明的组合疗法可单独投与或提供，或可与一种或一种以上其它医药学或生理学上可接受的化合物组合投与或提供。在本发明的一个方面中，其它医药学或生理学上可接受的化合物不为 BRS-3 激动剂且不为 DPP-IV 抑制剂。

在本发明的一个方面中，其它医药学或生理学上可接受的化合物为选自由以下物质组成的群组的医药剂：磺酰脲（例如，格列本脲（glibenclamide）、格列吡嗪（glipizide）、格列齐特（gliclazide）、格列美脲（glimepiride））、美格替耐（meglitinide）（例如，瑞格列奈（repaglinide）、那格列奈（nateglinide））、双胍类（biguanide）（例如，美氟明（metformin））、 α -葡萄糖苷酶抑制剂（例如，阿卡波糖（acarbose）、依帕司他（epalrestat）、米格列醇（miglitol）、伏格列波糖（voglibose））、噻唑烷二酮（例如，罗格列酮（rosiglitazone）、吡格列酮（pioglitazone））、胰岛素类似物（例如，赖脯胰岛素（insulin lispro）、门冬胰岛素（insulin aspart）、甘精胰岛素（insulin glargine））、吡啶甲酸铬/生物素和生物剂（例如，脂联素（adiponectin）或其包含 C 端球状结构域的片段，或脂联素或其所述片段的多聚体，或脂联素受体 AdipoR1 或 AdipoR2 的激动剂，优选其中所述激动剂具口服活性）。在本发明的一个方面中，所述医药剂为美氟明。在本发明的一个方面中，所述医药剂为脂联素受体 AdipoR1 或 AdipoR2 的激动剂，优选其中所述激动剂具口服活性。

在本发明的一个方面中，其它医药学或生理学上可接受的化合物为抗肥胖剂，诸如载脂蛋白-B 分泌/微粒体甘油三酯转移蛋白（apo-B/MTP）抑制剂、MCR-4 激动剂、缩胆囊素-A（CCK-A）激动剂、五羟色胺和去甲肾上腺素再吸收抑制剂（例如，西布曲明（sibutramine））、拟交感神经剂、 β_3 肾上腺素能受体激动剂、多巴胺激动剂（例如，溴隐亭（bromocriptine））、黑素细胞刺激素受体类似物、大麻素 1（cannabinoid 1）受体拮抗剂[例如，SR141716：N-(哌啶-1-基)-5-(4-氯苯基)-1-(2,4-二氯苯基)-4-甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺]、黑素浓集素拮抗剂、瘦素（lepton）（OB 蛋白）、瘦素类似物、瘦素受体激动剂、甘丙肽（galanin）拮抗剂、脂酶抑制剂（诸如四氢利泼斯汀（tetrahydrolipostatin），即奥利司他（Orlistat））、厌食剂（诸如，蛙皮素激动剂）、神经肽-Y 拮抗剂、甲状腺素

拟似剂 (thyromimetic agent)、脱氢表雄酮或其类似物、糖皮质激素受体激动剂或拮抗剂、食欲肽 (orexin) 受体拮抗剂、Urocortin 结合蛋白拮抗剂、胰高血糖素样肽-1 受体激动剂、睫状神经营养因子 (诸如, 购自 Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY 和 Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH 的 AxoKine™)、人类豚鼠相关蛋白 (AGRP)、胃饥饿素 (ghrelin) 受体拮抗剂、组胺 3 受体拮抗剂或反向激动剂、神经调节肽 U (neuromedin U) 受体激动剂、去甲肾上腺素能厌食剂 (例如, 苯丁胺 (phentermine)、马吲哚 (mazindol) 等) 和食欲抑制剂 (例如安非他酮 (bupropion))。在一些实施例中, 抗肥胖剂选自以下物质组成的群组: 奥利司他、西布曲明、溴隐亭、麻黄碱 (ephedrine)、瘦素和伪麻黄碱 (pseudoephedrine)。

在本发明的组合疗法中, 本发明的 BRS-3 激动剂和本发明的 DPP-IV 抑制剂可以同时或以分开的间隔投与。当同时投与时, 可将 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂并入单一医药组合物中; 或并入独立的组合物中, 例如 BRS-3 激动剂在一种组合物中, 而 DPP-IV 在另一种组合物中。这些组合物中的每一种都可与常用赋形剂、稀释剂或载剂一起调配, 并且压制成片剂, 或调配成酞剂或溶液; 和持续释放的剂型等。BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂可经由不同途径投与。举例来说, BRS-3 激动剂可以片剂形式经口投与, 而 DPP-IV 抑制剂可经吸入投与。

当分开投与时, 治疗有效量的本发明的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂可在不同时段投与。一种可在另一种之前投药, 只要两次投药之间的时间在治疗有效的时间间隔内即可。治疗有效的时间间隔为从将 (a) BRS-3 激动剂或 (b) DPP-IV 抑制剂投与哺乳动物时开始且以 (a) 和 (b) 的组合的治疗有益作用完成时终止的时间段。

一方面, 本发明提供一种医药组合物, 其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂, 或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。

一方面, 本发明提供一种医药组合物, 其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂, 或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型, 其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量。在某些实施例中, 所述血糖含量为高血糖含量。

一方面, 本发明提供一种医药组合物, 其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂, 或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型,

其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量，且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于降低个体体内血糖含量无效。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

一方面，本发明提供一种医药组合物，其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量，且其中所述作用为协同作用。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

一方面，本发明涉及一种医药组合物，其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量，其中所述作用为协同作用，并且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于降低个体体内血糖含量无效。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

一方面，本发明涉及一种医药组合物，其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量，其中由所述量的 BRS-3 激动剂与所述量的 DPP-IV 抑制剂的组合提供的作用大于由单独所述量的 BRS-3 激动剂提供的作用和由单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

一方面，本发明提供一种医药组合物，其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量。

一方面，本发明提供一种医药组合物，其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的

量，且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

一方面，本发明提供一种医药组合物，其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量，且其中所述作用为协同作用。

一方面，本发明涉及一种医药组合物，其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量，其中所述作用为协同作用，且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

一方面，本发明涉及一种医药组合物，其包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂的组合以及至少一种医药学上可接受的载剂，或基本上由所述组合与至少一种医药学上可接受的载剂组成。本发明还涉及所述医药组合物的剂型，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂为足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量，其中由所述量的 BRS-3 激动剂与所述量的 DPP-IV 抑制剂的组合提供的作用大于由单独所述量的 BRS-3 激动剂提供的作用和由单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用。

适用于本发明中的医药组合物包括含有达成预定目的的量的活性成分的组合物。在一些实施例中，应将本发明的医药组合物理解为可用于治疗或预防糖尿病和其相关病况。糖尿病和其相关病况根据本发明所述。在一些实施例中，应将本发明的医药组合物理解为可用于治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况。可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况根据本发明所述。

在本发明组合疗法的某些实施例中，本发明的 BRS-3 激动剂的量和本发明的 DPP-IV 抑制剂的量是以产生降低个体体内血糖含量的协同作用的量提供。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。所属领域技术人员尤其根据本文所提供的具体实施方式将能够确定提供降低个体体内血糖含量的协同作用的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的量。在本发明组合疗法的一个实施例中，根据本发明的 BRS-3 激动剂的量和根据本发明的 DPP-IV 抑制剂的量是以产生降低个体体内血糖含量的协同作用的量提供，其中单独所

述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于降低个体体内血糖含量无效。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。所属领域技术人员尤其根据本文所提供的具体实施方式将能够确定提供降低个体体内血糖含量的协同作用的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的量，其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于降低个体体内血糖含量无效。

在本发明组合疗法的某些实施例中，本发明的 BRS-3 激动剂的量和本发明的 DPP-IV 抑制剂的量是以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用的量提供。所属领域技术人员尤其根据本文所提供的具体实施方式将能够确定提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的量。在本发明组合疗法的一个实施例中，根据本发明的 BRS-3 激动剂的量和根据本发明的 DPP-IV 抑制剂的量是以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用的量提供，其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。所属领域技术人员尤其根据本文所提供的具体实施方式将能够确定提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的量，其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

从动物研究（包括但不限于，使用小鼠、大鼠、兔、猪和非人类灵长类动物进行的研究）获得的数据可用于调配用于人类的各种剂量。一般来说，所属领域技术人员应了解怎样由动物模型系统中获得的活体内数据外推到另一模型，诸如人类。在一些情况中，这些外推可仅基于动物模型与另一动物模型（诸如人类）的体重比较；在其它情况中，这些外推并非简单地基于体重，而是并入多种因素考虑。代表性因素包括患者的类型、年龄、体重、性别、饮食和医药病况、疾病的严重程度、投药途径、所使用的特定化合物的药理学考虑（诸如活性、功效、药物动力学和毒理学概况）、是否利用药物传递系统、进行治疗或预防的病状为急性或慢性或除本发明的化合物和作为药物组合的部分的化合物外是否投与其它活性化合物。有关用本发明的化合物和/或组合物治疗的疾病病况的剂量方案是根据上文所述的多种因素进行选择。因此，所使用的实际剂量方案可变化较大且由此可能偏离优选剂量方案，同时所属领域技术人员将认识到，可对这些典型范围外的剂量和剂量方案进行测试并且可在适当时将其用于本发明的方法中。

示范性和优选的动物模型系统为以小鼠进行的口服葡萄糖耐受性试验（oGTT）（参看实例 1）。在这一模型中，出于说明而非限制的目的，治疗上无效的单独 BRS-3 激动剂或单独 DPP-IV 抑制剂的量为产生小于或等于约 30%、小于约 25%、小于约 20%、小于约 15%、小于约 10%或小于约 5%，更优选小于约 25%、小于约 20%、小于约 15%、

小于约 10%或小于约 5%的血糖漂移 (glycemic excursion) 的曲线下面积 (AUC) 抑制的单独 BRS-3 激动剂或单独 DPP-IV 抑制剂的量。在这一模型中, 出于说明而非限制的目的, 治疗上无效的单独 BRS-3 激动剂或单独 DPP-IV 抑制剂的量为产生约 0-30%、约 0-25%、约 0-20%、约 0-15%、约 0-10%或约 0-5%, 更优选约 0-25%、约 0-20%、约 0-15%、约 0-10%或约 0-5%的血糖漂移的曲线下面积 (AUC) 抑制的单独 BRS-3 激动剂或单独 DPP-IV 抑制剂的量。在这一模型中, 出于说明而非限制的目的, 本发明的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合的治疗有效量为产生大于约 30%、大于约 35%、大于约 40%、大于约 45%、大于约 50%、大于约 55%、大于约 60%、大于约 65%、大于约 70%、大于约 75%、大于约 80%、大于约 85%、大于约 90%或大于约 95%, 更优选大于约 35%、大于约 40%、大于约 45%、大于约 50%、大于约 55%、大于约 60%、大于约 65%、大于约 70%或大于约 75%、大于约 80%、大于约 85%、大于约 90%或大于约 95%的血糖漂移的曲线下面积 (AUC) 抑制的所述组合的量。

