

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-515882

(P2010-515882A)

(43) 公表日 平成22年5月13日 (2010.5.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	2 G O 4 5
G 0 1 N 33/60 (2006.01)	G O 1 N 33/60 Z N A Z	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 170 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-544931 (P2009-544931)
 (86) (22) 出願日 平成20年1月4日 (2008.1.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年8月20日 (2009.8.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/000116
 (87) 国際公開番号 W02008/085888
 (87) 国際公開日 平成20年7月17日 (2008.7.17)
 (31) 優先権主張番号 60/878,796
 (32) 優先日 平成19年1月5日 (2007.1.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

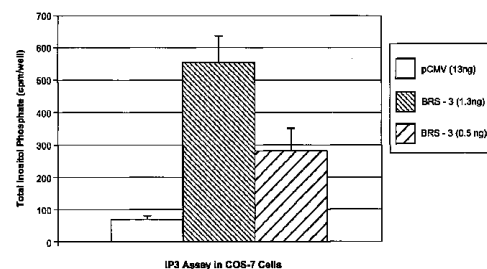
(71) 出願人 500478097
 アリーナ ファーマシューティカルズ,
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9212
 1 サンディエゴ・ナンシーリッジドライブ
 6166
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 睡眠関連障害を含むGABA関連神経学的障害を処置するためのGタンパク質共役受容体およびその調節因子

(57) 【要約】

本発明は、睡眠関連障害の治療に適した化合物としての候補化合物をスクリーニングするためにBRS-3を用いる方法に関する。本発明の逆アゴニストおよびアンタゴニストは、睡眠を促進するための、および不眠症等の、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するための治療剤として有用である。本発明のアゴニストおよび部分アゴニストは、覚醒状態を促進するための、およびナルコレプシー等に関連する過剰な眠気などの過剰な眠気を予防もしくは治療するための治療剤として有用である。本発明は、さらに、睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病的障害または認識障害などのGABA関連神経学的障害のための医薬剤としての候補化合物をスクリーニングするためにBRS-3を用いる方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

(a) 候補化合物を宿主細胞、または G P C R を発現する宿主細胞の膜と接触させる工程であって、ここで、該 G P C R は：

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列；

10

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸 2 ～ 3 9 9 ；

(i i i) 特異的プライマー配列番号 3 および配列番号 4 を用いるヒト D N A 試料に対するポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

(v) 配列番号 2 のアミノ酸配列における 1 個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号 2 から誘導されたアミノ酸配列を有する G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(v i) 配列番号 2 に対して少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、または少なくとも約 9 5 % の同一性を有する G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

20

(v i i) 配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンである G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；および

(v i i i) (i) ～ (v i i) のいずれか 1 つの生物学的に活性な断片；
よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、工程；ならびに

(b) 該受容体の機能性を阻害する該候補化合物の能力を決定する工程；
を含み、

ここで、該 G P C R の機能性を阻害する該候補化合物の能力は、該候補化合物が、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す、方法。

30

【請求項 2】

睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって、請求項 1 に記載の方法の工程を含み、さらに：

(c) 所望により、工程 (b) における G P C R の機能性を阻害する化合物を合成する工程；

40

(d) 工程 (b) における G P C R の機能性を阻害する化合物を哺乳動物に投与する工程；および

(e) 該化合物が、該哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を有し、抗痙攣活性を有し、抗偏頭痛活性を有し、抗鬱病活性を有し、または抗精神病活性を有するか否かを決定する工程；

を含み、

ここで、該哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を示し、抗痙攣活性を示し、抗偏頭痛活性を示し、抗鬱病活性を示し、または抗精神病活性を示す該候補化合物の能力は、該候補化合物が、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和され

50

る睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す、方法。

【請求項3】

前記哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記受容体の逆アゴニストを同定する工程を含む、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

前記受容体のアンタゴニストを同定する工程を含む、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

さらに、医薬として前記逆アゴニストもしくはアンタゴニストを処方する工程を含む、請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】

睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

(a') 宿主細胞、またはGPCRを発現する宿主細胞の膜を、候補化合物の存在下または不在下において、所望により標識された該GPCRに対する公知のリガンドとを接触させる工程であって、ここで、該GPCRは：

(i) 配列番号2のアミノ酸配列；

(ii) 配列番号2のアミノ酸2～399；

(iii) 特異的プライマー配列番号3および配列番号4を用いるヒトDNA試料に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

(v) 配列番号2のアミノ酸配列における1個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(vi) 配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(vii) 配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；および

(viii) (i)～(vii)のいずれか1つの生物学的に活性な断片；
よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、工程；

(b') 該公知のリガンドおよび該GPCRの間の複合体を検出する工程；

(c') 該候補化合物の不在下よりも該候補化合物の存在下においてより少ない該複合体が形成されるか否かを決定する工程；

(d') 所望により、その存在下でより少ない該複合体が工程(c')で形成される化合物を合成する工程；

(e') その存在下でより少ない該複合体が工程(c')で形成される化合物を哺乳動物に投与する工程；ならびに

(f') 該化合物が、該哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を有し、抗痙攣活性を有し、抗偏頭痛活性を有し、抗鬱病活性を有し、または抗精神病活性を有するか否

10

20

30

40

50

かを決定する工程；
を含み、

ここで、該哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を示し、抗痙攣活性を示し、抗偏頭痛活性を示し、抗鬱病活性を示し、または抗精神病活性を示す該候補化合物の能力は、該候補化合物が、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す、方法。

【請求項 8】

10

前記哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記睡眠障害が断片化された睡眠構造を含む、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記睡眠障害が、精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 24 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

20

前記睡眠障害が不眠症であり、または前記 G A B A 関連神経学的障害が不眠症、全般性不安障害、パニック発作、癲癇、偏頭痛、大鬱病障害、および統合失調症よりなる群から選択される、請求項 1～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1～11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項 1～11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記宿主細胞がメラニン保有細胞である、請求項 1～11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

30

前記 G P C R が配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記 G P C R が配列番号 2 に対して少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、または少なくとも約 95 % の同一性を有する G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む、請求項 1～14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記 G P C R が配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンである G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む、請求項 1～14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

40

睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であって、ここで、請求項 1～17 のいずれかに記載の方法に従って同定される化合物。

【請求項 19】

睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、および医薬上許容される担体

50

を含む医薬組成物であって、ここで、該化合物が請求項 1 ～ 17 のいずれかに記載の方法に従って同定される医薬組成物。

【請求項 20】

睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、および医薬上許容される担体を混合することを含む医薬組成物を調製する方法であって、ここで、該化合物を請求項 1 ～ 17 のいずれかに記載の方法に従って同定する、方法。

【請求項 21】

治療上有効量の哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または該逆アゴニストもしくはアンタゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬上許容される組成物を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含む、睡眠を促進する方法、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療する方法、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療する方法。

【請求項 22】

前記睡眠障害が断片化された睡眠構造を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

睡眠を促進する前記方法、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療する前記方法が、睡眠の定着を促進することを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

睡眠を促進する前記方法、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療する前記方法が、デルタ力を増加させることを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

前記睡眠障害が、精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 24 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 26】

前記睡眠障害が不眠症であり、または前記 G A B A 関連神経学的障害が不眠症、全般的な不安障害、パニック発作、癲癇、偏頭痛、大鬱病障害、および統合失調症よりなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

前記哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストが B R S - 3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである、請求項 21 ～ 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 21 ～ 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

睡眠を促進するための、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するための、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するための医薬の製造用の哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストの使用。

【請求項 30】

前記睡眠障害が断片化された睡眠構造を含む、請求項 29 に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

前記睡眠を促進すること、または前記睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防することもしくは治療することが睡眠の定着を促進することを含む、請求項 2 9 に記載の使用。

【請求項 3 2】

前記睡眠を促進すること、または前記睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防することもしくは治療することがデルタ力を増加させることを含む、請求項 2 9 に記載の使用。

【請求項 3 3】

前記睡眠障害が精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 2 4 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の使用。

10

【請求項 3 4】

前記睡眠障害が不眠症であり、または前記 G A B A 関連神経学的障害が不眠症、全般性不安障害、パニック発作、癲癇、偏頭痛、大鬱病障害、および統合失調症よりなる群から選択される、請求項 2 9 に記載の使用。

【請求項 3 5】

前記哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストが B R S - 3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである、請求項 2 9 ~ 3 4 のいずれかに記載の使用。

20

【請求項 3 6】

前記哺乳動物 B R S - 3 がヒト B R S - 3 である、請求項 2 9 ~ 3 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 3 7】

睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または該逆アゴニストもしくはアンタゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

30

【請求項 3 8】

前記睡眠障害が断片化された睡眠構造を含む、請求項 3 7 に記載の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 3 9】

前記睡眠を促進すること、または前記睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防することもしくは治療することが睡眠の定着を促進することを含む、請求項 3 7 に記載の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 4 0】

前記睡眠を促進すること、または前記睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防することもしくは治療することがデルタ力を増加させることを含む、請求項 3 7 に記載の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または医薬組成物。

40

【請求項 4 1】

前記睡眠障害が精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 2 4 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 4 2】

50

前記睡眠障害が不眠症であり、または前記 G A B A 関連神経学的障害が不眠症、全般性不安障害、パニック発作、癲癇、偏頭痛、大鬱病障害、および統合失調症よりなる群から選択される、請求項 37 に記載の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 43】

前記哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストが B R S - 3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである、請求項 37 ~ 42 のいずれかに記載の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 44】

前記哺乳動物 B R S - 3 がヒト B R S - 3 である、請求項 37 ~ 43 のいずれかに記載の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または医薬組成物。

10

【請求項 45】

覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

(a) 候補化合物を宿主細胞、または G P C R を発現する宿主細胞の膜と接触させる工程であって、ここで、該 G P C R は：

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列；

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸 2 ~ 399 ；

20

(i i i) 特異的プライマー配列番号 3 および配列番号 4 を用いるヒト D N A 試料に対するポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

(v) 配列番号 2 のアミノ酸配列における 1 個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号 2 から誘導されたアミノ酸配列を有する G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(v i) 配列番号 2 に対して少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、または少なくとも約 95 % の同一性を有する G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

30

(v i i) 配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンである G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；および

(v i i i) (i) ~ (v i i) のいずれか 1 つの生物学的に活性な断片；
よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、工程；ならびに

(b) 該受容体の機能性を刺激する該候補化合物の能力を決定する工程；
を含み、

ここで、該受容体の機能性を刺激する該候補化合物の能力は、該候補化合物が覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す、方法。

40

【請求項 46】

覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって、請求項 45 に記載の方法の工程を含み、さらに：

(c) 所望により、工程 (b) における G P C R の機能性を刺激する化合物を合成する工程；

(d) 工程 (b) における G P C R の機能性を刺激する化合物を哺乳動物に投与する工

50

程；および

(e) 該化合物が該哺乳動物において覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を有するか否かを決定する工程；

を含み、

ここで、該哺乳動物において、覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を示す該候補化合物の能力は、該候補化合物が覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す、方法。

【請求項 47】

10

前記哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記受容体のアゴニストを同定する工程を含む、請求項 45～47 のいずれかに記載の方法。

【請求項 49】

前記受容体の部分アゴニストを同定する工程を含む、請求項の 45～47 のいずれかに記載の方法。

【請求項 50】

さらに、前記アゴニストまたは部分アゴニストを医薬として処方する工程を含む、請求項 48 または請求項 49 に記載の方法。

20

【請求項 51】

覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

(a') 候補化合物の存在下または不在下で、宿主細胞または G P C R を発現する宿主細胞の膜を、所望により標識された該 G P C R に対する公知のリガンドとを接触させる工程であって、ここで、該 G P C R は：

(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列；

(i i) 配列番号 2 のアミノ酸 2～399；

30

(i i i) 特異的プライマー配列番号 3 および配列番号 4 を用いるヒト D N A 試料に対するポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされる G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

(v) 配列番号 2 のアミノ酸配列における 1 個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号 2 から誘導されたアミノ酸配列を有する G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(v i) 配列番号 2 に対して少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、または少なくとも約 95% の同一性を有する G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

40

(v i i) 配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンである G タンパク質共役受容体のアミノ酸配列；および

(v i i i) (i)～(v i i) のいずれか 1 つの生物学的に活性な断片；
よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、工程；

(b') 該公知のリガンドおよび該 G P C R の間の複合体を検出する工程；

(c') 該候補化合物の不在下よりも該候補化合物の存在下においてより少ない該複合体が形成されるか否かを決定する工程；

(d') 所望により、その存在下でより少ない該複合体が工程 (c') で形成される化合物を合成する工程；

50

(e') その存在下でより少ない該複合体が工程(c')で形成される化合物を哺乳動物に投与する工程；ならびに

(f') 該化合物が、該哺乳動物において覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を有するか否かを決定する工程；
を含み、

ここで、該哺乳動物において、覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を示す該候補化合物の能力は、該候補化合物が、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す、方法。

10

【請求項52】

前記哺乳動物が非ヒト哺乳動物である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記過剰な眠気が睡眠障害に関連している、請求項45～52のいずれかに記載の方法。

【請求項54】

前記睡眠障害が睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化(時差ぼけ)症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される、請求項53に記載の方法。

20

【請求項55】

前記睡眠障害がナルコレプシーであり、または前記GABA関連神経学的障害がナルコレプシー、認知症およびアルツハイマー型の認知症よりなる群から選択される、請求項53に記載の方法。

【請求項56】

前記過剰な眠気が神経学的障害に関連する、請求項45～52のいずれかに記載の方法。

【請求項57】

前記過剰な眠気が精神病性障害に関連する、請求項45～52のいずれかに記載の方法。

30

【請求項58】

前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、請求項45～57のいずれかに記載の方法。

【請求項59】

前記宿主細胞が酵母細胞である、請求項45～57のいずれかに記載の方法。

【請求項60】

前記宿主細胞がメラニン保有細胞である、請求項45～57のいずれかに記載の方法。

【請求項61】

前記GPCRが配列番号2のアミノ酸配列を含む、請求項45～60のいずれかに記載の方法。

40

【請求項62】

前記GPCRが、配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む、請求項45～60のいずれかに記載の方法。

【請求項63】

前記GPCRが、配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む、請求項45～60のいずれかに記載の方法。

【請求項64】

覚醒状態を促進するための、または過剰な眠気を予防もしくは治療するために適した化

50

合物であって、請求項 4 5～6 3 のいずれかに記載の方法に従って同定される、化合物。

【請求項 6 5】

覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物であって、該化合物が請求項 4 5～6 3 のいずれかに記載の方法に従って同定される、医薬組成物。

【請求項 6 6】

覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、および医薬上許容される担体を混合することを含む医薬組成物を調製する方法であって、該化合物を請求項 4 5～6 3 のいずれかに記載の方法に従って同定する、方法。

【請求項 6 7】

治療上有効量の哺乳動物 B R S－3 のアゴニストもしくは部分アゴニスト、または該アゴニストまたは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬上許容される組成物を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含む、覚醒状態を促進する方法、または過剰な眠気を予防もしくは治療する方法、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療する方法。

【請求項 6 8】

前記過剰な眠気が睡眠障害に関連する、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記睡眠障害が睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 2 4 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記睡眠障害がナルコレプシーであり、または前記 G A B A 関連神経学的障害がナルコレプシー、認知症およびアルツハイマー型の認知症よりなる群から選択される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記過剰な眠気が神経学的障害に関連する、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記過剰な眠気が精神病性障害に関連する、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記哺乳動物 B R S－3 のアゴニストもしくは部分アゴニストが B R S－3 選択的アゴニストまたは部分アゴニストである、請求項 6 7～7 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 4】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 6 7～7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 5】

覚醒状態を促進するための、または過剰な眠気を予防もしくは治療するための、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するための医薬の製造用の哺乳動物 B R S－3 のアゴニストもしくは部分アゴニストの使用。

【請求項 7 6】

前記過剰な眠気が睡眠障害に関連する、請求項 7 5 に記載の使用。

【請求項 7 7】

前記睡眠障害が睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺胞低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 24 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される、請求項 76 に記載の使用。

【請求項 78】

前記睡眠障害がナルコレプシーであり、または前記 GABA 関連神経学的障害がナルコレプシー、認知症およびアルツハイマー型の認知症よりなる群から選択される、請求項 76 に記載の使用。

10

【請求項 79】

前記過剰な眠気が神経学的障害に関連する、請求項 75 に記載の使用。

【請求項 80】

前記過剰な眠気が精神病性障害に関連する、請求項 75 に記載の使用。

【請求項 81】

前記哺乳動物 BRS-3 のアゴニストまたは部分アゴニストが BRS-3 選択的アゴニストまたは部分アゴニストである、請求項 75～80 のいずれかに記載の使用。

【請求項 82】

前記哺乳動物 BRS-3 がヒト BRS-3 である、請求項 75～81 のいずれかに記載の使用。

20

【請求項 83】

覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される GABA 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニスト、または該アゴニストまたは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 84】

前記過剰な眠気が睡眠障害に関連する、請求項 83 に記載のアゴニストまたは部分アゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 85】

前記睡眠障害が睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺胞低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 24 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される、請求項 84 に記載のアゴニストまたは部分アゴニスト、または医薬組成物。

30

【請求項 86】

前記睡眠障害がナルコレプシーであり、または前記 GABA 関連神経学的障害がナルコレプシー、認知症およびアルツハイマー型の認知症よりなる群から選択される、請求項 84 に記載のアゴニストまたは部分アゴニスト、または医薬組成物。

40

【請求項 87】

前記過剰な眠気が神経学的障害に関連する、請求項 83 に記載のアゴニストまたは部分アゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 88】

前記過剰な眠気が精神病性障害に関連する、請求項 83 に記載のアゴニストまたは部分アゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 89】

前記哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストが BRS-3 選択的アゴニストまたは部分アゴニストである、請求項 83～88 のいずれかに記載のアゴニストま

50

たは部分アゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 9 0】

前記哺乳動物 B R S - 3 がヒト B R S - 3 である、請求項 8 3 ~ 8 9 のいずれかに記載のアゴニストまたは部分アゴニスト、または医薬組成物。

【請求項 9 1】

睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病性障害、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害用の医薬剤のための候補化合物をスクリーニングする方法であって、構成要素：

(a) 宿主細胞、または G タンパク質共役受容体を含む宿主細胞の膜を提供する工程であって、該 G タンパク質共役受容体が配列番号 2 に対して少なくとも約 7 5 % の同一性、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、または少なくとも約 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、工程；および

(b) 該 G タンパク質共役受容体に対する候補化合物をスクリーニングする工程；を含む方法。

【請求項 9 2】

前記 G タンパク質共役受容体のアゴニストを同定する工程を含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記 G タンパク質共役受容体の部分アゴニストを同定する工程を含む、請求項 9 1 または請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記 G タンパク質共役受容体の逆アゴニストを同定する工程を含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記 G タンパク質共役受容体のアンタゴニストを同定する工程を含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記スクリーニングする工程が、前記アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストもしくはアンタゴニストが睡眠を促進し、抗不安活性を有し、抗痙攣活性を有し、抗偏頭痛活性を有し、抗鬱病活性を有し、抗精神病活性を有し、覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を有するか否かを決定することを含む、請求項 9 2 ~ 9 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 7】

さらに、前記アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストもしくはアンタゴニストを医薬として処方する工程を含む、請求項 9 2 ~ 9 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 8】

前記 G タンパク質共役受容体が配列番号 2 に対して少なくとも約 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 9 1 ~ 9 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 9】

前記 G タンパク質共役受容体が配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 9 1 ~ 9 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 0】

睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病性障害、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害用の医薬剤としての候補化合物をスクリーニングするための G タンパク質共役受容体の使用であって、該 G タンパク質共役受容体は配列番号 2 に対して少なくとも約 7 5 % の同一性、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、または少なくとも約 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、使用。

10

20

30

40

50

【請求項 101】

前記スクリーニングが前記 G タンパク質共役受容体アゴニストのためのものである、請求項 100 に記載の使用。

【請求項 102】

前記スクリーニングが前記 G タンパク質共役受容体の部分アゴニストのためのものである、請求項 100 または請求項 101 に記載の使用。

【請求項 103】

前記スクリーニングが前記 G タンパク質共役受容体の逆アゴニストのためのものである、請求項 100 に記載の使用。

【請求項 104】

前記スクリーニングが前記 G タンパク質共役受容体のアンタゴニストのためである、請求項 100 に記載の使用。

【請求項 105】

前記 G タンパク質共役受容体が配列番号 2 に対して少なくとも約 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 100 ～ 104 のいずれかに記載の使用。

【請求項 106】

前記 G タンパク質共役受容体が配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 100 ～ 105 のいずれかに記載の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、G タンパク質共役受容体（GPCR）を用いて、睡眠関連障害の治療に適した化合物としての候補化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明の逆アゴニストおよびアンタゴニストは睡眠を促進するための、および不眠症などの睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するための治療剤として有用である。本発明のアゴニストおよび部分アゴニストは、覚醒状態を促進するための、およびナルコレプシーなどに関連する過剰な眠気など、過剰な眠気を予防もしくは治療するための治療剤として有用である。本発明は、さらに、GPCR を用いて、睡眠障害、不安障害、痙攣性障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病性障害、または認識障害などの GABA 関連神経学的障害のための医薬剤としての候補化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明の化合物は、睡眠促進、覚醒状態促進、不安解消、抗痙攣、抗鬱、抗精神病、および認識増強活性を有する化合物を含む。

【背景技術】**【0002】**

以下の議論は本発明の理解を促進することを意図するが、本発明に対する先行技術であることを意図せず、またはそれを容認するものでもない。

【0003】**A. 睡眠障害**

睡眠は 3 つの状態：覚醒状態、ノンレム（NREM）睡眠、およびレム（REM）睡眠によってヒトにおいて特徴付けられる基本的な生理学的リズムの一部である。睡眠障害は通常の睡眠のパターンまたは挙動の乱れである。

【0004】

用語「不眠症」とは、対象による不適切な睡眠または非休養睡眠の認識をいう。問題は、例えば、以下：睡眠の開始、睡眠の維持または早朝の目覚めの 1 以上で起こり得る。不眠症は、ロサンゼルス地域において調査された成人集団の 32% で報告されている、たびたび起こる病状である（非特許文献 1）。Alachua County, フロリダの調査された集団の全体で 45% は、睡眠に至る、または眠ったままであるというトラブルを報告した（非特許文献 2）。

【0005】

過剰な日中の眠気（睡眠過剰）は発作性睡眠の基本的な特徴である。睡眠過剰は多数の

10

20

30

40

50

神経学的障害（多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィ、パーキンソン病）、精神病性障害（鬱病、統合失調症）および他の障害（閉塞性睡眠時無呼吸、夜勤睡眠障害、薬物誘導鎮静）とも関連付けられている。

【0006】

睡眠障害は一般的であって、かなりの無力および社会的かつ経済的コスト（例えば、道路交通事故、低い仕事効率）をもたらす可能性がある。例えば、非特許文献3；非特許文献4；American Academy of Sleep Medicine, ICSD-International classification of sleep disorders, revised: Diagnostic and coding manual, American Academy of Sleep Medicine, 2001. 参照。

10

【0007】

B. ボンベシン受容体サブタイプ-3 (BRS-3)

ボンベシンはカエルの皮膚から単離された14アミノ酸ペプチドである。ボンベシン受容体サブタイプ-3 BRS-3 Gタンパク質共役受容体 (BRS-3；例えば、ヒトBRS-3、GenBank（登録商標）アクセッション番号AAA35604およびその対立遺伝子；例えば、マウスBRS-3、GenBank（登録商標）アクセッション番号NP_033896およびその対立遺伝子；例えば、ラットBRS-3、GenBank（登録商標）アクセッション番号AF510984およびその対立遺伝子）は、胃-放出ペプチド受容体 (GRP-R；例えば、ヒトGRP-R、GenBank（登録商標）アクセ

20

シオン番号NP_005305）およびニューロメジンB受容体 (NMB-R；例えば、ヒトNMB-R、GenBank（登録商標）アクセッション番号NP_002502）に対して約50%相同性を呈し、それらは一緒になって、ボンベシン様受容体群を形成する。BRS-3は視床下部および子宮を含めた組織で選択的に発現される。BRS-3の活性化は細胞内イノシトール1, 4, 5-三リン酸 (IP3) の増大した蓄積をもたらし、これはBRS-3がGqに共役されることと一致する。最近の研究においては、BRS-3ノックアウトマウスは肥満、糖尿病、および高血圧を発症した [Ohki-Hamazakiら、Nature (1997) 390:165-169]。

【0008】

C. ガンマーアミノ酪酸 (GABA)

GABA (ガンマーアミノ酪酸) は脳における主な阻害性伝達物質である。グルタミン酸デカルボキシラーゼ67 (GAD67) はGABA作動性ニューロンについてのマーカーである。ガンマーアミノ酪酸A型 (GABA_A) 受容体は、哺乳動物脳における主な阻害性ニューロン受容体である。GABAによるそれらの活性化は固有のイオンチャネルを開き、塩化物が細胞に流入することを可能とし、引き続いて過剰分極を伴う。GABA_A受容体は、最も一般的には、化学量論の2つのαサブユニット、2つのβサブユニットおよび1つのγサブユニットを有するα、βおよびγサブユニットから構成されるペンタマー構造である。哺乳動物においては、α1-6、β1-3およびγ1-3を含めたいくつかのGABA_A受容体サブユニットアイソフォームがクローン化されている。GABA_A受容体のサブユニット組成はその薬理学的特性を決定する。ベンゾジアゼピン、例えば、ジアゼパムなどは、GABA_A受容体上の特異的部位に結合し、GABA誘発塩化物フラックスをアロステリックに増強させることによって、それらの治療効果を生じる。ベンゾジアゼピン結合部位に結合する他の化合物、例えば、FG7142 (N-メチル-β-カルボリン-3-カルボキサミド) およびα51A (3-(5-メチルイソオキサゾール3-イル)-6-[(1-メチル-1, 2, 3-トリアゾール4-イル)メチル-オキシ]-1, 2, 4-トリアゾロ[3, 4-α]フタラジン) はGABA誘発塩化物フラックスをアロステリック的に低下させることができる。

30

40

【0009】

GABAは哺乳動物における睡眠、不安、痙攣、鬱病、精神病、認識などの状態の調節において役割を果たす。

50

【0010】

Da Settimoら、Curr Med Chem (2007) 14:2680-2701; Mohler, Cell Tissue Res (2006) 326:505-516; Crestaniら、Mol Pharmacol (2001) 59:442-445; Nutt, J Clin Sleep Med (2006) 15:S7-S11; Lippaら、Proc Natl Sci USA (2005) 102:7380-7385; McKermanら、Nat Neurosci (2000) 3:587-92; Lowら、Science (2000) 290:131-134; Crestaniら、Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99:8980-8985; Dawsonら、J Pharmacol Exp Ther (2006) 316:1335-1345; Collinsonら、J Neurosci (2002) 22:5572-5580; Calabresiら、Trends Pharmacol Sci (2007) 28:188-195; Sanacoraら、CNS Neurol Disord Drug Targets (2007) 6:127-140)。

10

【0011】

D. 視床下部

視床下部背内側核 (DMH) は、各々、睡眠および覚醒状態の促進に関与する、腹側外側視索前 (VLPO) および外側視床下部領域 (LH) への入力最大の源の1つである (Chouら、J Neurosci (2002) 22:977-990; Chouら、J Neurosci (2003) 23:10691-10702; Saperら、Nature (2005) 437:1257-1263; Thompsonら、J Comp Neurol (1996) 376:143-173; Yoshidaら、J Comp Neurol (2006) 494:845-861)。特に、DMHニューロンは睡眠促進核VLPOに突出する主な阻害性神経伝達物質ガンマーアミノ酪酸 (GABA) を含有し、他方、グルタメート-チロトリン放出ホルモンニューロンは、オレキシンニューロンを含めて、覚醒促進LHに向けて突出する (Chouら、J Neurosci (2003) 23:10691-10702)。

20

【0012】

VLPO GABA作動性ニューロンは、LHにおいて覚醒促進オレキシンニューロンの刺激性を直接的に制御する (Gongら、J Physiol (2004) 556:935-946)。LHにおけるオレキシンニューロンは、マウス、イヌおよびヒトにおいて覚醒状態を促進する際に臨界的な役割を果たす (Chemelliら、Cell (1999) 98:437-451; Hungsら、Genome Res (2001) 11:531-539; Linら、(1999) 98:365-376; Peyronら、Nat Med (2000) 6:991-997)。

30

【0013】

E. Gタンパク質共役受容体

多数の受容体クラスがヒトに存在するが、これまで、ほとんどの豊富な治療的関連性は、Gタンパク質共役受容体 (GPCR) クラスによって表されている。ヒトゲノム内にはほぼ30,000~40,000の遺伝子があると見積もられており、これらのうち、ほぼ2%はGPCRをコードすると見積もられている。

40

【0014】

GPCRは医薬製品の開発のための重要な領域を表し：100の公知のGPCRのうちほぼ20から、全ての処方医薬のほぼ60%が開発されている。例えば、1999年には、トップ100のブランド名処方薬物のうち、以下の薬物がGPCRと相互作用する (薬物に関連して治療される主な病気および／または障害は括弧に入れて示される)。

【0015】

Clart in (登録商標) (アレルギー) Prozac (登録商標) (鬱病)
 Vasotec (登録商標) (高血圧) Paxil (登録商標) (鬱病) Zolof t (登録商標) (鬱病) Zyprexa (登録商標) (精神病性障害) C

50

o z a a r (登録商標) (高血圧) I m i t r e x (登録商標) (偏頭痛) Z a
 n t a c (登録商標) (反射) P r o p u l s i d (登録商標) (反射病) R i
 s p e r d a l (登録商標) (統合失調症) S e r e v e n t (登録商標) (喘息)
 P e p c i d (登録商標) (反射) G a s t e r (登録商標) (潰瘍) A t
 r o v e n t (登録商標) (気管支痙攣) E f f e x o r (登録商標) (鬱病)
 D e p a k o t e (登録商標) (癲癇) C a r d u r a (登録商標) (前立腺肥大)
 A l l e g r a (登録商標) (アレルギー) L u p r o n (登録商標) (前立腺
 癌) Z o l a d e x (登録商標) (前立腺癌) D i p r i v a n (登録商標) (麻酔)
 B u S p a r (登録商標) (不安) V e n t o l i n (登録商標) (気管
 支痙攣) H y t r i n (登録商標) (高血圧) W e l l b u t r i n (登録商標
) (鬱病) Z y r t e c (登録商標) (鼻炎) P l a v i x (登録商標) (M I
 /発作) T o p r o l - X L (登録商標) (高血圧) T e n o r m i n (登録商
 標) (狭心症) X a l a t a n (登録商標) (緑内障) S i n g u l a i r (登
 録商標) (喘息) D i o v a n (登録商標) (高血圧) H a r n a l (登録商標
) (前立腺過形成)

(Med Ad News 1999 Data)

GPCRは、その各々が膜に渡る、7つのアルファヘリックスを形成する22～24の間の疎水性アミノ酸の7つの配列を有する共通の構造的モチーフを共有する(各スパンは番号、すなわち、膜貫通1(TM1)、膜貫通2(TM2)などによって確認される)。膜貫通ヘリックスは、細胞膜の外部、または「細胞外」側の、膜貫通2および膜貫通3、膜貫通4および膜貫通5、および膜貫通6および膜貫通7の間のアミノ酸のストランドによって連結される(これらを、各々、「細胞外」領域1、2および3(EC-1、EC-2およびEC-3)という)。膜貫通ヘリックスは、細胞膜の内部の、または「細胞内」側の膜貫通1および膜貫通2、膜貫通3および膜貫通4、および膜貫通5および膜貫通6の間のアミノ酸のストランドによっても連結される(これらを、各々、「細胞内」領域1、2および3(IC-1、IC-2およびIC-3)という)。受容体の「カルボキシ」(「C」)末端は細胞内の細胞内空間に存在し、および受容体の「アミノ」(「N」)末端は細胞外部の細胞外空間に存在する。

【0016】

一般に、リガンドが受容体と結合する場合(しばしば、受容体の「活性化」という)、細胞内領域および細胞内「Gタンパク質」の間の共役を容易にする受容体の立体配座の変化がある。GPCRはGタンパク質に関して「混乱しており」、すなわち、GPCRは1を超えるGタンパク質と相互作用できることが報告されている。Kenakin, Life Sciences (1988) 43:1095-1101参照。他のGタンパク質が存在するが、現在、Gq、Gs、Gi、GzおよびGoが、同定されているGタンパク質である。Gタンパク質とのリガンド活性化GPCRの共役は、(「シグナル変換」といわれる)シグナリングカスケードプロセスを開始する。通常の条件下では、シグナル変換は、結局は、細胞の活性化または細胞の阻害をもたらす。理論に拘束されるつもりはないが、受容体のIC-3ループならびにカルボキシ末端はGタンパク質と相互作用すると考えられる。

【0017】

G共役GPCRは細胞内cAMPレベルを増加させる。Gi、Go、またはGzに共役したGPCRは細胞内cAMPレベルを減少させる。Gq共役GPCRは細胞内IP3およびCa²⁺レベルを増加させる。

【0018】

また、いくつかのクラスのGPCRを、G15またはG16などのホスホリパーゼC経路[Offermanns & Simon, J Biol Chem (1995) 270:15175-80]、または同一経路、例えば、ホスホリパーゼC[Milligan & Rees, Trends in Pharmaceutical Sciences (1999) 20:118-24]に非常に多数の異なるGPCRを共役するように設計された

キメラGタンパク質に共役するように見える混然としたGタンパク質もある。ホスホリパーゼC経路に共役したGPCRは細胞内IP3およびCa²⁺レベルを増加させる。

【0019】

生理学的条件下で、GPCRは2つの異なる立体配座：「不活性な」状態および「活性ナ」状態の間で平衡して細胞膜に存在する。不活性な状態の受容体は、細胞内シグナリング変換経路に連結して、生物学的応答をもたらすシグナル変換を開始することができない。受容体の立体配座を活性な状態に変化させることにより、（G-タンパク質を介する）変換経路への連結を可能にし、生物学的応答を生じる。