可以对剂量和间隔加以调整以便根据本发明提供降低个体体内血糖含量的协同作用, 或根据本发明提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用。在某些实施例中, 所述血糖含量为高血糖含量。应了解, 本发明的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的确切剂量将视 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂组合、其效力、投药模式、患者的年龄和体重以及待治疗的病况的严重程度而变化。确切调配物、投药途径和剂量可以由个别医师依据患者的病况进行选择。出于说明而非限制的目的, 根据本发明提供降低个体体内血糖含量的协同作用或根据本发明提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用的 BRS-3 激动剂或 DPP-IV 抑制剂的量小于约每公斤体重 0.001 mg、小于约每公斤体重 0.005 mg、小于约每公斤体重 0.01 mg、小于约每公斤体重 0.05 mg、小于约每公斤体重 0.1 mg、小于约每公斤体重 0.5 mg、小于约每公斤体重 1 mg、小于约每公斤体重 5 mg、小于约每公斤体重 10 mg、小于约每公斤体重 50 mg 或小于约每公斤体重 100 mg。在某些实施例中, 所述血糖含量为高血糖含量。在一些实施例中, 根据本发明提供降低个体体内血糖含量的协同作用或根据本发明提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用的 BRS-3 激动剂或 DPP-IV 抑制剂的量小于约每公斤体重 0.001-100 mg、小于约每公斤体重 0.001-50 mg、小于约每公斤体重 0.001-10 mg、小于约每公斤体重 0.001-5 mg、小于约每公斤体重 0.001-1 mg、小于约每公斤体重 0.001 to 0.5 mg、小于约每公斤体重 0.001-0.1 mg、小于约每公斤体重 0.001-0.05 mg、小于约每公斤体重 0.001-0.01 mg 或小于约每公斤体重 0.001-0.005 mg。在某些实施例中, 所述血糖含量为高血糖含量。在一些实施例中, 根据本发明提供降低个体体内血糖含量的协同作用或根据本发明提供增加个体体内

血液 GLP-1 含量的协同作用的 BRS-3 激动剂或 DPP-IV 抑制剂的量为约每公斤体重 0.001-100 mg、约每公斤体重 0.001-50 mg、约每公斤体重 0.001-10 mg、约每公斤体重 0.001-5 mg、约每公斤体重 0.001-1 mg、约每公斤体重 0.001-0.5 mg、约每公斤体重 0.001-0.1 mg、约每公斤体重 0.001-0.05 mg、约每公斤体重 0.001-0.01 mg 或约每公斤体重 0.001-0.005 mg。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

其它示范性且优选的动物模型系统为在葡萄糖激发小鼠后血液 GLP-1 含量增加（参看实例 15）。

可独立地对剂量和间隔加以调整以提供本发明 BRS-3 激动剂和本发明 DPP-IV 抑制剂的血浆含量，所述含量能够根据本发明提供降低个体体内血糖含量的协同作用或根据本发明提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。还可以使用所选择的 BRS-3 激动剂浓度范围值或所选择的 DPP-IV 抑制剂浓度范围值确定给药间隔，从而根据本发明提供降低个体体内血糖含量的协同作用，或根据本发明提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。应使用将血浆含量分别保持在所选 BRS-3 激动剂浓度和 DPP-IV 抑制剂浓度范围内历时所述时间的 10-90%，优选介于所述时间的 30-99%之间且最优选介于所述时间的 50-90%之间的方案投与 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂。在局部投药或选择性吸收的情况下，根据本发明提供降低个体体内血糖含量的协同作用或根据本发明提供增加个体体内血液 GLP-1 含量的协同作用的 BRS-3 激动剂浓度范围或 DPP-IV 抑制剂浓度范围可能与血浆浓度无关。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

当然，所投与的组合物的量将视所治疗的个体、个体体重、病痛的严重程度、投药方式和处方医师的判断而定。

因此，一方面，本发明提供一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生降低个体体内血糖含量的作用量的量投与。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量投与，且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于降低个体体内血糖含量无效。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量投与，且其中所述作用为协同作用。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量投与，其中所述作用为协同作用，并且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于降低个体体内血糖含量无效。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防糖尿病或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生降低个体体内血糖含量的作用的量投与，其中由所述量的 BRS-3 激动剂与所述量的 DPP-IV 抑制剂的组合提供的作用大于由单独所述量的 BRS-3 激动剂提供的作用和由单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用。在某些实施例中，所述血糖含量为高血糖含量。

本发明的组合疗法可用于治疗或预防哺乳动物（包括且最优选人类）的糖尿病或其相关病况。在一些实施例中，糖尿病为 1 型糖尿病。在一些优选实施例中，糖尿病为 2 型糖尿病。与糖尿病相关的病况包括（但不限于）高血糖、葡萄糖耐受性异常、胰岛素

抵抗、胰腺 β 细胞功能不全、肠内分泌细胞功能不全、糖尿、代谢性酸中毒、白内障、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性冠状动脉疾病、糖尿病性脑血管病、糖尿病性外周血管疾病、代谢综合症、高脂血症、动脉粥样硬化、中风、高血压和肥胖症。应了解，与糖尿病相关的病况可独立地或以任何组合包括在实施例 1 中。

因此，一方面，本发明提供一种减轻体重的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。

一方面，本发明涉及一种减轻体重的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与。

一方面，本发明涉及一种减轻体重的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

一方面，本发明涉及一种减轻体重的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，且其中所述作用为协同作用。

一方面，本发明涉及一种减轻体重的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，其中所述作用为协同作用，并且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

一方面，本发明涉及一种减轻体重的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，其中由所述量的 BRS-3 激动剂与所述量的 DPP-IV 抑制剂的组合提供的作用大于由单独所述量的 BRS-3 激动剂提供的作用和由单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用。

因此，一方面，本发明提供一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，且其中所述作用为协同作用。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定

量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中,本发明提供所述方法,其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与,其中所述作用为协同作用,并且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

一方面,本发明涉及一种治疗或预防肥胖症或其相关病况的方法,其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物,所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中,本发明提供所述方法,其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与,其中由所述量的 BRS-3 激动剂与所述量的 DPP-IV 抑制剂的组合提供的作用大于由单独所述量的 BRS-3 激动剂提供的作用和由单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用。

本发明的组合疗法可用于治疗或预防哺乳动物(包括且最优选人类)的肥胖症或其相关病况。与肥胖症相关的病况包括(但不限于)高血压、充血性心肌病、静脉曲张、肺栓塞、冠心病、中风、原发性颅内高压、感觉异常性股痛、呼吸困难、阻塞性睡眠呼吸暂停、低通气综合症、皮克威克综合症、哮喘、不能运动、退行性关节炎、下背痛、萎缩纹或“妊娠纹”、下肢静脉淤滞、淋巴水肿、蜂窝织炎、擦烂、疔、黑棘皮病、皮赘、胃食管返流病症、非酒精性脂肪肝/脂肪肝、胆结石、疝气、结肠癌、压力性尿失禁、肥胖相关性肾病、乳癌和子宫癌、抑郁和低自尊、生活质量不良、代谢综合症、2 型糖尿病、血脂异常、女性高雄激素血症、多囊卵巢综合症、痛经、不育症、妊娠并发症和男性性腺功能减退症。在某些实施例中,与肥胖症相关的病况选自由以下病况组成的群组:高血压、充血性心肌病、冠心病、中风、血脂异常、代谢综合症和 2 型糖尿病。应了解,与肥胖症相关的病况可独立地或以任何组合包括在实施例中。

因此,一方面,本发明提供一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法,其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物,所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。

一方面,本发明涉及一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法,其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物,所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中,本发明提供所述方法,其中

BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，且其中所述作用为协同作用。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，其中所述作用为协同作用，并且其中单独所述量的 BRS-3 激动剂和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂在治疗上对于增加个体体内血液 GLP-1 含量无效。

一方面，本发明涉及一种治疗或预防可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的组合物，所述组合物包含一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂或基本上由一定量本发明的 BRS-3 激动剂和一定量本发明的 DPP-IV 抑制剂组成。在相关方面中，本发明提供所述方法，其中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂是以足以产生增加个体体内血液 GLP-1 含量的作用的量投与，其中由所述量的 BRS-3 激动剂与所述量的 DPP-IV 抑制剂的组合提供的作用大于由单独所述量的 BRS-3 激动剂提供的作用和由单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所提供的作用。

本发明的组合疗法可用于治疗或预防哺乳动物（包括且最优选人类）的可通过增加

血液 GLP-1 含量改善的病况。可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况包括（但不限于）糖尿病、与糖尿病相关的病况、心肌梗塞、学习障碍、记忆障碍和神经退化性病症，其中与糖尿病相关的病况包括（但不限于）高血糖、葡萄糖耐受性异常、胰岛素抵抗、胰腺 β 细胞功能不全、肠内分泌细胞功能不全、糖尿、代谢性酸中毒、白内障、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性冠状动脉疾病、糖尿病性脑血管病、糖尿病性外周血管疾病、代谢综合症、高脂血症、动脉粥样硬化、中风、高血压和肥胖症，其中神经退化性病症包括（但不限于）由严重癫痫发作引起的兴奋毒性脑损伤、阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病、朊病毒相关疾病、运动神经元病、创伤性脑损伤、脊髓损伤和周围神经病。在一些实施例中，糖尿病为 1 型糖尿病。在一些优选实施例中，糖尿病为 2 型糖尿病。应了解，可通过增加血液 GLP-1 含量改善的病况可独立地或以任何组合包括在实施例中。

无需进一步详细说明，认为所属领域技术人员能够使用前述说明在最大程度上实践本发明。前述具体实施方式仅出于清晰理解的目的提供并且不应将其理解为对本发明的不合需要的限制，因为在本发明的范畴内进行的修改可为所属领域技术人员显而易见。

涉及本发明的标的物且所属领域技术人员众所周知的重组 DNA 技术可见于例如 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001) Cold Spring Harbor Laboratory 中，所述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中。

在本说明书全文中引用多项公开案、专利和专利申请案。本申请案中所参考的这些公开案、专利和专利申请案的公开内容都是以全文引用的方式并入本专利中。申请者在本文中对公开案、专利或专利申请案的引用并非表示申请者承认将所述公开案、专利或专利申请案的作为背景技术。

实例

无需进一步详细说明，认为所属领域技术人员能够使用前述说明在最大程度上实践本发明。以下详述的实例将仅出于例示说明的目的加以解释并非以任何方式限制前述揭示内容。所属领域技术人员将能够迅速地认识到所述程序的适当变更。

实例 1

内源性人 BRS-3 的全长克隆

编码内源性人 BRS-3 的多肽是使用 BRS-3 特异性引物

5'-ACAGAATTCAGAAGAAATGGCTCAAAGGCA -3' (SEQ ID NO:3; 具有 EcoRI 位点的有义链，以 ATG 作为起始密码子) 和

5'-CATGGATCCTTGAAAAGCTAGAATCTGTCC-3' (SEQ ID NO:4; 具有 BamHI 位

点的反义链，以 CTA 作为反义链的终止密码子）

和人子宫 cDNA(Clontech)作为模板通过 RT-PCR 进行克隆。使用 TaqPlus Precision™ DNA 聚合酶 (Stratagene) 通过以下循环进行扩增，其中步骤 2 到步骤 4 重复 25 次：

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

将具有预计尺寸的 1.23 Kb PCR 片段分离，用 EcoRI 和 BamHI 进行消化并且将其克隆到 pCMV 表达载体中，且使用 T7 DNA 测序酶试剂盒 (Amersham) 进行测序。有关核酸序列参看 SEQ ID NO:1 且有关所推断的氨基酸序列参看 SEQ ID NO:2。

实例 2

受体表达

尽管多种细胞可用于所属领域中供 G 蛋白偶合受体的表达，但最优选利用哺乳动物细胞或黑素细胞。以下为例示说明；相信所属领域技术人员能够确定优先有利于所属领域技术人员的技术。例如参看下文涉及黑素细胞的实例 6。

a. 瞬时转染

第一天，每 10 cm 培养盘涂布 6×10^6 个 293 细胞。第二天时，制备两个反应管（每一管遵循的比例是对于每一培养板来说）：管 A 是通过在 0.5 ml 无血清 DMEM (Gibco BRL) 中混合 4 μ g DNA（例如，pCMV 载体；具有受体 cDNA 的 pCMV 载体等）来制备；管 B 是通过在 0.5 ml 无血清 DMEM 中混合 24 μ l Lipofectamine (Gibco BRL) 来制备。随后通过倒转（数次）使管 A 和 B 混合，随后在室温下培育 30-45 分钟。所述混合物被称为“转染混合物”。用 PBS 将所涂布的 293 细胞洗涤一次，随后加入 5 ml 无血清 DMEM。将 1 ml 转染混合物加到细胞中，随后在 37℃/5% CO₂ 下培育 4 小时。通过抽吸去除转染混合物，随后加入 10 ml DMEM/10%胎牛血清。在 37℃/5% CO₂ 下培育细胞。培育 48 小时后，采集细胞并将其用于分析。

b. 稳定细胞系

将约 12×10^6 个 293 细胞涂布于 15 cm 的组织培养板上。使其在含有 10%胎牛血清和 1%丙酮酸钠、L-谷氨酰胺和抗生素的 DME 高糖培养基中生长。涂布 293 细胞后 24 小时（或到约 80%长满），使用 12 μ g DNA（例如，具有受体 cDNA 的 pCMV 载体）转染所述细胞。将 12 μ g DNA 与 60 μ l Lipofectamine 以及 2 ml 无血清 DME 高糖培养基组合。从培养板中抽吸出培养基并且用无血清培养基洗涤细胞一次。将 DNA、Lipofectamine 和培养基的混合物连同 10 ml 无血清培养基一起加到培养板中。在 37℃下培育 4 到 5 小时后，将培养基抽吸出并且加入 25 ml 含血清培养基。转染后 24 小时，再次将培养基抽吸出并且加入具有血清的新鲜培养基。转染后 48 小时，将培养基抽吸出并且加入含有

最终浓度为遗传霉素 (geneticin) (G418 药物) 的含血清培养基。将约 12×10^6 个 293 细胞涂布于 15 cm 的组织培养板上。使其在含有 10% 胎牛血清和 1% 丙酮酸钠、L-谷氨酰胺和抗生素的 DME 高糖培养基中生长。涂布 293 细胞后 24 小时 (或到约 80% 长满), 使用 12 μg DNA (例如, 具有受体 cDNA 的 pCMV 载体) 转染所述细胞。将 12 μg DNA 与 60 μl Lipofectamine 以及 2 ml 无血清 DME 高糖培养基组合。从培养板中抽吸出培养基并且用无血清培养基洗涤细胞一次。将 DNA、Lipofectamine 和培养基的混合物连同 10 ml 无血清培养基一起加到培养板中。在 37°C 下培育 4 到 5 小时后, 将培养基抽吸出并且加入 25 ml 含血清培养基。转染后 24 小时, 再次将培养基抽吸出并且加入具有血清的新鲜培养基。转染后 48 小时, 将培养基抽吸出并且加入含有最终浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的遗传霉素 (G418 药物) 的含血清培养基。经转染细胞现将经历关于含 G418 抗性基因的阳性转染细胞的选择。当出现选择时, 每四天到五天更换培养基。选择期间, 使细胞生长以产生稳定池或分裂以用于稳定克隆的选择。

实例 3

筛选作为 BRS-3 激动剂的候选化合物的分析

多种方法可用于筛选作为 BRS-3 激动剂的候选化合物。以下为例示说明; 相信所属领域技术人员能够确定优先有利于所属领域技术人员的需要的技术。用于筛选作为 G 蛋白偶合受体激动剂的化合物的分析已为所属领域技术人员众所周知 (例如参看国际专利申请案 WO 02/42461)。

1. 膜结合分析: [^{35}S]GTP γ S 分析

当 G 蛋白偶合受体处于其活性状态时, 由于配体结合或组成性活化, 受体与 G 蛋白偶合并刺激 GDP 释放和随后 GTP 与 G 蛋白的结合。G 蛋白-受体复合体中的 α 亚单元充当 GTP 酶, 并且缓慢地将 GTP 水解成 GDP, 此时受体通常失活。活化受体持续将 GTP 换成 GDP。可利用不可水解的 GTP 类似物 [^{35}S]GTP γ S 证实 [^{35}S]GTP γ S 与表达活化受体的膜的结合的增强。使用 [^{35}S]GTP γ S 结合测量活化的优势在于: (a) 其一般适用于所有 G 蛋白偶合受体; (b) 其接近膜表面从而使其不太可能获得影响胞内级联的分子。

所述分析利用 G 蛋白偶合受体刺激 [^{35}S]GTP γ S 与表达相关受体的膜结合的能力。因此, 所述分析为通用分析并且适用于有关所有 G 蛋白偶合受体的药物发现。

膜制备

在一些实施例中, 如下优选制备包含本发明的 G 蛋白偶合受体并且用于鉴别作为例如所述受体的激动剂的候选化合物的膜:

a. 材料

“膜刮擦缓冲液 (Membrane Scrape Buffer)”包含 20 mM HEPES 和 10 mM EDTA (pH 7.4); “膜洗涤缓冲液 (Membrane Wash Buffer)”包含 20 mM HEPES 和 0.1 mM EDTA (pH 7.4); “结合缓冲液”包含 20 mM HEPES、100 mM NaCl 和 10 mM MgCl₂ (pH 7.4)。

b. 程序

在整个程序中始终将所有材料保持于冰上。首先, 从长满的单层细胞中抽吸培养基, 随后用 10 ml 冷 PBS 冲洗, 接着进行抽吸。此后, 加入 5 ml 膜刮擦缓冲液以刮擦细胞; 随后将细胞提取物转移到 50 ml 离心管中 (4℃下以 20,000 rpm 离心 17 分钟)。此后, 抽吸出上清液, 并将离心块再悬浮于 30 ml 膜洗涤缓冲液中, 随后在 4℃下以 20,000 rpm 离心 17 分钟。接着抽吸出上清液, 并将离心块再悬浮于结合缓冲液中。随后使用 Brinkman Polytron™匀浆器进行均质化 (15-20 秒冲撞, 直到所有材料都呈悬浮液形式)。其在本文中被称为“膜蛋白”。

Bradford 蛋白分析

均质化后, 使用 Bradford 蛋白分析测定膜蛋白浓度 (可将蛋白稀释到约 1.5 mg/ml, 等分并冷冻 (-80℃) 以供以后使用; 当冷冻时, 所使用的方案如下: 分析当天, 在室温下解冻已冷冻的膜蛋白, 随后涡旋, 且然后用 Polytron 以 12 × 1,000 rpm 均质化约 5-10 秒; 应注意, 为进行多次制备, 应在不同制剂的均质化之间彻底清洁匀浆器)。

a. 材料

遵循制造商的说明书 (Biorad, 目录号 500-0006), 利用结合缓冲液 (根据上文)、Bradford 染料试剂、Bradford 蛋白标准品。

b. 程序

制备双重复管, 一只管包括膜且另一只作为对照“空白”。每一管都含有 800 μl 结合缓冲液。此后, 将 10 μl Bradford 蛋白标准品 (1 mg/ml) 加到每一管中, 且随后将 10 μl 膜蛋白仅加到一个管中 (非空白管)。此后, 将 200 μl Bradford 染料试剂加到每一管中, 随后各自涡旋。五分钟后, 将管再涡旋, 且将其中的物质转移到比色皿中。随后使用 CECIL 3041 分光光度计在 595 波长下读取比色皿。

鉴别分析

a. 材料

GDP 缓冲液是由 37.5 ml 结合缓冲液和 2 mg GDP (Sigma, 目录号 G-7127) 组成, 随后在结合缓冲液中进行一系列稀释以获得 0.2 μM GDP (每一孔中 GDP 的最终浓度都为 0.1 μM GDP); 包含候选化合物的每一孔中具有 200 μl 最终体积, 其是由 100 μl GDP 缓冲液 (最终浓度: 0.1 μM GDP)、50 μl 结合缓冲液中的膜蛋白和 50 μl 结合缓冲液中

的 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (0.6 nM) (每 10 ml 结合缓冲液 2.5 μl $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$) 组成。

b. 程序

优选使用 96 孔培养板格式筛选候选化合物 (其可在 -80°C 下冷冻)。短暂地使膜蛋白 (或具有排除目标 GPCR 的表达载体的膜, 其作为对照物) 均质化直到呈悬浮液形式。使用上文所述的 Bradford 蛋白分析测定蛋白浓度。在结合缓冲液中将膜蛋白 (和对照物) 稀释到 0.25 mg/ml (最终分析浓度为每孔 12.5 μg)。此后, 将 100 μl GDP 缓冲液加到 Wallac Scintistrip™ (Wallac) 的每一孔中。随后使用 5 μl 针具 (pin-tool) 将 5 μl 候选化合物转移到所述孔中 (即, 200 μl 总分析体积中的 5 μl 为 1:40 的比率, 使得候选化合物的最终筛选浓度为 10 μM)。同样, 为避免污染, 在每次转移步骤后, 应在包含水 (1 $\times$)、乙醇 (1 $\times$) 和水 (2 $\times$) 的三个贮液器中冲洗针具, 每次冲洗后都应将过量的液体从针具中摇出, 并用纸和无尘纸 (kimwipe) 干燥。此后, 将 50 μl 膜蛋白加到每一孔中 (也利用包含膜但无目标 GPCR 的对照孔), 并在室温下预培育 5-10 分钟。此后, 将 50 μl 结合缓冲液中的 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (0.6 nM) 加到每一孔中, 随后在室温下于振荡器上培育 60 分钟 (同样, 在本实例中, 培养板覆盖有箔)。随后, 通过在 22°C 下以 4000 RPM 旋转培养板 15 分钟来终止分析。然后, 用 8 通道歧管抽吸培养板, 并用培养板盖密封。随后, 于 Wallac 1450 上使用设置 “Prot. #37” 对培养板进行读数 (根据制造商的说明书)。