【0020】

受容体は、リガンド、または薬物などの化合物によって活性状態に安定化され得る。限定されないが、受容体のアミノ酸配列に対する修飾を含めた最近の発見は、活性状態の立体配座の受容体を促進し、安定化させるためのリガンドまたは薬物以外の手段を提供する。これらの手段は、受容体へのリガンド結合の効果をシミュレートすることによって、活性状態にある受容体を効果的に安定化させる。そのようなリガンド非依存性手段による安定化は「構成的受容体活性化」と呼ばれる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】Bixlerら、Am J Psychiatry (1979) 136 : 1257-1262

【非特許文献2】Karacanら、Soc Sci Med (1976) 10 : 239-244

【非特許文献3】Szabadi, Br J Clin Pharmacol (2006) 61 : 761-766

【非特許文献4】Harris, Respir Care Clin (2005) 11 : 567-586

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0022】

ヒトBRS-3ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は配列番号1に与えられ；該コードされたヒトBRS-3ポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号2に与えられる。

【0023】

出願人らは、予期せぬことに、視床下部背内側核(DMH)において、BRS-3ニューロンの大部分はGABA作動性ニューロンであることを見出した。本発明は、睡眠関連障害の治療に適した化合物としての候補化合物をスクリーニングするためのBRS-3に関連する方法をその特徴とする。本発明は、睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病性障害、および認識障害などのGABA関連神経学的障害のための医薬剤としての候補化合物をスクリーニングするためのBRS-3に関連する方法をその特徴とする。本発明の逆アゴニストおよびアンタゴニストは、睡眠を促進するための、および限定されないが、不眠症などを含めた睡眠を促進することによって緩和される障害の予防もしくは治療のための治療剤として有用である。本発明の逆アゴニストおよびアンタゴニストは、不眠症などの睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、汎発性不安障害またはパニック発作などの不安障害、癲癇、偏頭痛などの痙攣障害、大鬱病性障害などの鬱病性障害、統合失調症などの精神病性障害のための治療剤として有用である。本発明のアゴニストおよび部分アゴニストは、覚醒状態を促進するための、およびナルコレプシーなどに関連する過剰な眠気などの過剰な眠気を予防もしくは治療するための治療剤として有用である。本発明のアゴニストおよび部分アゴニストは、ナルコレプシーなどの睡眠状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認知症、またはアルツハイマー型の認知症などの認識障害のための治療剤として有用である。

【0024】

10

20

30

40

50

第1の態様において、本発明は、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

(a) 候補化合物を宿主細胞、またはGPCRを発現する宿主細胞の膜と接触させる工程であって、ここで、GPCRは：

(i) 配列番号2のアミノ酸配列；

(ii) 配列番号2のアミノ酸2～399；

(iii) 特異的プライマー配列番号3および配列番号4を用いるヒトDNA試料に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

(v) 配列番号2のアミノ酸配列における1個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(vi) 配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(vii) 配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；および

(viii) (i)～(vii)のいずれか1つの生物学的に活性な断片；
よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、工程；ならびに

(b) 受容体の機能性を阻害する候補化合物の能力を決定する工程；
を含み、

ここで、GPCRの機能性を阻害する候補化合物の能力は、候補化合物が、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法をその特徴とする。

【0025】

ある実施形態において、該方法は睡眠を促進するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、不安障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、痙攣障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、偏頭痛を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、鬱病障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。

【0026】

本発明は、加えて、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定す

るための方法であって、この第1の態様の工程(a)および(b)を含み、さらに：

(c) 所望により、工程(b)におけるGPCRの機能性を阻害する化合物を合成する工程；

(d) 工程(b)におけるGPCRの機能性を阻害する化合物を哺乳動物に投与する工程；および

(e) 化合物が、哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を有し、抗痙攣活性を有し、抗偏頭痛活性を有し、抗鬱病活性を有し、または抗精神病活性を有するか否かを決定する工程；

を含み、

ここで、哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を示し、抗痙攣活性を示し、抗偏頭痛活性を示し、抗鬱病活性を示し、または抗精神病活性を示す候補化合物の能力は、候補化合物が、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法をその特徴とする。

【0027】

ある実施形態において、該方法は睡眠を促進するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、不安障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該化合物は、痙攣障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、偏頭痛を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、鬱病障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。

【0028】

いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態において、哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は実験室動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は非ヒト霊長類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はげっ歯類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はラットである。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はマウスである。

【0029】

いくつかの実施形態において、哺乳動物において化合物が睡眠を促進するか否かの該決定は睡眠ポリグラフィを含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、該方法はGPCRの逆アゴニストを同定する工程を含む。いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、逆アゴニストを医薬として処方する工程を含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、該方法はGPCRのアンタゴニストを同定する工程を含む。いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、医薬として該アンタゴニストを処方する工程を含む。

【0032】

いくつかの実施形態において、該接触は、GPCRの公知のリガンドの存在下での接触

10

20

30

40

50

を含む。いくつかの実施形態において、該接触は、内因性ヒト B R S - 3 の公知のリガンドの存在下での接触を含む。

【0033】

いくつかの実施形態において、該接触は、G P C R の公知のアゴニストの存在下での接触を含む。いくつかの実施形態において、G P C R の公知のアゴニストは内因性ヒト B R S - 3 の公知のアゴニストである。G P C R の公知のアゴニストの存在下での接触を含む該接触に関するいくつかの実施形態において、候補化合物は、公知のアゴニストが G P C R に接触するのに先立って、G P C R と接触する。G P C R の公知のアゴニストの存在下での接触を含む該接触に関するいくつかの実施形態において、候補化合物は、公知のアゴニストが G P C R と接触するに先立って、数分までの間、G P C R と接触する。G P C R の公知のアゴニストの存在下での接触を含む該接触に関するいくつかの実施形態において、候補化合物は、公知のアゴニストが G P C R と接触するのに先立って、約 5 分まで、約 10 分まで、または約 30 分までの間、G P C R と接触する。

10

【0034】

いくつかの実施形態において、該接触は G P C R の公知のアゴニストの存在下での接触を含み、ここで、G P C R の公知のアゴニストは表 D から選択される化合物である。いくつかの実施形態において、該接触は G P C R の公知のアゴニストの存在下での接触を含み、ここで、G P C R の公知のアゴニストは化合物 D 28、化合物 D 30、化合物 D 31 または化合物 D 34 である。

【0035】

20

いくつかの実施形態において、該接触は、G P C R の公知のリガンドの不在下での接触を含む。いくつかの実施形態において、該接触は内因性ヒト B R S - 3 の公知のリガンドの不在下での接触を含む。いくつかの実施形態において、該接触は、G P C R の公知のアゴニストの不在下での接触を含む。いくつかの実施形態において、該接触は、内因性ヒト B R S - 3 の公知のアゴニストの不在下での接触を含む。

【0036】

いくつかの実施形態において、該方法は第 2 のメッセンジャーを検出することを含む。

【0037】

いくつかの実施形態において、該決定は、環状 A M P (c A M P)、環状 G M P (c G M P)、イノシトール 1, 4, 5 - 三リン酸 (I P 3)、ジアシルグリセロール (D A G)、M A P キナーゼ活性、M A P K / E R K キナーゼキナーゼ 1 (M E K K 1) 活性、および $C a^{2+}$ よりなる群から選択される第 2 のメッセンジャーのレベルの測定を含むプロセスによるものである。いくつかの実施形態において、該第 2 のメッセンジャーは I P 3 である。いくつかの実施形態において、細胞内 I P 3 のレベルは減少する。いくつかの実施形態において、該第 2 のメッセンジャーは $C a^{2+}$ である。いくつかの実施形態において、細胞内 $C a^{2+}$ のレベルは減少する。

30

【0038】

いくつかの実施形態において、該決定は、メラニン保有細胞アッセイの使用を含むプロセスによるものである。いくつかの実施形態において、メラニン保有細胞は、色素分散を受ける。いくつかの実施形態において、候補化合物はアゴニスト誘導色素分散を阻害する。いくつかの実施形態において、候補化合物は構成的に（例えば、アゴニスト非依存性）誘導された色素分散を阻害する。

40

【0039】

いくつかの実施形態において、該決定は、G P C R を含む膜への G T P γ S 結合の測定を含むプロセスによる。いくつかの実施形態において、G P C R を含む膜への G T P γ S 結合は減少する。

【0040】

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、候補化合物によって引き起こされた G P C R の変調を、G P C R を G P C R の公知のモジュレータに接触させることによって引き起こされた G P C R の第 2 の変調と比較する工程を含む。

50

【0041】

いくつかの実施形態において、ベースライン細胞内応答は、候補化合物の不在下でのベースライン応答と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%だけ候補化合物の存在下において阻害される。

【0042】

いくつかの実施形態において、ベースライン細胞内応答（例えば、公知アゴニストの不在下での応答）は、逆アゴニストの不在下でのベースライン応答と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%だけ逆アゴニストの存在下において阻害される。

10

【0043】

いくつかの実施形態において、ベースライン細胞内応答（例えば、公知のアゴニストの存在下での応答）は、アンタゴニストの不在下でのベースライン応答と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%だけアンタゴニストの存在下において阻害される。

20

【0044】

また、本発明は、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、あるいは睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

（a'）宿主細胞、またはGPCRを発現する宿主細胞の膜を、候補化合物の存在下または不在下において、所望により標識された該GPCRに対する公知のリガンドとを接触させる工程であって、ここで、GPCRは：

（i）配列番号2のアミノ酸配列；

30

（ii）配列番号2のアミノ酸2～399；

（iii）特異的プライマー配列番号3および配列番号4を用いるヒトDNA試料に対するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

（v）配列番号2のアミノ酸配列における1個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

（vi）配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

40

（vii）配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；および

（viii）（i）～（vii）のいずれか1つの生物学的に活性な断片；よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、工程；

（b'）該公知のリガンドおよび該GPCRの間の複合体を検出する工程；

（c'）該候補化合物の不在下よりも該候補化合物の存在下においてより少ない該複合体が形成されるか否かを決定する工程；

（d'）所望により、その存在下でより少ない該複合体が工程（c'）で形成される化

50

合物を合成する工程；

(e') その存在下でより少ない該複合体が工程(c')で形成される化合物を哺乳動物に投与する工程；ならびに

(f') 化合物が、哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を有し、抗痙攣活性を有し、抗偏頭痛活性を有し、抗鬱病活性を有し、または抗精神病活性を有するか否かを決定する工程；

を含み、

ここで、哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を示し、抗痙攣活性を示し、抗偏頭痛活性を示し、抗鬱病活性を示し、または抗精神病活性を示す候補化合物の能力は、候補化合物が、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法に関する。

【0045】

ある実施形態において、該方法は睡眠を促進するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、不安障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、痙攣障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、偏頭痛を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、鬱病障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。

【0046】

いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態において、哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は実験室動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は非ヒト霊長類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はげっ歯類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はラットである。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はマウスである。

【0047】

いくつかの実施形態において、化合物が哺乳動物において睡眠を促進するか否かの該決定は睡眠ポリグラフィを含む。

【0048】

いくつかの実施形態において、該所望により標識された公知のリガンドが放射性標識されている。

【0049】

いくつかの実施形態において、公知のリガンドは表Dから選択される化合物である。いくつかの実施形態において、公知のリガンドが化合物D28、化合物D30、化合物D31、または化合物D34である。いくつかの実施形態において、公知のリガンドは表Eから選択される化合物である。いくつかの実施形態において、公知のリガンドは化合物E21または化合物E22である。

【0050】

いくつかの実施形態において、該候補化合物の不在下よりも該候補化合物の存在下においてより少ない該複合体が形成されるか否かの決定は、該候補化合物の不在下よりも該候

10

20

30

40

50

補化合物の存在下において、少なくとも約10%少ない、少なくとも約20%少ない、少なくとも約30%少ない、少なくとも約40%少ない、少なくとも約50%少ない、少なくとも約60%少ない、少なくとも約70%少ない、少なくとも約75%少ない、少なくとも約80%少ない、少なくとも約85%少ない、少なくとも約90%少ない、または少なくとも約95%少ない該複合体が形成されるか否かを決定することを含む。

【0051】

いくつかの実施形態において、該方法は、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療する、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を単離するためのものである。

10

【0052】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は断片化された睡眠構造(sleep architecture)を含む。

【0053】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は精神生理学的不眠症(psychophysiological insomnia)、睡眠状態誤認(sleep state misperception)、特発性不眠症(idiopathic insomnia)、閉塞性睡眠時無呼吸症候群(obstructive sleep apnea syndrome)、中枢性肺泡低換気症候群(central alveolar hypoventilation syndrome)、周期的四肢運動障害(periodic limb movement disorder)、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害(hypnotic-dependent sleep disorder)、毒物誘発性睡眠障害(toxin-induced sleep disorder)、タイムゾーン変化(時差ぼけ)症候群(time zone change (jet lag) syndrome)、交代勤務睡眠障害(shift work sleep disorder)、不規則睡眠覚醒パターン(irregular sleep-wake pattern)、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群(advanced sleep phase syndrome)、および非24時間睡眠覚醒障害(non-24 hour sleep-wake disorder)よりなる群から選択される。

20

30

【0054】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は不眠症である。

【0055】

いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴を伴わない広場恐怖症、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、急性ストレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、不安障害は全般性不安障害である。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作である。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇および非癲癇発作よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇である。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害、気分変調性障害、および特定されない鬱病障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害である。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症、統合失調障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症である。いくつかの実施形態において、統合失調症は共有型統合失調症、解体型統合失調症、緊張型統合失調症、未分化統合失調症および残遺型統合失調症から選択される。

40

50

【0056】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は真核生物細胞である。

【0057】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、哺乳動物宿主細胞はCHO細胞、COS-7細胞、MCB3901細胞、293細胞または293T細胞である。

【0058】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は酵母細胞である。

【0059】

いくつかの実施形態において、宿主細胞はメラニン保有細胞である。

10

【0060】

いくつかの実施形態において、Gタンパク質共役受容体は配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む。

【0061】

いくつかの実施形態において、Gタンパク質共役受容体は配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0062】

いくつかの実施形態において、Gタンパク質共役受容体は、配列番号2を有する受容体の構造的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む。

20

【0063】

いくつかの実施形態において、PCRはRT-PCRである。

【0064】

いくつかの実施形態において、ヒトDNAはBRS-3を発現する組織または細胞型に由来するヒトcDNAである。いくつかの実施形態において、ヒトcDNAは視床下部に由来する。

【0065】

いくつかの実施形態において、特異的プライマー配列番号3および配列番号4を用いるヒトDNA試料に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体は、内因性BRS-3 Gタンパク質共役受容体である。

30

【0066】

いくつかの実施形態において、GPCRは組換体である。

【0067】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は組換え宿主細胞である。

【0068】

いくつかの実施形態において、GPCRは内因性である。いくつかの実施形態において、内因性であるGPCRは内因性哺乳動物GPCRである。いくつかの実施形態において、内因性哺乳動物GPCRであるGPCRは内因性哺乳動物BRS-3である。いくつかの実施形態において、GPCRは非内因性である。

40

【0069】

いくつかの実施形態において、GPCRは哺乳動物BRS-3である。

【0070】

いくつかの実施形態において、該宿主細胞は、GPCRをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

【0071】

いくつかの実施形態において、該決定は、GPCRを含む膜で行われる。

【0072】

いくつかの実施形態において、候補化合物は小分子である。

【0073】

50

いくつかの実施形態において、候補化合物はポリペプチドである。いくつかの実施形態において、候補化合物は抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物はポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、候補化合物は抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、候補化合物は脂質である。いくつかの実施形態において、候補化合物はポリペプチドではない。いくつかの実施形態において、候補化合物はペプチドではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は脂質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は非内因性である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、真核生物または原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は哺乳動物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rの機能性を阻害、または刺激することが知られていない化合物である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rのアゴニストであることが知られていない化合物である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rの部分アゴニストであることが知られていない化合物である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rの逆アゴニストであることが知られていない化合物である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rのアンタゴニストであることが知られていない化合物である。

10

【0074】

20

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または工程（c'）において、その存在下でより少ない該複合体が形成される化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の合成を含む。いくつかの実施形態において、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、G P C Rの逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

【0075】

30

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに：所望により、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または工程（c'）において、その存在下でより少ない該複合体が形成される化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の構造を決定する工程；および、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または工程（c'）において、その存在下でより少ない該複合体が形成される化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、あるいは工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または工程（c'）において、その存在下でより少ない該複合体が形成される化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の名称または構造を提供することを含む。いくつかの実施形態において、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、G P C Rの逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

40

【0076】

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに：所望により、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または工程（c'）において、その存在下でより少な

50

い複合体が形成される化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の構造を決定する工程；所望により、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または工程（c'）において、その存在下でより少ない該複合体が形成される化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の名称または構造を提供する工程；次いで、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または工程（c'）において、その存在下でより少ない該複合体が形成される化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を生成または合成することを含む。いくつかの実施形態において、工程（b）においてG P C Rの機能性を阻害する化合物、または睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、G P C Rの逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

10

20

【0077】

第2の態様において、本発明は、第1の態様の方法に従って同定可能な、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物をその特徴とする。

【0078】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、第1の実施形態の方法に従って同定される。

【0079】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は断片化された睡眠構造を含む。

30

【0080】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ばけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0081】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は不眠症である。

【0082】

いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴を伴わない広場恐怖症、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、急性ストレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、不安障害は全般性不安障害である。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作である。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇および非癲癇発作よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇である。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害、気分変調性障害、および特定されない鬱病障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病

40

50

障害である。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症、統合失調障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症である。いくつかの実施形態において、統合失調症は共有型統合失調症、解体型統合失調症、緊張型統合失調症、未分化統合失調症および残遺型統合失調症から選択される。

【0083】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRの逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRの逆アゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRのアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、GPCRの逆アゴニストもしくはアンタゴニストは哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストであるGPCRの逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、BRS-3選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3はヒトBRS-3である。

【0084】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は小分子である。

【0085】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドでない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はペプトイドではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障

害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は非内因性である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

10

【0086】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3において、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、トランスフェクトされたCHO細胞からの膜で行われるGTP γ S結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞において行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞において行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞において行われるIP3アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされたCOS-7細胞またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、上記モジュレータは、該アッセイにおいて10 μ M未満、該アッセイにおいて9 μ M未満、該アッセイにおいて8 μ M未満、該アッセイにおいて7 μ M未満、該アッセイにおいて6 μ M未満、該アッセイにおいて5 μ M未満、該アッセイにおいて4 μ M未満、該アッセイ

20

30

40

50

において3 μ M未満、該アッセイにおいて2 μ M未満、該アッセイにおいて1 μ M未満、該アッセイにおいて900 nM未満、該アッセイにおいて800 nM未満、該アッセイにおいて700 nM未満、該アッセイにおいて600 nM未満、該アッセイにおいて500 nM未満、該アッセイにおいて400 nM未満、該アッセイにおいて300 nM未満、該アッセイにおいて200 nM未満、該アッセイにおいて100 nM未満、該アッセイにおいて90 nM未満、該アッセイにおいて80 nM未満、該アッセイにおいて70 nM未満、該アッセイにおいて60 nM未満、該アッセイにおいて50 nM未満、該アッセイにおいて40 nM未満、該アッセイにおいて30 nM未満、該アッセイにおいて20 nM未満、該アッセイにおいて10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選

10

20

【0087】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、経口的に活性である。

【0088】

第3の態様において、本発明は、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物をその特徴とする。

30

【0089】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、BRS-3選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

40

【0090】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を

50

予防もしくは治療するのに適した化合物は、第2の態様に従う。

【0091】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は断片化された睡眠構造を含む。

【0092】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0093】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は不眠症である。

【0094】

いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴を伴わない広場恐怖症、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、急性ストレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、不安障害は全般性不安障害である。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作である。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇および非癲癇発作よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇である。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害、気分変調性障害、および特定されない鬱病障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害である。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症、統合失調障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症である。いくつかの実施形態において、統合失調症は共有型統合失調症、解体型統合失調症、緊張型統合失調症、未分化統合失調症および残遺型統合失調症から選択される。

【0095】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、小分子である。

【0096】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適

10

20

30

40

50

した化合物は、ポリペプチドでない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ペプチドでない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、脂質でない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、非内因性である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

10

20

【0097】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3において、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 μ M未満、または約10 μ M未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、トランスフェクトされたCHO細胞からの膜で行われるGTP γ Sで結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞において行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞で行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞において行われるIP3アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされたCOS-7細胞またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡

30

40

50

眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて10 μ M未満、該アッセイにおいて9 μ M未満、該アッセイにおいて8 μ M未満、該アッセイにおいて7 μ M未満、該アッセイにおいて6 μ M未満、該アッセイにおいて5 μ M未満、該アッセイにおいて4 μ M未満、該アッセイにおいて3 μ M未満、該アッセイにおいて2 μ M未満、該アッセイにおいて1 μ M未満、該アッセイにおいて900 nM未満、該アッセイにおいて800 nM未満、該アッセイにおいて700 nM未満、該アッセイにおいて600 nM未満、該アッセイにおいて500 nM未満、該アッセイにおいて400 nM未満、該アッセイにおいて300 nM未満、該アッセイにおいて200 nM未満、該アッセイにおいて100 nM未満、該アッセイにおいて90 nM未満、該アッセイにおいて80 nM未満、該アッセイにおいて70 nM未満、該アッセイにおいて60 nM未満、該アッセイにおいて50 nM未満、該アッセイにおいて40 nM未満、該アッセイにおいて30 nM未満、該アッセイにおいて20 nM未満、該アッセイにおいて10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

10

20

30

【0098】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、経口的に活性である。

【0099】

第4の態様において、本発明は、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、および医薬上許容される担体を混合することを含む、医薬組成物を調製する方法をその特徴とする。

【0100】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストで

40

50

ある。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒト B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、B R S - 3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

【0101】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、第2の態様に従う。

【0102】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は断片化された睡眠構造を含む。

【0103】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0104】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は不眠症である。

【0105】

いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴を伴わない広場恐怖症、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、急性ストレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、不安障害は全般性不安障害である。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作である。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇および非癲癇発作よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇である。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害、気分変調性障害、および特定されない鬱病障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害である。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症、統合失調障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症である。いくつかの実施形態において、統合失調症は共有型統合失調症、解体型統合失調症、緊張型統合失調症、未分化統合失調症および残遺型統合失調症から選択される。

【0106】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRの逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRの逆アゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRのアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、GPCRの逆アゴニストもしくはアンタゴニストは哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、ヒト B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、配列番号2のアミノ酸配列を有するヒト B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

10

20

30

40

50

【0107】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである GPCR の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、BRS-3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 はヒト BRS-3 である。

【0108】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、小分子である。

【0109】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片でない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、脂質である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ポリペプチドでない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ペプチドでない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、脂質ではない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、非内因性である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物または真核生物が天然で生産する物質でない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物が天然で生産する物質でない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、真核生物が天然で生産する物質でない。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物が天然で生産する物質でない。

【0110】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによ

10

20

30

40

50

て緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3において、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、トランスフェクトされたCHO細胞からの膜で行われるGTP γ S結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラノーマ保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞で行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞において行われるIP3アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞またはトランスフェクトされたメラノーマ保有細胞またはトランスフェクトされたCOS-7細胞またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて10 μ M未満、該アッセイにおいて9 μ M未満、該アッセイにおいて8 μ M未満、該アッセイにおいて7 μ M未満、該アッセイにおいて6 μ M未満、該アッセイにおいて5 μ M未満、該アッセイにおいて4 μ M未満、該アッセイにおいて3 μ M未満、該アッセイにおいて2 μ M未満、該アッセイにおいて1 μ M未満、該アッセイにおいて900 nM未満、該アッセイにおいて800 nM未満、該アッセイにおいて700 nM未満、該アッセイにおいて600 nM未満、該アッセイにおいて500 nM未満、該アッセイにおいて400 nM未満、該アッセイにおいて300 nM未満、該アッセイにおいて200 nM未満、該アッセイにおいて100 nM未満、該アッセイにおいて90 nM未満、該アッセイにおいて80 nM未満、該アッセイにおいて70 nM未満、該アッセイにおいて60 nM未満、該アッセイにおいて50 nM未満、該アッセイにおいて40 nM未満、該アッセイにおいて30 nM未満、該アッセイにおいて20 nM未満、該アッセイにおいて10 nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和さ

れる睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約 $10\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約 $10\text{ nM} \sim 100\text{ nM}$ の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける IC_{50} を持つアゴニストまたはアンタゴニストである。

【0111】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、経口的に活性である。

10

【0112】

第5の態様において、本発明は、治療上有効量の哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または該逆アゴニストもしくはアンタゴニストを含む医薬上許容される組成物、および医薬上許容される担体を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含み、睡眠を促進する、あるいは睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療する方法をその特徴とする。

【0113】

いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。

20

【0114】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはヒト BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、ヒト BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、配列番号2のアミノ酸配列を有するヒト BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒト BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは BRS-3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

【0115】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは第2の態様に従う。

30

【0116】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は断片化された睡眠構造を含む。

【0117】

いくつかの実施形態において、睡眠の促進、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の予防もしくは治療は、睡眠の強化を促進することを含む。

【0118】

いくつかの実施形態において、睡眠の促進、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の予防もしくは治療は、デルタ力を増加させることを含む。

【0119】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

40

【0120】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は不眠症である。

【0121】

いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴を伴わない広場恐怖症、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、急性ス

50

トレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、不安障害は全般性不安障害である。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作である。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇および非癲癇発作よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇である。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害、気分変調性障害、および特定されない鬱病障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害である。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症、統合失調障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症である。いくつかの実施形態において、統合失調症は共有型統合失調症、解体型統合失調症、緊張型統合失調症、未分化統合失調症および残遺型統合失調症から選択される。

10

【0122】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは小分子である。

【0123】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは脂質である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはポリペプチドでない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはペプチドでない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは脂質でない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは非内因性である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、原核生物が天然で生産する物質でない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

20

30

【0124】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、ヒト BRS-3 において、約 $10 \mu\text{M}$ 未満、約 $1 \mu\text{M}$ 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 $10 \text{ nM} \sim 10 \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 $10 \text{ nM} \sim 1 \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 $10 \text{ nM} \sim 100 \text{ nM}$ の間隔から選択される値未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、トランスフェクトされた CHO 細胞からの膜で行われる GTP γ S 結合ア

40

50

ッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞で行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞で行われるIP3アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100nM未満、または約10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされたCOS-7細胞またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、該アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100nM未満、または約10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、該アッセイにおいて10 μ M未満、該アッセイにおいて9 μ M未満、該アッセイにおいて8 μ M未満、該アッセイにおいて7 μ M未満、該アッセイにおいて6 μ M未満、該アッセイにおいて5 μ M未満、該アッセイにおいて4 μ M未満、該アッセイにおいて3 μ M未満、該アッセイにおいて2 μ M未満、該アッセイにおいて1 μ M未満、該アッセイにおいて900nM未満、該アッセイにおいて800nM未満、該アッセイにおいて700nM未満、該アッセイにおいて600nM未満、該アッセイにおいて500nM未満、該アッセイにおいて400nM未満、該アッセイにおいて300nM未満、該アッセイにおいて200nM未満、該アッセイにおいて100nM未満、該アッセイにおいて90nM未満、該アッセイにおいて80nM未満、該アッセイにおいて70nM未満、該アッセイにおいて60nM未満、該アッセイにおいて50nM未満、該アッセイにおいて40nM未満、該アッセイにおいて30nM未満、該アッセイにおいて20nM未満、該アッセイにおいて10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約10nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約10nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約10nM～100nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

【0125】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは表Eから選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは化合物E21である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは化合物E22である。

【0126】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアンタゴニストは表Eから選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアンタゴニストは化合物E21である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアンタゴニストは化合物E22である。

【0127】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは経口的に活性である。

【0128】

第6の態様において、本発明は、睡眠を促進するための、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するための医薬の製造のための、哺乳動物BRS-3の逆アゴニス

10

20

30

40

50

トもしくはアンタゴニストの使用をその特徴とする。

【0129】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するための、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するための医薬の製造のための、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストの使用は、哺乳動物において、睡眠を促進するための、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するための医薬の製造のための、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストの使用である。

【0130】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3はヒトBRS-3である。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【0131】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、ヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒトBRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはBRS-3選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

【0132】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは第2の態様に従う。

【0133】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は断片化された睡眠構造を含む。

【0134】

いくつかの実施形態において、睡眠の促進、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の予防もしくは治療は、睡眠の定着(sleep consolidation)を促進することを含む。

【0135】

いくつかの実施形態において、睡眠の促進、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の予防もしくは治療は、デルタ力(delta power)を増加させることを含む。

【0136】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化(時差ぼけ)症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0137】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は不眠症である。

【0138】

いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴を伴わない広場恐怖症、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、急性ストレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、不安障害は全般性不安障害である。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作である。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇および非癲癇発作よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇である。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害、気分変調性障害、および特定されな

10

20

30

40

50

い鬱病障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害である。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症、統合失調障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症である。いくつかの実施形態において、統合失調症は共有型統合失調症、解体型統合失調症、緊張型統合失調症、未分化統合失調症および残遺型統合失調症から選択される。

【0139】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは小分子である。

10

【0140】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、抗体またはその抗原結合断片でない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは脂質である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはポリペプチドでない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはペプチドでない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは脂質でない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは非内因性である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、原核生物または真核生物が天然で生産する物質でない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、真核生物が天然で生産する物質でない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

20

30

【0141】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、ヒト B R S - 3 において、約 $10 \mu\text{M}$ 未満、約 $1 \mu\text{M}$ 未満、約 100nM 未満、または約 10nM 未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 10nM ~ $10 \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 10nM ~ $1 \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 10nM ~ 100nM の間隔から選択される値未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、トランスフェクトされた C H O 細胞からの膜で行われる G T P γ S 結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた H e L a 細胞で行われる F L I P R アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた C O S - 7 細胞もしくは C H O 細胞もしくは H e L a 細胞で行われる I P 3 アッセイにおいて、約 $10 \mu\text{M}$ 未満、約 $1 \mu\text{M}$ 未満、約 100nM 未満、または約 10nM 未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、トランスフェクトされた C H O 細胞、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされた C O S - 7 細胞またはトランスフェ

40

50

クトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、該アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100nM未満、または約10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、該アッセイにおいて10 μ M未満、該アッセイにおいて9 μ M未満、該アッセイにおいて8 μ M未満、該アッセイにおいて7 μ M未満、該アッセイにおいて6 μ M未満、該アッセイにおいて5 μ M未満、該アッセイにおいて4 μ M未満、該アッセイにおいて3 μ M未満、該アッセイにおいて2 μ M未満、該アッセイにおいて1 μ M未満、該アッセイにおいて900nM未満、該アッセイにおいて800nM未満、該アッセイにおいて700nM未満、該アッセイにおいて600nM未満、該アッセイにおいて500nM未満、該アッセイにおいて400nM未満、該アッセイにおいて300nM未満、該アッセイにおいて200nM未満、該アッセイにおいて100nM未満、該アッセイにおいて90nM未満、該アッセイにおいて80nM未満、該アッセイにおいて70nM未満、該アッセイにおいて60nM未満、該アッセイにおいて50nM未満、該アッセイにおいて40nM未満、該アッセイにおいて30nM未満、該アッセイにおいて20nM未満、該アッセイにおいて10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約10nM~10 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約10nM~1 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約10nM~100nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

【0142】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、表Eから選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは化合物E21である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは化合物E22である。

【0143】

いくつかの実施形態において、哺乳動物のBRS-3のアンタゴニストは表Eから選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアンタゴニストは化合物E21である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアンタゴニストは化合物E22である。

【0144】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、経口的に活性である。

【0145】

第7の態様において、本発明は、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または逆アゴニストもしくはアンタゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物をその特徴とする。

【0146】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3はヒトBRS-3である。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【0147】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによ

10

20

30

40

50

て緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物は、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または逆アゴニストもしくはアンタゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物は、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物である。

10

【0148】

いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または逆アゴニストもしくはアンタゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物は、哺乳動物において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または逆アゴニストもしくはアンタゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物である。

20

【0149】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、ヒト B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、ヒト B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するヒト B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒト B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、B R S - 3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

30

【0150】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは第 2 の態様に従う。

【0151】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は断片化された睡眠構造を含む。

【0152】

いくつかの実施形態において、睡眠の促進、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の予防もしくは治療は、睡眠の定着を促進することを含む。

【0153】

いくつかの実施形態において、睡眠の促進、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の予防もしくは治療は、デルタ力を増大することを含む。

40

【0154】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 24 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0155】

いくつかの実施形態において、睡眠障害は不眠症である。

50

【0156】

いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴を伴わない広場恐怖症、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫性障害、心的外傷後ストレス障害、急性ストレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、不安障害は全般性不安障害である。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作である。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇および非癲癇発作よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇である。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害、気分変調性障害、および特定されない鬱病障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害である。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症、統合失調障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症である。いくつかの実施形態において、統合失調症は共有型統合失調症、解体型統合失調症、緊張型統合失調症、未分化統合失調症および残遺型統合失調症から選択される。

10

【0157】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、小分子である。

20

【0158】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、ポリペプチドである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、ポリペプチドであり、ただし、該ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、脂質である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、ポリペプチドではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストはペプトイドではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、脂質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、非内因性である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

30

40

【0159】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、ヒト BRS-3 において、約 $10\ \mu\text{M}$ 未満、約 $1\ \mu\text{M}$ 未満、約 $100\ \text{nM}$ 未満、または約 $10\ \text{nM}$ 未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 $10\ \text{nM}$ ~ $10\ \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 $10\ \text{nM}$ ~ $1\ \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の IC_{50} を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態におい