2. 腺苷酰基环化酶分析

可改变设计用于基于细胞的分析的 Flash Plate™腺苷酰基环化酶试剂盒 (New England Nuclear; 目录号 SMP004A) 以与粗原生质膜一起使用。Flash Plate 的孔中可含有闪烁体涂层, 所述涂层还含有识别 cAMP 的特异性抗体。可通过对放射性 cAMP 示踪剂与 cAMP 抗体的结合的直接竞争来量化所述孔中所产生的 cAMP。下文是用于有关测量表达受体的全细胞中 cAMP 含量改变的简要方案。

在某些实施例中, 利用改变的 Flash Plate™腺苷酰基环化酶试剂盒 (New England Nuclear; 目录号 SMP004A) 用于根据以下方案对作为例如 BRS-3 激动剂的候选化合物进行鉴别。

转染后约 3 天, 采集经过本发明的 G 蛋白偶合受体转染的细胞。通过使含有 20 mM HEPES (pH 7.4) 和 10 mM MgCl_2 的缓冲液中悬浮细胞的均质化来制备膜。均质化是使用 Brinkman Polytron™在冰上进行历时约 10 秒。在 4°C 下以 $49,000 \times g$ 离心所得匀浆 15 分钟。随后将所得离心块再悬浮于含有 20 mM HEPES (pH 7.4) 和 0.1 mM EDTA 的缓冲液中, 使其均质化 10 秒, 随后在 4°C 下以 $49,000 \times g$ 离心 15 分钟。然后, 将所得离心块储存于 -80°C 下待用。直接鉴别筛选当天, 在室温下将膜小球缓慢解冻, 将其再悬浮于

含有 20 mM HEPES (pH 7.4) 和 10 mM MgCl_2 的缓冲液中以得到 0.60 mg/ml 的最终蛋白浓度 (将再悬浮的膜放于冰上待用)。

根据制造商的说明书, 制备 cAMP 标准品和检测缓冲液 (包含 2 μCi 示踪剂 [^{125}I] cAMP (100 μl) 到 11 ml 检测缓冲液) 并加以保存。新鲜制备分析缓冲液以供筛选, 且其含有 20 mM HEPES (pH 7.4)、10 mM MgCl_2 、20 mM 磷酸肌酸 (phosphocreatine) (Sigma)、0.1 单位/毫升肌酸磷酸激酶 (Sigma)、50 μM GTP (Sigma) 和 0.2 mM ATP (Sigma); 随后将分析缓冲液储存于冰上待用。

优选将候选化合物连同 40 μl 膜蛋白 (每孔 30 μg) 和 50 μl 分析缓冲液加到 (例如) 96 孔培养板的孔中 (每孔 3 μl ; 12 μM 的最终分析浓度)。随后, 在轻柔振荡的情况下, 在室温下将所述混合物培育 30 分钟。

培育后, 将 100 μl 检测缓冲液加到每一孔中, 随后培育 2-24 小时。在 Wallac MicroBeta™ 平板读取器中使用 “Prot. #31” 对培养板进行计数 (根据制造商的说明书)。

3. 基于报告基因的分析

a. CRE-LUC 报告基因分析

以每孔 2×10^4 个细胞的密度将 293 和 293T 细胞涂布于 96 孔培养板上, 并且根据制造商的说明书于次日使用 Lipofectamine 试剂 (BRL) 进行转染。如下制备用于每六孔转染的 DNA/脂质混合物: 小心地使 100 μl DMEM 中的 260 ng 质粒 DNA 与 100 μl DMEM 中的 2 μl 脂质混合 (260 ng 质粒 DNA 是由 200 ng 8×CRE-Luc 报告基因质粒、50 ng 包含本发明的 G 蛋白偶合受体的 pCMV 或单独 pCMV 和 10 ng GPRS 表达质粒 (pcDNA3 中的 GPRS (Invitrogen)) 组成)。如下制备 8×CRE-Luc 报告基因质粒: 通过在 p βgal -Basic 载体 (Clontech) 中的 BglV-HindIII 位点处克隆大鼠生长激素抑制素启动子 (-71/+51) 来获得载体 SRIF- $\beta\text{-gal}$ 。通过 PCR 由腺病毒模板 AdpCF126CCRE8 获得八个 cAMP 反应元件的拷贝 (参看 Suzuki 等人, Hum Gene Ther (1996) 7:1883-189, 其公开内容是以全文引用的方式并入本文中), 并且将其克隆到 SRIF- $\beta\text{-gal}$ 载体的 Kpn-BglV 位点处, 从而产生 8×CRE- $\beta\text{-gal}$ 报告基因载体。通过用从 pGL3-basic 载体 (Promega) 获得的荧光素酶基因在 HindIII-BamHI 位点处置换 8×CRE- $\beta\text{-gal}$ 报告基因载体中的 β -半乳糖苷酶基因来产生 8×CRE-Luc 报告基因质粒。室温下培育 30 分钟后, 用 400 μl DMEM 稀释 DNA/脂质混合物, 并且将 100 μl 经稀释的混合物加到每一孔中。在细胞培养恒温箱中培育 4 小时后, 将 100 μl 具有 10% FCS 的 DMEM 加到每一孔中。次日, 用每孔 200 μl 具有 10% FCS 的 DMEM 交换经转染细胞。八小时后, 用 PBS 洗涤一次, 随后将孔换成每孔 100 μl 无酚红的 DMEM。次日, 遵循制造商的说明书, 使用 LucLite™ 报告基因分析试剂盒

(Packard) 测量荧光素酶活性, 并且在 1450 MicroBeta™ 闪烁和发光计数器 (Wallac) 上读取。

b. AP1 报告基因分析 (Gq 相关受体)

检测 Gq 刺激的方法取决于 Gq 依赖性磷脂酶 C 使在启动子中含有 AP1 元件的基因活化的已知特性。遵循上文有关 CREB 报告基因分析所述的方案, 可利用 Pathdetect™ AP-1 顺式报告系统 (Stratagene, 目录号 219073), 但是磷酸钙沉淀物的组分为 410 ng pAP1-Luc、80 ng pCMV 受体表达质粒和 20 ng CMV-SEAP。

c. SRF-LUC 报告基因分析 (Gq 相关受体)

一种检测 Gq 刺激的方法取决于 Gq 依赖性磷脂酶 C 使在启动子中含有血清反应因子的基因活化的已知特性。可利用 Pathdetect™ SRF-Luc-报告系统 (Stratagene) 分析例如 COS7 细胞中的 Gq 偶合活性。根据制造商的说明书, 使用 Mammalian Transfection™ 试剂盒 (Stratagene, 目录号 200285) 以系统的质粒组分和编码内源或非内源性 GPCR 的指定表达质粒转染细胞。简言之, 根据制造商的说明书, 将 410 ng SRF-Luc、80 ng pCMV 受体表达质粒和 20 ng CMV-SEAP (经分泌的碱性磷酸酶表达质粒; 测量经转染细胞的培养基中的碱性磷酸酶活性以控制样本之间的转染效率变化) 组合于磷酸钙沉淀物中。将一半沉淀物均等地分布于 96 孔培养板中的 3 个孔上, 在无血清培养基中的细胞上保持 24 小时。在最后 5 小时将细胞与例如 1 μM 测试化合物一起培育。随后溶解细胞, 并根据制造商的说明书使用 Lucite™ 试剂盒 (Packard, 目录号 6016911) 和 “Trilux 1450 Microbeta” 液体闪烁和发光计数器 (Wallac) 分析荧光素酶活性。可使用 GraphPad Prism™ 2.0a (GraphPad Software Inc.) 分析数据。

4. 胞内 IP3 积累分析 (Gq 相关受体)

第 1 天时, 可将待由本发明的 G 蛋白偶合受体转染的细胞涂于 24 孔培养板上, 通常为每孔 1×10^5 个细胞 (但可以使这一数量优化)。第 2 天时, 通过首先使每孔 50 μl 无血清 DMEM 中的 0.25 μg DNA (例如, pCMV 载体、具有受体 cDNA 的 pCMV 载体等) 与每孔 50 μl 无血清 DMEM 中的 2 μl Lipofectamine 混合来转染细胞。小心地混合溶液, 且在室温下培育 15-30 分钟。用 0.5 ml PBS 洗涤细胞, 并使 400 μl 无血清培养基与转染培养基混合, 且将其加到细胞中。随后在 37°C/5%CO₂ 下培育细胞 3-4 小时, 且然后去除转染培养基并以每孔 1 ml 常规生长培养基替换。第 3 天时, 以 ³H-肌醇标记细胞。简言之, 去除培养基, 并用 0.5 ml PBS 洗涤细胞。随后, 每孔加入 0.5 ml 无肌醇/无血清培养基 (GIBCO BRL) 和每孔 0.25 μCi ³H-肌醇, 并且在 37°C/5% CO₂ 下培育细胞 16-18 小时整夜。第 4 天时, 用 0.5 ml PBS 洗涤细胞, 并加入 0.45 ml 含无肌醇/无血清培养

基、10 μM 帕吉林 (pargyline)、10 mM 氯化锂的分析培养基, 或 0.4 ml 分析培养基和 50 μl 10 $\times$ 测试化合物 (最终浓度为 10 μM)。随后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育细胞 30 分钟。然后用 0.5 ml PBS 洗涤细胞, 并且每孔加入 200 μl 新制/冰冷的终止溶液 (1 M KOH; 18 mM 硼酸钠; 3.8 mM EDTA)。在冰上保持溶液 5-10 分钟或直到细胞溶解, 且接着以 200 μl 新制/冰冷的中和溶液 (7.5% HCl) 中和。随后将溶解产物转移到 1.5 ml eppendorf 管中, 并且每管加入 1 ml 氯仿/甲醇 (1:2)。涡旋溶液 15 秒, 并将上层相施加到 Biorad AG1-X8TM 阴离子交换树脂 (100-200 目) 中。首先, 用水以 1:1.25 W/V 洗涤树脂, 并将 0.9 ml 上层相装载于柱上。用 10 ml 5 mM 肌醇和 10 ml 5 mM 硼酸钠/60 mM 甲酸钠洗涤柱。将三磷酸肌醇洗提到含有 10 ml 闪烁混合液 (scintillation cocktail) 的闪烁瓶中, 所述闪烁混合液含有 2 ml 0.1 M 甲酸/1 M 甲酸铵。通过用 10 ml 0.1 M 甲酸/3 M 甲酸铵洗涤使柱再生, 并用去离子水冲洗两次, 并且在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存于水中。

实例 4

测量胞内钙浓度的荧光成像平板读取器 (FLIPR) 分析 (例如, Gq 相关受体)

将来自各别克隆系的经目标受体 (实验性) 和 pCMV (阴性对照) 稳定转染的细胞以每孔 5.5×10^4 个细胞接种到经聚-D-赖氨酸预处理的具有完全培养基 (具有 10% FBS、2mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠的 DMEM) 的 96 孔培养板 (Becton-Dickinson, #356640) 中以供次日分析。为制备 Fluo4-AM (Molecular Probe, #F14202) 培育缓冲液储备液, 将 1 mg Fluo4-AM 溶解于 467 μl DMSO 和 467 μl 泊洛尼克酸 (Pluronic acid) (Molecular Probe, #P3000) 中以得到 1 mM 储备液, 其可在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下储存一个月。Fluo4-AM 为荧光钙指示剂染料。

于洗涤缓冲液 (1 $\times$ HBSS/2.5 mM 丙磺舒 (Probenicid) /20 mM HEPES (pH 7.4)) 中制备候选化合物。

分析时, 将培养基从各孔中去除, 并以 100 μl 的 4 μM Fluo4-AM/2.5 mM 丙磺舒 (Sigma, #P8761) /20 mM HEPES/完全培养基 (pH 7.4) 装载细胞。在 37 $^{\circ}\text{C}$ /5% CO_2 下使得培育进行 60 分钟。

培育 1 小时后, 去除 Fluo4-AM 培育缓冲液, 并用 100 μl 洗涤缓冲液洗涤细胞 2 次。在每一孔中留下 100 μl 洗涤缓冲液。将培养板放回 37 $^{\circ}\text{C}$ /5% CO_2 下的恒温箱中培育 60 分钟。

对 FLIPR (荧光成像平板读取器; Molecular Device) 设定程序以于第 30 秒时加入 50 μl 候选化合物, 并且记录由候选化合物所引起的胞内钙浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]$) 的瞬时改变, 再历时 150 秒。使用 FLIPR 软件, 使用总荧光改变数来测定激动剂活性。仪器软件使荧光读数标准化以得到零点处的等效初始读数。

在一些实施例中, 包含目标受体的细胞进一步包含 $G\alpha 15$ 、 $G\alpha 16$ 或嵌合 $Gq/Gi \alpha$ 单元。

尽管上文提供使用经稳定转染的细胞进行关于激动剂活性的 FLIPR 分析, 但所属领域技术人员将能够容易地对所述分析进行修改以便表征拮抗剂活性。所属领域技术人员也将容易地了解, 可替代性地使用瞬时转染过的细胞。

实例 5

MAP 激酶分析

可对 MAP 激酶 (丝裂原活化激酶) 进行监测以评估受体活化。可通过若干种方法对 MAP 激酶进行检测。一种方法是基于对磷酸化状态的评估, 即未磷酸化状态 (非活性) 或经磷酸化状态 (活性)。经磷酸化的蛋白在 SDS-PAGE 中具有较慢迁移率, 且因此可以使用 Western 印迹法将其与未经刺激的蛋白相比较。或者, 可使用对经磷酸化的蛋白具特异性的抗体 (New England Biolabs), 其可用于检测经磷酸化激酶的增加。在任一方法中, 细胞都经测试化合物刺激且随后经 Laemmli 缓冲液提取。将可溶部分施加于 SDS-PAGE 凝胶上, 并且以电泳法将蛋白转移到硝酸纤维素或 Immobilon 中。通过标准 Western 印迹技术检测免疫反应带。将可见或化学发光信号记录于薄膜上, 并且可以通过光密度分析法进行量化。

另一种方法是基于经由磷酸化分析评估 MAP 激酶活性。用测试化合物刺激细胞, 并且制备可溶提取物。在 30°C 下将提取物与 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 、ATP 再生系统和 MAP 激酶的特异性底物 (诸如由胰岛素调控的经磷酸化的热稳定和酸稳定蛋白或 PHAS-I) 一起培育 10 分钟。通过加入 H_3PO_4 终止反应, 并且将样本转移到冰上。将等分试样点渍于保留磷酸化蛋白的 Whatman P81 色谱纸上。洗涤色谱纸并用液体闪烁计数器对 ^{32}P 进行计数。或者, 将细胞提取物与 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ 、ATP 再生系统和通过链亲和素 (streptavidin) 结合到过滤器载体的生物素标记的髓鞘碱性蛋白一起培育。髓鞘碱性蛋白为活性 MAP 激酶的底物。在 30°C 下进行磷酸化反应 10 分钟。随后, 可经由过滤器抽吸提取物, 所述过滤器将保留经磷酸化的髓鞘碱性蛋白。洗涤过滤器, 并通过液体闪烁计数对 ^{32}P 进行计数。

实例 6

黑素细胞技术

黑素细胞是在低等脊椎动物体内发现的皮肤细胞。其含有被称为黑素体的着色细胞器。当 G 蛋白偶合受体 (GPCR) 活化时, 黑素细胞能够使这些黑素体沿微管网络重新分布。这种色素移动的结果是可见的细胞变亮或变暗。在黑素细胞中, 由 Gi 偶合受体活化所引起的胞内 cAMP 含量降低使得黑素体迁移到细胞中心, 从而导致颜色显著变亮。如果 Gs 偶合受体活化后 cAMP 含量随后升高, 那么黑素体再分散, 并且细胞再次变暗。由 Gq 偶合受体活化所引起的二酰基甘油含量的增加也可以诱导这种再分散。此外, 所述技术也适用于研究某

些受体酪氨酸激酶。黑素细胞的反应在受体活化后数分钟内发生，并且导致简单稳固的颜色改变。使用常规酶标分光仪 (absorbance microplate reader) 或适度视频成像系统 (modest video imaging system) 可轻易地检测所述反应。与其它皮肤细胞不同，黑素细胞是来源于神经嵴，并且似乎表达信号转导蛋白 (signaling protein) 的全长互补序列。具体说来，细胞表达广泛范围的 G 蛋白且因此能够功能性地表达几乎所有的 GPCR。

可利用黑素细胞鉴别针对 GPCR 的化合物，包括天然配体。可通过引入能够对特定刺激物起反应而分散或聚集色素并表达编码 GPCR 的外源克隆的色素细胞系的测试细胞来进行本方法。可使用刺激剂 (例如褪黑激素) 来设置色素部署的起始状态，其中当 GPCR 活化诱导色素分散时，色素聚集于测试细胞内。然而，用刺激剂刺激细胞来设置色素部署的起始状态，其中当 GPCR 活化诱导色素聚集时，色素分散。随后使测试细胞与化合物接触，并且测定细胞中的色素部署是否从色素部署的起始状态有所改变。由候选化合物 (包括但不限于配体) 与 GPCR 偶合引起的色素细胞分散在培养皿 (petri dish) 上看起来较暗，而色素细胞聚集看起来较亮。

材料和方法将遵循美国专利第 5,462,856 号和美国专利第 6,051,386 号的公开内容中所述。这些专利的公开内容是以全文引用的方式并入本文中。

将细胞涂在例如 96 孔培养板上 (每一培养板一种受体)。在转染后 48 小时，用 10 nM 褪黑激素处理各培养板上的半数细胞。褪黑激素活化黑素细胞中的内源 Gi 偶合受体，并且使其聚集其色素。将剩余的半数细胞转移到无血清培养基 0.7X L-15 (Gibco) 中。1 小时后，无血清培养基中的细胞保持色素分散状态，而经褪黑激素处理的细胞处于色素聚集状态。此时，用剂量反应的测试/候选化合物处理细胞。如果所涂布的 GPCR 与测试/候选化合物结合，那么预期黑素细胞将对所述化合物起反应而经历颜色改变。如果受体为 Gs 或 Gq 偶合受体，那么褪黑激素聚集的黑素细胞将经历色素分散。相反，如果受体为 Gi 偶合受体，那么预期色素分散细胞将经历剂量依赖性色素聚集。

实例 7

放射性标记的化合物

在某些实施例中，已知为本发明的 G 蛋白偶合受体的配体的化合物放射性标记。如本文所述的放射性标记的化合物可用于筛选分析中以鉴别/评估化合物。概括说来，可以通过新合成或经鉴别化合物 (即，测试化合物) 减少放射性标记的已知配体与受体之间复合体形成的能力来评估其减少所述放射性标记的已知配体与受体结合的能力。可以并入本发明化合物中的适当放射性核包括 (但不限于) ^3H (也写作 T)、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{125}I 、 ^{82}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{15}O 、 ^{13}N 、 ^{35}S 和 ^{77}Br 。并入 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^{82}Br 的化

合物通常将最有用。

应了解,“放射性标记的化合物”为已并入至少一种放射性核的化合物。在一些实施例中,放射性核选自 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{35}S 和 ^{82}Br 组成的群组。在一些实施例中,放射性核为 ^3H 或 ^{14}C 。而且,还应了解,已知为本发明的G蛋白偶合受体的配体的化合物中所示的所有原子可为所述原子最常见的同位素或较为稀有的放射性同位素或非放射性同位素。

所属领域众所周知用于将放射性同位素并入有机化合物中的合成方法(包括适用于已知为本发明的G蛋白偶合受体的配体的化合物的方法)且所述方法包括将活性水平的氟并入目标分子,其包括如下步骤:**A.**用氟气进行的催化还原-这一程序通常得到具有高特异性活性的产物并且需要卤化或不饱和前体。**B.**用硼氢 ^3H 化钠进行的还原-这一程序相当便宜并且需要含有诸如醛、酮、内酯、酯等可还原的官能团的前体。**C.**用氢 ^3H 化铝锂进行的还原-这一程序提供具有几乎理论特异性活性的产物。其也需要含有诸如醛、酮、内酯、酯等可还原的官能团的前体。**D.**氟气暴露标记-这一程序涉及在存在适当催化剂的情况下将含有可交换质子的前体暴露于氟气中。**E.**使用碘甲烷 ^3H 进行N-甲基化-通常使用这一程序通过用具有高特异性活性的碘甲烷(^3H)处理适当前体来制备O-甲基或N-甲基(^3H)产物。这种方法通常允许高特异性活性,诸如约80-87 Ci/mmol。