50

て、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 10 nM ~ 100 nM の間隔から選択される値未満の IC₅₀ を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、トランスフェクトされた CHO 細胞からの膜で行われる GTPγS 結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラノーマ保有細胞で行われる色素分散アッセイにのいて、またはトランスフェクトされた HeLa 細胞で行われる FLIPR アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた COS-7 細胞もしくは CHO 細胞もしくは HeLa 細胞で行われる IP3 アッセイにおいて、約 10 μM 未満、約 1 μM 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の IC₅₀ を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、トランスフェクトされた CHO 細胞またはトランスフェクトされたメラノーマ保有細胞またはトランスフェクトされた COS-7 細胞またはトランスフェクトされた HeLa 細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する組換え BRS-3 受容体を発現する。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、該アッセイにおいて、約 10 μM 未満、約 1 μM 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の IC₅₀ を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、該アッセイにおいて 10 μM 未満、該アッセイにおいて 9 μM 未満、該アッセイにおいて 8 μM 未満、該アッセイにおいて 7 μM 未満、該アッセイにおいて 6 μM 未満、該アッセイにおいて 5 μM 未満、該アッセイにおいて 4 μM 未満、該アッセイにおいて 3 μM 未満、該アッセイにおいて 2 μM 未満、該アッセイにおいて 1 μM 未満、該アッセイにおいて 900 nM 未満、該アッセイにおいて 800 nM 未満、該アッセイにおいて 700 nM 未満、該アッセイにおいて 600 nM 未満該アッセイにおいて 500 nM 未満、該アッセイにおいて 400 nM 未満、該アッセイにおいて 300 nM 未満、該アッセイにおいて 200 nM 未満、該アッセイにおいて 100 nM 未満、該アッセイにおいて 90 nM 未満、該アッセイにおいて 80 nM 未満、該アッセイにおいて 70 nM 未満、該アッセイにおいて 60 nM 未満、該アッセイにおいて 50 nM 未満、該アッセイにおいて 40 nM 未満、該アッセイにおいて 30 nM 未満、該アッセイにおいて 20 nM 未満、該アッセイにおいて 10 nM 未満の IC₅₀ を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 10 nM ~ 10 μM の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける IC₅₀ を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 10 nM ~ 1 μM の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける IC₅₀ を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、約 10 nM ~ 100 nM の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける IC₅₀ を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

10

20

30

40

【0160】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは表 E から選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、化合物 E21 である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、化合物 E22 である。

【0161】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアンタゴニストは表 E から選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアンタゴニストは化合物 E21 である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアンタゴニストは化合物 E22 である。

【0162】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、経口的に活性である。

50

【0163】

第8の態様において、本発明は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

(a) 候補化合物を宿主細胞、またはGPCRを発現する宿主細胞の膜と接触させる工程であって、ここで、GPCRは：

(i) 配列番号2のアミノ酸配列；

(ii) 配列番号2のアミノ酸2～399；

(iii) 特異的プライマー配列番号3および配列番号4を用いるヒトDNA試料に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

(v) 配列番号2のアミノ酸配列における1個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(vi) 配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(vii) 配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；および

(viii) (i)～(vii)のいずれか1つの生物学的に活性な断片；
よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、工程；ならびに

(b) 受容体の機能性を刺激する候補化合物の能力を決定する工程；
を含み、

ここで、GPCRの機能性を刺激する候補化合物の能力は、候補化合物が、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法をその特徴とする。

【0164】

ある実施形態において、該方法は覚醒状態を促進するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、過剰な眠気を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。

【0165】

本発明は、加えて、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって、この第8の態様の工程(a)および(b)を含み、さらに：

(c) 所望により、工程(b)におけるGPCRの機能性を刺激する化合物を合成する工程；

(d) 工程(b)におけるGPCRの機能性を刺激する化合物を哺乳動物に投与する工

10

20

30

40

50

程；および

(e) 化合物が哺乳動物において覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を有するか否かを決定する工程；

を含み、

ここで、哺乳動物において、覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を示す候補化合物の能力は、候補化合物が覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法をその特徴とする。

【0166】

10

ある実施形態において、該方法は覚醒状態を促進するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、過剰な眠気を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。

【0167】

20

いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態において、哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は実験室動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は非ヒト霊長類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はげっ歯類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はラットである。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はマウスである。

【0168】

いくつかの実施形態において、化合物が哺乳動物において覚醒状態を促進するか否かの該決定は睡眠ポリグラフィを含む。

【0169】

30

いくつかの実施形態において、該方法は G P C R のアゴニストを同定する工程を含む。いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、該アゴニストを医薬として処方する工程を含む。

【0170】

いくつかの実施形態において、該方法は G P C R の部分アゴニストを同定する工程を含む。いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、該部分アゴニストを医薬として処方する工程を含む。

【0171】

いくつかの実施形態において、該接触は、G P C R の公知のリガンドの不在下での接触を含む。いくつかの実施形態において、該接触は、内因性ヒト B R S - 3 の公知のリガンドの不在下での接触を含む。いくつかの実施形態において、該接触は、G P C R の公知のアゴニストの不在下での接触を含む。いくつかの実施形態において、該接触は、内因性ヒト B R S - 3 の公知のアゴニストの不在下での接触を含む。

40

【0172】

いくつかの実施形態において、該方法は第 2 のメッセンジャーを検出することを含む。

【0173】

いくつかの実施形態において、該決定は、環状 A M P (c A M P)、環状 G M P (c G M P)、イノシトール 1, 4, 5 - 三リン酸 (I P 3)、ジアセチルグリセロール (D A G)、M A P キナーゼ活性、M A P K / E R K キナーゼキナーゼ 1 (M E K K 1) 活性、および $C a^{2+}$ よりなる群から選択される第 2 のメッセンジャーのレベルの測定を含むプ

50

ロセスによる。いくつかの実施形態において、該第2のメッセンジャーはIP3である。いくつかの実施形態において、細胞内IP3のレベルは増加する。いくつかの実施形態において、該第2のメッセンジャーは Ca^{2+} である。いくつかの実施形態において、細胞内 Ca^{2+} のレベルは増加する。

【0174】

いくつかの実施形態において、該決定は、メラニン保有細胞アッセイの使用を含むプロセスによる。いくつかの実施形態において、メラニン保有細胞は色素分散を受ける。いくつかの実施形態において、候補化合物は色素分散を刺激する。

【0175】

いくつかの実施形態において、該決定は、GPCRを含む膜へのGTPγS結合の測定を含むプロセスによる。いくつかの実施形態において、GPCRを含む膜へのGTPγS結合が増加される。

【0176】

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、候補化合物によって引き起こされたGPCRの変調を、GPCRをGPCRの公知のモジュレータに接触させることによって引き起こされたGPCRの第2の変調と比較する工程を含む。

【0177】

いくつかの実施形態において、ベースライン細胞内応答は、候補化合物の不在下でのベースライン応答と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約400%、または少なくとも約500%だけ候補化合物の存在下において刺激される。

【0178】

いくつかの実施形態において、ベースライン細胞内応答は、アゴニストまたは部分アゴニストの不在下でのベースライン応答と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約400%、または少なくとも約500%だけアゴニストまたは部分アゴニストの存在下において刺激される。

【0179】

また、本発明は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

(a') 候補化合物の存在下または不在下で、宿主細胞またはGPCRを発現する宿主細胞の膜を、所望により標識された該GPCRに対する公知のリガンドとを接触させる工程であって、ここで、GPCRは：

(i) 配列番号2のアミノ酸配列；

(ii) 配列番号2のアミノ酸2～399；

(iii) 特異的プライマー配列番号3および配列番号4を用いるヒトDNA試料に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

(v) 配列番号2のアミノ酸配列における1個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(vi) 配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(vii) 配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク

10

20

30

40

50

質共役受容体のアミノ酸配列；および

(v i i i) (i) ~ (v i i) のいずれか 1 つの生物学的に活性な断片；
よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、工程；

(b') 該公知のリガンドおよび該 G P C R の間の複合体を検出する工程；

(c') 該候補化合物の不在下よりも該候補化合物の存在下においてより少ない該複合体が形成されるか否かを決定する工程；

(d') 所望により、その存在下でより少ない該複合体が工程 (c') で形成される化合物を合成する工程；

(e') その存在下でより少ない該複合体が工程 (c') で形成される化合物を哺乳動物に投与する工程；ならびに

(f') 化合物が、哺乳動物において覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を有するか否かを決定する工程；

を含み、

ここで、哺乳動物において、覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を示す候補化合物の能力は、候補化合物が、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法に関する。

【0180】

ある実施形態において、該方法は、覚醒状態を促進するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、過剰な眠気を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。ある実施形態において、該方法は、認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法である。

【0181】

いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態において、哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態において非ヒト哺乳動物は実験室動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は非ヒト霊長類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はげっ歯類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はラットである。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はマウスである。

【0182】

いくつかの実施形態において、該方法は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を単離するためのものである。

【0183】

いくつかの実施形態において、化合物が哺乳動物において覚醒状態を促進するか否かの該決定は睡眠ポリグラフィを含む。

【0184】

いくつかの実施形態において、該所望により標識された公知のリガンドは放射性標識されている。

【0185】

いくつかの実施形態において、公知のリガンドは表 D から選択される化合物である。いくつかの実施形態において、公知のリガンドは、化合物 D 2 8、化合物 D 3 0、化合物 D 3 1、または化合物 D 3 4 である。いくつかの実施形態において、公知のリガンドは表 E

10

20

30

40

50

から選択される化合物である。いくつかの実施形態において、公知のリガンドは化合物 E 2 1 または化合物 E 2 2 である。

【0186】

いくつかの実施形態において、該候補化合物の不在下よりも該候補化合物の存在下においてより少ない該複合体が形成されるか否かの該決定は、該候補化合物の不在下よりも該候補化合物の存在下において、少なくとも約 10 % 少ない、少なくとも約 20 % 少ない、少なくとも約 30 % 少ない、少なくとも約 40 % 少ない、少なくとも約 50 % 少ない、少なくとも約 60 % 少ない、少なくとも約 70 % 少ない、少なくとも約 75 % 少ない、少なくとも約 80 % 少ない、少なくとも約 85 % 少ない、少なくとも約 90 % 少ない、または少なくとも約 95 % 少ない該複合体が形成されるか否かを決定することを含む。

10

【0187】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連する。

【0188】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害は、睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰 (post traumatic hypersomnia)、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化 (時差ぼけ) 症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 24 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

20

【0189】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害はナルコレプシーである。

【0190】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連する。

【0191】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連し、ここで、神経学的障害は多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィ、およびパーキンソン病よりなる群から選択される。

【0192】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連する。

30

【0193】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連し、ここで、精神医学的障害は鬱病および統合失調症から選択される。

【0194】

いくつかの実施形態において、認識障害は精神錯乱、認知症、健忘症障害、および特定されない認識障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神錯乱は全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱、および特定されない精神錯乱よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認知症はアルツハイマー型の認知症、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症、および特定されない認知症よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症、またはアルツハイマー型の認知症である。いくつかの実施形態において、健忘症障害は全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害、および特定されない健忘症障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症である。いくつかの実施形態において、認識障害はアルツハイマー型の認知症である。

40

【0195】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は真核生物細胞である。

【0196】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態に

50

において、哺乳動物細胞はCHO細胞、COS-7細胞、MCB3901細胞、293細胞または293T細胞である。

【0197】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は酵母細胞である。

【0198】

いくつかの実施形態において、宿主細胞はメラニン保有細胞である。

【0199】

いくつかの実施形態において、Gタンパク質共役受容体は、配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む。

10

【0200】

いくつかの実施形態において、Gタンパク質共役受容体は配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0201】

いくつかの実施形態において、Gタンパク質共役受容体は、配列番号2を有する受容体の構造的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む。

【0202】

いくつかの実施形態において、PCRはRT-PCRである。

【0203】

いくつかの実施形態において、ヒトDNAは、BRS-3を発現する組織または細胞型に由来するヒトcDNAである。いくつかの実施形態において、ヒトcDNAは視床下部に由来する。

20

【0204】

いくつかの実施形態において、特異的プライマー配列番号3および配列番号4を用いるヒトDNA試料に対するポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体は、内因性BRS-3 Gタンパク質共役受容体である。

【0205】

いくつかの実施形態において、GPCRは組換え体である。

【0206】

いくつかの実施形態において、宿主細胞は組換え宿主細胞である。

30

【0207】

いくつかの実施形態において、GPCRは内因性である。いくつかの実施形態において、内因性であるGPCRは内因性哺乳動物GPCRである。いくつかの実施形態において、内因性哺乳動物GPCRであるGPCRは内因性哺乳動物BRS-3である。いくつかの実施形態において、GPCRは非内因性である。

【0208】

いくつかの実施形態において、GPCRは哺乳動物BRS-3である。

【0209】

いくつかの実施形態において、該宿主細胞はGPCRをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

40

【0210】

いくつかの実施形態において、該決定は、GPCRを含む膜で行われる。

【0211】

いくつかの実施形態において、候補化合物は小分子である。

【0212】

いくつかの実施形態において、候補化合物はポリペプチドである。いくつかの実施形態において、候補化合物は、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物はポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体または抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、候補化合物は抗体またはその抗原

50

結合断片である。いくつかの実施形態において、候補化合物は脂質である。いくつかの実施形態において、候補化合物はポリペプチドでない。いくつかの実施形態において、候補化合物はペプチドではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は脂質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は非内因性である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rの機能性を阻害し、または刺激することが知られていない化合物である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rのアゴニストであることが知られていない化合物である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rの部分アゴニストであることが知られていない化合物である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rの逆アゴニストであることが知られていない化合物である。いくつかの実施形態において、候補化合物は、G P C Rのアнтаゴニストであることが知られていない化合物である。

10

【0213】

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに、工程（b）においてG P C Rの機能性を刺激する化合物、またはその存在下でより少ない該複合体が工程（c'）において形成される化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を合成することを含む。いくつかの実施形態において、工程（b）においてG P C Rの機能性を刺激する化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、G P C Rのアゴニストまたは部分アゴニストである。

20

【0214】

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに：所望により、工程（b）においてG P C Rの機能性を刺激する化合物、またはその存在下でより少ない該複合体が工程（c'）で形成される化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の構造を決定する工程；ならびに、工程（b）においてG P C Rの機能性を刺激する化合物、またはその存在下でより少ない該複合体が工程（c'）で形成される化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、あるいは工程（b）においてG P C Rの機能性を刺激する化合物、またはその存在下でより少ない該複合体が工程（c'）で形成される化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の名称または構造を提供することを含む。いくつかの実施形態において、工程（b）においてG P C Rの機能性を刺激する化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、G P C Rのアゴニストまたは部分アゴニストである。

30

40

【0215】

いくつかの実施形態において、該方法は、さらに：所望により、工程（b）においてG P C Rの機能性を刺激する化合物、またはその存在下でより少ない該複合体が工程（c'）において形成される化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の構造を決定する工程；所望により、工程（b）においてG P C Rの機能性を刺激する化合物、またはその存在下でより少ない該複合体が工程（c'）で形成される化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化

50

合物、あるいは工程（b）においてGPCRの機能性を刺激する化合物、またはその存在下で、より少ない該複合体が工程（c'）で形成される化合物、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物の名称または構造を提供する工程；ならびに、工程（b）においてGPCRの機能性を刺激する化合物、またはその存在下でより少ない該複合体が工程（c'）において形成される化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を生産または合成することを含む。いくつかの実施形態において、工程（b）においてGPCRの機能性を刺激する化合物、または覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRのアゴニストまたは部分アゴニストである。

10

【0216】

第9の態様において、本発明は、第8の態様の方法に従って同定可能な、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物をその特徴とする。

【0217】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、第8の態様の方法に従って同定される。

20

【0218】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連する。

【0219】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害は、睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0220】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害はナルコレプシーである。

30

【0221】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連する。

【0222】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連し、ここで、神経学的障害は多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィ、およびパーキンソン病よりなる群から選択される群から選択される。

【0223】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連する。

40

【0224】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連し、ここで、精神医学的障害は、鬱病および統合失調症から選択される。

【0225】

いくつかの実施形態において、認識障害は精神錯乱、認知症、健忘症障害および特定されない認識障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神錯乱は全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱、および特定されない精神錯乱よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認知症はアルツハイマー型の認知症、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症、および特定されない認知症よりなる群から選択される。い

50

いくつかの実施形態において、健忘症障害は、全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害、および特定されない健忘症障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症である。いくつかの実施形態において、認識障害はアルツハイマー型の認知症である。

【0226】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、GPCRのアゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はGPCRの部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、GPCRのアゴニストまたは部分アゴニストは、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストであるGPCRのアゴニストまたは部分アゴニストは、BRS-3選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3はヒトBRS-3である。

【0227】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は小分子である。

【0228】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はペプチドではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は非内因性である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩

10

20

30

40

50

和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

【0229】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3において、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択された値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、トランスフェクトされたCHO細胞からの膜で行われるGTP γ S結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞で行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞で行われるIP3アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされたCOS-7細胞またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて10 μ M未満、該アッセイにおいて9 μ M未満、該アッセイにおいて8 μ M未満、該アッセイにおいて7 μ M未満、該アッセイにおいて6 μ M未満、該アッセイにおいて5 μ M未満、該アッセイにおいて4 μ M未満、該アッセイにおいて3 μ M未満、該アッセイにおいて2 μ M未満、該アッセイにおいて1 μ M未満、該アッセイにおいて900 nM未満、該アッセイにおいて800 nM未満、該アッセイにおいて700 nM未満、該アッセイにおいて600 nM未満、該アッセイにおいて500 nM未満、該アッセイにおいて400 nM未満、該アッセイにおいて300 nM未満、該アッセイにおいて200 nM未満、該アッセイにおいて100 nM未満、該アッセイにおいて90 nM未満、該アッセイにおいて80 nM未満、該アッセイにおいて70 nM未満、該アッセイにおいて60 nM未満、該アッセイにおいて50 nM未満、該アッセイにおいて40 nM未満、該アッセイにおいて30 n

10

20

30

40

50

M未満、該アッセイにおいて20 nM未満、該アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、EC₅₀覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。

10

【0230】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は経口的に活性である。

【0231】

第10の態様において、本発明は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物をその特徴とする。

20

【0232】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、BRS-3選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。

30

【0233】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、第9の態様に従う。

【0234】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連する。

40

【0235】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害は、睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0236】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害はナ

50

ルコレプシーである。

【0237】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連する。

【0238】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連し、ここで、神経学的障害は多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィ、およびパーキンソン病よりなる群から選択される。

【0239】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連する。

【0240】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連し、ここで、精神医学的障害は鬱病および統合失調症から選択される。

【0241】

いくつかの実施形態において、認識障害は精神錯乱、認知症、健忘症障害、および特定されない認識障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神錯乱は全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱、および特定されない精神錯乱よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認知症はアルツハイマー型の認知症、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症、および特定されない認知症よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症、またはアルツハイマー型の認知症である。いくつかの実施形態において、健忘症障害は全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害、および特定されない健忘症障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症である。いくつかの実施形態において、認識障害はアルツハイマー型の認知症である。

【0242】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は小分子である。

【0243】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ポリペプチドではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はペプチドではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質でない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を

10

20

30

40

50

促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は非内因性である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

10

【0244】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3において、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、トランスフェクトされたCHO細胞からの膜で行われるGTP γ S結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラノーマ保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞で行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞で行われるIP3アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞、またはトランスフェクトされたメラノーマ保有細胞、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞、またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて10 μ M未満、該アッセイにおいて9 μ M未満、該アッセイにおいて8 μ M未満、該アッセイにおいて7 μ M未満、該アッセイにおいて6 μ M未満、該アッセイにおいて5 μ M未満、該アッセイにおいて4 μ M未満、該アッセイにおいて3 μ M未満、該アッセイにおいて2 μ M未満、該アッセイにおいて1 μ M未満、該アッセイにおいて900 nM未満、

20

30

40

50

該アッセイにおいて800 nM未満、該アッセイにおいて700 nM未満、該アッセイにおいて600 nM未満、該アッセイにおいて500 nM未満、該アッセイにおいて400 nM未満、該アッセイにおいて300 nM未満、該アッセイにおいて200 nM未満、該アッセイにおいて100 nM未満、該アッセイにおいて90 nM未満、該アッセイにおいて80 nM未満、該アッセイにおいて70 nM未満、該アッセイにおいて60 nM未満、該アッセイにおいて50 nM未満、該アッセイにおいて40 nM未満、該アッセイにおいて30 nM未満、該アッセイにおいて20 nM未満、該アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。

10

【0245】

20

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、経口的に活性である。

【0246】

第11の態様において、本発明は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物、および医薬上許容される担体を混合することを含む、医薬組成物を調製する方法をその特徴とする。

【0247】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、BRS-3選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。

30

40

【0248】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、第9の実施形態に従う。

【0249】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連する。

【0250】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害は、

50

睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0251】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害はナルコレプシーである。

【0252】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連する。

10

【0253】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連し、ここで、神経学的障害は多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィ、およびパーキンソン病よりなる群から選択される群から選択される。

【0254】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連する。

【0255】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連し、ここで、精神医学的障害は鬱病および統合失調症から選択される。

【0256】

20

いくつかの実施形態において、認識障害は精神錯乱、認知症、健忘症障害、および特定されない認識障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神錯乱は全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱、および特定されない精神錯乱よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認知症はアルツハイマー型の認知症、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症、および特定されない認知症よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症、またはアルツハイマー型の認知症である。いくつかの実施形態において、健忘症障害は全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害、および特定されない健忘症障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症である。いくつかの実施形態において、認識障害はアルツハイマー型の認知症である。

30

【0257】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は小分子である。

【0258】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片であり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではないものとする。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、また

40

50

は過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はポリペプチドではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物はペプチドではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は脂質でない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は非内因性である。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

10

20

【0259】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、ヒト BRS-3 において、約 $10 \mu\text{M}$ 未満、約 $1 \mu\text{M}$ 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約 10 nM ~ $10 \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約 10 nM ~ 100 nM の間隔から選択される値未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、トランスフェクトされた CHO 細胞からの膜で行われる $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞に行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた HeLa 細胞で行われる FLIPR アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた COS-7 細胞もしくは CHO 細胞もしくは HeLa 細胞で行われる IP3 アッセイにおいて、約 $10 \mu\text{M}$ 未満、約 $1 \mu\text{M}$ 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、トランスフェクトされた CHO 細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされた COS-7 細胞またはトランスフェクトされた HeLa 細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する組換え BRS-3 受容体を発現する。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて、約 $10 \mu\text{M}$ 未満、約 $1 \mu\text{M}$ 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の EC_{50} を持つ

30

40

50

アゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、該アッセイにおいて10 μ M未満、該アッセイにおいて9 μ M未満、該アッセイにおいて8 μ M未満、該アッセイにおいて7 μ M未満、該アッセイにおいて6 μ M未満、該アッセイにおいて5 μ M未満、該アッセイにおいて4 μ M未満、該アッセイにおいて3 μ M未満、該アッセイにおいて2 μ M未満、該アッセイにおいて1 μ M未満、該アッセイにおいて900 nM未満、該アッセイにおいて800 nM未満、該アッセイにおいて700 nM未満、該アッセイにおいて600 nM未満、該アッセイにおいて500 nM未満、該アッセイにおいて400 nM未満、該アッセイにおいて300 nM未満、該アッセイにおいて200 nM未満、該アッセイにおいて100 nM未満、該アッセイにおいて90 nM未満、該アッセイにおいて80 nM未満、該アッセイにおいて70 nM未満、該アッセイにおいて60 nM未満、該アッセイにおいて50 nM未満、該アッセイにおいて40 nM未満、該アッセイにおいて30 nM未満、該アッセイにおいて20 nM未満、該アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。

【0260】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに適した化合物は、経口的に活性である。

【0261】

第12の態様において、本発明は、治療上有効量の哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニスト、または該アゴニストまたは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬上許容される組成物を、それを必要とする哺乳動物に投与することを含む、覚醒状態を促進する方法、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療する方法をその特徴とする。

【0262】

いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【0263】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストはヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、ヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストは、配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストはBRS-3選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。

【0264】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは第9の態様に従う。

【0265】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連する。

【0266】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害は、睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0267】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害はナルコレプシーである。

10

【0268】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連する。

【0269】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連し、ここで、神経学的障害は多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィ、およびパーキンソン病よりなる群から選択される群から選択される。

【0270】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連する。

【0271】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連し、ここで、精神医学的障害は鬱病および統合失調症から選択される。

20

【0272】

いくつかの実施形態において、認識障害は精神錯乱、認知症、健忘症障害、および特定されない認識障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神錯乱は全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱、および特定されない精神錯乱よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認知症はアルツハイマー型の認知症、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症、および特定されない認知症よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症、またはアルツハイマー型の認知症である。いくつかの実施形態において、健忘症障害は全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害、および特定されない健忘症障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症である。いくつかの実施形態において、認識障害はアルツハイマー型の認知症である。

30

【0273】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは小分子である。

【0274】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは脂質である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドでない。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストはペプチドではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは脂質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは非内因性である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のア

40

50

ゴニストもしくは部分アゴニストは、原核生物または真核生物が天然に生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは原核生物が天然に生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、真核生物が天然に生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

【0275】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、ヒト BRS-3 において、約 $10\ \mu\text{M}$ 未満、約 $1\ \mu\text{M}$ 未満、約 $100\ \text{nM}$ 未満、または約 $10\ \text{nM}$ 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 $10\ \text{nM}$ ~ $10\ \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 $10\ \text{nM}$ ~ $1\ \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 $10\ \text{nM}$ ~ $100\ \text{nM}$ の間隔から選択される値未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、トランスフェクトされた CHO 細胞からの膜で行われる GTPγS 結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラノーマ保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた HeLa 細胞で行われる FLIPR アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた COS-7 細胞もしくは CHO 細胞もしくは HeLa 細胞で行われる IP3 アッセイにおいて、約 $10\ \mu\text{M}$ 未満、約 $1\ \mu\text{M}$ 未満、約 $100\ \text{nM}$ 未満、または約 $10\ \text{nM}$ 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、トランスフェクトされた CHO 細胞またはトランスフェクトされたメラノーマ保有細胞またはトランスフェクトされた COS-7 細胞またはトランスフェクトされた HeLa 細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する組換え BRS-3 受容体を発現する。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、該アッセイにおいて約 $10\ \mu\text{M}$ 未満、約 $1\ \mu\text{M}$ 未満、約 $100\ \text{nM}$ 未満、または約 $10\ \text{nM}$ 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、該アッセイにおいて $10\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $9\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $8\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $7\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $6\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $5\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $4\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $3\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $2\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $1\ \mu\text{M}$ 未満、該アッセイにおいて $900\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $800\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $700\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $600\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $500\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $400\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $300\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $200\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $100\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $90\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $80\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $70\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $60\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $50\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $40\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $30\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $20\ \text{nM}$ 未満、該アッセイにおいて $10\ \text{nM}$ 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 $10\ \text{nM}$ ~ $10\ \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 $10\ \text{nM}$ ~ $1\ \mu\text{M}$ の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 $10\ \text{nM}$ ~ $100\ \text{nM}$ の間隔から選択される値未満の該アッセイにおいて EC_{50} を持つアゴニスト

10

20

30

40

50

トまたは部分アゴニストである。

【0276】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは表 D から選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、化合物 D 2 8、化合物 D 3 0、化合物 D 3 1、または化合物 D 3 4 である。

【0277】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは経口的に活性である。

【0278】

第 1 3 の態様において、本発明は、覚醒状態を促進するための、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するための医薬の製造のための哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストの使用をその特徴とする。

【0279】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するための、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するための医薬の製造のための哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストの使用は、哺乳動物において、覚醒状態を促進するための、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するための医薬の製造のための哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストの使用である。

【0280】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 はヒト B R S - 3 である。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【0281】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、ヒト B R S - 3 のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、ヒト B R S - 3 のアゴニストまたは部分アゴニストは、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するヒト B R S - 3 のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒト B R S - 3 のアゴニストまたは部分アゴニストは、B R S - 3 選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。

【0282】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは第 9 の態様に従う。

【0283】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連する。

【0284】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害は、睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 2 4 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

【0285】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害はナルコレプシーである。

【0286】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連する。

【0287】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連し、ここで、神経学的障害は多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィ、およびパーキンソン病よりなる群から選択される群から選択される。

【0288】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連する。

【0289】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連し、ここで、精神医学的障害は鬱病および統合失調症から選択される。

【0290】

いくつかの実施形態において、認識障害は精神錯乱、認知症、健忘症障害、および特定されない認識障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神錯乱は全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱、および特定されない精神錯乱よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認知症はアルツハイマー型の認知症、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症、および特定されない認知症よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、健忘症障害は全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害、および特定されない健忘症障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症である。いくつかの実施形態において、認識障害はアルツハイマー型の認知症である。

10

【0291】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは小分子である。

20

【0292】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは脂質である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストはペプチドではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは脂質でない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは非内因性である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

30

40

【0293】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、ヒト BRS-3 において、約 10 μ M 未満、約 1 μ M 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の EC₅₀ を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 10 nM ~ 10 μ M の間隔から選択される値未満の EC₅₀ を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 10 nM ~ 1 μ M の間隔から選択される値未満の EC₅₀ を持つ

50

アゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 10 nM ~ 100 nM の間隔から選択される値未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、トランスフェクトされた CHO 細胞からの膜で行われる GTPγS 結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた HeLa 細胞で行われる FLIPR アッセイにおいて、またはトランスフェクトされた COS-7 細胞もしくは CHO 細胞もしくは HeLa 細胞で行われる IP3 アッセイにおいて、約 10 μM 未満、約 1 μM 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、トランスフェクトされた CHO 細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされた COS-7 細胞またはトランスフェクトされた HeLa 細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する組換え BRS-3 受容体を発現する。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、該アッセイにおいて、約 10 μM 未満、約 1 μM 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、該アッセイにおいて 10 μM 未満、該アッセイにおいて 9 μM 未満、該アッセイにおいて 8 μM 未満、該アッセイにおいて 7 μM 未満、該アッセイにおいて 6 μM 未満、該アッセイにおいて 5 μM 未満、該アッセイにおいて 4 μM 未満、該アッセイにおいて 3 μM 未満、該アッセイにおいて 2 μM 未満、該アッセイにおいて 1 μM 未満、該アッセイにおいて 900 nM 未満、該アッセイにおいて 800 nM 未満、該アッセイにおいて 700 nM 未満、該アッセイにおいて 600 nM 未満、該アッセイにおいて 500 nM 未満、該アッセイにおいて 400 nM 未満、該アッセイにおいて 300 nM 未満、該アッセイにおいて 200 nM 未満、該アッセイにおいて 100 nM 未満、該アッセイにおいて 90 nM 未満、該アッセイにおいて 80 nM 未満、該アッセイにおいて 70 nM 未満、該アッセイにおいて 60 nM 未満、該アッセイにおいて 50 nM 未満、該アッセイにおいて 40 nM 未満、該アッセイにおいて 30 nM 未満、該アッセイにおいて 20 nM 未満、該アッセイにおいて 10 nM 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 10 nM ~ 10 μM の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 10 nM ~ 1 μM の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 10 nM ~ 100 nM の間隔から選択される値未満の該アッセイにおける EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。

10

20

30

40

【0294】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは表 D から選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、化合物 D28、化合物 D30、化合物 D31、または化合物 D34 である。

【0295】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは経口的に活性である。

【0296】

第 14 の態様において、本発明は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物 BRS-3 の該アゴニストまたは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物をその特徴とする。

50

【0297】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3はヒトBRS-3である。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトである。

【0298】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニスト、または該アゴニストまたは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに用いるための哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニスト、または該アゴニストまたは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物である。

10

【0299】

いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニスト、または該アゴニストまたは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物は、哺乳動物において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニスト、または該アゴニストまたは部分アゴニストおよび医薬上許容される担体を含む医薬組成物である。

20

【0300】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、ヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、ヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストは配列番号2のアミノ酸配列を有するヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはヒトBRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストはBRS-3選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。

30

【0301】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは第9の態様に従う。

【0302】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連する。

【0303】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害は、睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。

40

【0304】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害に関連し、ここで、睡眠障害はナルコレプシーである。

【0305】

50

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連する。

【0306】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害に関連し、ここで、神経学的障害は多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィ、およびパーキンソン病よりなる群から選択される群から選択される。

【0307】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連する。

【0308】

いくつかの実施形態において、過剰な眠気は精神医学的障害に関連し、ここで、精神医学的障害は鬱病および統合失調症から選択される。

【0309】

いくつかの実施形態において、認識障害は精神錯乱、認知症、健忘症障害、および特定されない認識障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神錯乱は全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱、および特定されない精神錯乱よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認知症はアルツハイマー型の認知症、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症、および特定されない認知症よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症、またはアルツハイマー型の認知症である。いくつかの実施形態において、健忘症障害は全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害、および特定されない健忘症障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は認知症である。いくつかの実施形態において、認識障害はアルツハイマー型の認知症である。

【0310】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは小分子である。

【0311】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドであり、但し、ポリペプチドは抗体またはその抗原結合断片ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは脂質である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストはポリペプチドではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストはペプチドではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは脂質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは非内因性である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、原核生物または真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、原核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、真核生物が天然で生産する物質ではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、哺乳動物が天然で生産する物質ではない。

【0312】

いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、ヒト BRS-3 において、約 $10 \mu\text{M}$ 未満、約 $1 \mu\text{M}$ 未満、約 100 nM 未満、または約 10 nM 未満の EC_{50} を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約 1

10

20

30

40

50

0 nM～10 μMの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約10 nM～1 μMの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、トランスフェクトされたCHO細胞からの膜で行われるGTPγS結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞で行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞で行われるIP3アッセイにおいて約10 μM未満、約1 μM未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされたCOS-7細胞またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、該アッセイにおいて、約10 μM未満、約1 μM未満、約100 nM未満、または約10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、該アッセイにおいて10 μM未満、該アッセイにおいて9 μM未満、該アッセイにおいて8 μM未満、該アッセイにおいて7 μM未満、該アッセイにおいて6 μM未満、該アッセイにおいて5 μM未満、該アッセイにおいて4 μM未満、該アッセイにおいて3 μM未満、該アッセイにおいて2 μM未満、該アッセイにおいて1 μM未満、該アッセイにおいて900 nM未満、該アッセイにおいて800 nM未満、該アッセイにおいて700 nM未満、該アッセイにおいて600 nM未満、該アッセイにおいて500 nM未満、該アッセイにおいて400 nM未満、該アッセイにおいて300 nM未満、該アッセイにおいて200 nM未満、該アッセイにおいて100 nM未満、該アッセイにおいて90 nM未満、該アッセイにおいて80 nM未満、該アッセイにおいて70 nM未満、該アッセイにおいて60 nM未満、該アッセイにおいて50 nM未満、該アッセイにおいて40 nM未満、該アッセイにおいて30 nM未満、該アッセイにおいて20 nM未満、該アッセイにおいて10 nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約10 nM～10 μMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約10 nM～1 μMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストまたはである。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、約10 nM～100 nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。

【0313】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、表Dから選択される化合物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは、化合物D28、化合物D30、化合物D31、または化合物D34である。

【0314】

いくつかの実施形態において、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストは経口的に活性である。

【0315】

第15の態様において、本発明は、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、

10

20

30

40

50

不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病性障害、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害用の医薬剤について、候補化合物をスクリーニングする方法をその特徴とし、該方法は：

(a) Gタンパク質共役受容体を含む宿主細胞または宿主細胞の膜を提供する工程であって、該Gタンパク質共役受容体は配列番号2に対して少なくとも約75%の同一性、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、または少なくとも約95%の同一性を有する、工程；および

(b) 該Gタンパク質共役受容体に対する候補化合物をスクリーニングする工程；を含む。

10

【0316】

ある実施形態において、該方法はGタンパク質共役受容体のアゴニストを同定する工程を含む。

【0317】

ある実施形態において、該方法はGタンパク質共役受容体の部分アゴニストを同定する工程を含む。

【0318】

ある実施形態において、該方法はGタンパク質共役受容体の逆アゴニストを同定する工程を含む。

【0319】

ある実施形態において、該方法はGタンパク質共役受容体のアンタゴニストを同定する工程を含む。

20

【0320】

ある実施形態において、該スクリーニングは、該アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、またはアンタゴニストが睡眠を促進し、抗不安活性を有し、抗痙攣活性を有し、抗偏頭痛活性を有し、抗鬱病活性を有し、抗精神活性を有し、覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を有するか否かを決定することを含む。

【0321】

ある実施形態において、該スクリーニングは：

(i) 該アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストもしくはアンタゴニストを哺乳動物に投与する工程；および

30

(ii) 該アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニスト、またはアンタゴニストが睡眠を促進し、抗不安活性を有し、抗痙攣活性を有し、抗偏頭痛活性を有し、抗鬱病活性を有し、抗精神活性を有し、覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を有するか否かを決定する工程；

を含む。

【0322】

ある実施形態において、該哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。

【0323】

ある実施形態において、該方法は、さらに、該アゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストもしくはアンタゴニストを医薬として処方する工程を含む。

40

【0324】

ある実施形態において、Gタンパク質共役受容体は、配列番号2に対して少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0325】

ある実施形態において、Gタンパク質共役受容体は配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0326】

第16の態様において、本発明は、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病性障害、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的

50

障害用の医薬剤としての候補化合物をスクリーニングするための G タンパク質共役受容体の使用をその特徴とし、ここで、G タンパク質共役受容体は、配列番号 2 に対して少なくとも約 75 % の同一性、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、または少なくとも約 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0327】

ある実施形態において、該スクリーニングは、G タンパク質共役受容体のアゴニストのためである。

【0328】

ある実施形態において、該スクリーニングは、G タンパク質共役受容体の部分アゴニストのためである。

【0329】

ある実施形態において、該スクリーニングは、G タンパク質共役受容体の逆アゴニストのためである。

【0330】

ある実施形態において、該スクリーニングは、G タンパク質共役受容体のアンタゴニストのためである。

【0331】

ある実施形態において、G タンパク質共役受容体は、配列番号 2 に対して少なくとも約 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0332】

ある実施形態において、G タンパク質共役受容体は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。

【0333】

出願人は、本発明の実施形態のいずれかからの任意の 1 以上の候補化合物を排除する権利を留保する。出願人は、本発明の実施形態のいずれかからの任意の 1 以上のモジュレータを排除する権利を留保する。その例として、限定されないが、出願人は、本発明の実施形態のいずれかから任意の 1 以上の逆アゴニストもしくはアンタゴニストを排除する権利も留保する。さらなる例として、限定されないが、出願人は、本発明の実施形態のいずれかから任意の 1 以上のアゴニストまたは部分アゴニストを排除する権利を留保する。出願人は、本発明の実施形態のいずれかから任意のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを排除する権利を留保する。出願人は、加えて、本発明の実施形態のいずれかから任意の睡眠障害を排除する権利を留保する。出願人は、加えて、本発明の実施形態のいずれかから任意の神経学的障害を排除する権利を留保する。出願人は、加えて、本発明の実施形態のいずれかから任意の精神医学的障害を排除する権利を留保する。出願人は、加えて、本発明の実施形態のいずれかから任意の G A B A 関連神経学的障害を排除する権利を留保する。また、本発明の睡眠障害は個々に、または任意の組合せにて実施形態に含めることができることも明らかに意図される。本発明の神経学的障害は個々にまたは任意の組合せでも実施形態に含めることができることが明らかに意図される。また、本発明の精神医学的障害は、個々に、または任意の組合せでも、実施形態に含むことができることが明らかに意図される。また、本発明の G A B A 関連神経学的障害は、個々に、または任意の組合せでも、実施形態に含めることができると明らかに意図される。

【0334】

さら技巧を凝らすことなく、当業者であれば、これまでの記載を用いて本発明を最大限実施することができると考えられる。これまでの詳細な記載は、理解の明瞭性のためだけに掲げており、本発明の範囲内の修飾が当業者に明らかになるように、不要な限定が理解されるべきではない。

【0335】

本出願を通じて、種々の刊行物、特許および公開された特許出願が引用される。本出願で引用されたこれらの刊行物、特許および公開された特許出願の開示は、本明細書におい

10

20

30

40

50

て参照によりその全体が本開示に組み込まれる。刊行物、特許、または公開された特許出願の出願人による本明細書での引用は、該刊行物、特許、または公開された特許出願を先行技術として自認するものではない。

【0336】

本出願は、示された日付に合衆国特許および商標局に合衆国急行便を介して出願された以下の仮特許出願からの優先権の利益を主張する：2007年1月5日に提出された米国仮特許出願番号60/878,796。該仮特許出願の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0337】

【図1】説明のためであって、限定されないが、図1は、BRS-3に無関係の内因性の構成的に活性なGs共役GPCRのGsα融合タンパク質構築体である「標的受容体」に対する候補化合物の一次スクリーニングの結果を示す。「化合物A」についての結果をウエルA2に供する。「化合物B」についての結果をウエルG9に供する（実施例6参照）。

【図2】BRS-3は、細胞内IP3蓄積を増加させるための検出可能な構成的活性を呈する（実施例10参照）。

【図3】BRS-3における[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]ボンベシン(6-14)のアゴニスト活性の特徴付け。[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]ボンベシン(6-14)は表Dにおける化合物D34に対応する。A. FLIPRアッセイを用いるBRS-3における[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]ボンベシン(6-14)のアゴニスト活性の特徴付け。B.メラニン保有細胞アッセイを用いるBRS-3における[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]ボンベシン(6-14)のアゴニスト活性の特徴付け。C. IP3蓄積アッセイを用いるBRS-3における[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]ボンベシン(6-14)のアゴニスト活性の特徴付け（実施例11参照）。

【図4】ラットにおける視床下部背内側核(DMH)でのBRS-3およびGAD67の発現を示す代表的な顕微鏡写真画像はパネルA~Cとして供される（実施例14参照）。

【図5A】ラットにおける視床下部背内側核(DMH)でのBRS-3およびGAD67の発現の代表的なグラフ表示、ここで、図5Bは図5Aの一部の拡大である（実施例14参照）。

【図5B】ラットにおける視床下部背内側核(DMH)でのBRS-3およびGAD67の発現の代表的なグラフ表示、ここで、図5Bは図5Aの一部の拡大である（実施例14参照）。

【図6】BRS-3の共発現、およびBRS-3の検出可能な発現を呈する視床下部のサブ領域内のニューロンによる多数の神経伝達物質またはマーカーのインサイチュハイブリダイゼーション分析の結果（実施例14参照）。

【発明を実施するための形態】

【0338】

定義

アゴニストは、GPCRへの結合により、GPCRを活性化して、GPCRによって媒介される細胞内応答を誘導する剤（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。

【0339】

本明細書で用いるアミノ酸の略語を表Bに記載する：

【0340】

10

20

30

40

【表 B - 1】

表B

アラニン	ALA	A
アルギニン	ARG	R
アスパラギン	ASN	N
アスパラギン酸	ASP	D

【 0 3 4 1 】

10

【表 B - 2】

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

20

30

アンタゴニストは、アゴニストまたは部分アゴニストとほぼ同一部位において G P C R に結合し、好ましくは競合的に結合するが、G P C R の活性形態によって開始される細胞内応答を活性化せず、それにより、アゴニストまたは部分アゴニストによる細胞内応答を阻害することができる剤（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。アンタゴニストは、典型的には、アゴニストまたは部分アゴニストの不在下においてベースライン細胞内応答を減少させない。

40

【 0 3 4 2 】

抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含むことがここで意図されている。本発明の抗体は当該分野で公知のいずれの適当な方法によっても調製することができる。

【 0 3 4 3 】

不安障害は過剰な不安に関連する障害を含むことが理解されるべきである。不安障害は、必ずしも限定されないが、次の用語は D S M - I V - T R （登録商標）（A m e r i c a n P s y c h i a t r i c A s s o c i a t i o n, 「D S M - I V - T R （登録

50

商標)」(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision), 2000)において定義されるように、パニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴を伴わない広場恐怖症、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫神経症障害、心的外傷後ストレス障害、急性ストレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害を含む。

【0344】

GPCRポリペプチドまたはアミノ酸配列の生物学的に活性な断片は、天然に生じるGPCRの構造的および生化学的機能を有するポリペプチドまたはアミノ酸配列の断片を意味する。ある実施形態において、生物学的に活性な断片はGタンパク質に共役される。ある実施形態において、生物学的に活性な断片はリガンドに結合する。

10

【0345】

候補化合物は、スクリーニング技術で使うことができ、本明細書においては、試験化合物と互換可能に用いる分子(例えば、限定されないが、化学化合物)を意味する。

【0346】

脱力発作は、通常、情緒によって誘発される筋緊張の突然の喪失のエピソードをいう。

【0347】

コドンは、リン酸基に共役した、一般には、ヌクレオシド[アデノシン(A)、グアノシン(G)、シジチン(C)、ウリジン(U)およびチミジン(T)]を含み、翻訳された場合、アミノ酸をコードする3つのヌクレオチド(またはヌクレオチドと同等物)の群を意味する。

20

【0348】

認識障害は、支配的な特徴としての機能の従前のレベルと比較して、認識の有意な損傷を有する障害を含むと理解されるべきである。認識障害は、必ずしも限定されないが、DSM-IV-TR(登録商標)(American Psychiatric Association, 「DSM-IV-TR(登録商標)」(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision), 2000)において用語が定義されているように、(必ずしも限定されないが、全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱および特定されない精神錯乱を含めた)精神錯乱、(必ずしも限定されないが、アルツハイマー型の認知症、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症、および特定されない認知症を含めた)認知症、(必ずしも限定されないが、全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害、および特定されない健忘症障害を含めた)健忘症障害、および特定されない認識障害を含むと理解されるべきである。

30

【0349】

組成物は、少なくとも1つの成分を含む物質を意味する。

【0350】

化合物効率または効率は、例えば、候補化合物の存在下または不在下におけるcAMPレベルの測定によって、1以上のGPCR機能を阻害または刺激する化合物の能力を意味する。化合物効率を測定する例示的な手段は、本特許書類の実施例セクションに開示されている。

40

【0351】

構成的に活性な受容体は、そのリガンドまたはその化学的同等体への受容体の結合を介する以外の手段によって活性状態において安定化された受容体を意味する。

【0352】

構成的に活性化された受容体は、構成的に活性であるようにまたはより構成的に活性であるように修飾されている内因性受容体を意味する。

【0353】

50

構成的受容体活性化は、そのリガンドまたはその化学的同等体への結合の不在下における受容体の活性化を意味する。

【0354】

接触または接触させることは、インビトロ系におけるか、またはインビボ系におけるかを問わず、一緒に少なくとも2つの部位をブリッジングすることを意味する。

【0355】

痙攣障害は、対象の障害を含むと理解され、ここで、対象は痙攣、例えば、癲癇発作による痙攣を罹っている。痙攣障害は、必ずしも限定されないが、癲癇および非癲癇発作、例えば、痙攣剤の対象への投与による痙攣を含む。

【0356】

鬱病障害は、用語がDSM-IV-TR（登録商標）（American Psychiatric Association, 「DSM-IV-TR（登録商標）」（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision）, 2000）で定義されているように、限定されないが、大鬱病障害、気分変調性障害、および特定されない鬱病障害を含む。

【0357】

直接同定する、または直接同定されたとは、句「候補化合物」または「試験化合物」との関係において、Gタンパク質共役受容体に対する公知のリガンド（例えば、公知のアゴニスト）の不在下におけるGタンパク質共役受容体に対する化合物のスクリーニングを意味する。

【0358】

睡眠異常症とは、睡眠を開始または維持する障害をいう。

【0359】

内因性は、哺乳類が天然に生産する物質を意味する。内因性は、用語「受容体」に関連して、例えば、限定されないが、哺乳動物（例えば、限定されないが、ヒト）によって天然で生産されるものを意味する。内因性は、遺伝子の対立遺伝子変種、ならびにそのようにコードされた対立遺伝子ポリペプチド変種を含む。本明細書で用いるように、「内因性GPCR」および「天然GPCR」は互換可能に用いられる。対照的に、用語、非内因性は、この文脈では、哺乳動物（例えば、限定されないが、ヒト）によって天然で生産されないものを意味する。

【0360】

発現ベクターは、発現ベクターについての適当な宿主細胞組換え体において、クローン化DNAの転写、および転写されたmRNAの翻訳に必要なDNA配列を意味する。適当に構築された発現ベクターは、宿主細胞における自律複製のための複製起点、選択マーカー、限定された数の有用な静電酵素部位、高コピー数に対する潜在能力、および活性なプロモータを含有する。転写されるべきクローン化DNAは、発現ベクター内の構成的に、または条件的に活性なプロモータに作動可能に連結されている。

【0361】

Gタンパク質共役受容体融合タンパク質およびGPCR融合タンパク質は、本明細書で開示された発明との関係では、各々、少なくとも1つのGタンパク質、最も好ましくは、そのようなGタンパク質のアルファ（ α ）サブユニット（これはGTPに結合するサブユニットである）に融合した、内因性の構成的に活性なGPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRを含む非内因性タンパク質を意味し、該Gタンパク質は、好ましくは、内因性GPCRと天然で共役するGタンパク質と同一タイプである。好ましい形態において、Gタンパク質は、GPCRのC末端に直接融合することができるか、あるいは該2つの間にスペーサがあり得る。

【0362】

宿主細胞は、その中に一体化されたベクターを有することができる細胞を意味する。この関係では、ベクターは、典型的には、適当なプロモータ配列と作動可能に連結してGP

10

20

30

40

50

C RまたはG P C R融合タンパク質をコードする核酸を含み、G P C RまたはG P C R融合タンパク質の発現が起こるのを可能にする。

【0363】

睡眠過剰とは、過剰な日中の睡魔（E D S）をいう。

【0364】

本明細書で用いる予防もしくは治療を必要とするとは、対象または動物が必要とする、または治療から利益をうけるであろう介護士（例えば、ヒトの場合には医師、看護師、看護従業者など；非ヒト哺乳動物を含めた動物の場合には獣医）によってなされた判断をいう。この判断は、介護士の専門的知識の領域にある種々の因子に基づいてなされるが、本発明の化合物によって治療可能な状態の結果として、対象または動物が病気である、または病気となるだろう知識を含む。

10

【0365】

阻害する、または阻害しているは、用語「嘔吐」に対する関係において、嘔吐が、化合物に不在下とは反対に、化合物の存在下で嘔吐が減少し、または妨げられることを意味する。

【0366】

不眠症とは、対象による不適切なまたは非休息的睡眠の認識をいう。

【0367】

逆アゴニストは、G P C Rに結合し、かつアゴニストまたは部分アゴニストの不在下において観察される正常な基礎レベル活性未満の受容体の活性な形態によって開始されるベースライン細胞内応答を阻害する剤（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。

20

【0368】

リガンドは本明細書で用いるように、G P C Rに特異的に結合する分子を意味する。内因性リガンドは、天然G P C Rに結合する内因性分子である。G P C Rのリガンドは、限定されないが、G P C Rのアゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストもしくはアンタゴニストであってよい。

【0369】

偏頭痛は、いくつかの場合においては、光の閃光、盲点、または腕または脚中のうずきなどの感覚的警告サイン（オーラ）が先行する、またはそれに伴うつらい頭痛をいう。偏頭痛には、また、しばしば、他の兆候、ならびに嘔吐、吐気、および光および音の極端な感受性などの兆候が伴う。

30

【0370】

本明細書で用いるように、変調する、または修飾するは、特定の活性、機能または分子の量、質、または効果の増大または減少をいうことを意味する。

【0371】

モジュレータは、先に定義したアゴニスト、部分アゴニスト、逆アゴニストおよびアンタゴニストを含むように定義される。

【0372】

ナルコレプシーとは、過剰な日中の睡魔（E D S）、乱れた夜の睡眠、異常なレム（R E M）睡眠および、しばしば、脱力発作によって特徴付けられる睡眠障害をいう。

40

【0373】

錯眠とは、睡眠に関連する挙動の乱れをいう。

【0374】

部分アゴニストは、完全アゴニストが行うよりも程度が低いにかかわらず、G P C Rへの結合によって、G P C Rを活性化して、G P C Rによって変調される細胞内応答を誘導する剤（例えば、リガンド、候補化合物）を意味する。

【0375】

医薬組成物は、少なくとも1つの有効成分を含む組成物を意味し、それにより、組成物は哺乳動物（例えば、限定されないがヒト）における特定の有効な結果について調査することができる。当業者であれば、有効成分が、例えば、当業者の必要性に基づいて所望の

50

有効な結果を有するか否かを決定するのに適当な技術を理解し、認識するであろう。

【0376】

ポリヌクレオチドは、一本鎖または二重型のいずれかの1を超える分子のRNA、DNA、またはRNA/DNAハイブリッド配列をいう。本発明のポリヌクレオチドは、合成、組み換え、エキソビボ世代、またはその組合せを含めた、いずれかの公知の方法によって、ならびに当該分野で公知の精製方法を利用して調製することができる。

【0377】

ポリペプチドとは、ポリマーの長さに関係することなくアミノ酸のポリマーをいう。かくして、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質はポリペプチドの定義内に含まれる。この用語は、ポリペプチドの発現後修飾を特定または排除しない。例えば、グリコシル基、アセチル基、リン酸基、脂質基などの共有結合を含むポリペプチドは、用語ポリペプチドによって明らかに含まれる。

【0378】

プライマーは、本明細書においては、標的ヌクレオチド配列に対して相補的であって、標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズするのに用いられる特定のオリゴヌクレオチド配列を示すように用いる。プライマーは、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、または逆転写酵素によって触媒されるヌクレオチド重合の開始点として機能する。

【0379】

睡眠の促進とは、睡眠の持続および／または質の増加をいう。

【0380】

覚醒状態の促進とは、覚醒状態の持続の増加をいう。

【0381】

精神病性障害は、DSM-IV-TR（登録商標）（American Psychiatric Association, 「DSM-IV-TR（登録商標）」（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision）, 2000）において用語が定義されているように、必ずしも限定されないが、統合失調症、統合失調障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害を含む。

【0382】

受容体機能性とは、限定されないが、遺伝子転写の調節、イオンの流入または流出の調節、触媒反応の実行、および／または第2のメッセンジャー応答の誘導などのGタンパク質を介する活性の変調を含めた、細胞において刺激を受け取り、および効果を変調する受容体の正常な操作をいう。

【0383】

統合失調症は、用語がDSM-IV-TR（登録商標）（American Psychiatric Association, 「DSM-IV-TR（登録商標）」（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision）, 2000）で定義されているように、必ずしも限定されないが、サブタイプ妄想型統合失調症、解体型統合失調症、緊張性統合失調症、未分化統合失調症、および残遺型統合失調症を含むことが理解される。

【0384】

第2のメッセンジャーは、受容体活性化の結果として生じる細胞内応答を意味する。第2のメッセンジャーは、例えば、イノシトール1, 4, 5-三リン酸（IP3）、ジアセチルグリセロール（DAG）、環状AMP（cAMP）、環状GMP（cGMP）、MAPキナーゼ活性、MAPK/ERKキナーゼキナーゼ1（MEKK1）活性、および Ca^{2+} を含むことができる。第2のメッセンジャー応答は、受容体活性化の決定のために測定することができる。加えて、第2のメッセンジャー応答は、例えば、受容体の逆アゴニ

スト、部分アゴニスト、アゴニスト、およびアンタゴニストとしての候補化合物の同定のために測定することができる。

【0385】

選択的BRS-3モジュレータとは、胃放出ペプチド受容体（GRP-R）またはニューロメジンB受容体（NMB-R）などの、1以上の密接に関連する受容体に渡るBRS-3受容体に対する選択性を有するBRS-3のモジュレータをいう。

【0386】

睡眠障害とは、通常睡眠のパターンまたは挙動の乱れをいう。睡眠障害は、必ずしも限定されないが、American Academy of Sleep Medicine, ICSD-睡眠障害の国際分類、改訂版：Diagnostic and coding manual, American Academy of Sleep Medicine, 2001に記載された睡眠障害を含むと理解されるべきである。

【0387】

小分子は、ペプチド、ペプチド模倣薬、アミノ酸、アミノ酸類縁体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類縁体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体、有機化合物または無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物または有機金属化合物を含む）、およびその塩、エステルおよび他の医薬上許容される形態を含めた、モル当たり約10,000グラム未満の分子量を有する化合物を意味すると解釈されるべきである。ある好ましい実施形態において、小分子は、モル当たり約5,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物である。ある好ましい実施形態において、小分子は、モル当たり約1,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物である。ある好ましい実施形態において、小分子は、モル当たり約5,000グラム未満の分子量を有する有機または無機化合物である。

【0388】

刺激する、または刺激している、は、用語「応答」との関係では、化合物の不在下とは反対に、化合物の存在下において応答が増加することを意味する。

【0389】

対象は、本明細書で用いるように、好ましくは、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、非ヒト哺乳動物、およびヒトを含めた哺乳動物をいい、より好ましくは、マウスまたはラット、最も好ましくはヒトをいう。

【0390】

治療上有効量とは、本明細書で用いるように、以下：

（1）病気の予防；例えば、病気、状態または障害の素因があり得るが、未だ、病気の病理学または兆候学を経験し、または呈していない対象において病気、状態または障害を予防すること、

（2）病気の阻害；例えば、病気、状態または障害の病理学または兆候学を経験している、または呈している対象において病気、状態または障害を阻害すること（すなわち、病理学および／または兆候学の更なる進展の阻止）、および

（3）病気の緩和；例えば、病気、状態または障害の病理学または兆候学を経験している、または呈している対象における病気、状態または障害を緩和すること（すなわち、病理学および／または兆候学の逆行）

の1以上を含む研究者、獣医、医師または他の臨床家によって求められている組織、系、動物、対象またはヒトにおいて生物学的または医学的応答を誘導する活性な化合物または医薬剤の量をいう。

【0391】

変種は、該用語が本明細書で用いられるように、各々、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、1以上の必須の特性を保有できるポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的な変種は、別の参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なる。変種のヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を改変させてもさせなくてもよい。ポリペプ

10

20

30

40

50

チドの典型的な変種は、別の参照ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。変種および参照ポリペプチドは、いずれかの組合せにて、1以上の置換、付加、欠失によってアミノ酸配列が異なってもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変種は対立遺伝子変種などの天然に生じるものであってよく、あるいはそれは、天然で生じることが知られていない変種であってよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に生じない変種は、突然変異誘発技術によって、または直接的合成によって作製することができる。

A. 導入

以下のセクションの順序はプレゼンテーション効率について記載され、開示または以下の請求の範囲に対する限定として意図されず、またそのように解釈されない。

B. 受容体の表現

10

1. 目的とするGPCRポリペプチド

本発明のGPCRは：

(a) 配列番号2のアミノ酸配列；

(b) 配列番号2のアミノ酸2～399；

(c) 特異的プライマー配列番号3および配列番号4を用いてヒトDNA試料に対するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅可能なポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

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

(e) 配列番号2のアミノ酸配列における1個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

20

(f) 配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；

(g) 配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列；および

(h) (a)～(g)のいずれか1つの生物学的に活性な断片；

よりなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0392】

30

いくつかの実施形態において、GPCRは配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0393】

いくつかの実施形態において、GPCRは、配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体のアミノ酸配列を含む。

【0394】

いくつかの実施形態において、配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体は、内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体は、内因性哺乳動物Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するGタンパク質共役受容体は、非内因性Gタンパク質共役受容体である。

40

【0395】

いくつかの実施形態において、配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体は、内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンであるGタンパク質共役受容体は、配列番号2を有する内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつか

50

の実施形態において、配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンである G タンパク質共役受容体は、非内因性 G タンパク質共役受容体である。

【0396】

いくつかの実施形態において、ヒト DNA は、BRS-3 を発現する組織または細胞型に由来するヒト cDNA である。いくつかの実施形態において、ヒト cDNA は視床下部に由来する。

【0397】

いくつかの実施形態において、本発明の GPCR は組換え体である。いくつかの実施形態において、組み換え GPCR は哺乳動物 BRS-3 である。いくつかの実施形態において、組み換え GPCR はヒト BRS-3 である。

10

【0398】

いくつかの実施形態において、本発明の GPCR は内因性である。

【0399】

いくつかの実施形態において、本発明の GPCR は非内因性である。

【0400】

いくつかの実施形態において、本発明の GPCR は哺乳動物 BRS-3 である。

【0401】

いくつかの実施形態において、内因性である本発明の GPCR は哺乳動物 BRS-3 である。

【0402】

20

いくつかの実施形態において、本発明の GPCR は構成的に活性である。いくつかの実施形態において、構成的に活性である本発明の GPCR は内因性 GPCR である。いくつかの実施形態において、構成的に活性である本発明の GPCR は非内因性 GPCR である。いくつかの実施形態において、構成的に活性である本発明の GPCR は哺乳動物 BRS-3 である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 はヒト BRS-3 である。いくつかの実施形態において、ヒト BRS-3 は配列番号 2 またはその対立遺伝子である。

【0403】

いくつかの実施形態において、本発明の内因性 GPCR は構成的に活性である。いくつかの実施形態において、本発明の非内因性 GPCR は構成的に活性である。いくつかの実施形態において、本発明の哺乳動物 BRS-3 は構成的に活性である。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 はヒト BRS-3 である。いくつかの実施形態において、ヒト BRS-3 は配列番号 2 またはその対立遺伝子である。

30

【0404】

いくつかの実施形態において、本発明の GPCR は構成的活性の検出可能なレベルを呈する。いくつかの実施形態において、本発明の内因性 GPCR は構成的活性の検出可能なレベルを呈する。いくつかの実施形態において、本発明の非内因性 GPCR は構成的活性の検出可能なレベルを呈する。いくつかの実施形態において、本発明の哺乳動物 BRS-3 は構成的活性の検出可能なレベルを呈する。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 は構成的に活性な BRS-3 である。いくつかの実施形態において、ヒト BRS-3 は配列番号 2 またはその対立遺伝子である。

40

【0405】

いくつかの実施形態において、対象の方法で用いることができる G タンパク質共役受容体は配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンである。いくつかの実施形態において、配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンは内因性 G タンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンは、配列番号 2 を有する内因性 G タンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、配列番号 2 を有する受容体の構成的に活性なバージョンは非内因性 G タンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、構成的活性は、細胞内 IP3 を増加させるためである。いくつかの実施形態において、構成的活性は、メラニン

50

保有細胞に色素分散を受けさせるためである。ある実施形態において、配列番号2を有する受容体の構成的に活性なバージョンは、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ポンベシン(6-14)が、それに対して、約10 μM未満、約5 μM未満、約1 μM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、約25 nM未満、約10 nM未満、または約5 nM未満の、FLIPRアッセイにおいて、またはメラニン保有細胞アッセイにおいて、またはIP3アッセイにおいて、該受容体におけるEC₅₀値を有するアゴニストであるGタンパク質共役受容体である。

【0406】

説明のために、限定されないが、N末端メチオニン残渣またはN末端シグナルペプチドの欠失は、本発明で用いることができる生物学的に活性な断片を提供すると考えられる。いくつかの実施形態において、本発明の生物学的に活性な断片は、構成的活性の検出可能なレベルを呈する断片である。いくつかの実施形態において、構成的活性は、細胞内IP3を増加させるためである。いくつかの実施形態において、構成的活性は、メラニン保有細胞に色素分配を受けさせるためである。ある実施形態において、本発明の生物学的に活性な断片は、それに対して、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ポンベシン(6-14)が、約10 μM未満、約5 μM未満、約1 μM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、約25 nM未満、約10 nM未満、または約5 nM未満の、FLIPRアッセイにおいて、またはメラニン保有細胞アッセイにおいて、またはIP3アッセイにおいて、該受容体におけるEC₅₀値を有するアゴニストであるGタンパク質共役受容体である。ある実施形態において、本発明の生物学的に活性な断片は、抗体を哺乳動物BRS-3に特異的に結合させる断片である。BRS-3に対する抗体は、商業的に入手可能であり；例えば、ヒトBRS-3に対する抗体はAtlas Antibodies (Stockholm, Sweden) から、およびABR-Affinity BioReagents (Golden, CO) から入手可能である。

【0407】

配列番号2のヒトBRS-3の対立遺伝子変種は、本発明の範囲内にあると考えられる。

【0408】

配列番号2のヒトBRS-3の哺乳動物オルソログである変種は、本発明の範囲内にあると考えられる。説明のために、限定されないが、マウスBRS-3(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号NP_033896)、ラットBRS-3(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号AF510984)、チンパンジーBRS-3(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号XP_001137541)、アカゲザルBRS-3(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号NP_001028074)、イヌBRS-3(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号XP_854769)、ヒツジBRS-3(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号NP_001009215)、ウシBRS-3(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号XP_584211)、およびモルモットBRS-3(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号P35371)は、本発明の範囲内であると考えられる。

【0409】

ある実施形態において、対象の方法で用いることができる変種Gタンパク質共役受容体は、配列番号2のアミノ酸配列において1個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有するGタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性哺乳動物Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性ヒトGタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は非内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は構成的活性の検出可能なレベルを呈する。いくつかの実施形態において、構成的活性は細胞内IP3を増加させるためである。いくつかの実施形態において、構成的

活性は、メラニン保有細胞に色素分散を受けさせるためである。いくつかの実施形態において、配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有する該Gタンパク質共役受容体は、それに対して、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン(6-14)が約10 μM未満、約5 μM未満、約1 μM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、約25 nM未満、約10 nM未満、または約5 nM未満のFLIPRアッセイにおいて、メラニン保有細胞アッセイにおいて、またはIP3アッセイにおいて、該受容体におけるEC₅₀値を有するアゴニストであるGタンパク質共役受容体である。

【0410】

ある実施形態において、本発明の方法で用いることができる変種Gタンパク質共役受容体は、配列番号2のアミノ酸配列における10以下の保存的アミノ酸置換および／または3以下の非保存的アミノ酸置換によって配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有するGタンパク質共役受容体である。ある実施形態において、アルギニン、リシンおよびヒスチジンは相互に対して保存的に置換可能であり；グルタミン酸およびアスパラギン酸は相互に対して保存的に置換可能であり；グルタミンおよびアスパラギンは相互に対して保存的に置換可能であり；ロイシン、イソロイシンおよびバリンは相互に対して保存的に置換可能であり；フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは相互に対して保存的に置換可能であり；またグリシン、アラニン、セリン、スレオニンおよびメチオニンは相互に対して保存的に置換可能である。アミノ酸置換、アミノ酸欠失およびアミノ酸付加は任意の位置（例えば、CまたはN末端、または内部位置）におけるものであってよい。いくつかの実施形態において、変種は内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性哺乳動物Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性ヒトGタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は非内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は構成的活性の検出可能なレベルを呈する。いくつかの実施形態において、構成的活性は細胞内IP3を増加させるためである。いくつかの実施形態において、構成的活性はメラニン保有細胞に色素分配を受けさせるためである。ある実施形態において、配列番号2から誘導されたアミノ酸配列を有する該Gタンパク質共役受容体は、それに対して、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン(6-14)が約10 μM未満、約5 μM未満、約1 μM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、約25 nM未満、約10 nM未満、または約5 nM未満のFLIPRアッセイにおいて、またはメラニン保有細胞アッセイにおいて、またはIP3アッセイにおいて、該受容体におけるEC₅₀値を有するアゴニストであるGタンパク質共役受容体である。

【0411】

配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の同一性を有する変種Gタンパク質共役受容体は、本発明の範囲内にあると考えられる。いくつかの実施形態において、変種は内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性哺乳動物Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性ヒトGタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は非内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は構成的活性の検出可能なレベルを呈する。いくつかの実施形態において、構成的活性は細胞内IP3を増加させるためのものである。いくつかの実施形態において、構成的活性はメラニン保有細胞に色素分配を受けさせるためである。ある実施形態において、配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の同一性を有するGタンパク質共役受容体は、それに対して、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン(6-14)が、約10 μM未満、約5 μM未満、約1 μM未満、約100 nM未満、約50 nM未満、約25 nM未満、約10 nM未満、または約5 nM未満のFLIPRアッセイにおいて、またはメラニン保有細胞

胞アッセイにおいて、またはIP3アッセイにおいて、該受容体におけるEC₅₀値を有するアゴニストであるGタンパク質共役受容体である。ある実施形態において、配列番号2に対して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の同一性を有するGタンパク質共役受容体は、哺乳動物BRS-3に抗体を特異的に結合させるGタンパク質共役受容体である。BRS-3に対する抗体は、商業的に入手可能であり；例えば、ヒトBRS-3に対する抗体はAtlas Antibodies (Stockholm, Sweden) から、およびABR-Affinity BioReagents (Golden, CO) から入手可能である。パーセント同一性は公知のコンピュータプログラムを用いて慣用的に決定することができる。

10

【0412】

ある実施形態において、本発明の方法で用いることができる変種Gタンパク質共役受容体は、配列番号2に対して少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。例えば、配列番号2に対して95%「同一性」を有する変種Gタンパク質共役受容体とは、変種のアミノ酸配列が、配列番号2の各100アミノ酸当たり5までのアミノ酸改変を含むことができる以外は、配列番号2のアミノ酸1～399と同一であることを意味する。かくして、例えば、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を得るためには、配列中のアミノ酸残基の5%（100のうち5）までを、配列番号2のアミノ酸1～399と比較して、別のアミノ酸で挿入し、欠失し、または置換することができる。これらの改変は、アミノまたはカルボキシ末端において、あるいは配列中の残基のうちいずれかに左右されて散在するそれらの末端位置間の任意の箇所、または配列内の1以上の連続基において起こり得る。