用于将活性水平的 ^{125}I 并入目标分子中的合成方法包括:**A.**桑德迈尔(Sandmeyer)反应和类似反应-这一程序将芳基或杂芳基胺转化成重氮盐(诸如四氟硼酸盐)且随后使用 Na^{125}I 将重氮盐转化成经 ^{125}I 标记的化合物。代表性程序报导于Zhu, D.-G.和其同事的*J. Org. Chem.* **2002**, 67, 943-948中。**B.**酚的邻位 ^{125}I 碘化-如Collier, T. L.和其同事的*J. Labelled Compd Radiopharm.* **1999**, 42, S264-S266中所报导,这一程序允许将 ^{125}I 并入酚的邻位。**C.**芳基和杂芳基溴与 ^{125}I 交换-这一方法通常为两步骤过程。第一个步骤为,在存在卤化三烷基锡或六烷基二锡[例如, $(\text{CH}_3)_3\text{SnSn}(\text{CH}_3)_3$]的情况下,使用例如Pd催化的反应[即, $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$]或通过芳基或杂芳基锂将芳基或杂芳基溴转化成相应的三烷基锡中间物。代表性程序报导于Bas, M.-D.和其同事的*J. Labelled Compd Radiopharm.* **2001**, 44, S280-S282中。

上述技术意欲作为例示而非限制说明。用于放射性标记已知为本发明的G蛋白偶合受体的配体的化合物的其它技术也已为所属领域技术人员众所周知。

实例 8

受体结合分析

可以对测试化合物减少已知为本发明的G蛋白偶合受体的配体的化合物与受体之

间复合体形成的能力进行评估。在某些实施例中，所述已知配体放射性标记。可以将放射性标记的已知配体用于筛选分析中以鉴别/评估化合物。概括说来，可以通过新合成或经鉴别化合物（即，测试化合物）减少放射性标记的已知配体与受体之间复合体形成的能力来评估其减少所述放射性标记的已知配体与受体结合的能力。

用于检测已知为本发明的 G 蛋白偶合受体的配体的化合物与受体之间的复合体的分析方案

A. 受体的制备

用 10 μg 包含编码本发明的 G 蛋白偶合受体的聚核苷酸的表达载体使用 60 μl Lipofectamine（每 15 cm 盘）瞬时转染 293 细胞。使瞬时转染过的细胞随着培养基的改变在所述盘中生长 24 小时（75%长满）并且用每盘 10 ml Hepes-EDTA 缓冲液（20 mM Hepes + 10 mM EDTA（pH 7.4））去除细胞。随后在 Beckman Coulter 离心机中以 17,000 rpm（JA-25.50 型转子）将细胞离心 20 分钟。接着将离心块再悬浮于 20 mM Hepes + 1 mM EDTA（pH 7.4）中，并用 50 ml Dounce 匀浆器进行均质化且再次离心。去除上清液后，将离心块储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下直到用于结合分析。当用于分析时，在冰上解冻膜 20 分钟，且随后加入 10 ml 培育缓冲液（20 mM Hepes, 1 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, pH 7.4）。然后涡旋膜以再悬浮粗制膜离心块，并用 Brinkmann PT-3100 Polytron 匀浆器以设置 6 进行均质化 15 秒。使用 BRL Bradford 蛋白分析测定膜蛋白的浓度。

B. 结合分析

对于总体结合来说，将 50 μl 总体积经适当稀释的膜（在含有 50 mM Tris HCl（pH 7.4）、10 mM MgCl_2 和 1 mM EDTA 的分析缓冲液中进行稀释；5-50 μg 蛋白质）加入 96 孔聚丙烯微量滴定盘中，随后加入 100 μl 分析缓冲液和 50 μl 放射性标记的已知配体。对于非特异性结合来说，加入 50 μl 而非 100 μl 分析缓冲液，并且再加入 50 μl 10 μM 未放射性标记的所述已知配体，随后加入 50 μl 所述放射性标记的已知配体。然后在室温下培育培养板 60-120 分钟。通过使分析板滤过具有 Brandell 96 孔培养板收集器的 Microplate Devices GF/C Unifilter 过滤板来终止结合反应，随后用含有 0.9% NaCl 的冷 50 mM Tris HCl（pH 7.4）洗涤。然后密封过滤板底部，将 50 μl Optiphase Supermix 加入每一孔中，密封板顶部，且于 Trilux MicroBeta 闪烁计数器中对板进行计数。为确定所述放射性标记的已知配体与所述受体之间是否是在存在测试化合物的情况下形成较少复合体，将 100 μl 经适当稀释的所述测试化合物加入适当孔中，而非加入 100 μl 分析缓冲液，随后加入 50 μl 所述放射性标记的已知配体。

在存在测试化合物的情况下放射性标记已知配体特异性结合的水平低于在不存在测试化合物的情况下放射性标记已知配体特异性结合的水平将指示，所述放射性标记已知配体与

所述受体之间是在存在测试化合物的情况下而非在不存在测试化合物的情况下形成较少复合体。

实例 9

BRS-3 增加胞内 IP3 积累

用含有编码内源性人 BRS-3 的 cDNA 的 pCMV 表达载体或单独 pCMV 载体瞬时转染 COS-7 细胞。将胞内 IP3 的积累以总磷酸肌醇积累读出。

将 COS-7 细胞以每孔 10,000 个细胞涂布于 96 孔培养板中并且使其附着整夜。随后一式三份用每孔 0.5 或 1.3 ng BRS-3/pCMV 或每孔 13 ng 空 pCMV 使用 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen #11668-027) 转染 COS-7 细胞。约 15 小时后, 将经过转染的 COS-7 细胞放回完全培养基(含有 10% FBS、1% L-谷氨酰胺和 1.5 g/L 碳酸氢钠的 DMEM)中并且在 37°C 下持续细胞培养约 8 小时。

在如本文所述转染后约 24 小时, 将 COS-7 细胞用于 IP3 分析中。将完全培养基用补充有 1.5 g/L 碳酸氢钠和 4 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-肌醇(Perkin Elmer Life Sciences)的 100 μl 无肌醇培养基(Invitrogen/Gibco formula 02-5092EA; 含有 D-葡萄糖、L-谷氨酰胺、酚红和吡哆醇盐酸盐且无肌醇、碳酸氢钠和丙酮酸钠的 DMEM)替换, 并且在 37°C 下培育细胞约 15 小时。随后, 通过抽吸去除培养基并且用 IP3 培养基(补充有 10 μM 帕吉林和 10 mM 氯化锂的如上文所述的无肌醇培养基)替换, 并且在 37°C 下培育细胞 3 小时。(为筛选作为 BRS-3 激动剂的测试化合物, 这 3 小时的培育中将包括测试化合物)。培育后, 通过抽吸去除培养基并且用含有冰冷的 0.1 M 甲酸的缓冲液加以替换。在最初于干冰上培育 30 分钟后, 接着在 -80°C 下将培养板冷冻整夜以达成细胞完全溶解。

细胞溶解完全后, 在 37°C 的烘箱中将分析培养板解冻。随后将解冻的内容物转移到预先装载有树脂(Biorad, AG1-X8 100-200 目, 甲酸盐形式)的 96 孔过滤板(Millipore, Multiscreen)中。使用真空歧管过滤所述板并且用水洗涤树脂多次。接着施加洗提缓冲液(200 μl , 1.0 M 甲酸铵/0.1 M 甲酸)并且在真空下将所得洗提液收集于 96 孔收集板中。将等分的洗提液(200 μl)转移到含有 4 ml 闪烁液的闪烁瓶中并且在闪烁计数器(Perkin Elmer Life Sciences, Optiphase Supermix 或 Hi-Safe 3)上对其进行计数。

已发现, BRS-3 展现可检测水平的组成性活性并且增加 COS-7 细胞中 IP3 的积累水平。参看图 1。使用 293 细胞获得类似结果(未图示)。

实例 10

GLUTag 细胞中 BRS-3 表达的 RT-PCR 分析

使用 RT-PCR 测定 GLUTag 细胞中 BRS-3 的表达。GLUTag 是产生 GLP-1 的小鼠肠内分泌

泌 L-细胞系[Brubaker 等人, Endocrinology (1998)139:4108-4114]。

GLUTag 细胞中 BRS-3 的表达是使用以下引物:

5'-TCCCGCTCTCGATTATCTCTGTCT-3' (SEQ ID NO:5, 有义链) 和

5'-TCCTCTCCCTTCTTGGCACTACTG-3' (SEQ ID NO:6, 反义链)

通过 RT-PCR 评估。PCR 引物 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 经选择从而能够跨内含子扩增 BRS-3, 由此易于将 cDNA (508 bp) 的扩增产物与基因组 DNA 的扩增产物相区别。

总 RNA 是使用购自 Invitrogen 的 Trizol Reagent 从 GLUTag 细胞分离。cDNA 合成是通过使用得自 Bio-Rad (iScript™) 的 cDNA 合成试剂盒进行。PCR 是使用 Taq Supermix (Invitrogen) 在含有 2 µl cDNA 和 100 ng 各引物的 50 µl 反应混合物中进行。对照反应包括无模板对照和小鼠基因组 DNA 模板对照。将样本放入热循环仪中并且在 94°C 下培育 5 分钟, 随后进行[94°C 下 30 秒, 57.5°C 下 30 秒和 72°C 下 1 分钟]循环 30 次, 并且最后在 72°C 下培育 10 分钟。然后在 1%/TAE 琼脂糖凝胶上分析 5 µl 的各 PCR 反应产物。

已发现, GLUTag 细胞表达 BRS-3。参看图 2。

实例 11

BRS-3 激动剂对 GLUTag 细胞中胞内 IP3 积累的影响

GLUTag 是产生 GLP-1 的小鼠肠内分泌 L-细胞系[Brubaker 等人, Endocrinology (1998)139:4108-4114]。测定 BRS-3 激动剂对 GLUTag 细胞中胞内 IP3 积累水平的影响。

如上文实例 9 中所述进行 GluTag 细胞中的 IP3 分析。在 IP3 培养基中进行的 3 小时培育期间, GLUTag 细胞是与或不与 BRS-3 激动剂一起培育。在某些实施例中, BRS-3 激动剂选自表 B 中的左边一栏。

已发现, BRS-3 激动剂会增加 GLUTag 细胞中胞内 IP3 积累。

实例 12

BRS-3 激动剂对刺激 GLUTag 细胞中 GLP-1 分泌的影响

GLUTag 是产生 GLP-1 的小鼠肠内分泌 L-细胞系[Brubaker 等人, Endocrinology (1998)139:4108-4114]。测定 BRS-3 激动剂对刺激 GLUTag 细胞中 GLP-1 分泌的影响。