20

【0413】

いくつかの実施形態において、本発明の方法で用いることができる変種Gタンパク質共役受容体は、ストリンジェントな条件下で配列番号1の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性哺乳動物Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は内因性ヒトGタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は非内因性Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態において、変種は、構成的活性の検出可能なレベルを呈する。いくつかの実施形態において、構成的活性は、細胞内IP3を増加させるためである。いくつかの実施形態において、構成的活性はメラニン保有細胞に色素分散を受けさせるためである。ある実施形態において、ストリンジェントな条件下で配列番号1の相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるGタンパク質共役受容体は、それに対して、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン(6-14)が、約10μM未満、約5μM未満、約1μM未満、約100nM未満、約50nM未満、約25nM未満、約10nM未満、または約5nM未満のFLIPRアッセイにおいて、またはメラニン保有細胞アッセイにおいて、またはIP3アッセイにおいて、該受容体におけるEC₅₀値を有するアゴニストであるGタンパク質共役受容体である。ハイブリダイゼーション技術は当業者によく知られている。いくつかの実施形態において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は：50%ホルムアミド、5×SSC（1×SSC=150mM NaCl, 15mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルトの溶液10%デキストラン硫酸、および20μg/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での42℃における一晚のインキュベーション；続いての、約50℃、約55℃、約60℃、または約65℃における0.1×SSCまたは0.2×SSC中でのフィルタの洗浄を含む。いくつかの実施形態において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC（1×SSC=150mM NaCl, 15mMクエン酸

30

40

50

三ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハルトの溶液、10%デキストラン硫酸および20 μg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での42℃における一晩のインキュベーション; 続いての、約50℃、約55℃、約60℃、または約65℃における、0.1×SSC/0.1%SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、または0.2×SSC/0.1%SDS中でのフィルタの洗浄を含む。

【0414】

a. 配列の同一性

ある実施形態において、パーセント同一性は、当該分野でよく知られている基本ローカルアラインメント検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool (「BLAST」)) を用いて評価する [例えば、その各々の開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Karlin and Altschul, Proc Natl Acad Sci USA (1990) 87:2264-2268; Altschulら、J Mol Biol (1990) 215:403-410; Altschulら、Nature Genetics (1993) 3:266-272; and Altschulら、Nucleic Acids Res (1997) 25:3389-3402 参照]。BLASTプログラムは、ユーザによって供されるデフォルトパラメータ、または修飾パラメータで用いることができる。好ましくは、パラメータはデフォルトパラメータである。

【0415】

ある実施形態において、グローバル配列アラインメントとも言われる、クエリ配列 (例えば、配列番号2のアミノ酸配列) および検索すべき配列の間の最良な全体の一致を決定するための好ましい方法は、Brutlagら [Comp App Biosci (1990) 6:237-245; その開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる] のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを用いて決定することができる。配列アラインメントにおいて、クエリ配列および検索された配列は共にアミノ酸配列である。該グローバル配列アラインメントの結果はパーセント同一性で表される。FASTDBアミノ酸アラインメントで用いる好ましいパラメータは: マトリックス= PAM0、k-tuple=2、ミスマッチペナルティ=1、ジョイニングペナルティ=20、ランダム化グループ=25、長さ=0、カットオフスコア=1、ウィンドウサイズ=配列長さ、ギャップペナルティ=5、ギャップサイズペナルティ=0.05、ウィンドウサイズ=247、または検索されたアミノ酸配列の長さのいずれかの短い方である。

【0416】

検索された配列が、内部欠失のためではなく、NまたはC末端欠失のためクエリ配列よりも短いとき、パーセント同一性において、結果は手動で修正する必要がある。なぜならば、FASTDBプログラムは、グローバルパーセント同一性を計算する場合に、検索された配列のNおよびC末端切形を説明しないからである。クエリ配列に対するNおよびC末端において切形された検索された配列については、パーセント同一性は、クエリ配列の合計残基のパーセントとしての、対応する検索された配列残基と一致/整列しない、検索された配列のNおよびC末端にあるクエリ配列の残基の数を計算することによって修正される。残基が一致/整列したか否かは、FASTDB配列アラインメントの結果によって決定される。このパーセンテージは、次いで、特定のパラメータを用いる前記FASTDBプログラムによって計算されたパーセント同一性から差し引いて、最終のパーセント同一性スコアに到達させる。この最終のパーセント同一性スコアは、本発明の目的に用いるものである。クエリ配列と一致/整列しない、検索された配列のNおよびC末端に対する残基のみが、パーセント同一性スコアを手動で調整する目的で考えられる。すなわち、検索された配列の最も遠いNまたはC末端残基の外側にあるクエリアミノ酸残基のみである。

【0417】

例えば、90アミノ酸残基検索配列を100残基クエリ配列と整列させて、パーセント同一性を決定する。欠失は、検索配列のN末端で起こり、従って、FASTDBアライン

メントはN末端における最初の残基と一致／整列しない。10の不对残基は、配列の10%（一致しないNおよびC末端における残基の数／クエリ配列における残基の合計数）を表わし、従って、10%はFASTDBプログラムによって計算されたパーセント同一性スコアから差し引かれる。残りの90残基が完全に一致すれば、最終のパーセント同一性は90%となろう。

【0418】

別の例において、90残基検索配列は100残基クエリ配列と比較される。このときの欠失は内部であり、従って、クエリと一致／整列しない、検索配列のNまたはC末端には残基が存在しない。この場合、FASTDBによって計算されるパーセント同一性は手動で修正されない。再度、クエリ配列と一致／整列しない、FASTDBに提示された、対象の配列のNおよびC末端の外側の残基位置のみが手動で修正される。他の修正は、本発明の目的のためになされる。

【0419】

b. 融合タンパク質

ある実施形態において、目的とするポリペプチドは、融合タンパク質であり、例えば、親和性タグドメインまたはレポータードメインを含有することができる。適当な親和性タグは、別の部位、通常は別のポリペプチド、最も通常には抗体に特異的に結合することができるいずれのアミノ酸配列も含む。適当な親和性タグは、例えば、当該分野で知られているように、エピトープタグ、例えば、（血球凝集素インフルエンザウイルスからの）V5タグ、FLAGタグ、HAタグ、mycタグなどを含む。適当な親和性タグは、当該分野で知られているように、結合基質が知られているドメイン、例えば、HIS、GSTおよびMBPタグ、および特異的結合パートナー、例えば、抗体、特にモノクローナル抗体が入手可能である他のタンパク質からのドメインも含む。適当な親和性タグは、特異的に結合し、かつ適当な結合パートナー、例えば、IgG Fc受容体を用いて検出することができる、IgG Fc領域などのいずれのタンパク質-タンパク質相互作用ドメインも含む。そのような融合タンパク質は、欠失した、または代替アミノ酸で置換されたそのN末端メチオニン残基を有するGPCRとインフレームで融合した異種N末端ドメイン（例えば、エピトープタグ）を含有できると明らかに意図される。

【0420】

適当なレポータードメインは、ポリペプチドの存在を報告することができる任意のドメインも含む。親和性タグを用いて、例えば、タグに特異的に結合する標識された抗体を用いてポリペプチドの存在を報告してもよいが、発光レポータードメインはより通常に用いられる。適当な発光レポータードメインは（例えば、ホタル、ウミホタル属（*Vargula*）、ウミシイタケ（*Renilla reniformis*）またはレミラ・ミュレリ（*Renilla muelleri*）からの）ルシフェラーゼ、またはその発光変種を含む。他の適当なレポータードメインは（例えば、クラゲ、サンゴ、およびエクオリア（*Aequoria*）、ウミシイタケ（*Renilla*）、*Ptilosarcus*、*Stylatula*種からのものなどの他の腔腸動物からの）蛍光タンパク質、またはその発光変種を含む。これらのレポータータンパク質の発光変種は当該分野で非常によく知られており、天然レポータータンパク質と比較して、より明るく、よりばやけたものであってよく、あるいは異なる励起および／または発光スペクトルを有してもよい。例えば、いくつかの変種は、当該分野で知られているように、それらがもはや緑色には見えず、青色、シアン色、黄色、増強された黄赤色（各々、BFP、CFP、YFP、eYFPおよびRFPと呼ばれる）に見えてよく、または他の発光スペクトルを有してもよいように改変される。他の適当なレポータードメインは、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、および分泌された胚アルカリ性ホスファターゼなどの生化学的変化または色の変化を通じてポリペプチドの存在を報告することができるドメインを含む。

【0421】

また、当該分野で知られているように、親和性タグまたはレポータードメインは、目的

とするポリペプチド中のいずれの位置に存在してもよい。しかしながら、ほとんどの実施形態においては、それらが目的とするポリペプチドのCまたはN末端に存在する。

【0422】

2. 目的とするGPCRポリペプチドをコードする核酸

核酸を操作するための遺伝子暗号および組換え技術は公知であり、目的とするGPCRポリペプチドのアミノ酸配列は先に記載されているので、目的とするGPCRポリペプチドをコードする核酸の設計および生産は、十分に当業者の技量内である。ある実施形態において、標準的な組換えDNA技術(Ausubel, ら、Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook, ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (1989) Cold Spring Harbor, N. Y.) 方法が用いられる。例えば、GPCRコード配列は、本明細書に記載される必要がない種々の組換え方法のいずれか1つ、またはその組合せを用いて、GPCRコード配列のライブラリーから単離することができる。タンパク質をコードする核酸配列中のヌクレオチドの引き続いての置換、欠失、および/または付加もまた、標準的な組換えDNA技術を用いてなすこともできる。

【0423】

例えば、部位特異的突然変異誘発およびサブクローニングを用いて、目的とするポリペプチドをコードするポリヌクレオチド中の核酸残基を導入/欠失/置換することができる。他の実施形態において、PCRを用いてもよい。目的とするポリペプチドをコードする核酸は全体がオリゴヌクレオチドから化学合成によって作製することもできる(例えば、Cell ら、Science (2002) 297:1016-8)。

【0424】

いくつかの実施形態において、目的とするポリペプチドをコードする核酸のコドンは、特定の種、特に哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、非ヒト霊長類またはヒト種の細胞での発現について最適化される。いくつかの実施形態において、目的とするポリペプチドをコードする核酸のコドンは、特定の種、特に両生類種の細胞での発現について最適化される。

【0425】

a. ベクター

本発明は、さらに、対象の核酸を含む(「構築体」とも言われる)ベクターを提供する。本発明の多くの実施形態において、対象の核酸配列は、配列が、例えば、プロモータを含めた発現制御配列に作動可能に連結された後に宿主において発現されるであろう。対象の核酸は、典型的には、エピソードとして、または宿主染色体DNAの集積部分として、宿主細胞において複製することができる発現ベクターに配置される。通常、発現ベクターは選択マーカー、例えば、テトラサイクリンまたはネオマイシンを含有して、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にする(例えば、本明細書において参照により組み込まれる米国特許第4,704,362号参照)。単一および二重発現カセットベクターを含めたベクターは当該分野でよく知られている(Ausubel, ら、Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook, ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor, N. Y.)。適当なベクターはウイルスベクター、プラスミド、コスミド、人工染色体(ヒト人工染色体、細菌人工染色体、酵母人工染色体など)、ミニ染色体などを含む。レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスベクターを用いてもよい。

【0426】

種々の発現ベクターが、細胞中の目的とするポリペプチドを生産する目的で当業者も入手可能であり、(例えば、Invitrogen, Carlsbad, CA; Clontech, Mountain View, CA; Stratagene, La Jolla

a, C A から) 商業的に入手可能な発現ベクターを含む。商業的に入手可能な発現ベクターは、非限定例として、CMVプロモータベースのベクターを含む。1つの適当な発現ベクターはpCMVである。発現ベクターはアデノウイルスであってよい。例示的なアデノウイルスベクターは、Qbiogene (Carlsbad, CA) からAdEasy (商標) として購入することができる [その各々の開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Hutchinsonら、Proc Natl Acad Sci USA (1998) 95:2509-2514; および米国特許第5,922,576号]。他の適当な発現ベクターは当業者に容易に明らかであろう。

【0427】

対象の核酸は、通常、目的とする対象のポリペプチドをコードする単一のオープンリーディングフレームを含み、ある実施形態においては、目的とするポリペプチドの発現のための宿主細胞は真核生物細胞、例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞であってよいので、オープンリーディングフレームはイントロンによって中断されていてもよい。対象の核酸は、典型的には、対象の核酸に加えて、RNA安定性、翻訳効率などを指令することができる3'および5'非翻訳領域(UTR)を含有することができる転写ユニットの一部である。対象の核酸は、対象の核酸に加えて、目的とするポリペプチドの転写および発現を指令する核酸プロモータ、および転写ターミネータを含有する発現カセットの一部であってもよい。

【0428】

真核生物プロモータは、ウイルスプロモータおよび真核生物遺伝子に由来するプロモータを含めた、真核生物宿主生物において機能的であるいずれのプロモータでもあり得る。例示的な真核生物プロモータは、限定されないが、以下：マウスメタロチオネインI遺伝子配列のプロモータ(Harmerら、J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288, 1982); ヘルペスウイルスのTKプロモータ(McKnight, Cell 31:355-365, 1982); SV40初期プロモータ(Benoistら、Nature (London) 290:304-310, 1981); 酵母gal1遺伝子配列プロモータ(Johnstonら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975, 1982) Silverら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:5951-5955, 1984)、CMVプロモータ、EF-1プロモータ、エクジソン応答性プロモータ、テトラサイクリン応答性プロモータなどを含む。ウイルスプロモータは特に注目すべきものであろう。というのはそれらが一般に特に強いプロモータだからである。ある実施形態において、標的病原体のプロモータであるプロモータを用いる。本発明で用いるプロモータは、それらが導入されている細胞型(および/または動物)においてそれらが機能的であるように選択される。ある実施形態において、プロモータは、CMVプロモータである。

【0429】

ある実施形態において、対象のベクターは選択マーカーの発現を提供することもできる。適当なベクターおよび選択マーカーは当該分野でよく知られており、Ausubel, Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995) および Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (2001) Cold Spring Harbor, N. Y.) において議論されている。種々の異なる遺伝子が選択マーカーとして使用されてきたが、対象のベクターにおいて選択マーカーとして使用される特定の遺伝子は、主として、便宜のために選択される。公知の選択マーカー遺伝子は：チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子、キサントシングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子、CAD、アデノシンデアミナーゼ遺伝子、アスパラギンシンターゼ遺伝子、抗生物質耐性遺伝子、例えば、tet^r、amp^r、Cmrまたはcat、kan^rまたはneo^r (アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子)、ヒグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子などを含む。

【0430】

前記したように、目的とするポリペプチドは、アフィニティドメインおよび／またはレポータードメインを含有する融合タンパク質であってよい。例えば、GPCRのCまたはN末端において、レポーターまたはタグおよびGPCRの間の融合を作製する方法は十分に当業者の技量内であり（例えば、McLeanら、Mol. Pharma. Mol Pharmacol. 1999 56:1182-91; Ramsayら、Br. J. Pharmacology, 2001, 315-323）、これ以上は記載しない。そのような融合タンパク質は、欠失、または代替アミノ酸で置換されたそのN末端メチオニン残基を有していたGPCRとインフレーム融合した異種N末端ドメイン（例えば、エピトープタグ）を含有してもよいことは明示的に考えられる。目的とするポリペプチドは、まず、天然ポリペプチドから作製することができ、次いで、前記したような、適当なレポーター／タグに作動可能に連結することができる。

10

【0431】

対象の核酸は、制限部位、多重クローニング部位、プライマー結合部位、結紮可能な端部、組換え部位などを含有して、通常、目的とするポリペプチドをコードする核酸の構築を容易にすることもできる。

【0432】

b. 宿主細胞

本発明は、さらに、対象の核酸を含むベクターを含む宿主細胞を提供する。適当な宿主細胞は、原核生物、例えば、細菌細胞（例えば、大腸菌）、ならびに真核生物細胞、例えば、動物細胞（例えば、昆虫、哺乳動物、魚類、両生類、鳥類、または爬虫類細胞）、植物細胞（例えば、トウモロコシ、またはシロイヌナズナ（*Arabidopsis*）細胞）、または真菌（例えば、酵母細胞、出芽酵母（*S. cerevisiae*）細胞）を含む。ある実施形態において、目的とするポリペプチドをコードする核酸の発現に適したいずれの細胞も宿主細胞として用いることができる。通常、動物宿主細胞系が用いられ、その例は以下の通りである：サル腎臓細胞（COS細胞）、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1細胞（COS-7, ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓細胞（HEK-293 [「293」], Grahamら、J. Gen Virol. 36:59 (1977)）；HEK-293T [「293T」] 細胞；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK, ATCC CCL10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO, Ur1aub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216, (1980)）；シリアンゴールデンハムスター細胞MCB3901（ATCC CRL-9595）；マウスセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；ヒト頸癌腫細胞（HeLa, ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；パフフローラット肝臓細胞（BRL 3A, ATCC CRL 1422）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（hep G2, HB8065）；マウス乳癌（MMT 060562, ATCC CCL 51）；TRI細胞（Matherら、Annals N. Y. Acad. Sci 383:44-68 (1982)）；NIH/3T3細胞（ATCC CRL-1658）；およびマウスL細胞（ATCC CCL-1）。

20

30

40

【0433】

ある実施形態において、メラニン保有細胞が用いられる。メラニン保有細胞は下等脊椎動物で見出される皮膚細胞である。関連物質および方法は、米国特許第5,462,856号および米国特許第6,051,386号の開示に従うだろう。これらの特許の開示はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0434】

ある実施形態において、酵母細胞が用いられる。

【0435】

50

さらなる細胞系は当業者に明らかとなり、広く種々の細胞系が American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 から入手可能である。

C. 候補化合物のスクリーニング

1. 一般的 GPCR スクリーニング アッセイ 技術

Gタンパク質受容体は、活性になると Gタンパク質（例えば、Gq, Gs, Gi, Gz, Go）に結合し、GTP の Gタンパク質への結合を刺激する。次いで、Gタンパク質は GTPase として作用し、GTP をゆっくりと GDP まで加水分解し、それにより、受容体は、通常の条件下では、脱活性化されるようになる。しかしながら、活性化された受容体は継続的に GDP を GTP に交換する。GTP の非加水分解可能類縁体である [³⁵S] GTPγS を用いて、活性化された受容体を発現する膜への増強された結合をモニタリングすることができる。[³⁵S] GTPγS を用いて、リガンドの不在下および存在下での膜への Gタンパク質共役をモニタリングすることができる。とりわけ、当業者によく知られ、かつ入手可能なこのモニタリングの例は、1995 年に Traynor および Nahorski によって報告された。このアッセイ系の好ましい使用は、候補化合物の初期スクリーニングのためである。なぜならば、該系が、受容体の細胞内ドメインと相互作用する特定の Gタンパク質にかかわらず、全ての Gタンパク質共役受容体に一般的に適応可能だからである。

【0436】

2. 特異的な GPCR スクリーニング アッセイ 技術

「一般的」Gタンパク質共役レポーターアッセイ（すなわち、アゴニストまたは逆アゴニストである化合物を選択するためのアッセイ）を用いて候補化合物を同定すると、いくつかの実施形態において、化合物が受容体部位において相互作用したことを確認するためのさらなるスクリーニングが好ましい。例えば、「一般的」アッセイによって同定された化合物はレポーターに結合しなくてもよいが、代わりに、単に、細胞内ドメインからの Gタンパク質に「共役解除」してもよい。

【0437】

a. Gs、Gz および Gi

Gs は酵素 アデニルシクラーゼを刺激する。GI（および Gz および Go）は、他方、アデニルシクラーゼを阻害する。アデニルシクラーゼは、ATP の cAMP への変換を触媒し；かくして、Gs タンパク質を共役させる活性化された GPCR は、cAMP の増大した細胞レベルと関連付けられる。他方、Gi（または Gz、Go）タンパク質を共役させる活性化された GPCR は、cAMP の減少した細胞レベルと関連付けられる。一般に、「Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission,」Chpt. 8, From Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J. G. ら、eds. Sinauer Associates, Inc. (1992) 参照。かくして、cAMP を検出するアッセイを利用して、候補化合物が、例えば、受容体に対する逆アゴニストであるかを決定することができる（すなわち、そのような化合物は cAMP のレベルを減少させるであろう）。cAMP を測定するための当該分野で公知の種々のアプローチを利用することができ；いくつかの実施形態において、好ましいアプローチは、ELISA ベースのフォーマットでの抗 cAMP 抗体の使用に依拠する。利用することができる別のタイプのアッセイは、全細胞第 2 メッセンジャーレポーター系アッセイである。遺伝子上のプロモータは、特定の遺伝子がコードするタンパク質の発現を駆動する。環状 AMP は、次いで、cAMP 応答エレメントと呼ばれる特異的部位においてプロモータに結合し、遺伝子の発現を駆動する、cAMP 応答性 DNA 結合タンパク質または転写因子 (CREB) の結合を促進することによって遺伝子発現を駆動する。レポーター遺伝子、例えば、β-ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼの前に多数の cAMP 応答エレメントを含有するプロモータを有するレポーター系を構築することができる。かくして、活性化された Gs 連結レポーターは、次いで、遺

伝子を活性化させ、レポータータンパク質の発現を活性化させる cAMP の蓄積を引き起こす。β-ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼなどのレポータータンパク質は、次いで、標準的な生化学的アッセイ (Chemら、1995) を用いて検出することができる。

【0438】

b. G_oおよびG_q

G_qおよびG_oは酵素ホスホリパーゼCの活性化に関連しており、該酵素は、今度は、リン脂質PIP₂を加水分解し、2つの細胞内メッセンジャー：ジアシルグリセロール (DAG) およびイノシトール1, 4, 5-三リン酸 (IP3) を放出する。IP3の増大した蓄積は、G_qおよびG_o関連受容体の活性化に関連付けられる。一般に、「Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission, Chpt. 8, Fromm Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J. G. ら、eds. Sinauer Associates, Inc. (1992) 参照。IP3蓄積を検出するアッセイを利用して、候補化合物が、例えば、G_qまたはG_o関連受容体に対する逆アゴニストであるかを決定することができる (すなわち、そのような化合物はIP3のレベルを減少させるであろう)。G_q関連受容体もまた、G_q依存性ホスホリパーゼCが、AP1エレメントを含有する遺伝子の活性化を引き起こす点で、AP1レポーターアッセイを用いて調べることができ；かくして、活性化されたG_q関連レポーターは、そのような遺伝子の発現の増加を証明し、それにより、逆アゴニストは、そのような発現の減少の証拠となり、アゴニストはそのような発現の増加の証明となろう。そのような検出のための商業的に入手可能なアッセイは入手可能である。

【0439】

3. GPCR融合タンパク質

逆アゴニストまたはアゴニストの直接同定用の候補化合物のスクリーニングで用いられる、内因性の構成的に活性なGPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRの使用は、定義により、受容体がそれに結合した内因性リガンドの不在下でさえ活性である点で、興味深いスクリーニングチャレンジを提供する。かくして、例えば、化合物が逆アゴニストまたはアゴニストであり得るか、またはそのような受容体に対して影響を有しないか否かの理解を可能にする分別を目的とし、例えば、候補化合物の存在下における非内因性受容体およびその化合物の不在下における非内因性受容体を識別するために、いくつかの実施形態においては、そのような分別を高めることができるアプローチを利用するのが好ましい。いくつかの実施形態において、好ましいアプローチは、GPCR融合タンパク質の使用である。

【0440】

一般に、前記したアッセイ技術 (ならびに当業者に知られた他の技術) を用いて、非内因性GPCRが構成的に活性化されたと判断されると、内因性GPCRと共役する主要なGタンパク質を決定することが可能である。Gタンパク質のGPCRへの共役は評価することができるシグナリング経路を提供する。いくつかの実施形態において、哺乳動物またはメラニン保有細胞発現系を用いてスクリーニングを行うのが好ましい。というのはそのような系はそこに内因性Gタンパク質を有すると期待されるからである。かくして、定義により、そのような系においては、非内因性の構成的に活性化されたGPCRは連続的にシグナルを発するであろう。いくつかの実施形態において、このシグナルは、例えば、受容体に対する逆アゴニストの不在下において、特に、スクリーニングとの関係では、それが逆アゴニストと接触した場合に、受容体との間をより容易に分別するのが可能であろう。

【0441】

GPCR融合タンパク質は、GPCRとのGタンパク質共役の効率を高めることが意図されている。GPCR融合タンパク質は、内因性の構成的に活性なGPCRまたは非内因性の構成的に活性化されたGPCRいずれかでのスクリーニングに好ましいだろう。なぜならば、そのようなアプローチは、そのようなスクリーニング技術において生じるシグナ

ルを増加させるからである。これは、重要な「ノイズに対するシグナル」比率を促進するのに重要であり；そのような重要な比率は、本明細書に開示された候補化合物のスクリーニングに好ましい。

【0442】

GPCR融合タンパク質の発現で有用な構築体の構築は、当業者が有する視界内にある。商業的に入手可能な発現ベクターおよび系は、調査者の特定のニーズに適合し得る種々のアプローチを提供する。そのようなGPCR融合タンパク質構築体の構築における重要な基準は、限定されないが、GPCR配列およびGタンパク質配列が、共に、インフレームにあること（好ましくは、内因性GPCRについての配列はGタンパク質配列の上流にある）、およびGPCRの「停止」コドンが、GPCRの発現に際して、Gタンパク質もまた発現させることができるように、欠失または置換されていることを含む。GPCRはGタンパク質に直接連結させることができ、あるいは2つの間にスペーサ残基が有り得る（好ましくは、約12以下であれば、この数字は当業者によって容易に確認することができる）。便宜性に基づき、スペーサを用いるのが好ましい。いくつかの実施形態において、非内因性GPCRに共役するGタンパク質は、GPCR融合タンパク質構築体の作製に先立って同定されているのが好ましい。同定されているGタンパク質は少数であるにすぎないので、Gタンパク質の配列を含む構築体（すなわち、ユニバーサルGタンパク質構築体、以下の実施例4（a）参照）がその中へのGPCR配列の挿入のために利用できるのが好ましく；これは、異なる配列を有する種々の異なるGPCRの大規模なスクリーニングに関してさらなる効率を提供する。

【0443】

前記したように、Gi、GzおよびGoに共役する活性化されたGPCRは、これらのタイプのGPCR挑戦に基づくcAMP作製アッセイの形成を阻害すると期待される〔すなわち、cAMPシグナルは、活性化に際し減少し、かくして、例えば、（このシグナルをさらに減少させだあろう）アゴニストチャレンジの直接同定を行う。本明細書に開示されているように、これらのタイプの受容体では、活力のあるシクラーゼベースのアッセイを確立する努力において、GPCRの内因性Gタンパク質に基づかないGPCR融合タンパク質を作り出すことが可能であることは確認されている。かくして、例えば、内因性Gi共役受容体は、Gsタンパク質に融合することができ—そのような融合構築体は、発現に際して、シクラーゼベースのアッセイを確立できるように、「天然」Giタンパク質よりはむしろ、例えば、Gsと共役するように内因性GPCRを「駆動する」または「強いる」。かくして、Gi、GzおよびGo共役受容体では、いくつかの実施形態において、GPCR融合タンパク質を用い、アッセイがアデニルシクラーゼ活性の検出に基づく場合、融合構築体はGs（または酵素アデニルシクラーゼの形成を刺激する同等のGタンパク質）によって確立されるのが好ましい。

【0444】

【表 C】

表C

G タンパク質	GPCRの活性化 (すなわち、構成 的活性化、または アゴニスト結合)に 際してのcAMP 生産に対する効果	GPCRの活性化 (すなわち、構成 的活性化、または アゴニスト結合)に 際してのIP3蓄積 に対する効果	逆アゴニストとの 接触に際しての cAMP生産に 対する効果	逆アゴニストとの 接触に際しての IP3蓄積に対する 効果
Gs	増加	N/A	減少	N/A
Gi	減少	N/A	増加	N/A
Gz	減少	N/A	増加	N/A
Go	減少	増加	増加	減少
Gq	N/A	増加	N/A	減少

同等に効果的なのは、Gs、Gi、GzまたはGoタンパク質と融合したGqタンパク質を利用するGタンパク質融合構築体である。いくつかの実施形態において、好ましい融合構築体は、Gqタンパク質で達成することができ、ここで、Gタンパク質 α -サブユニット（「G α q」）の最初の6つのアミノ酸は欠失されており、G α qのC末端における最後の5つのアミノ酸は目的とするGタンパク質のG α の対応するアミノ酸で置き換えられている。例えば、融合構築体は、Giタンパク質と融合したGq（6アミノ酸欠失）を有することができ、その結果、「Gq/Gi融合構築体」がもたらされる。この融合構築体は、第2のメッセンジャー、例えば、イノシトール三リン酸またはジアシルグリセロールがcAMP生産の代わりに測定できるように、内因性Gi共役受容体をその非内因性Gタンパク質、Gqに共役させる。

【0445】

4. 標的Gi共役GPCRの、シグナル増強体Gs共役GPCRとの同時トランスフェクション（cAMPベースのアッセイ）

Gi共役受容体はアデニルシクラーゼを阻害することが知られており、従って、cAMP生産のレベルを減少させ、これはcAMPレベルの評価を興味深くすることができる。ある実施形態において、活性化に際して優先的にGiに共役する受容体の活性化の指標としてcAMPの生産の減少を測定する際に効果的な技術は、シグナル増強体、例えば、活性化に際してGsと優先的に共役する非内因性の構成的に活性化された受容体（例えば、TSHR-A6231；後記参照）をGi連結GPCRで同時トランスフェクトすることによって達成することができる。明らかなように、Gs共役受容体の活性化は、cAMPの生産の増加に基づいて決定することができる。Gi共役受容体の活性化は、cAMPの生産の減少に導く。かくして、同時トランスフェクションアプローチは、これらの「反対」効果を有利に開発することを意図する。例えば、非内因性の構成的に活性化されたGs共役受容体（「シグナル増強体」）の発現ベクター単独での同時トランスフェクションは、ベースラインcAMPシグナルを提供する（すなわち、Gi共役受容体はcAMPレベルを減少させるが、この「減少」は、構成的に活性化されたGs共役シグナル増強体によって確立されたcAMPレベルの実質的増加に相対的であろう）。次いで、シグナル増強体を「標的受容体」で同時トランスフェクトすることによって、Gi共役標的受容体の逆アゴニストは測定されたcAMPシグナルを増強させ、他方、Gi共役標的受容体のアゴニストはこのシグナルを減少させるであろう。

【0446】

このアプローチを用いて直接同定される候補化合物を独立して評価して、これらはシグナル増強受容体を標的としないことを確実にする必要がある（これは、同時トランスフェ

クトされた受容体に対するスクリーニングに先立って、またはその後に行うことができる)。

D. 例示的な BRS-3 アゴニスト

本発明の方法で有用な例示的な BRS-3 アゴニストは、表 D で供される化合物を含む。表 D における化合物は、加えて、BRS-3 の例示的なリガンドである。

【0447】

BRS-3 アゴニストの例は Weber ら、J Med Chem (2003) 46: 1918-1930 に記載されており、その開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる。

【0448】

BRS-3 アゴニストの例は Mantey ら、J Pharmacol Exp Ther (2004) 310: 1161-1169 に記載されており、その開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる。

【0449】

BRS-3 アゴニストの例は Boyle ら、J Peptide Sci (2005) 11: 136-141 に記載されており、その開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる。

【0450】

BRS-3 アゴニストの例は Lammerich ら、Br J Pharmacol (2003) 138: 1431-1440 に記載されており、その開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる。

【0451】

BRS-3 アゴニストの例は、Gonzalez ら、Pharmacol Exp Ther (2007 Nov 15) に記載されており、その開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる。

【0452】

ある実施形態において、BRS-3 アゴニストは、表 D から選択される化合物である。

【0453】

ある実施形態において、BRS-3 アゴニストは、化合物 D1、化合物 D2、化合物 D3、化合物 D4、化合物 D5、化合物 D6、化合物 D7、化合物 D8、化合物 D9、化合物 D10、化合物 D11、化合物 D12、化合物 D13、化合物 D14、化合物 D15、化合物 D16、化合物 D17、化合物 D18、化合物 D19、化合物 D20、化合物 D21、化合物 D22、化合物 D23、化合物 D24、化合物 D25、化合物 D26、化合物 D27 から選択される化合物であり；これらの化合物は Weber ら、J Med Chem (2003) 46: 1918-1930 に見出すことができ、選択的 BRS-3 アゴニストとして記載される。

【0454】

ある実施形態において、BRS-3 アゴニストは、化合物 D28、化合物 D29、化合物 D30 から選択される化合物であり；これらの化合物は Mantey ら、J Pharmacol Exp Ther (2004) 310: 1161-1169 に見出すことができ、選択的 BRS-3 として記載されている。

【0455】

ある実施形態において、BRS-3 アゴニストは化合物 D31、化合物 D32、化合物 D33 から選択される化合物であり、これらの化合物は、Boyle ら、J Peptide Sci (2005) 11: 136-141 に見出すことができ、選択的 BRS-3 アゴニストとして記載されている。

【0456】

ある実施形態において、BRS-3 アゴニストは化合物 D34 であり；この化合物は Mantey ら、J Biol Chem (1997) 272: 26062-26071 に見出すことができ、GRP-R および NMB-R を超えて BRS-3 に対して非選択的な

10

20

30

40

50

B R S - 3 アゴニストとして記載されている。

【 0 4 5 7 】

ある実施形態において、B R S - 3 アゴニストは化合物 D 3 5 であり；この化合物は、M a n t e y ら、J B i o l C h e m (1 9 9 7) 2 7 2 : 2 6 0 6 2 - 2 6 0 7 1 に言い出すことができ、B R S - 3 アゴニストとして記載されている。

【 0 4 5 8 】

【表 D - 1】

表D

化合物番号	化合物
D1	N1-[(1R)-2-(1H-3-インドリル)-1-[1-(2-フェニルエチル)カルバモイル]エチル]-(2S)-2-[1-(2-(4-クロロフェニル)エチル)カルボキサミド]ペンタンジアミド
D2	N1-[(1R)-2-(1H-3-インドリル)-1-[1-(2-フェニルエチル)カルバモイル]エチル]-(2S)-2-[(1H-2-インドリルメチル)カルボキサミド]ペンタンジアミド
D3	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(ベンジルカルボキサミド)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D4	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(4-クロロベンジル)-カルボキサミド]エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D5	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-((1, 3-ベンゾジオキソール-5-イルメチル)カルボキサミド)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D6	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-((3-ピリジル)メチルカルボキサミド)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D7	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-((1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-イソキノリニル)メチルカルボキサミド)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D8	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-((1H-2-インドリル)メチルカルボキサミド)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D9	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(ベンジル)アミノ]メチルカルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D10	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(4-クロロベンジル)アミノ]メチルカルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D11	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(3-ピリジル)メチルアミノ]メチルカルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D12	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(2-フェニルエチル)アミノ]メチルカルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D13	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(ベンジルアミノ)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D14	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(4-クロロベンジル)アミノ]エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D15	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[1S]-1-(1-(2-フェニルエチル)アミノ)エチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D16	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N']-(ベンゾイル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D17	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N']-(4-クロロベンゾイル)-ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D18	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N']-(2-(3-ピリジル)エタノイル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D19	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N']-(2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-イソキノリニル)エタノイル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド

10

20

30

40

50

【 0 4 5 9 】

【 表 D - 2 】

D20	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(2-(1H-2-インドリル)エタノイル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D21	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(フェニルメチレン)-ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D22	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(フラン-2-イルメチレン)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D23	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(ベンジル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D24	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(4-クロロベンジル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D25	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[N'-(2-フリルメチル)ヒドラジノ]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D26	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[4-ベンジルピペラジノ]メチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D27	N1-(2-フェニルエチル)-(2R)-2-[[4-ベンジルピペリジノ]メチル]カルボキサミド]-3-(1H-3-インドリル)プロパンアミド
D28	[D-Tyr ⁶ , (R)-Apa ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]ボンベシン(6-14) (式中、Apaはアミノプロピオン酸を表す)
D29	[D-Tyr ⁶ , (S)-Apa ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]ボンベシン(6-14) (式中、Apaはアミノプロピオン酸を表す)
D30	[D-Tyr ⁶ , (R)-Apa ¹¹ -4Cl, Phe ¹³ , Nle ¹⁴]ボンベシン(6-14) (式中、Apaはアミノプロピオン酸を表す)
D31	Ac-Phe-Trp-Ala-His(τ Bzl)-Nip-Gly-Arg-NH ₂ (式中、Nipはピペリジン-3-カルボン酸を表す)
D32	Ac-Phe ⁷ -Trp ⁸ -Ala ⁹ -His(τ Bzl) ¹⁰ -β Ala ¹¹ -His ¹² -Arg ¹³ -NH ₂
D33	Ac-Phe ⁷ -Trp ⁸ -Ala ⁹ -Val ¹⁰ -β Ala ¹¹ -His ¹² -Arg ¹³ -Trp-NH ₂
D34	[D-Tyr ⁶ , β Ala ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]ボンベシン(6-14) (式中、Nleはノルロイシンを表す)
D35	[D-Phe ⁶ , β -Ala ¹¹ , Phe ¹³ , Nle ¹⁴]ボンベシン(6-14) (式中、Nleはノルロイシンを表す)

10

20

30

表 D 中の化合物は個々に、または本発明の任意の実施形態における任意の組合せにて用いることができることが明示的に考えられる。また、表 D 中の化合物は個々に、または本発明の任意の実施形態からの任意の組合せにて排除することができることが明示的に考えられる。

【 0 4 6 0 】

加えて表 D に列挙されたものを含めた本発明の化合物は、その医薬上許容される塩、水和物、溶媒和物、幾何異性体、互変異性体、および光学異性体も含む。例えば、Bergers (1977)、Journal of Pharmaceutical Sciences 66:1-19; and Polymorphism in Pharmaceutical Solids (1999) Britain, ed., Marcel Dekker, Inc (その各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる) 参照。

40

E. 例示的な BRS-3 アンタゴニスト

本発明の方法で有用な例示的な BRS-3 アンタゴニストは、表 E で供される化合物を含む。表 E 中の化合物は、加えて、BRS-3 の例示的なリガンドである。

【 0 4 6 1 】

BRS-3 アンタゴニストの例は、Ryanら、J Biol Chem (1998) 273:13613-13624 (その開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる) に記載されている。

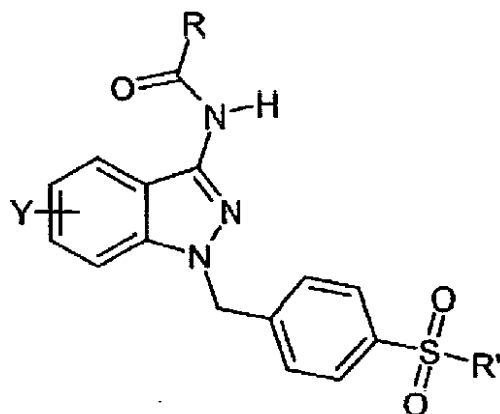
【 0 4 6 2 】

50

BRS-3 アンタゴニストの例は、国際出願番号 PCT/GB 2004/005169 (WO 2005/056532 として公開) (その開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる) に記載されている。BRS-3 アンタゴニストとして国際出願番号 PCT/GB 2004/005169 に開示されているのは、式 (I) :

【0463】

【化1】



(I)

(式中、

R はアリール C_{1-6} -アルキル、ヘテロアリール C_{1-6} -アルキル、アリールオキシ- C_{1-6} -アルキルまたはヘテロアリールオキシ- C_{1-6} -アルキルであり；および R は、所望により、独立して、 C_{1-6} -アルコキシ、 C_{1-6} -アルキル、メチレンジオキシ、アリール、ハロゲンおよびハロ C_{1-6} -アルキルの 1 以上で置換されており；

R' は、 C_{1-6} -ジアルキルアミン、 C_{1-6} -アルキルアミン、 C_{4-7} -環状アルキルアミンまたは C_{3-8} -シクロアルキルアミンであり；および R' は、所望により、独立して、 C_{1-6} -アルコキシの 1 以上で置換されており；および

Y は水素、 C_{1-6} -アルキル、 C_{1-6} -アルコキシまたはハロゲンである)

【0464】

国際出願番号 PCT/GB 2004/005169 に開示された BRS-3 アンタゴニストの特別な例は、式 (I) による以下の化合物 (本明細書において群 A1 と称する) を含む：N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-フェノキシアセトアミド；2-ベンゾ [1, 3] ジオキソ-5-イル-N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド；2, 3-ジヒドロ-ベンゾ [1, 4] ジオキシ-2-カルボン酸 [1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド；N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-(3-メトキシ-フェニル)-アセトアミド；2-フェノキシー-N-{1-[4-(ピロリジン-1-スルホニル)-ベンジル]-1H-インダゾール-3-イル}-プロピオンアミド；2-(4-クロロ-フェノキシー-N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド；N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-(3, 4-ジメトキシ-フェニル)-アセトアミド；N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-フェノキシアセトアミド；N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-フェノキシー-プロピオンアミド；2, 3-ジヒドロ-ベンゾ [1, 4] ジオキシ-2-カルボン酸 [1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダ

ゾール-3-イル]-アミド；2-(4-クロロフェノキシ)N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド；2-(3,4-ジメトキシフェニル)-N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド；N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-(4-メトキシフェニル)-アセトアミド；N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-(3-メトキシフェニル)-アセトアミド；2,3-ジヒドロベンゾフラン-2-カルボン酸[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド；2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]-ジオキシン-2-カルボン酸[1-(4-エチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド；2,3-ジヒドロベンゾ[1,4]-ジオキシン-2-カルボン酸[1-(4-ジメチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド；2-(3,4-ジメトキシフェニル)-N-[1-(4-ジメチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド；N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-フェノキシプロピオンアミド；および2,3-ジヒドロベンゾフラン-2-カルボン酸[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド。

10

【0465】

ある実施形態において、BRS-3アンタゴニストは表Eから選択される化合物である。

20

【0466】

ある実施形態において、BRS-3アンタゴニストは化合物E1および化合物E2から選択される化合物であり；これらの化合物はRyanら、J Biol Chem (1998) 273:13613-13624に見出すことができ、BRS-3アンタゴニストとして記載されている。

【0467】

ある実施形態において、BRS-3アンタゴニストは化合物E1、化合物E2、化合物E3、化合物E4、化合物E5、化合物E6、化合物E7、化合物E8、化合物E9、化合物E10、化合物E11、化合物E12、化合物E13、化合物E14、化合物E15、化合物E16、化合物E17、化合物E18、化合物E19、化合物E20、化合物E21、化合物E22から選択される化合物であり；これらの化合物は国際出願番号PCT/GB2004/005169(WO2005/056532として公開)に見出すことができ、それらはBRS-3アンタゴニストとして開示されている。

30

【0468】

【表 E】

表E

化合物番号	化合物
E1	D-Nal, Cys, Tyr, D-Trp, Lys, Val, Cys, Nal-NH ₂ (式中、Nalはβ-ナフチルアラニンを表す)
E2	[D-Pro ⁴ , D-Trp ^{7, 9, 10}]SP(4-11) (式中、SPは物質Pを表す)
E3	N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-フェノキシ-アセトアミド
E4	2-ベンゾ[1, 3]ジオキソ-5-イル-N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド
E5	2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-2-カルボン酸 [1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド
E6	N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-(3-メトキシ-フェニル)-アセトアミド
E7	2-フェノキシ-N-[1-[4-(ピロリジン-1-スルホニル)-ベンジル]-1H-インダゾール-3-イル]プロピオンアミド
E8	2-(4-クロロ-フェノキシ-N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド
E9	N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-(3, 4-ジメトキシ-フェニル)-アセトアミド
E10	N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-フェノキシ-アセトアミド
E11	N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-フェノキシ-プロピオンアミド
E12	2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-2-カルボン酸 [1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド
E13	2-(4-クロロ-フェノキシ)-N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド
E14	2-(3, 4-ジメトキシ-フェニル)-N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド
E15	N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-(4-メトキシ-フェニル)-アセトアミド
E16	N-[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-(3-メトキシ-フェニル)-アセトアミド
E17	2, 3-ジヒドロ-ベンゾフラン-2-カルボン酸[1-(4-ジプロピルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド
E18	2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-2-カルボン酸 [1-(4-エチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド
E19	2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[1, 4]ジオキシン-2-カルボン酸 [1-(4-ジメチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド
E20	2-(3, 4-ジメトキシ-フェニル)-N-[1-(4-ジメチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アセトアミド
E21	N-[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-2-フェノキシ-プロピオンアミド
E22	2, 3-ジヒドロ-ベンゾフラン-2-カルボン酸[1-(4-ジエチルスルファモイル-ベンジル)-1H-インダゾール-3-イル]-アミド

10

20

30

40

表 E 中の化合物は個々に、または本発明の任意の実施形態における任意の組合せで用いることができることが明示的に考えられる。また、表 E 中の化合物は個々に、または本発明の任意の実施形態からの任意の組合せにて排除することができることが明示的に考えられる。

【0469】

加えて、表 E に列挙されたものを加えた本発明の化合物は、その医薬上許容される塩、水和物、溶媒和物、幾何異性鎖体、互変異性体、光学異性体を含む。例えば、Berge ら (1977)、Journal of Pharmaceutical Science

50

s 66:1-19; and Polymorphism in Pharmaceutical Solids (1999) Britain, ed., Marcel Dekker, Inc (その各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる) 参照。

F. 医学的化学

候補化合物

当該分野で公知のいずれの分子も、本発明の GPCR の活性を変調する（増加させる、または減少させる）その能力に次いで試験することができる。活性を変調する化合物を同定するには、候補化合物は、受容体を発現する細胞に直接供することができる。

【0470】

本発明のこの実施形態は、受容体の量、またはその活性を変調する、例えば、阻害、拮抗、または作用する分子について化学ライブラリーをスクリーニングするのによく適している。化学ライブラリーはペプチドライブラリー、ペプチド模倣薬ライブラリー、化学的に合成されたライブラリー、組換え体、例えば、ファージディスプレイライブラリー、およびインビトロ翻訳ベースのライブラリー、他の非ペプチド合成有機ライブラリーなどであり得る。本発明のこの実施形態は、限定されないが、血漿および組織抽出物を含めた生物学的物質を含む内因性候補化合物をスクリーニングし、および生物学的活性を有することが知られた内因性化合物のライブラリーをスクリーニングするのによく適している。

【0471】

いくつかの実施形態において、候補化合物の直接的同定は、組合せ化学技術を介して生じた化合物と組合せて行われ、それにより、数千の化合物がランダムにそのような分析のために調製される。候補化合物は、化学ライブラリーのメンバーであってよい。これは、任意の便宜な数の対象メンバー、例えば、数十～数百～千～数百万の適当な化合物、ペプチド、ペプトイドおよび他のオリゴマー化合物（環状または線状）、および鋳型ベースのより小さな分子、例えば、ベンゾジアゼピン、ヒダントイン、ピアリール、カルボン酸および多環化合物（例えば、ナフタレン、フェノチアジン、アクリジン、ステロイドなど）、炭水化物およびアミノ酸誘導体、ジヒドロピリジン、ベンゾヒドリルおよび複素環（例えば、トリジン、インドール、チアゾリジンなど）を含むことができる。述べた数および列挙した化合物のタイプは説明的であり、限定的なものではない。好ましい化学ライブラリーは、低分子量の化学化合物、および潜在的な治療剤を含む。

【0472】

例示的な化学ライブラリーはいくつかの源（ArQule、Tripos/Pan Labs、ChemDesign、Pharmacopoeia）から商業的に入手可能である。いくつかの場合において、これらの化学ライブラリーは、メンバー化合物が結合し、かくして、効果的なモジュレータである分子の直接的および即時の同定を可能にする基質上のライブラリーの各メンバーの同一性をコードする組合せ戦略を用いて生じさせる。かくして、多くの組合せアプローチにおいて、化合物のプレート上の位置はその化合物の組成を特定する。また、1つの例において、単一プレート位置は、目的とする相互作用を含むウェルへの投与によってスクリーニングすることができる1～20の化学物質を有することができる。かくして、変調が検出されると、相互作用する対のより小さなプールを変調活性についてアッセイすることができる。そのような方法によって、多くの候補分子をスクリーニングすることができる。

【0473】

用いるのに適した多くの多様性ライブラリーは当該分野で知られており、本発明に従って試験すべき化合物を提供するのに用いることができる。別法として、ライブラリーは、標準的方法を用いて構築することができる。さらに、より一般的な構造的に拘束された有機多様性（例えば、ナノ粒子）ライブラリーを用いることもできる。その例として、ベンゾジアゼピンライブラリー（例えば、Buninら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712 参照）を用いてもよい。

【0474】

10

20

30

40

50

本発明の別の実施形態において、組合せ化学を用いて、本発明のGPCRのモジュレータを同定することができる。組合せ化学は、その多くが構造的に類似していてもよい、数千の化合物のうち数百を含有するライブラリーを作り出すことができる。高スループットのスクリーニングプログラムは、公知の標的に対する親和性についてこれらの膨大なライブラリーをスクリーニングすることができるが、新しいアプローチが開発されており、これはより小さな寸法のライブラリーを達成するが、最大の化学的多様性を提供する（例えば、Matter、1997、Journal of Medicinal Chemistry 40:1219-1229参照）。

【0475】

組合せ化学の1つの方法である親和性フィンガープリンティングは、従前には、タンパク質の規定されたパネル用の結合親和性について小さな分子の個々のライブラリーを試験するのに用いられてきた。該スクリーニングによって得られたフィンガープリントを用いて、目的とする他のタンパク質または受容体（本発明においては、本発明の受容体）について対象のライブラリーメンバーの親和性を予測する。フィンガープリントを、目的とするタンパク質と反応することが知られた他の化合物から得られたフィンガープリントと比較して、ライブラリー化合物が同様に反応するかどうかを予測する。例えば、複合体またはタンパク質成分との相互作用についてライブラリー中の各リガンドを試験するよりはむしろその活性を有することが知られた他の化合物と同様なフィンガープリントを有するリガンドのみを試験することができる（例えば、Kauvarら、Affinity Fingerprinting Pharmaceutical Manufacturing International. 8:25-28; and Kauvar, Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, D. Kurtz, L. Stanker and J. H. Skerritt. Editors, 1995, AOAC: Washington, DC., 305-312参照）。

【0476】

いくつかの実施形態において、候補化合物はポリペプチドである。いくつかの実施形態において、候補化合物はポリペプチドでない。いくつかの実施形態において、候補化合物はペプチドでない。いくつかの好ましい実施形態において、候補化合物は小分子である。いくつかの実施形態において、候補化合物は抗体またはその抗原結合断片でない。

【0477】

モジュレータとして同定された候補化合物

一般に、そのようなスクリーニングの結果は、特有のコア構造を有する化合物であり；その後、これらの化合物を好ましいコア構造の付近のさらなる化学的修飾に付して、その医学的特性をさらに増強させることができる。そのような技術は当業者に知られており、この特許書類においては詳細に取り組まない。

【0478】

ある実施形態において、本発明のモジュレータは経口的に活性である。当業者に入手可能な多数の計算アプローチが、薬物の経口バイオアベイラビリティの予測のための開発されてきた（Oomsら、Biochim Biophys Acta (2002) 1587:118-25; Clark & Grootenhuys, Curr Opin Drug Devel (2002) 5:382-90; Chengら、J Comput Chem (2002) 23:172-83; Norinder & Haeblerlein, Adv Drug Deliv Rev (2002) 54:291-313; Matterら、Comb Chem High Throughput Screen (2001) 4:453-75; Podlogar & Muegge, Curr Top Med Chem (2001) 1:257-75（各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる））。さらに、陽電子射出断層撮影法（PET）が、多数のグループによって成功裏に用いられて、非ヒト霊長類およびヒト身体を含めた、薬物の経口投与に続い

ての哺乳動物身体中での、経口バイオアベイラビリティの評価を含めた薬物分布の直接的測定が得られている（Nodaら、J Nucl Med（2003）44：105－8；Gulyasら、Eur J Nucl Med Mol Imaging（2002）29：1031－8；Kanervaら、Psychopharmacology（1999）145：76－81（各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる））。いくつかの実施形態において、本発明のモジュレータは経口的に活性である。

【0479】

ある実施形態において、経口的に活性である本発明のモジュレータは血液脳関門を通過することができる。当業者に入手可能な多数の計算アプローチが、血液脳関門の透過の予測のために開発されている（Oomsら、Biochim Biophys Acta（2002）1587：118－25；Clark&Grootenhuis、Curr Opin Drug Devel（2002）5：382－90；Chengら、J Comput Chem（2002）23：172－83；Norinder&Haeberlein、Adv Drug Deliv Rev（2002）54：291－313；Matterら、Comb Chem High Throughput Screen（2001）4：453－75；Podlogar&Muegge、Curr Top Med Chem（2001）1：257－75（各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる））。多数のインビトロ方法が、薬物の血液脳関門透過性を予測するのに開発されている（Lohmannら、J Drug Target（2002）10：263－76；Hansenら、J Pharm Biomed Anal（2002）27：945－58；Otisら、J Pharmacol Toxicol Methods（2001）45：71－7；Dehouckら、J Neurochem（1990）54：1798－801（各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる））。さらに、多数の戦略が、血液脳関門を通過の薬物送達を増強させるのに開発されている（Schermann、Vascul Pharmacol（2002）38：349－54；Pardridge、Arch Neurol（2002）59：35－40；Pardridge、Neuron（2002）36：555－8（各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる））。最後に、陽電子射出断層撮影法（PET）は多数のグループによって首尾よく用いられ、非ヒト霊長類およびヒト身体を含めた、哺乳動物身体において、脳内のそれを含めた薬物分布の直接的測定が得られている（Nodaら、J Nucl Med（2003）44：105－8；Gulyasら、Eur J Nucl Med Mol Imaging（2002）29：1031－8；Kanervaら、Psychopharmacology（1999）145：76－81（各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる））。

【0480】

いくつかの実施形態において、該モジュレータはBRS－3受容体に対して選択的であり、ここで、BRS－3受容体に対して選択的なモジュレータは、胃放出ペプチド受容体（GRP－R；例えば、ヒトGRP－R、GenBank（登録商標）アクセッション番号NP_005305）またはニューロメジンB受容体（NMB－R；例えば、ヒトNMB－R、GenBank（登録商標）アクセッション番号NP_002502）などの、1以上の密接に関連する受容体よりも大きなBRS－3に対する選択性を有するモジュレータを言うとして理解される。ある実施形態において、BRS－3選択的モジュレータは、少なくとも約10倍、または少なくとも約100倍のGRP－RまたはNMB－Rよりも大きなBRS－3に対する選択性を有するBRS－3選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。ある実施形態において、BRS－3選択的モジュレータは、少なくとも約10倍、少なくとも約100倍の、GRP－RおよびNMB－Rよりも大きなBRS－3に対する選択性を有するBRS－3選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。ある実施形態において、BRS－3選択的モジュレータは、少なくとも約10倍、または少な

10

20

30

40

50

くとも約100倍の、GRP-RまたはNMB-Rよりも大きなBRS-3に対する選択性を有するBRS-3選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。ある実施形態において、BRS-3選択的モジュレータは、少なくとも約10倍、または少なくとも約100倍のGRP-RおよびNMB-Rよりも大きなBRS-3に対する選択性を有するBRS-3選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの好ましい実施形態において、BRS-3はヒトBRS-3である。

【0481】

いくつかの実施形態において、モジュレータは、ヒトBRS-3において、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100 μ M未満、または約10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM~10 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM~1 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM~100 μ Mの間隔から選択される値未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、トランスフェクトされたCHO細胞からの膜で行われるGTP γ S結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞で行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞で行われるIP3アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100nM未満、または約10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされたCOS-7細胞またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、モジュレータは、該アッセイにおいて約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100nM未満、または約10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、該モジュレータは、該アッセイにおいて約10 μ M未満、該アッセイにおいて約9 μ M未満、該アッセイにおいて約8 μ M未満、該アッセイにおいて約7 μ M未満、該アッセイにおいて約6 μ M未満、該アッセイにおいて約5 μ M未満、該アッセイにおいて約4 μ M未満、該アッセイにおいて約3 μ M未満、該アッセイにおいて約2 μ M未満、該アッセイにおいて約1 μ M未満、該アッセイにおいて約900nM未満、該アッセイにおいて約800nM未満、該アッセイにおいて約700nM未満、該アッセイにおいて約600nM未満、該アッセイにおいて約500nM未満、該アッセイにおいて約400nM未満、該アッセイにおいて約300nM未満、該アッセイにおいて約200nM未満、該アッセイにおいて約100nM未満、該アッセイにおいて約90nM未満、該アッセイにおいて約80nM未満、該アッセイにおいて約70nM未満、該アッセイにおいて約60nM未満、該アッセイにおいて約50nM未満、該アッセイにおいて約40nM未満、該アッセイにおいて約30nM未満、該アッセイにおいて約20nM未満、該アッセイにおいて約10nM未満のIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM~10 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM~1 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM~100nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるIC₅₀を持つ逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。

【0482】

本発明の1つの態様において、BRS-3逆アゴニストもしくはアンタゴニストは選択的BRS-3逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、選択的BRS-3逆

10

20

30

40

50

アゴニストもしくはアンタゴニストは、少なくとも約10倍、より好ましくは少なくとも約100倍の、胃放出ペプチド受容体（GRP-R；例えば、ヒトGRP-R、GenBank（登録商標）アクセション番号NP_005305）またはニューロメジンB受容体（NMB-R；例えば、ヒトNMB-R、GenBank（登録商標）アクセション番号NP_002502）よりも大きなBRS-3に対する選択性を有する。本発明の1つの態様において、BRS-3逆アゴニストもしくはアンタゴニストは選択的BRS-3逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、ここで、選択的BRS-3逆アゴニストもしくはアンタゴニストは、少なくとも約10倍、より好ましくは少なくとも約100倍の、胃放出ペプチド受容体（GRP-R）およびニューロメジンB受容体（NMB-R）よりも大きなBRS-3に対する選択性を有する。

10

【0483】

いくつかの実施形態において、モジュレータは、ヒトBRS-3において、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100nM未満、または約10nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM～1 μ Mの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM～100nMの間隔から選択される値未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、トランスフェクトされたCHO細胞からの膜で行われるGTP γ S結合アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞で行われる色素分散アッセイにおいて、またはトランスフェクトされたHeLa細胞で行われるFLIPRアッセイにおいて、またはトランスフェクトされたCOS-7細胞もしくはCHO細胞もしくはHeLa細胞で行われるIP3アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100nM未満、または約10nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、トランスフェクトされたCHO細胞またはトランスフェクトされたメラニン保有細胞またはトランスフェクトされたCOS-7細胞またはトランスフェクトされたHeLa細胞は、配列番号2のアミノ酸配列を有する組換えBRS-3受容体を発現する。いくつかの実施形態において、モジュレータは、該アッセイにおいて、約10 μ M未満、約1 μ M未満、約100nM未満、または約10nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、該モジュレータは、該アッセイにおいて約10 μ M未満、該アッセイにおいて約9 μ M未満、該アッセイにおいて約8 μ M未満、該アッセイにおいて約7 μ M未満、該アッセイにおいて約6 μ M未満、該アッセイにおいて約5 μ M未満、該アッセイにおいて約4 μ M未満、該アッセイにおいて約3 μ M未満、該アッセイにおいて約2 μ M未満、該アッセイにおいて約1 μ M未満、該アッセイにおいて約900nM未満、該アッセイにおいて約800nM未満、該アッセイにおいて約700nM未満、該アッセイにおいて約600nM未満、該アッセイにおいて約500nM未満、該アッセイにおいて約400nM未満、該アッセイにおいて約300nM未満、該アッセイにおいて約200nM未満、該アッセイにおいて約100nM未満、該アッセイにおいて約90nM未満、該アッセイにおいて約80nM未満、該アッセイにおいて約70nM未満、該アッセイにおいて約60nM未満、該アッセイにおいて約50nM未満、該アッセイにおいて約40nM未満、該アッセイにおいて約30nM未満、該アッセイにおいて約20nM未満、該アッセイにおいて約10nM未満のEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM～10 μ Mの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM～1nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、約10nM～100nMの間隔から選択される値未満の該アッセイにおけるEC₅₀を持つアゴニストまたは部分アゴニストである。

20

30

40

50

【0484】

本発明の1つの態様において、BRS-3アゴニストまたは部分アゴニストは選択的BRS-3アゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、選択的BRS-3アゴニストまたは部分アゴニストは、少なくとも約10倍、より好ましくは少なくとも約100倍の、胃放出ペプチド受容体（GRP-R）またはニューロメジンB受容体（NMB-R）よりも大きなBRS-3に対する選択性を有する。本発明の1つの態様において、BRS-3アゴニストまたは部分アゴニストは選択的BRS-3アゴニストまたは部分アゴニストであり、ここで、選択的BRS-3アゴニストまたは部分アゴニストは、少なくとも約10倍、より好ましくは少なくとも約100倍の、胃放出ペプチド受容体（GRP-R）およびニューロメジンB受容体（NMB-R）よりも大きなBRS-3に対する選択性を有する。

10

G. 指標および処置方法

睡眠構造

睡眠構造とは、睡眠のいくつかの段階への組織化、および時間に渡ってのそれらの段階の分布をいう。睡眠は2つの生理学的な状態：ノンレム（NREM）およびレム（REM）睡眠を含む。NREMは4つの段階よりなり、その各々は、より深い睡眠を示すより遅いパターンを伴う次第に遅くなる脳波パターンによって特徴付けられる。いわゆるデルタ睡眠、NREM睡眠の段階3および4は最も深く、かつ最もリフレッシュするタイプの睡眠である。睡眠障害を持つ多くの患者は、段階3および4の回復睡眠を適切に達成することができない。臨床期間において、患者の睡眠パターンは断片化されたものとして記載され、患者が段階1および2の間で交互に大きな時間を消費し（半覚醒状態）、覚醒しており、かつ深い睡眠は非常に短い時間であることを意味する。本明細書で用いるように、用語「断片化された睡眠構造」は、睡眠障害患者などの個体が、限定された外部刺激によって覚醒している状態に容易に目覚めることができる睡眠のより軽い期間であるNREM睡眠段階1および2においてその睡眠時間の大部分を消費することを意味する。その結果、頻繁な短時間の軽い睡眠を経る個々のサイクルは、睡眠時間を通じて頻繁な覚醒によって中断される。多くの睡眠障害は、断片化された睡眠構造によって特徴付けられる。例えば、睡眠不満を持つ多くの高齢の患者は、長い期間の深いリフレッシュ睡眠（NREM段階3および4）を達成する困難を有し、代わりに、その睡眠時間の大部分をNREM睡眠段階1および2において消費する。

20

30

【0485】

断片化された睡眠構造とは対照的に、本明細書で用いられるように、「睡眠の定着」は、NREM睡眠期間、特に、段階3および4の数およびそれらの睡眠期間の長さが増大し、他方、覚醒期間の数および長さが減少する状態を意味する。本質的には、睡眠障害患者の構造は、夜の間、増大した睡眠期間およびより少ない覚醒を伴う睡眠状態に強化され、より長い時間が、より少数の振動段階1および2睡眠を伴う遅い波睡眠（段階3および4）において消費される。本発明の化合物は、従前に断片化された睡眠を持つ患者が、今や、より長いより一貫する期間の間で回復的なデルタ波睡眠を達成することができるように、睡眠パターンを強化する際に効果的であり得る。

【0486】

睡眠が段階1から後の段階に移動するにつれ、心拍および血圧は低下し、代謝速度およびグルコース消費は降下し、筋肉は緩和される。正常な睡眠構造においては、NREM睡眠は合計睡眠時間の約75%を占め；段階1は合計睡眠時間の5~10%を占め、段階2は約45~50%を占め、段階3はほぼ12%を占め、および段階4は13~15%を占める。睡眠開始から約90分後に、NREM睡眠が夜の最初のREM睡眠エピソードに取って代わる。REMは合計睡眠時間のほぼ20%を占める。NREM睡眠とは対照的に、REM睡眠は高い鼓動、呼吸、および血圧、ならびに活性な覚醒状態で見られるものと同様の他の生理学的パターンによって特徴付けられる。よって、REM睡眠は「逆説睡眠」としても知られている。睡眠の開始はNREM睡眠の間に起こり、健康な若い成人では、10~20分を要する。REM相と一緒にNREM睡眠の4つの段階は、通常4ま

40

50

たは5回の睡眠の持続を通じて反復される1つの完全な睡眠周期を形成する。睡眠のサイクル特性は規則的であって、信頼性があり；REM期間は夜の間に約90分ごとに起こる。しかしながら、第1のREM期間は最も短い傾向があり、しばしば、10分未満継続し、他方、より遅いREM期間は最大で40分継続し得る。年齢と共に、睡眠維持ならびに睡眠の質を損なう睡眠構造の変化のため、就寝と睡眠開始との間の時間は増大し、夜間睡眠の合計量は減少する。NREM（特に、段階3および4）およびREM睡眠の双方は低下する。しかしながら、最も軽い睡眠である段階1のNREM睡眠は年齢とともに増加する。

【0487】

本明細書で用いるように、用語「デルタ力」は、NREM睡眠の間の0.5～3.5Hz範囲における脳波図（EGG）活性の持続の尺度を意味し、より深いよりリフレッシュする睡眠の尺度であると考えられる。デルタ力は、プロセスSと呼ばれる理論的プロセスの尺度であると仮定されており、個人が与えられた睡眠期間の間に経験する睡眠の量に反比例すると考えられる。睡眠はホメオスタシス機構によって制御され；従って、睡眠が減ると睡眠への駆動は大きくなる。プロセスSは覚醒期間を通じて構築され、デルタ力睡眠の間に最も効果的に解除されると考えられる。デルタ力は、睡眠期間に先立ってのプロセスSの大きさの尺度である。より長く覚醒したままであると、プロセスSはより大きくなり、または睡眠するよう駆動し、かくして、NREM睡眠の間のデルタ力はより大きくなる。しかしながら、睡眠障害を持つ個人は、デルタ波睡眠を達成および維持するのが困難であり、かくして、睡眠の間のこの構築を解除する限定された能力を持つプロセスSの大きな構築を有する。

【0488】

睡眠障害の主観的および客観的決定

睡眠（例えば、非回復または回復睡眠）の開始、持続または質が損なわれているか、または改良されているかを決定するための多数の方法がある。1つの方法は患者の主観的決定であり、例えば、覚醒に際して眠気を感じ、または休息する。他の方法は、睡眠の間の他者による患者の観察、例えば、どれくらい長く睡眠に陥るのに必要か、夜の間に患者が何回目覚めるか、睡眠の間に患者がどのように落ち着きがないかの観察を含む。別の方法は、睡眠ポリグラフィを用いて睡眠の段階を客観的に測定することである。

【0489】

睡眠ポリグラフィは、睡眠の間の多数の電気生理学的パラメータのモニタリングであり、一般に、脳波図（EGG）活性、眼電図（EOG）活性および筋電図（EMG）活性の測定、ならびに睡眠構造を記録する目的の測定を含む。これらの結果は、観察と一緒にあって、睡眠潜時（寝るまでに必要な時間の量）のみならず、睡眠継続（睡眠および覚醒状態の全体のバランス）および睡眠の定着（デルタ波または回復睡眠で消費される睡眠時間のパーセント）を測定することができ、これは、睡眠の質の指標であり得る。

【0490】

睡眠ポリグラフィによって測定することができる5つの区別される睡眠段階がある：レム（REM）睡眠および4つの段階のノンレム（NREM）睡眠（段階1、2、3および4）。段階1のNREM睡眠は覚醒状態から睡眠への移行であり、健康な成人においては睡眠消費時間の約5%を占める。特異的EEG波形（睡眠紡錘波およびK複合体）によって特徴付けられる段階2のNREM睡眠は、睡眠消費時間の約50%を占める。段階3および4のNREM睡眠（合わせて、徐波睡眠およびデルタ波睡眠としても知られている）は、睡眠の最も深いレベルであり、睡眠時間の約10～20%を占める。その間に鮮明な夢の大部分が起こるREM睡眠は合計睡眠の約20～25%を占める。

【0491】

これらの睡眠段階は夜に渡って特徴的な時間的構成を有する。NREM段階3および4は、夜の1/3～1/2で起こる傾向があり、睡眠剥奪に対する応答の持続が増加する。REM睡眠は夜を通じて周期的に起こる。約80～100分毎のNREM睡眠が交互に起こる。REM睡眠期間は朝に向けて持続が増大する。ヒトの睡眠もまたライフスパンに渡