第一天, 将 GLUTag 细胞涂布于 24 孔培养板中的完全培养基 (DMEM/10% FBS) 中。第二天时, 将所述培养基用低糖培养基 (DMEM/3 mM 葡萄糖/10% FBS) 替换。第三天时, 用 1 × PBS 将细胞洗涤两次。在组织培养恒温箱中于 37°C 和 5% CO₂ 下, 在具有 15 mM 葡萄糖的无血清 DMEM 中, 用各种浓度 (出于说明而非限制的目的, 约 1 nM 到约 10 µM) 的 BRS-3 激动剂或用作为阳性对照的佛司可林 (forskolin) (1 µM) 刺激经过洗涤 GLUTag 细胞 1 小时。随后收集上清液并且通过在 500 g 和 4°C 下离心 5 分钟来使其澄清。使用购自

LINCO Research Laboratory 的试剂[胰高血糖素样肽-1（活性）ELISA 试剂盒，目录号第 EGLP-35K 号]通过 ELISA 来测定释放到上清液中的 GLP-1。

已发现，当用 BRS-3 激动剂刺激时，GLUTag 细胞分泌 GLP-1。

实例 13：小鼠口服葡萄糖耐受性试验（oGTT）中 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂对降低高血糖含量的影响

如本文所述进行小鼠口服葡萄糖耐受性试验（oGTT）。

在小鼠 oGTT 分析中，治疗有效量通常为将产生大于 30% 的 AUC 抑制的药物量，而治疗无效量通常为将产生小于或等于 30% AUC 抑制的药物量。

经由口腔管饲法向超重的禁食小鼠（每次治疗 n=6 只小鼠）投与媒剂（PET）、BRS-3 激动剂[例如，剂量介于约 0.1 mkg 到约 1 mkg（每公斤体重化合物的毫克数）之间，当单独使用时，所述剂量在治疗上有效]、DPP-IV 抑制剂[例如，剂量介于约 0.1 mkg 到约 1 mkg 之间，当单独使用时，所述剂量在治疗上无效]或 BRS-3 激动剂与 DPP-IV 抑制剂的组合（例如，前述治疗无效的剂量）。30 分钟后，接着经口传递葡萄糖丸（3 g/kg）。使用从尾部切口收集的血液（约 5 μ l）和血糖仪以约 20 分钟的间隔测定血浆葡萄糖含量历经 2 小时的时间。基于从 6 只小鼠获得的数据绘制血糖漂移曲线并且以平均值 $\pm$ SEM 形式给出。计算每只小鼠的血糖漂移的曲线下面积（AUC）并且测定 AUC 抑制（%）。

已发现，与单独 BRS-3 激动剂或单独 DPP-IV 抑制剂相比较，BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合将产生协同 AUC 抑制。

还发现，一定量 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合产生的 AUC 抑制将大于由单独所述量的 BRS-3 激动剂所产生的抑制和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所产生的抑制。

实例 14：用于治疗或预防糖尿病和其相关病况的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合

选择根据本发明的 BRS-3 激动剂。选择根据本发明的 DPP-IV 抑制剂。

在约 0.01 mkg（每公斤体重化合物的毫克数）到约 100 mkg 的剂量范围内，测定关于小鼠口服葡萄糖耐受性试验（oGTT）中曲线下面积（AUC）抑制百分比的 BRS-3 激动剂的滴定值。参看上文实例 13。选择产生约 15-20% 血糖漂移 AUC 抑制的 BRS-3 激动剂的剂量。通常，在这一小鼠模型中，产生 30% 或更低 AUC 抑制的 BRS-3 激动剂的剂量在治疗上无效。

在约 0.01 mkg（每公斤体重化合物的毫克数）到约 100 mkg 的剂量范围内，测定关于小鼠口服葡萄糖耐受性试验（oGTT）中曲线下面积（AUC）抑制百分比的 DPP-IV 抑制剂的滴定值。参看上文实例 13。选择产生约 15-20% 血糖漂移 AUC 抑制的 DPP-IV 抑制剂的剂量。通常，在这一小鼠模型中，产生 30% 或更低 AUC 抑制的 DPP-IV 抑制剂的剂量在治疗上无

效。

在小鼠 oGTT 分析中测定由所选剂量的 BRS-3 激动剂和所选剂量的 DPP-IV 抑制剂的组合所产生的血糖漂移 AUC 抑制。测定 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合的治疗效力。通常,在这一小鼠模型中,产生大于 30%的 AUC 抑制的所述组合的量在治疗上有效。测定 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂之间的协同作用。

可使用从这一小鼠模型所获得的数据来调配用于人类的剂量范围。一般说来,所属领域技术人员将了解怎样由从一种动物模型系统中获得的活体内数据外推至另一模型,诸如人类。本发明的 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合可用于治疗或预防糖尿病和其相关病况。

应了解,上文意欲出于说明而非限制的目的。

实例 15: 小鼠体内葡萄糖激发后 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂对增加血液 GLP-1 含量的影响

使 C57blk/6 雄性小鼠(8 周龄)禁食 18 小时,并且以每组 n=6 将其随机分成 12 组。向小鼠经口投与媒剂(PET)、BRS-3 激动剂[例如,剂量介于约 0.1 mkg 到约 1 mkg(每公斤体重化合物的毫克数)之间,当单独使用时,所述剂量在治疗上有效]、DPP-IV 抑制剂[例如,剂量介于约 0.1 mkg 到约 1 mkg 之间,当单独使用时,所述剂量在治疗上无效]或 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂的组合(例如,前述治疗无效剂量)。治疗后 30 分钟,经口传递 3 g/kg 葡萄糖丸,并且在 0 分钟(无葡萄糖丸)时和口服葡萄糖丸后 2 分钟和 5 分钟时收集血浆。通过使用购自 Linco Research Laboratory[胰高血糖素样肽-1(活性)ELISA 试剂盒,目录号第 EGLP-35K 号]的 GLP-1 ELISA 试剂盒测定血浆 GLP-1 含量。

已发现,投与 BRS-3 激动剂和 DPP-IV 抑制剂将对于增加血液 GLP-1 含量产生协同作用。

还发现,投与一定量 BRS-3 激动剂与一定量 DPP-IV 抑制剂的组合产生的增加血液 GLP-1 含量的作用将大于单独所述量的 BRS-3 激动剂所产生的作用和单独所述量的 DPP-IV 抑制剂所产生的作用。

实例 16: 关于 BRS-3 激动剂活性的酵母报告基因分析

先前曾在文献(例如参看 Miret 等人, J Biol Chem (2002) 277:6881-6887; Campbell 等人, Bioorg Med Chem Lett (1999) 9:2413-2418; King 等人, Science (1990) 250:121-123; WO 99/14344; WO 00/12704; 和 US 6,100,042)中对基于酵母细胞的报告基因分析进行描述。简单说来,已对酵母细胞进行工程设计从而已缺失内源性酵母 Ga(GPA1)并且经使用多种技术构建的 G 蛋白嵌合体替换。此外,已缺失内源性酵母 α 细胞 GPCR, Ste3 从而允许所选哺乳动物 GPCR 的同源表达。在酵母中,于真核细胞中保守(例如,丝裂原活化蛋白激酶路径)的信息素(pheromone)信号转导路径的元件驱动 Fus1 的表达。通过将 β -半乳糖苷酶(LacZ)

放在 *Fus1* 启动子 (*Fus1p*) 的控制下, 已研发出一种系统, 由此受体活化将导致酶读出。

酵母细胞是通过改编的 Agatep 等人 (Agatep 等人, 1998, Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online, Trends Journals, Elsevier) 所述的乙酸锂方法转化。简单说来, 使酵母细胞在酵母胰蛋白胨培养板 (YT) 上生长整夜。将酵母表达载体 (2 μg 复制起点) 和乙酸锂/聚乙二醇/TE 缓冲液中的载体单链 DNA (10 μg)、两种 *Fus1p*-LacZ 报告基因质粒各 2 μg (一种具有 URA 选择标记且一种具有 TRP)、2 μg BRS-3 (例如, 人类受体) 吸取到 Eppendorf 管中。含有受体/无受体对照的酵母表达质粒具有 LEU 标记。将酵母细胞接种到这一混合物中并且在 30°C 下进行反应 60 分钟。随后, 在 42°C 下使酵母细胞热休克 15 分钟。接着洗涤细胞并且使其在选择培养板上展开。选择培养板为合成的限定酵母培养基-LEU、URA 和 TRP (SD-LUT)。在 30°C 下培育 2-3 天, 随后在 LacZ 分析中测试生长于选择培养板上的集落。

为了对 β -半乳糖苷酶进行荧光酶分析, 使载有标的 BRS-3 受体的酵母细胞在 SD-LUT 液体培养基中生长整夜直到不饱和浓度 (即, 细胞仍在分裂并且尚未达到稳定期)。用新鲜培养基将其稀释到最佳分析浓度并且将 90 μl 酵母细胞加到 96 孔黑色聚苯乙烯板 (Costar) 中。将溶解于 DMSO 中并且在 10% DMSO 溶液中稀释到 10 $\times$ 浓度的测试化合物加到所述板中, 并且将所述板在 30°C 下放置 4 小时。4 小时后, 将 β -半乳糖苷酶的底物加到各孔中。在这些实验中, 使用二(β -D-吡喃半乳糖苷)荧光素 (FDG), 即释放荧光素的所述酶的底物, 从而允许荧光读出。每孔加入 20 μl 500 μM FDG/2.5% Triton X100 (需要清洁剂以使细胞可渗透)。将细胞与底物一起培育 60 分钟后, 每孔加入 20 μl 1 M 碳酸钠以终止反应并且增强荧光信号。然后在荧光计中于 485/535 nm 下对所述板进行读数。