って特徴的に変化する。子供時代および初期青春期における多量の徐波睡眠を伴った相対的安定の後、睡眠の持続および深さは成人の年齢の範囲に渡って劣化する。この劣化は増大した覚醒状態、および段階 1 睡眠および減少した段階 3 および 4 の睡眠によって繁栄されている。

【0492】

睡眠障害

本発明の化合物は B R S - 3 受容体のモジュレータであって、睡眠障害の治療で有用である。本発明の逆アゴニストおよびアンタゴニストは睡眠を促進するのに有用であり、以下：睡眠開始潜時（睡眠誘導の尺度）の低下、夜間覚醒状態の数の低下、および R E M 睡眠への影響なくしての、デルタ波睡眠の時間の量（睡眠の質の増強および睡眠の定着の尺の）の遅延の 1 以上を促進するのに有用である。本発明の逆アゴニストおよびアンタゴニストは睡眠を促進するための、および限定されないが、不眠症などを含めた、睡眠を促進することによって緩和される障害を予防もしくは治療するための治療剤として有用である。本発明のアゴニストおよび部分アゴニストは、過剰な眠気によって特徴付けられる睡眠障害の治療で有用である。本発明のアゴニストおよび部分アゴニストは、覚醒状態を促進するための、およびナルコレプシーを伴う過剰な眠気等などの過剰な眠気を予防もしくは治療するための治療剤として有用である。従って、本発明の態様は、睡眠障害の治療のための本発明の化合物の治療的使用に関する。

H. 医薬組成物

本発明の化合物は、当該分野でよく知られた技術を用いて医薬組成物に処方することができる。

【0493】

本発明は、治療上有効量の本発明のモジュレータまたはリガンドを、治療（または予防）を必要とする対象に投与することによる治療（および予防）の方法を提供する（また、例えば、2002年8月29日に W O 0 2 / 0 6 6 0 5 として公開された P C T 出願番号 P C T / I B 0 2 / 0 1 4 6 1 参照（各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる））。1つの態様において、モジュレータまたはリガンドは小分子である。1つの態様において、モジュレータは逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。1つの態様において、モジュレータは逆アゴニストである。1つの実施形態において、モジュレータはアンタゴニストである。1つの態様において、モジュレータは実質的に精製される。1つの実施形態において、対象は、限定されないが、ウシ、ブタ、ウマ、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどを含めた哺乳動物であり、好ましくは、ヒトである。

【0494】

本発明のモジュレータは単独で、あるいは当業者によく知られた技術を用いて適当な担体または賦形剤と混合される医薬組成物にて、非ヒト哺乳動物（後記実施例参照）および／またはヒトに投与することができる。適当な医薬上許容される担体は、当業者に入手可能である；例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition, 1980 参照。

【0495】

次いで、医薬組成物は治療上有効用量で供される。治療上有効用量とは、説明のため、かつ限定されないが、かつ本明細書に記載された方法によって決定された、障害の兆候または生理学的状態の予防または緩和をもたらすのに十分なモジュレータの量をいう。ある実施形態において、治療上有効用量とは、睡眠の促進をもたらすのに十分な哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストの量をいう。ある実施形態において、治療上有効用量とは、覚醒状態の促進をもたらすのに十分な哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストの量をいう。

【0496】

本発明のモジュレータは、単独で、または他の医薬的または生理学的に許容される化合物と組合せて供することができることが明示的に考えられる。ある実施形態において、哺

乳動物 BRS-3 の逆アゴニストおよびアンタゴニストは、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の治療のために、単独で、または他の医薬上または生理学上許容される化合物と組合せて供することができる。いくつかの実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストおよび部分アゴニストは、単独で、あるいは過剰な眠気の治療上の他の医薬上または生理学上許容される化合物と組合せて供することができる。ある実施形態において、過剰な眠気は睡眠障害と関連している。ある実施形態において、過剰な眠気は神経学的障害と関連している。ある実施形態において、該医薬上または生理学上許容される化合物は、GABA 受容体に結合する化合物である。ある実施形態において、該医薬上または生理学上許容される化合物は、GABA 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合する化合物である。ある実施形態において、該医薬上または生理学上許容される化合物は、GABA_A 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合する化合物である。ある実施形態において、GABA_A 受容体などの GABA 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合する該化合物は、GABA 誘発塩化物フラックスをアロステリックに増強させる。ある実施形態において、GABA_A 受容体などの GABA 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合する該化合物は、GABA 誘発塩化物フラックスをアロステリックに低下させる。GABA_A 受容体などの GABA 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合し、かつ GABA 誘発塩化物フラックスをアロステリックに増強させ、または低下させる化合物は当該分野で公知である（例えば、Da Settimo ら、Curr Med Chem (2007) 14: 2680-2701 参照）。

10

【0497】

20

本発明のモジュレータは、単独で、または他の医薬上または生理学上許容される化合物と組合せて供することができることが明示的に考えられる。ある実施形態において、哺乳動物 BRS-3 の逆アゴニストおよびアンタゴニストは、単独で、あるいは睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害（例えば、不眠症）、不安障害（例えば、全般性不安障害またはパニック発作）、痙攣障害（例えば、癲癇）、偏頭痛、鬱病障害（例えば、大鬱病障害）、または精神病性障害（例えば、統合失調症）である GABA 関連神経学的障害の治療用の他の医薬上または生理学上許容される化合物と組合せて供することができる。ある実施形態において、哺乳動物 BRS-3 のアゴニストおよび部分アゴニストは、単独で、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害（例えば、ナルコレプシー）または認識障害（例えば、認知症またはアルツハイマー型の認知症）である GABA 関連神経学的障害の治療用の他の医薬上または生理学上許容される化合物と組合せて供することができる。ある実施形態において、該医薬上または生理学上許容される化合物は、GABA 受容体に結合する化合物である。ある実施形態において、該医薬上または生理学上許容される化合物は、GABA 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合する化合物である。ある実施形態において、該医薬上または生理学上許容される化合物は、GABA_A 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合する化合物である。ある実施形態において、GABA_A 受容体などの GABA 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合する該化合物は、GABA 誘発塩化物フラックスをアロステリックに増強させる。ある実施形態において、GABA_A 受容体などの GABA 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合する該化合物は、GABA 誘発塩化物フラックスをアロステリックに低下させる。GABA_A 受容体などの GABA 受容体上のベンゾジアゼピン結合部位に結合し、かつ GABA 誘発塩化物フラックスをアロステリックに増強させ、または低下させる化合物は当該分野で知られている（例えば、Da Settimo ら、Curr Med Chem (2007) 14: 2680-2701 参照）。

30

40

【0498】

本発明の化合物は、単独の活性な医薬剤（すなわち、単一療法）として投与することができるが、本発明の化合物は、本明細書に記載された病気／疾患／障害の治療用の他の剤と組合せることもできる（すなわち、組合せ療法）。従って、本発明の別の態様は、本明細書に記載された 1 以上のさらなる医薬剤と組合せた、治療上有効量の本発明のアンタゴニストまたは逆アゴニストを（例えば、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進すること

50

によって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに) 治療を必要とする対象に投与することを含む治療方法を含む。本発明のさらなる態様は、本明細書に記載された1以上のさらなる医薬剤と組合せて、治療上有効量の本発明のアゴニストまたは部分アゴニストを、治療を必要とする対象に投与することを含む(例えば、覚醒状態を促進するための、または過剰な眠気を予防もしくは治療するための) 治療方法を含む。

【0499】

本発明の化合物と他の医薬剤との組合せ療法の範囲は、前記または後記にて本明細書に列挙されたものに限定されず、主として、対象における本発明の病気、疾患または障害の治療に有用な任意の医薬剤または医薬組成物との任意の組合せでも含むことが理解されるであろう。

10

【0500】

投与の経路

投与の適当な経路は、当該分野で公知の方法を用いる、経口、鼻、直腸、経粘膜、経皮、または腸投与、筋肉内、皮下、筋内注射を含めた非経口送達、ならびに鞘内、直接的心室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、肺内(吸入)または眼内注射を含む。他の適当な投与経路はエアロゾルおよびデポ処方である。本発明の医薬の徐放処方、特にデポ剤は明らかに考えられる。ある実施形態において、投与の経路は経口である。

【0501】

組成物/処方

本発明に従って用いる医薬上または生理学上許容される組成物および医薬は、賦形剤および補助剤を含む1以上の生理学上許容される担体を用いて慣用的な手法で処方することができる。適当な処方を選択された投与経路に依存する。

20

【0502】

本明細書に記載されたある種の医薬は医薬上または生理学上許容される担体、および本発明の少なくとも1つのモジュレータを含む。注射のためには、本発明の剤は水性溶液中で、好ましくは、ハンスの溶液、リンゲル液、あるいはリン酸または炭酸水素塩緩衝剤などの生理食塩水緩衝剤などの生理学的に相溶性のある緩衝剤中で処方することができる。経粘膜投与では、浸透すべきバリアに適した浸透剤処方を用いる。そのような浸透剤は一般に当該分野で知られている。

【0503】

経口的に摂取することができる医薬上または生理学上許容される製剤は、ゼラチンで作成されたプッシュフィットカプセル、ならびにゼラチン、およびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤で作成された柔軟な密封されたカプセルを含む。プッシュフィットカプセルは、ラクトースなどの充填剤、澱粉などの結合剤、および/またはタルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および、所望により、安定化剤と混合された有効成分を含有することができる。ソフトカプセルにおいては、活性化合物を脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適当な液体に浸透させ、または懸濁させることができる。加えて、安定剤を加えてもよい、経口投与用の全ての処方はそのような投与に適した用量とする必要がある。

30

【0504】

バカル投与では、組成物は慣用的な手法で処方された錠剤またはロゼンジの形態をとることができる。

40

【0505】

吸入による投与では、本発明に従って使用される化合物は、便利には、適当なガス状プロペラント、例えば、二酸化炭素を使用して、ネブライザ用の圧縮バックからのエアロゾルスプレー提示の形態で送達される。圧縮エアロゾルの場合には、投与単位は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定することができる。吸入器またはインサフレーターで用いられる、例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物、およびラクトースまたは澱粉などの適当な粉末基剤の粉末混合物を含有して処方することができる。

50

【0506】

化合物は、注射による、例えば、ボラス注射または連続的注入による非経口投与用に処方することができる。注射用の処方は、保存剤を加えた、例えば、アンプルまたは多用量容器中の単位用量で供することができる。組成物は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンなどの形態をとることができる、懸濁化剤、安定化剤、および／または分散剤などの処方剤を含有することができる。

【0507】

非経口投与用の医薬上または生理学上許容される処方は、水溶性形態の活性化合物の水性溶液を含む。水性懸濁液は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランなどの懸濁液の粘度を増加させる物質を含有することができる。所望により、懸濁液は、適当な安定剤、または化合物の溶解性を増加させる剤を含有して高濃度溶液の調製を可能にすることもできる。

10

【0508】

別法として、有効成分は、使用前に、滅菌バイロジェン非含有水などの適当なビヒクルによる構成のための粉末または凍結乾燥形態であってもよい。

【0509】

先に記載した処方に加えて、化合物は、デポ処方として処方することもできる。そのような長期作用処方は、（例えば、皮下または筋肉内の）移植によって、または筋肉内注射によって投与してもよい。かくして、例えば、化合物は（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）適当なポリマーまたは疎水性物質、またはイオン交換樹脂で、あるいは貧溶解性誘導体として、例えば、貧溶解性塩として処方してもよい。

20

【0510】

特定の実施形態において、化合物は制御された放出系を介して送達することができる。1つの実施形態において、ポンプを使用してもよい（Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwaldら、1980 Surgery 88:507-516, Saqudekら、1989, N Engl. J Med. 321:547-579）。別の実施形態において、ポリマー物質を用いることができる（Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball, eds., Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Levyら、1985, Science 228:190-192, Duringら、1989, Ann. Neuron. 25:351-356 Howardら、1989, J. Neurosurg. 71:858-863）。他の制御放出系は、Langer (1990, Science 249:1527-1533) によってレビュー中で議論されている。

30

【0511】

加えて、化合物は、治療剤を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスなどの徐放系を用いて送達してもよい。種々の徐放物質が確立されており、当業者によってよく知られている。徐放カプセルは、それらの化学的性質に依存して、化合物を数週間から100日を超えるまでの間化合物を放出する。

40

【0512】

治療試薬の化学的性質および生物学的安定性に依存して、モジュレータ安定化のためのさらなる戦略を使用することができる。

【0513】

医薬上または生理学上許容される組成物は、適当な固体またはゲル相担体または賦形剤を含むこともできる。そのような担体または賦形剤の例は、限定されないが、炭酸カルシ

50

ウム、リン酸カルシウム、種々の糖、澱粉、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどのポリマーを含む。

【0514】

効果的な用量

本発明で用いるのに適した医薬上または生理学上許容される組成物は、有効成分がその意図した目的を達成するのに効果的な量で含有された組成物を含む。より具体的には、治療上有効量は、治療すべき対象の現存する兆候の発達を予防し、またはそれを緩和するのに効果的な量を意味する。効果的な量の決定は、特に、本明細書で供した詳細な開示に徴して、十分に、当業者の能力内である。

【0515】

本発明の方法で用いるいずれの化合物についても、治療上有効量は、細胞培養アッセイから最初に見積もることができる。例えば、用量が、インビトロアッセイにおいてBRS-3を含む細胞中のIP3の細胞内レベルを増加させ、または減少させることが示された濃度、または範囲を含む循環濃度範囲を達成するように動物モデルにおいて処方することができる。そのような情報を用いて、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。

【0516】

治療上有効量とは、患者において兆候の緩和をもたらす化合物の量をいう。そのような化合物の毒性および治療効果は、例えば、LD₅₀（試験集団の50%に対して致死的な用量）およびED₅₀（試験集団の50%において治療上有効な用量）を決定するための細胞培養または実験動物における標準的な医薬的手順によって決定することができる。毒性および治療効果の用量比率は治療指標であって、LD₅₀およびED₅₀の間の比率として表すことができる。高い治療指標を呈する化合物が好ましい。

【0517】

これらの細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータは、ヒトで用いるための一定範囲の用量を処方するのに用いることができる。そのような化合物の用量は、好ましくは、ほとんどまたは全く毒性を伴わないED₅₀を含む一定範囲の循環濃度内にある。用量は、使用される投与形態および利用される投与経路に依存してこの範囲内で変化し得る。正確な処方、投与の経路、および用量は、患者の状態に鑑みて主治医によって選択することができる（例えば、fingler, 1975, 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」における、Ch. 1参照）。

【0518】

投与の量および間隔は、特定の状況に応じて、本発明の障害を予防もしくは治療するのに十分な活性化合物の血漿レベルを提供するために主観的に調整することができる。これらの効果を達成するのに必要な用量は、対象の特徴および投与の経路に依存するであろう。

【0519】

投与間隔は、最少有効濃度についての値を用いて決定することもできる。化合物は、時間の10~90%の間、好ましくは30~99%の間、最も好ましくは50~90%の間、最少有効濃度を超えて血漿レベルを維持する養生法を用いて投与する必要がある。局所投与または選択的摂取の場合には、薬物の有効な局所濃度は、血漿濃度に関連しなくてもよい。

【0520】

投与される組成物の量は、もちろん、治療すべき対象、対象の体重、病気の重症度、投与の様式、および処方する医師の判断に依存するであろう。

【0521】

所望の結果を達成するために毎日または定期的に投与することができる本発明のモジュレータの量についての好ましい用量範囲は0.1~100mg/kg体重である。他の好ましい用量範囲は0.1~30mg/kg体重である。他の好ましい用量範囲は0.1~10mg/kg体重である。他の好ましい用量範囲は0.1~3.0mg/kg体重であ

10

20

30

40

50

る。もちろん、これらの日用量は、1日の流れの間に少量ずつ周期的に送達または投与することができる。これらの用量範囲は好ましい範囲にすぎず、本発明を限定する意図はないことを注記する。該所望の効果は、限定されないが、睡眠の促進、または覚醒状態の促進、または睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、精神病性障害または認識障害に対する治療的有効性を含む。該所望の結果は、限定されないが、対象における体重の減少、対象における脂肪症の減少、対象における体脂肪率の減少、および肥満またはそれに関連する状態の予防もしくは治療を含む。

I. 治療の方法

本発明は、本発明モジュレータを、それを必要とする対象に投与することを含む、限定されないが、睡眠または覚醒状態を促進する方法、および睡眠障害を予防もしくは治療する方法を含めた方法にとりわけ向けられる。

10

【0522】

いくつかの実施形態において、モジュレータは、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに用いるための哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは睡眠の定着を促進するのに用いるための逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。モジュレータはデルタ力を増加させるのに用いるための逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠障害は断片化された睡眠構造を含む。いくつかの実施形態において、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害は、精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。睡眠を促進することによって緩和される該睡眠障害は、個々に、または任意の組合せにて、本発明の実施形態に含まれ得ることが明示的に考えられる。いくつかの実施形態において、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害は不眠症である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害は交代勤務睡眠障害である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害はタイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群である。いくつかの実施形態において、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害は、閉塞性睡眠時無呼吸症候群である。いくつかの実施形態において、モジュレータは、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに用いるための、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストであり、但し、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害は閉塞性睡眠時無呼吸症候群ではないものとする。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに用いるためのモジュレータは哺乳動物BRS-3の逆アゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに用いるためのモジュレータは、哺乳動物BRS-3のアンタゴニストである。

20

30

【0523】

いくつかの実施形態において、モジュレータは、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害、または精神病性障害であるGABA関連神経学的障害を治療するのに用いるための哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。いくつかの実施形態において、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害は精神生理学的不眠症、睡眠状態誤認、特発性不眠症、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非24時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害は不眠症である。いくつかの実施形態において、

40

50

G A B A 関連神経学的障害、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害は閉塞性睡眠時無呼吸症候群ではない。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作、広場恐怖症、広場恐怖症を伴わないパニック障害、広場恐怖症を伴うパニック障害、パニック障害の履歴のない広場症候群、特異的恐怖症、社会的恐怖症、強迫神経症障害、心的外傷後ストレス障害、急性ストレス障害、全般性不安障害、全身病状による不安、物質誘発性不安障害、分離不安障害、性嫌悪障害、および特定されない不安障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、不安障害は全般性不安障害である。いくつかの実施形態において、不安障害はパニック発作である。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇および非癲癇性発作よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、痙攣障害は癲癇である。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害、気分変調性障害および特定されない鬱病障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、鬱病障害は大鬱病障害である。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症、統合失調性障害、統合失調性感情障害、妄想障害、短期精神病性障害、二人組精神病、全身病状による精神病性障害、物質誘発性精神病性障害、および特定されない精神病性障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神病性障害は統合失調症である。いくつかの実施形態において、統合失調性は共有型統合失調症、解体型統合失調症、緊張型統合失調症、未分化統合失調症、および残遺型統合失調症から選択される。いくつかの実施形態において、モジュレータは哺乳動物 B R S - 3 の逆アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは哺乳動物 B R S - 3 のアンタゴニストである。

10

20

【0524】

いくつかの実施形態において、モジュレータは、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるための哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、睡眠障害に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、睡眠状態誤認、ナルコレプシー、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷性睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性閉塞性睡眠時無呼吸、中枢性肺泡低換気症候群、周期的四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群および非 24 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される睡眠障害と関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態においては、モジュレータは、ナルコレプシーに関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。過剰な眠気との関連性を有する該睡眠障害は、個々に、または任意の組み合わせにて、本発明の実施形態に含まれ得ることが明示的に考えられる、いくつかの実施形態において、モジュレータは、交代勤務睡眠障害に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態においてモジュレータは、閉塞性睡眠時無呼吸症候群に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、覚醒状態を促進するのに、または睡眠障害に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるための哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストであり、但し、睡眠障害は閉塞性睡眠時無呼吸症候群ではないものとする。いくつかの実施形態において、モジュレータは、神経学的障害に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、多発性硬化症、筋緊張性ジストロフィおよびパーキンソン病よりなる群から選択される神経学的障害に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態

30

40

50

において、モジュレータは、精神医学的障害に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは、鬱病および統合失調症よりなる群から選択される精神医学的障害に関連する過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストまたは部分アゴニストである、いくつかの実施形態において、モジュレータは、過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのアゴニストであり、ここで、過剰な眠気は睡眠過剰である、いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのモジュレータは、哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに用いるためのモジュレータは、哺乳動物 B R S - 3 の部分アゴニストである。

10

【0525】

いくつかの実施形態において、モジュレータは、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、または認識障害である G A B A 関連神経学的障害を治療するのに用いるための哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストもしくは部分アゴニストである。いくつかの実施形態において、覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害は、睡眠障害誤認、再発性睡眠過剰、特発性睡眠過剰、心的外傷後睡眠過剰、閉塞性睡眠時無呼吸症候群、中枢性睡眠時無呼吸症候群、中枢性肺泡低換気症候群、周期性四肢運動障害、不穏下肢症候群、睡眠薬依存性睡眠障害、毒物誘発性睡眠障害、タイムゾーン変化（時差ぼけ）症候群、交代勤務睡眠障害、不規則睡眠覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、および非 24 時間睡眠覚醒障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、G A B A 関連神経学的障害、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害はナルコレプシーである。いくつかの実施形態において、G A B A 関連神経学的障害、または覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害は閉塞性睡眠時無呼吸症候群ではない。いくつかの実施形態において、G A B A 関連神経学的障害は認識障害である。いくつかの実施形態において、認識障害は精神錯乱、認知症、健忘症障害、および特定されない認識障害からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、精神錯乱は全身病状による精神錯乱、物質誘発性精神錯乱、複数の病因による精神錯乱、および特定されない精神錯乱よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認知症はアルツハイマー型、血管認知症、他の全身病状による認知症、物質誘発性持続性認知症、複数の病因による認知症および特定されない認知症からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、健忘症障害は、全身病状による健忘症障害、物質誘発性持続性健忘症障害および特定されない健忘症障害よりなる群から選択される。いくつかの実施形態において、認識障害は、認知症である。いくつかの実施形態において、認識障害はアルツハイマー型の認知症である。いくつかの実施形態において、モジュレータは哺乳動物 B R S - 3 のアゴニストである。いくつかの実施形態において、モジュレータは哺乳動物 B R S - 3 の部分アゴニストである。

20

30

【0526】

本出願に記載された G A B A 関連神経学的障害の各々、ならびに該 G A B A 関連神経学的障害の各組合せは、本発明の範囲内にある別の実施形態であることが明らかに意図される。本出願に記載された睡眠障害の各々、ならびに該睡眠障害の各組合せは、本発明の範囲内の別の実施形態であることが明らかに意図される。本出願に記載された睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の各々、ならびに睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害の各組合せは本発明の範囲内の別の実施形態であることが明らかに意図される。本出願に記載された不安障害の各々の、ならびに該不安障害の各組合せは、本発明の範囲内の別の実施形態であることが明示的に考えられる。本出願に記載された痙攣障害の各々、ならびに該痙攣障害の各組合せは、本発明の範囲内にある別の実施形態であることが明示的に考えられる。本出願に記載された鬱病障害の各々、ならびに該鬱病障害の各組合せは、本発明の範囲内の別の実施形態であることが明らかに意図される。本出願に記載された精神医学的障害の各々、ならびに該精神医学的障害の各組合せは、本発明の範囲

40

50

内にある別の実施形態であることが明らかに意図される。本出願に記載された統合失調症サブタイプの各々、ならびに該統合失調症サブタイプの各組合せは、本発明の範囲内の別の実施形態であることが明らかに意図される。本明細書に記載された覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害の各々、ならびに覚醒状態を促進することによって緩和される該睡眠障害は、本発明の範囲内の別の実施形態であることが明らかに意図される。本出願に記載された認識障害の各々、ならびに該認識障害の各組合せは、本発明の範囲内の別の実施形態であることが明らかに意図される。

【0527】

いくつかの実施形態において、モジュレータは経口的に活性である。いくつかの実施形態において、該経口的に活性なモジュレータは、さらに、血液脳関門を通過することができる。いくつかの実施形態において、モジュレータは医薬組成物で対象に投与される。いくつかの実施形態において、モジュレータは医薬組成物で対象に供される。いくつかの実施形態において、モジュレータは、経口的に摂取される医薬組成物で対象に供される。いくつかの実施形態において、対象は非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態において、対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物は、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはヒトである。ある好ましい実施形態において、対象または哺乳動物はヒトである。

【0528】

J. 他の用途

哺乳動物 BRS-3 受容体などの本発明の GPCR の受容体機能を変調する（すなわち、増加させ、減少させ、またはブロックする）剤は、候補化合物を GPCR と接触させ、受容体機能に対する候補化合物の効果を決定することによって同定することができる。ヒト BRS-3 受容体などの哺乳動物 BRS-3 受容体の機能を変調する化合物の選択性は、BRS-3 に対するその効果を 1 以上の他の Gタンパク質共役受容体に対するその効果と比較することによって評価することができる。ある実施形態において、BRS-3 選択的モジュレータは、少なくとも約 10 倍、または少なくとも約 100 倍の、胃放出ペプチド受容体（GRP-R；例えば、ヒト GRP-R、GenBank（登録商標）アクセッション番号：NP_005305）またはニューロメジン B 受容体（NMB-R；例えば、ヒト NMB-R、GenBank（登録商標）アクセッション番号：NP_002502）よりも大きな BRS-3 に対する選択性を有する BRS-3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。ある実施形態において、BRS-3 選択的モジュレータは、少なくとも約 10 倍、または少なくとも約 100 倍の、GRP-R および NMB-R よりも大きな BRS-3 に対する選択性を有する BRS-3 選択的逆アゴニストもしくはアンタゴニストである。ある実施形態において、BRS-3 選択的モジュレータは、少なくとも約 10 倍、または少なくとも約 100 倍の、GRP-R または NMB-R よりも大きな BRS-3 に対する選択性を有する BRS-3 選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。ある実施形態において、BRS-3 選択的モジュレータは、少なくとも約 10 倍、または少なくとも約 100 倍の、GRP-R および NMB-R よりも大きな BRS-3 に対する選択性を有する BRS-3 選択的アゴニストまたは部分アゴニストである。BRS-3 機能を変調する化合物の同定に続き、そのような候補化合物は、さらに、限定されないが、インビボモデルを含めた他のアッセイで試験して、それらの活性を確認し、または定量することができる。説明として、限定されないが、対象の発明では、医薬剤として用いるための哺乳動物 BRS-3 GPCR のモジュレータとしての化合物の同定を明らかに意図する。BRS-3 受容体機能のモジュレータは、例えば、正常または異常な BRS-3 機能が関与する病気および生理学的状態の治療で治療的に有用である。

【0529】

哺乳動物 BRS-3 受容体などの本発明の GPCR のリガンドである剤は、候補化合物を GPCR と接触させ、次いで、候補化合物が受容体に結合するか否かを決定することによって同定することができる。ヒト BRS-3 の受容体などの BRS-3 受容体に結合する化合物の選択性は、BRS-3 受容体へのその結合を、1 以上の他の Gタンパク質共

10

20

30

40

50

役受容体へのその結合と比較することによって評価することができる。ある実施形態において、BRS-3選択的リガンドは、少なくとも約10倍、または少なくとも約100倍の、胃放出ペプチド受容体（GRP-R；例えば、ヒトGRP-R、GenBank（登録商標）アクセション番号NP_005305）またはニューロメジンB受容体（NMB-R；例えば、ヒトNMB-R、GenBank（登録商標）アクセション番号NP_002502）よりも大きなBRS-3に対する選択性を有するBRS-3選択的リガンドである。ある実施形態において、BRS-3選択的リガンドは、少なくとも約10倍、少なくとも約100倍の、GRP-RおよびNMB-Rよりも大きなBRS-3に対する選択性を有するBRS-3選択的リガンドである。BRS-3受容体機能のモジュレータであるリガンドは、正常または異常なBRS-3機能が関与する病気、障害および生理学的状態の治療で治療的に有用である。

10

【0530】

他の実施形態において、例えば、睡眠を促進するのに、または覚醒状態を促進するのに適し、または例えば、睡眠障害用の医薬剤として有用な剤は、候補化合物をBRS-3受容体と接触させ、次いで、BRS-3受容体発現に対する候補化合物の効果を決定することによって同定される。いくつかの実施形態において、該剤は細胞においてBRS-3受容体の発現を低下させる。いくつかの実施形態において、該剤は、ニューロン細胞においてBRS-3の受容体の発現を低下させる。いくつかの実施形態において、該剤は、ヒトニューロン細胞においてBRS-3受容体の発現を低下させる。いくつかの実施形態において、BRS-3受容体は、細胞またはニューロン細胞によって内因的に発現される。いくつかの実施形態において、BRS-3受容体発現のレベルは、抗BRS-3受容体抗体を用いて測定される。いくつかの実施形態において、BRS-3受容体発現のレベルは、免疫組織化学またはフローサイトメトリーまたはウエスタンブロットによって抗BRS-3受容体抗体を用いて測定される。抗BRS-3抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得ることが明らかに意図される。BRS-3に対する抗体は商業的に入手可能であり；例えば、ヒトBRS-3に対する抗体はAtras Antibodies（Stockholm, Sweden）から、およびABR-Affinity BioReagents（Golden, CO）から入手可能である。いくつかの実施形態において、BRS-3受容体発現のレベルは、BRS-3受容体に特異的な放射性標識リガンドを用いて測定される（後記参照）。いくつかの実施形態において、BRS-3受容体発現のレベルはインサイチュハイブリダイゼーションまたはノーザンブロットまたはRTPCRによって測定される。

20

30

【0531】

また、本発明は、睡眠を促進するのに、睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害および精神病性障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

（a）BRS-3受容体を含む複数の細胞を候補化合物と接触させ、または接触させない工程；

40

（b）候補化合物と接触した細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベル、および候補化合物と接触していない細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルを測定する工程；ならびに

（c）候補化合物と接触した細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルを、候補化合物と接触していない細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルと比較する工程；を含み、

ここで、候補化合物と接触していない細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルと比較した、候補化合物と接触した細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルの減少は、候補化合物が、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠

50

障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法に関する。

【0532】

本発明は、加えて、睡眠を促進するのに、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するのに、あるいは睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって、前記工程（a''）～（c''）を含み、さらに：

（d''）所望により、工程（c''）において、その存在で B R S - 3 受容体の発現のレベルが減少される化合物を合成する工程；

（e''）工程（c''）において、その存在下で B R S - 3 受容体の発現のレベルが減少する化合物を哺乳動物に投与する工程；ならびに

（f''）化合物が、哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を有し、抗痙攣活性を有し、抗偏頭痛活性を有し、抗鬱病活性を有し、または抗精神病活性を有するか否かを判断する工程；

を含み、

ここで、哺乳動物において、睡眠を促進し、抗不安活性を示し、抗痙攣活性を示し、抗偏頭痛活性を示し、抗鬱病活性を示し、または抗精神病活性を示す候補化合物の能力は、候補化合物が睡眠を促進するのに、睡眠を促進することによって促進される睡眠障害、不安障害、痙攣障害、偏頭痛、鬱病障害および精神病性障害よりなる群から選択される G A B A 関連精神医学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法でその特徴とする。

【0533】

いくつかの実施形態において、哺乳動物は非哺乳動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は実験室動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は、非ヒト霊長類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はげっ歯類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はラットである。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はマウスである。

【0534】

いくつかの実施形態において、化合物が哺乳動物において睡眠を促進するか否かの決定は睡眠ポリグラフィを含む。

【0535】

いくつかの実施形態において、候補化合物が細胞において B R S - 3 受容体の発現を減少する剤であるか否かを決定する該方法は、インビトロ方法である。

【0536】

いくつかの実施形態において、工程（a''）における候補化合物と接触したまたは接触していない該複数の細胞は、該細胞における B R S - 3 受容体の発現のレベルが工程（b''）において測定される前に、少なくとも約 1 時間、少なくとも約 2 時間、少なくとも約 4 時間、少なくとも約 8 時間、少なくとも約 16 時間、少なくとも約 24 時間、少なくとも約 36 時間、または少なくとも約 48 時間培養される。

【0537】

本発明は、細胞（例えば、ニューロン細胞）において B R S - 3 発現を減少させる該化合物、該化合物を含む組成物（例えば、医薬組成物）、および（例えば、睡眠を促進するために、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するために）該組成物を用いる方法に関し、ここで、該化合物は小分子である。本発明は、細胞（例えば、ニューロン細胞）において B R S - 3 発現を減少させる該化合物、該化合物を含む組成物（例えば、医薬組成物）、および（例えば、睡眠を促進するために、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するために）該組成物

を用いる方法に関し、ここで、化合物はアンチセンス核酸（例えば、アンチセンスRNA）である。本発明は細胞（例えば、ニューロン細胞）においてBRS-3発現を減少させる該化合物、該化合物を含む組成物（例えば、医薬組成物）、および（例えば、睡眠を促進するために、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するために）該組成物を用いる方法に関し、ここで、化合物は、標準的な手法に従ってBRS-3受容体をコードする遺伝子のヌクレオチド配列に由来するヌクレオチド配列を含む小干渉性RNA（siRNA）または短ヘアピンRNA（shRNA）分子である。当業者に知られているように、siRNA、shRNAおよびアンチセンスRNAは一般に、標的遺伝子の発現を変調することができる（例えば、Hulmlund JT, Ann NY Acad Sci (2003) 1002:244-251; and Devroereら、Expert Opin Biol Ther (2004) 4:319-327（その各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる）を参照）。

10

【0538】

また、本発明は、覚醒状態を促進するのに、または過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、あるいは覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物を同定するための方法であって：

（a'）BRS-3受容体を含む複数の細胞を候補化合物と接触させ、または接触させない工程、

（b'）候補化合物と接触した細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルおよび候補化合物と接触していない細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルを測定する工程；ならびに

20

（c'）候補化合物と接触した細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルを候補化合物と接触していない細胞におけるBRS-3の発現のレベルと比較する工程；を含み、

ここで、候補化合物と接触していない細胞のBRS-3受容体の発現のレベルと比較した、候補化合物と接触した細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルの増加は、候補化合物が覚醒状態を促進するのに、あるいは過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、あるいは覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法に関する。