相比经过空载体转化的酵母细胞, 经过 BRS-3 转化的酵母细胞中荧光信号色素分散的增加将指示测试化合物为刺激 BRS-3 受体功能的化合物。

尽管前述说明书和出于说明的目的提供的实例已对本发明的原理进行教示, 但应了解, 本发明的实践涵盖在以下权利要求和其等效内容的范围内的所有常见变更、改编或修改。

<110> 艾尼纳制药公司

<120> 用于治疗肥胖症和糖尿病以及其相关病况和用于治疗可通过增加血液GLP-1含量改善的病况的组合疗法

<130> 112.w01

<150> 60/675,730

<151> 2005-04-27

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1200

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

atggctcaaa ggcagcctca ctcacctaata cagacttttaa tttcaatcac aaatgacaca	60
gaatcatcaa gctctgtggt ttctaacgat aacacaaata aaggatggag cggggacaac	120
tctccaggaa tagaagcatt gtgtgccatc tatattactt atgctgtgat catttcagt	180
ggcatccttg gaaatgctat tctcatcaaa gtctttttca agaccaaata catgcaaaca	240
gttccaaata ttttcatcac cagcctggct tttggagatc ttttacttct gctaacttgt	300
gtgccagtgg atgcaactca ctaccttgca gaaggatggc tgttcggaag aattggttgt	360
aagggtgctct ctttcatccg gctcacttct gttgggtgtgt cagtgttcac attaacaatt	420
ctcagcgctg acagatacaa ggcagttgtg aagccacttg agcgacagcc ctccaatgcc	480
atcctgaaga cttgtgtaaa agctggctgc gtctggatcg tgtctatgat atttgctcta	540
cctgaggcta ttttttcaaa tgtatacact tttcgagatc ccaataaaaa tatgacattt	600
gaatcatgta cctcttatcc tgtctctaag aagctcttgc aagaaataca ttctctgctg	660
tgcttcttag tgttctacat tattccactc tctattatct ctgtctacta ttcttgatt	720
gctaggaccc tttaaaaaag caccctgaac atacctactg aggaacaaag ccatgcccgt	780
aagcagattg aatcccgaag gagaattgcc agaacggtat tgggtgttggg ggctctgttt	840
gccctctgct gggtgcaaaa tcacctctg tacctctacc attcattcac ttctcaaacc	900
tatgtagacc cctctgccat gcatttcatt ttcaccattt tctctcgggt tttggctttc	960
agcaattctt gcgtaaaccc ctttgctctc tactggctga gcaaaagctt ccagaagcat	1020
tttaaagctc agttgttctg ttgcaaggcg gagcggcctg agcctcctgt tgctgacacc	1080
tctcttacca ccctggctgt gatgggaacg gtcccgggca ctgggagcat acagatgtct	1140

gaaattagtg tgacctcggt cactgggtgt agtgtgaagc aggcagagga cagattctag 1200

<210> 2
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Met Ala Gln Arg Gln Pro His Ser Pro Asn Gln Thr Leu Ile Ser Ile
 1 5 10 15

Thr Asn Asp Thr Glu Ser Ser Ser Ser Val Val Ser Asn Asp Asn Thr
 20 25 30

Asn Lys Gly Trp Ser Gly Asp Asn Ser Pro Gly Ile Glu Ala Leu Cys
 35 40 45

Ala Ile Tyr Ile Thr Tyr Ala Val Ile Ile Ser Val Gly Ile Leu Gly
 50 55 60

Asn Ala Ile Leu Ile Lys Val Phe Phe Lys Thr Lys Ser Met Gln Thr
 65 70 75 80

Val Pro Asn Ile Phe Ile Thr Ser Leu Ala Phe Gly Asp Leu Leu Leu
 85 90 95

Leu Leu Thr Cys Val Pro Val Asp Ala Thr His Tyr Leu Ala Glu Gly
 100 105 110

Trp Leu Phe Gly Arg Ile Gly Cys Lys Val Leu Ser Phe Ile Arg Leu
 115 120 125

Thr Ser Val Gly Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Ile Leu Ser Ala Asp
 130 135 140

Arg Tyr Lys Ala Val Val Lys Pro Leu Glu Arg Gln Pro Ser Asn Ala
 145 150 155 160

Ile Leu Lys Thr Cys Val Lys Ala Gly Cys Val Trp Ile Val Ser Met
 165 170 175

Ile Phe Ala Leu Pro Glu Ala Ile Phe Ser Asn Val Tyr Thr Phe Arg
 180 185 190

Asp Pro Asn Lys Asn Met Thr Phe Glu Ser Cys Thr Ser Tyr Pro Val
 195 200 205

Ser Lys Lys Leu Leu Gln Glu Ile His Ser Leu Leu Cys Phe Leu Val

210 215 220

Phe Tyr Ile Ile Pro Leu Ser Ile Ile Ser Val Tyr Tyr Ser Leu Ile
225 230 235 240

Ala Arg Thr Leu Tyr Lys Ser Thr Leu Asn Ile Pro Thr Glu Glu Gln
245 250 255

Ser His Ala Arg Lys Gln Ile Glu Ser Arg Lys Arg Ile Ala Arg Thr
260 265 270

Val Leu Val Leu Val Ala Leu Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Asn His
275 280 285

Leu Leu Tyr Leu Tyr His Ser Phe Thr Ser Gln Thr Tyr Val Asp Pro
290 295 300

Ser Ala Met His Phe Ile Phe Thr Ile Phe Ser Arg Val Leu Ala Phe
305 310 315 320

Ser Asn Ser Cys Val Asn Pro Phe Ala Leu Tyr Trp Leu Ser Lys Ser
325 330 335

Phe Gln Lys His Phe Lys Ala Gln Leu Phe Cys Cys Lys Ala Glu Arg
340 345 350

Pro Glu Pro Pro Val Ala Asp Thr Ser Leu Thr Thr Leu Ala Val Met
355 360 365

Gly Thr Val Pro Gly Thr Gly Ser Ile Gln Met Ser Glu Ile Ser Val
370 375 380

Thr Ser Phe Thr Gly Cys Ser Val Lys Gln Ala Glu Asp Arg Phe
385 390 395

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 3
acagaattca gaagaaatgg ctcaaaggca

30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工

<220>		
<223>	引物	
<400>	4	
catggatcct	tgaaaagcta	gaatctgtcc
		30
<210>	5	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	5	
tcccgctctc	gattatctct	gtct
		24
<210>	6	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	6	
tcctctccct	tcttggcact	actg
		24

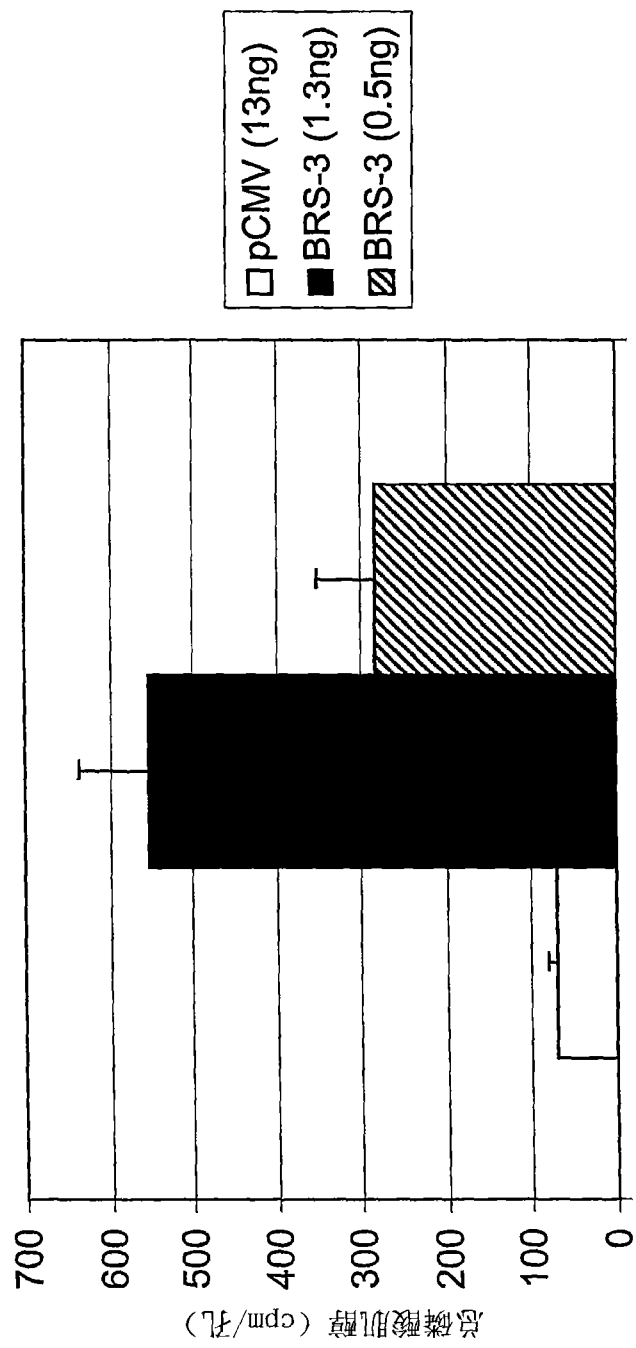


图1 在COS-7细胞中进行的IP3分析

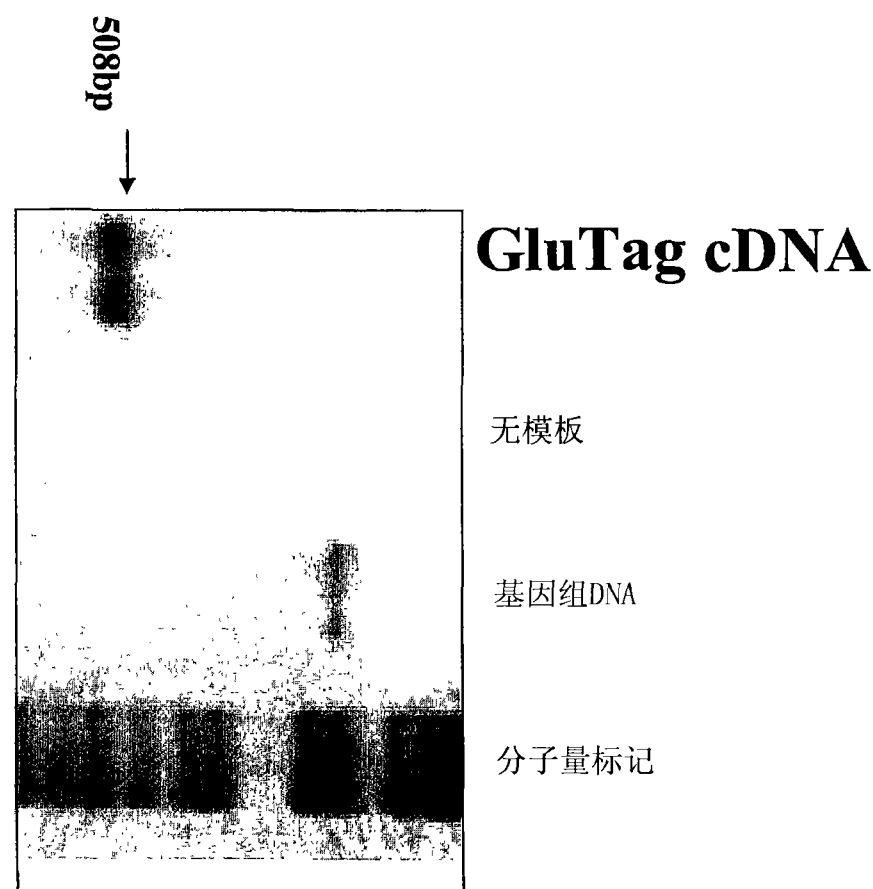


图2 GLUtag细胞中BRS-3的表达