30

【0539】

本発明は、加えて、覚醒状態を促進するのに、あるいは過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、あるいは覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適しているか否かを同定するための方法であって、前記工程（a'）～（c'）を含み、さらに；

（d'）所望により、工程（c'）において、その存在下でBRS-3受容体の発現のレベルが増加される化合物を合成する工程；

（e'）工程（c'）において、その存在下でBRS-3受容体の発現のレベルが増加する化合物を哺乳動物に投与する工程；および

40

（f'）化合物が、哺乳動物において、覚醒状態を促進するか、または、認識増強活性を有するか否かを決定する工程；

を含み、

ここで、哺乳動物において、覚醒状態を促進するか、または認識増強活性を示す候補化合物の能力が、候補化合物が覚醒状態を促進するのに、あるいは過剰な眠気を予防もしくは治療するのに、あるいは覚醒状態を促進することによって緩和される睡眠障害、および認識障害よりなる群から選択されるGABA関連神経学的障害を予防もしくは治療するのに適した化合物であることを示す方法をその特徴とする。

【0540】

50

いくつかの実施形態において、哺乳動物は非哺乳動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は実験室動物である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は、非ヒト霊長類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物は、げっ歯類である。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はラットである。いくつかの実施形態において、非ヒト哺乳動物はマウスである。

【0541】

いくつかの実施形態において、化合物が哺乳動物において覚醒状態を促進するか否かの該決定は睡眠ポリグラフィを含む。

【0542】

いくつかの実施形態において、候補化合物が細胞においてBRS-3受容体の発現を増加させる剤であるか否かを同定する該方法は、インビトロ法である。

10

【0543】

いくつかの実施形態において、工程(a'')における候補化合物と接触したまたは接触していない該複数の細胞は、該細胞におけるBRS-3受容体の発現のレベルが(b'')において測定される前に、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約16時間、少なくとも約24時間、少なくとも約36時間、または少なくとも約48時間培養される。

【0544】

本発明は、細胞（例えば、ニューロン細胞）においてBRS-3発現を増加させる該化合物、該化合物を含む組成物（例えば、医薬組成物）、および（例えば、睡眠を促進するために、または睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害を予防もしくは治療するために）該組成物を用いる方法に関し、ここで、化合物は小分子である。

20

【0545】

また、本発明は、ヒトを含めた、組織試料におけるBRS-3を局在化および定量するための、およびBRS-3の公知のリガンドなどの放射線同位体標識化合物の結合の阻害に関する方法においてBRS-3リガンドを同定するための、インビトロおよびインビボ双方で、放射線イメージングのみならずアッセイにおいても有用である哺乳動物BRS-3などの本発明のGPCRのモジュレータまたはリガンドとして同定される本発明の化合物の放射線同位体標識バージョンにも関する。そのような放射線同位体標識化合物を含むBRS-3などの哺乳動物BRS-3などの本発明のGPCRに関する新規なアッセイを開発するのは本発明のさらなる目的である。説明として、かつ限定されないが、放射線イメージングによって可視化された正常な範囲を超えて増大した脳BRS-3は、不眠症などの睡眠の促進によって緩和される睡眠障害に対する、全般性不安障害およびパニック発作などの不安障害に対する、癲癇などの痙攣障害に対する、偏頭痛に対する、大鬱病障害などの鬱病障害に対する、または統合失調症などの精神病性障害に対する危険性がある対象を同定すると考えられる。また、説明として、限定されないが、放射線イメージングによって可視化される正常な範囲を下回る減少した脳BRS-3は、睡眠過剰、ナルコレプシーなどの覚醒状態の促進によって緩和される睡眠障害に対する、または認知症およびアルツハイマー型認知症などの認識障害に対する危険性がある対象を同定する。いくつかの実施形態において、脳BRS-3は視床下部BRS-3である。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。

30

40

【0546】

また、本発明は、哺乳動物BRS-3受容体のモジュレータまたはリガンドである放射性化合物を、該放射線イメージングを必要とする哺乳動物に投与することを含む放射線イメージング方法に関する。1つの態様において、哺乳動物BRS-3受容体のリガンドは、哺乳動物BRS-3受容体のモジュレータではない。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒトでない。いくつかの実施形態において、放射線イメージング方法は、哺乳動物が、不眠症などの睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害に対する、またはそれに向けて進行している、全般性不安障害およびパニック発作などの不安障害に対する、癲癇などの痙攣障害に対する、偏頭痛に対する、大鬱病障害などの鬱病障害に対する、ま

50

たは統合失調症などの精神病性障害に対する危険性があるか否かを同定するためのものであり、ここで、正常な範囲を超える哺乳動物における脳BRS-3のレベルは、哺乳動物が不眠症などの睡眠の促進によって緩和される睡眠障害に対する、またはそれに向けて進行している、全般性不安障害およびパニック発作などの不安障害に対する、癲癇などの痙攣障害に対する、偏頭痛に対する、大鬱病障害などの鬱病障害に対する、または統合失調症などの精神病性障害に対する危険性があることを示す。いくつかの実施形態において、放射線イメージング方法は、不眠症などの睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、全般性不安障害およびパニック発作などの不安障害、癲癇などの痙攣障害、偏頭痛、大鬱病障害などの鬱病障害、または統合失調症などの精神病性障害を、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストで、細胞においてBRS-3発現を減少させる化合物で、または逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または細胞においてBRS-3を減少させる化合物、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物で予防もしくは治療する哺乳動物を同定するためのものであり、ここで、正常な範囲を超える哺乳動物における脳BRS-3のレベルは、不眠症などの睡眠を促進することによって緩和される睡眠障害、全般性不安障害およびパニック発作などの不安障害、癲癇などの痙攣障害、偏頭痛、大鬱病障害などの鬱病障害、または統合失調症などの精神病性障害を、哺乳動物BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストで、または細胞においてBRS-3発現を減少させる化合物、または逆アゴニストもしくはアンタゴニスト、または細胞においてBRS-3発現を減少させる化合物、医薬上許容される担体を含む、医薬組成物で予防もしくは治療する哺乳動物を同定する。いくつかの実施形態において、放射線イメージング方法は、哺乳動物が、ナルコレプシーなどの睡眠障害に関連する過剰な眠気などの過剰な眠気に対する危険性がある、またはそれに向けて進行する、または、認知症およびアルツハイマー型などの認識障害に対する危険性がある、またはそれに向けて進行するか否かを同定するためのものであり、ここで、正常な範囲を下回る哺乳動物における脳BRS-3のレベルは、哺乳動物が、ナルコレプシーなどの睡眠障害に関連する過剰な眠気などの過剰な眠気に対する危険性がある、またはそれに向けて進行する、または、認知症およびアルツハイマー型などの認識障害に対する危険性がある、またはそれに向けて進行することを示す。いくつかの実施形態において、放射線イメージング方法は、ナルコレプシーなどの睡眠障害に関連する過剰な眠気などの過剰な眠気、または認知症およびアルツハイマー型の認知症などの認識障害を、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストで、または細胞においてBRS-3発現を増加させる化合物で、アゴニストまたは部分アゴニストまたは細胞におけるBRS-3発現を増加させる化合物、および医薬上許容される担体を含む医薬組成物で予防もしくは治療する必要がある哺乳動物を同定するためのものであり、ここで、正常な範囲を下回る哺乳動物における脳BRS-3のレベルは、ナルコレプシーなどの睡眠障害に関連する過剰な眠気などの過剰な眠気、または認知症およびアルツハイマー型の認知症などの認識障害を、哺乳動物BRS-3のアゴニストもしくは部分アゴニストで、または細胞においてBRS-3発現を増加させる化合物で、またはアゴニストまたは部分アゴニスト、または細胞においてBRS-3発現を増加させる化合物、および医学上許容される担体を含む医薬組成物で予防もしくは治療する必要がある哺乳動物を同定する。いくつかの実施形態において、脳BRS-3は視床下部BRS-3である。いくつかの実施形態において、視床下部BRS-3は視床下部背内側核(DMH)BRS-3である。

【0547】

本発明は、ヒトBRS-3などの哺乳動物BRS-3などの本発明のGPCRのモジュレータまたはリガンドとして同定される本発明の放射線同位体標識バージョンを含む。

【0548】

また、本発明は、ヒトBRS-3などの哺乳動物BRS-3などの本発明のGPCRに結合したリガンドを検出するのに有用な試験リガンドの放射線同位体標識バージョンに関する。いくつかの実施形態において、本発明では、ヒトBRS-3などの哺乳動物BRS-3などの本発明のGPCRに結合したリガンドを検出するのに有用な該放射性標識試験

リガンドのライブラリーが明らか意図される。ある実施形態において、該ライブラリーは少なくとも約 10 、少なくとも約 10^2 、少なくとも約 10^3 、少なくとも約 10^5 、または少なくとも約 10^6 の該放射性標識試験リガンドを含む。本発明のさらなる目的は、そのような放射性同位体標識試験リガンドを含む、ヒトBRS-3などの哺乳動物BRS-3などの本発明のGPCRに関する新規なアッセイを開発することである。

【0549】

いくつかの実施形態において、化合物の放射性同位体標識バージョンは1以上の原子が典型的には天然で見出される、(すなわち天然で生じる)原子質量または質量数とは異なる原子質量または質量数を有する原子によって置き換えられているまたは置換されているという事実を除いて該化合物と同一である。本発明の化合物に組み込まれ得る適当な放射性核種は、限定されないが、 ^2H (ジューテリウム)、 ^3H (トリチウム) ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^8Br 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I および ^{131}I を含む。本発明の放射性標識化合物に包含される放射性核種は、その放射性標識化合物の具体的適応に依存するであろう。例えば、インビトロBRS-3受容体標識および競合アッセイでは、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^8Br 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S を組み込む化合物が一般には最も有用であろう。放射線イメージング適用では、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br または ^{77}Br が一般には最も有用であろう。いくつかの実施形態において、放射性核種は ^3H 、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^8Br よりなる群から選択される。

【0550】

放射性同位体を有機化合物に組み込ませるための合成方法は、本発明の化合物に適用可能であり、当該分野でよく知られている。例えば、活性レベルのトリチウムを標的分子に組み込むこれらの合成方法は以下の通りである。

【0551】

A. トリチウムガスでの接触還元—この手法は、通常、高特異的活性産物を生じ、ハロゲン化前駆体または不飽和前駆体を必要とする。

【0552】

B. ホウ水素化ナトリウム [^3H] での還元—この手法はかなり安価であって、アルデヒド、ケトン、ラクトン、エステルなどの還元可能な官能基を含有する前駆体を必要とする。

【0553】

C. 水素化アルミニウムリチウム [^3H] での還元—この手法はせいぜい理論的な特異的活性を産物に与える。また、アルデヒド、ケトン、ラクトン、エステルなどの還元可能な官能基を含有する前駆体も必要とする。

【0554】

D. トリチウムガス暴露標識—この手法は、適当な触媒の存在下において、交換可能なプロトンを含む前駆体をトリチウムガスに曝露することを含む。

【0555】

E. ヨウ化メチル [^3H] を用いるN-メチル化—この手法は、通常、適当な前駆体を高特異的活性ヨウ化メチル [^3H] で処理することによって、O-メチルまたはN-メチル [^3H] 産物を調製するのに使用される。この方法は、一般に、例えば、約 $70\sim 90\text{ Ci/ミリモル}$ などのより高い特異的活性を可能にする。

【0556】

活性レベルの ^{125}I を標的分子に組み込む合成方法は以下を含む：

A. Sandmeyerなどの反応—この手法は、アリールまたはヘテロアリールアミンをテトラフルオロボレート塩などのジアゾニウム塩に、続いて Na^{125}I を用いて ^{125}I 標識化合物に変換する。表示の手法はZhu, D. —G. および共同研究者によってJ. Org. Chem. 2002, 67, 943-948において報告されている。

【0557】

B. フェノールのオルト ^{125}I ヨウ素化—この手法は Collier, T. L. および共同研究者によって J. Labeled Compd Radiopharm. 1999, 42, S264—S266 において報告されているように、フェノールのオルト位置において ^{125}I の取込を可能とする。

【0558】

C. ^{125}I での臭化アリールおよびヘテロアリール交換—この方法は、一般には、2 工程プロセスである。最初の工程において、トリアルキルスズハライドまたはヘキサアルキルスズ（例えば、 $(\text{CH}_3)_3\text{SnSn}(\text{CH}_3)_3$ ）の存在下、例えば、Pd 触媒反応（すなわち $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ ）を用いて、またはアリールまたはヘテロアリールリチウムを通じて、臭化アリールまたは臭化ヘテロアリールを対応するトリアルキルスズ中間体に変換する。表示の手法は、Bas, M. —D. および共同研究者によって J. Labeled Compd Radiopharm. 2001, 44, S280—S282 において報告されている。

【0559】

いくつかの実施形態において、化合物の放射性同位体標識バージョンは、放射線核種を含む 1 以上の置換基の付加を除いて、化合物と同一である。いくつかのさらなる実施形態において、化合物は小分子である。いくつかのさらなる実施形態において、化合物はポリペプチドである。いくつかの実施形態において、化合物は抗体またはその抗原結合断片である。いくつかのさらなる実施形態において、該抗体はモノクローナルである。適当な該放射線核種は、限定されないが、 ^2H （ジューテリウム）、 ^3H （トリチウム）、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{82}Br 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I および ^{131}I を含む。本発明の放射性標識化合物に組み込まれる放射性核種は、その放射性標識化合物の具体的適用に依存するであろう。例えば、インビトロ BRS-3 受容体標識および競合アッセイでは、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{82}Br 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S を組み込む化合物は、一般には最も有用であろう。放射線イメージング適用のためには、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br または ^{77}Br は、一般には最も有用である。いくつかの実施形態において、放射性核種は、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^{82}Br よりなる群から選択される。

【0560】

放射性核種を含む 1 以上の置換基を付加させる方法は当業者の技量内であり、限定されないが、酵素方法（Marchalonis JJ, Biochemical Journal (1969) 113:299—305; Thorell JI and Johansson BG, Biochimica et Biophysica Acta (1969) 251:363—9; その各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる）による、および／または Chloramine-T/Iodogen/Iodobead 方法（Hunter WM and Greenwood FC, Nature (1962) 194:495—6; Greenwood FC ら、Biochemical Journal (1963) 89:114—23; その各々の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる）による、放射性同位体ヨウ素の付加を含む。

【0561】

開示されたレポーターおよび方法の他の使用は、とりわけ、本特許書類のレビューに基づいて当業者に明らかとなるであろう。

【実施例】

【0562】

以下の実施例は本発明の明瞭化の目的のために掲げるのであり、限定するものではない。具体的な核酸およびアミノ酸配列を本明細書で開示するが、当業者は、以下に報告される同一または実質的に同様の結果を呈しつつ、これらの配列に対して重要でない修飾を施

10

20

30

40

50

す能力が備わっている。そのような修飾されたアプローチは本開示の範囲内にあると考えられる。さらに技巧を凝らすことなく、当業者であればこれまでの記載を用い、本発明をその最大限まで実施できると信じる。以下の詳細な実施例は単に説明的なものであり、これまでの開示を断じて限定するものではないと解釈されるべきである。当業者であれば該手法から適当な変形を直ちに認識するであろう。

【0563】

本発明の主題に関連する、当業者によく知られた組換えDNA技術は、例えば、M a n i a t i s Tら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l (1989) C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y ; 米国特許第6, 399, 373号; および2002年8月19日にW O 0 2 / 0 6 6 5 0 5として公開されたP C T出願番号P C T / I B 0 2 / 0 1 4 6 1に見出すことができる。

10

【0564】

(実施例1)

内因性ヒトBRS-3の全長クローニング

内因性ヒトBRS-3をコードするポリヌクレオチドはBRS-3特異的プライマー: 5' - A C A G A A T T C A G A A G A A A T G G C T C A A A G G C A - 3' (配列番号3; E c o R I 部位に対してセンス、開始コドンとしてのA T G) および5' - C A T G G A T C C T T G A A A G C T A G A A T C T G T C C - 3' (配列番号4; B a m H I 部位に対してアンチセンス、停止コドンとしてのC T A)

20

を用い、およびヒト子宮cDNA (C l o n t e c h) を鋳型として用いるR T - P C R によってクローン化した。T a q P l u s P r e c e s s i o n (商標) DNAポリメラーゼ (S t r a t a g e n e) を、25回反復される工程2~工程4を含む以下のサイクルによる増幅で用いた。

94℃、3分; 94℃、1分; 56℃、1分; 72℃、1分20秒; 72℃; 10分
予測されたサイズの1.23Kb PCR断片を単離し、E c o R I およびB a m H I で消化し、p C M V発現ベクターにクローン化し、T7 DNA配列キット (A m e r s h a m) を用いて配列決定した。核酸配列については配列番号1および推定アミノ酸配列については配列番号2参照。

【0565】

30

(実施例2)

受容体発現

種々の細胞がタンパク質の発現のために当該分野で入手可能であるが、哺乳動物細胞またはメラニン保有細胞を利用するのが最も好ましい。このための主な理由は実施者に予測され、すなわち、例えば、G P C Rの発現のための酵母細胞の利用は、可能であれば、プロトコルに、非哺乳動物細胞を導入し、これは、受容体共役、遺伝的メカニズムおよび哺乳動物系について進化した分泌経路を含まなくてもよく (事実酵母の場合には、含まず)、かくして、潜在的な使用が可能であれば、非哺乳動物細胞で得られた結果は、哺乳動物細胞またはメラニン保有細胞から得られたものほど好ましくはない。哺乳動物細胞の内、C H O、C O S - 7、M C B 3 9 0 1、2 9 3、2 9 3 T およびH e L a細胞が特に好ましいが、利用される特異的哺乳動物細胞は、当業者の必要に応じて予測することができる。実施例9を含めた、メラニン保有細胞に関する後記参照。

40

【0566】

a. 一過性トランスフェクション

第1日に10cm皿当たり 4×10^6 の293細胞を平板培養する。第2日に、2つの反応チューブを調製し (各チューブについての以下の割合は平板当りのものである): チューブAは、0.5mlの無血清DMEM (G i b c o B R L) 中4μgのDNA (例えば、p C M Vベクター; G P C Rをコードするポリヌクレオチドを含むp C M Vベクターなど) を混合することによって調製し; チューブBは0.5mlの無血清DMEM中24μlのリポフェクタミン (G i b c o B R L) を混合することによって調製する。チュ

50

ープAおよびBを逆にして（数回）混合し、続いて、室温にて30～45分間インキュベートする。この混合物を「トランスフェクション混合物」という。平板培養した293細胞を1×PBSで洗浄し、続いて、5mlの無血清DMEMを加える。1mlのトランスフェクション混合物を細胞に加え、続いて、37℃/5%CO₂で4時間インキュベートする。トランスフェクション混合物を吸引によって取り出し、続いて、10mlのDMEM/10%胎児ウシ血清を加える。細胞を37℃/5%CO₂でインキュベートする。48時間のインキュベーションの後に細胞を収穫し、分析で使用する。

【0567】

b. 安定な細胞系

約12×10⁶個の293細胞を15cmの組織培養プレート上で平板培養する。10%の胎児ウシ血清および1%のピルビン酸ナトリウム、L-グルタミンおよび抗生物質を含有するDME高グルコース培地中で成長させる。293細胞の平板培養から24時間後に（または約80%の密集度まで）、細胞を12μgのDNA（例えば、本発明のGPCRをコードするポリヌクレオチドを含むpCMV-neo^rベクター）を用いてトランスフェクトする。12μgのDNAを、60μlのリポフェクタミン、および血清を含まない2mlのDME高グルコース培地と合わせる。培地をプレートから吸引し、細胞を、血清を含まない培地で1回洗浄する。DNA、リポフェクタミン、および培地混合物を、血清を含まない10mlの培地と共にプレートに加える。4～5時間の37℃でのインキュベーションに続き、培地を吸引し、血清を含有する25mlの培地を加える。トランスフェクションから24時間後に培地を再度吸引し、血清を含む新鮮な培地を加える。トランスフェクションから48時間後に培地を吸引し、血清を含み、ゲネチシン（G418薬物）を含有する培地を最終濃度500μg/mlで加える。トランスフェクトされた細胞は、ここで、G418耐性遺伝子を含有する陽性にトランスフェクトされた細胞についての選択を受ける。選択が起こるにつれ、培地を4～5日毎に交換する。選択の間、細胞を成長させて、安定なプールを作り出し、安定なクローナル選択のために分ける。

【0568】

（実施例3）

GPCR活性化の決定のためのアッセイ（例えば、スクリーニングアッセイ）

目的とするGPCR、または「標的」GPCRの活性化を評価するために、種々のアプローチが利用できる。以下のものは説明的であり；当業者には、当業者の要求に優先的に利点がある技術を決定する能力が備わっている。

【0569】

1. 膜結合アッセイ：[³⁵S]GTPγSアッセイ

Gタンパク質共役受容体がある場合、リガンド結合または構成的活性化のいずれかの結果として、受容体はGタンパク質に共役し、GDPの放出、および、引き続いてのGTPのGタンパク質への結合を刺激する。Gタンパク質受容体複合体のアルファサブユニットはGTPaseとして作用し、GTPをGDPにゆっくりと加水分解し、その時点で、受容体は正常に脱活性化される。活性化された受容体は、継続してGDPをGTPに交換する。非加水分解可能GTP類似体である[³⁵S]GTPγSを利用して、活性化された受容体を発現する膜への[³⁵S]GTPγSの増強された結合を示すことができる。活性化を測定するのに[³⁵S]GTPγS結合を用いる利点は、（a）全てのGタンパク質共役受容体に包括的に適用でき；（b）膜表面において近位にあり、細胞内カスケードに影響する分子をあまり拾い上げないようにすることである。

【0570】

アッセイは、関連受容体を発現する膜への[³⁵S]GTPγS結合を刺激するGタンパク質共役受容体の能力を利用する。従って、アッセイを利用してGPCRのモジュレータとしての候補化合物をスクリーニングすることができる。アッセイは包括的であって、全てのGタンパク質共役受容体において薬物発見への適用を有する。

【0571】

[³⁵S]GTPγSアッセイを、20nM HEPES、および1～約20mMの間

の $MgCl_2$ (20 mM が好ましいが、この量は結果の最適化のために調整することができる)、pH 7.4、約 0.3 ~ 約 1.2 nM の間の $[^3H] GTP\gamma S$ を含む結合緩衝液 (1.2 が好ましいが、この量は結果の最適化のために調整することができる)、および 12.5 ~ 75 μg の膜タンパク質 (例えば、本発明の GPCR 発現する 293 細胞; この量は最適化のために調整することができる)、および 10 μM の GDP (この量は最適化のために変化させることができる) 中で 1 時間インキュベートする。次いで、小麦胚芽アグルチニンビーズ (25 μl ; Amersham) を加え、混合物を室温でさらに 30 分間インキュベートする。次いで、チューブを室温にて 1500 $\times g$ で 5 分間遠心分離し、次いで、シンチレーションカウンタでカウントする。

【0572】

2. アデニリルシクラーゼ

細胞ベースのアッセイのために設計された Flash Plate (商標) Adenyl cyclase キット (New England Nuclear; Cat. No. SMP004A) を修飾して、粗製原型質膜で用いることができる。Flash Plate (フラッシュプレート) ウェルは、cAMP を認識する特異的抗体も含有するシンチラントコーティングを含有することができる。ウェルで生じた cAMP は、放射性 cAMP トレーサーの cAMP 抗体への結合についての直接的競合によって定量することができる。以下は、受容体を発現する全細胞における cAMP レベルの変化の測定のための簡単なプロトコルとして働く。

【0573】

トランスフェクトされた細胞を、一過性トランスフェクションからほぼ 24 ~ 48 時間後に収穫する。培地を注意深く吸引し、捨てる。10 ml の PBS を各皿の細胞にゆっくりと加え、続いて、注意深く吸引する。1 ml の Sigma 細胞解離緩衝液および 3 ml の PBS を各プレートに加える。細胞をプレートからピペットで取り、細胞懸濁液を 50 ml の円錐形遠心管に集める。次いで、細胞を室温にて 1, 100 rpm において 5 分間遠心分離する。細胞ペレットを、注意深く、適当な容量の PBS (約 3 ml / プレート) に再懸濁させる。次いで、血球計を用いて細胞をカウントし、さらなる PBS を加えて、適当な数の細胞を得る (最終容量は約 50 μl / ウェル)。

【0574】

cAMP 標準、および (1 μCi のトレーサー $[^3H] cAMP$ (50 μl) ~ 1 ml の検出緩衝液を含有する) 検出緩衝液を調製し、製造業者の指示に従って維持する。スクリーニングのためにアッセイ緩衝液を新たに調製し、該緩衝液は、50 μl の刺激緩衝液、3 μl の試験化合物 (12 μM 最終アッセイ濃度) および 50 μl の細胞を含有する。アッセイ緩衝液を利用するまで氷上に貯蔵する。例えば、96 ウェルプレート中で好ましく行われたアッセイは、50 μl の cAMP 標準を適当なウェルに加え、続いて、50 μl の PBS をウェル H-11 および H-12 に加えることによって開始する。50 μl のシンチレーション緩衝液を全てのウェルに加える。DMSO (または選択された候補化合物) を、3 μl の化合物溶液を分注できるピンツールを用いて適当なウェルに加え、最終アッセイ濃度 20 μM の試験化合物および 100 μl 合計アッセイ用量である。次いで、細胞をウェルに加え、室温で 60 分間インキュベートする。次いで、トレーサー cAMP を含有する 100 μl の検出ミックスをウェルに加える。次いで、プレートをさらに 2 時間インキュベートし、続いて、Wallac MicroBeta シンチレーションカウンタでカウントする。次いで、cAMP / ウェルの値を、各アッセイプレート内に含まれる標準 cAMP 曲線から外挿する。

【0575】

3. Gi 共役標的 GPCR のための細胞ベースの cAMP アッセイ

甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) は、活性化に際して cAMP の蓄積を引き起こす Gs 共役 GPCR である。TSHR は、アミノ酸残基 623 を突然変異させる (すなわち、アラニン残基をイソロイシン残基に変化させる) ことによって構成的に活性化される。Gi 共役受容体は、アデニリルシクラーゼを阻害し、従って、cAMP 生産のレベルを

10

20

30

40

50

減少させると予測され、これは、cAMPレベルチャレンジの評価を行うことができる。Gi共役受容体の活性化の指標としてのcAMPの生産の減少を測定するための効果的な技術は、「シグナル増強剤」として、最も好ましくは非内因性の構成的に活性化されたTSHR (TSHR-A623I) (または内因性の構成的に活性なGs共役受容体)を、Gi共役標的GPCRで同時トランスフェクトして、cAMPのベースラインレベルを確立することによって達成することができる。Gi共役受容体は、シグナル増強剤で同時トランスフェクトし、スクリーニングのために用いることができるこの物質である。そのようなアプローチを利用してcAMPアッセイを用いる場合に、効果的にシグナルを生成することができる。いくつかの実施形態において、このアプローチは、好ましくは、Gi共役受容体に対する候補化合物の同定で用いる。Gi共役GPCRについては、このアプローチを用いる場合、標的GPCRの逆アゴニストは、cAMPシグナルを増加させ、アゴニストはcAMPシグナルを減少させることを注記する。

10

【0576】

第1日において、10cm皿当たり 4×10^6 個の293細胞を平板培養する。第2日に、2つの反応チューブを調製し (各チューブについての以下の割合はプレート値である) : チューブAは、0.5mlの無血清DMEM (Irvine Scientific, Irvine, CA) 中、合計4 μ gのDNA (例えば、pCMVベクター; 突然変異されたTSHR (TSHR-A623I) を含むpCMVベクター; TSHR-A623Iおよび標的GPCR等) につき、哺乳動物細胞にトランスフェクトされた各受容体の2 μ gのDNAを混合することによって調製し; チューブBは、0.5mlの無血清DMEM中、24 μ lのリポフェクタミン (Gibco BRL) を混合することによって調製する。次いで、チューブAおよびBを逆にして (数回) 混合し、続いて、室温にて30~45分間インキュベートする。混合物を「トランスフェクション混合物」という。平板培養した293細胞を1 $\times$ PBSで洗浄し、続いて、5mlの無血清DMEMを加える。次いで、1.0mlのトランスフェクション混合物を細胞に加え、続いて、37 $^{\circ}$ C/5%CO₂にて4時間インキュベートする。次いで、トランスフェクション混合物を吸引によって除去し、続いて、10mlのDMEM/10%胎児ウシ血清を加える。次いで、細胞を37 $^{\circ}$ C/5%CO₂でインキュベートする。ほぼ24~48時間のインキュベーションの後、次いで、細胞を収穫し、分析のために利用する。

20

【0577】

Flash Plate (商標) Adenylyl Cyclaseキット (New England Nuclear; Cat. No. SMP004A) を、細胞ベースのアッセイのために設計するが、当業者の要望に応じて、修飾して粗製原形質膜で使うことができる。フラッシュプレートウエルは、cAMPを認識する特異的抗体も含有するシンチラントコーティングを含有する。ウエルで生じたcAMPは、放射性cAMPトレーサーのcAMP抗体への結合についての直接的競合によって定量することができる。以下は、受容体を発現する全細胞におけるcAMPレベルの変化の測定のための簡単なプロトコルとして働く。

30

【0578】

トランスフェクトされた細胞は、一過性トランスフェクションからほぼ24時間~48時間後に収穫される。培地を注意深く吸引し、捨てる。10mlのPBSを各皿の細胞にゆっくりと加え、続いて、注意深く吸引する。1mlのSigma細胞解離緩衝液および3mlのPBSを各プレートに加える。細胞をプレートからピペットで取り、細胞懸濁液を50mlの円錐形遠心管に集める。次いで、細胞を室温にて1,100rpmにおいて5分間遠心分離する。細胞ピペットを、注意深く、適当な容量のPBS (約3ml/プレート) に再懸濁させる。次いで、血球計を用いて細胞をカウントし、さらなるPBSを加えて、適当な数の細胞を得る (最終容量は約50 μ l/ウエル)。

40

【0579】

cAMP標準、および(1 μ Ciのトレーサー [¹²⁵I] cAMP (50 μ l) ~ 1mlの検出緩衝液を含む) 検出緩衝液を調製し、製造業者の指示に従って維持する。ス

50

クリーニングのためにアッセイ緩衝液を新たに調製する必要がある、該緩衝液は、 $50\mu\text{l}$ の刺激緩衝液、 $3\mu\text{l}$ の試験化合物（ $12\mu\text{M}$ の最終アッセイ濃度）および $50\mu\text{l}$ の細胞を含有し、アッセイ緩衝液は利用するまで氷上で貯蔵することができる。アッセイは、 $50\mu\text{l}$ のcAMP標準を適当なウェルに加え、続いて、 $50\mu\text{l}$ のPBSをウェルH-11およびH12に加えることによって開始することができる。 $50\mu\text{l}$ の刺激緩衝液を全てのウェルに加える。選択された化合物（例えば、TSH）を、 $3\mu\text{l}$ の化合物溶液を分注することができるピンツールを用いて適当なウェルに加え、最終アッセイ濃度は、 $12\mu\text{M}$ の試験化合物および $100\mu\text{l}$ の合計アッセイ容量である。次いで、細胞をウェルに加え、室温にて60分間インキュベートする。次いで、トレーサーcAMPを含有する $100\mu\text{l}$ の検出ミックスをウェルに加える。次いで、プレートにさらに2時間インキュベートし、続いて、Wallac MicroBetaシンチレーションカウンタでカウントする。次いで、cAMP/ウェルの値を、各アッセイプレートに含まれる標準cAMP曲線から外挿する。

10

【0580】

4. レポーターベースのアッセイ

a. CRE-LUCレポーターアッセイ（Gs関連受容体）

293および293T細胞を、ウェル当たり 2×10^4 細胞の密度で96ウェルプレートにて平板培養し、製造業者の指示に従って、翌日、リポフェクタミン試薬（BRL）を用いてトランスフェクトする。DNA/脂質混合物を、以下のように、各6ウェルトランスフェクションについて調製し： $100\mu\text{l}$ のDMEM中の 260ng のプラスミドDNAを、 $100\mu\text{l}$ のDMEM中の $2\mu\text{l}$ の脂質と穏やかに混合する（ 260ng のプラスミドDNAは 200ng の $8 \times \text{CRE-Luc}$ レポータープラスミド、内因性受容体または非内因性受容体を含む 50ng のpCMV、またはpCMV単独、および 10ng のCMV-SEAPよりなる（分泌されたアルカリ性ホスファターゼ発現プラスミド；アルカリ性ホスファターゼ活性をトランスフェクトされた細胞の培地中で測定し、試料間のトランスフェクション効率の変動について制御する））。 $8 \times \text{CRE-Luc}$ レポータープラスミドは以下の通りに調製した：ベクターSRIF- β -galは、P β gal-Basicベクター（Clontech）中のBg1V-hindIII部位においてラットソマトスタチンプロモータ（-71/+51）をクローニングすることによって得た。cAMP応答エレメントの8コピーは、アデノウイルス鋳型AdpCF126CCRE8（Suzukiら、Hum Gene Ther（1996）7：1883-1893（その開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる）参照）からPCRによって得、Kpn-Bb1V部位においてSRIF- β -galベクターにクローン化し、その結果、 $8 \times \text{CRE-}\beta$ -galレポーターベクターが得られる。 $8 \times \text{CRE-Luc}$ レポータープラスミドは、 $8 \times \text{CRE-}\beta$ -galレポーターベクター中のベクターガラクトシダーゼ遺伝子を、HindIII-BamHI部位において、pGL3ベーシックベクター（Promega）から得られたルシフェラーゼ遺伝子で置き換えることによって生じた。室温での30分のインキュベーションに続き、DNA/脂質混合物を $400\mu\text{l}$ のDMEMで希釈し、 $100\mu\text{l}$ の希釈された混合物を各ウェルに加える。 $10\% \text{ FCS}$ を含む $100\mu\text{l}$ のDMEMを、細胞培養インキュベータ中での4時間後のインキュベーション後に各ウェルに加える。翌日、トランスフェクトされた細胞を $200\mu\text{l}$ /ウェルの、 $10\% \text{ FCS}$ を含むDMEMと交換する。8時間後に、ウェルをPBSで一回洗浄した後に、 $100\mu\text{l}$ /ウェルのフェノールレッドを含まないDMEMに変更する。ルシフェラーゼ活性は、製造業者の指示に従い、LucLite（商標）レポーター遺伝子アッセイキット（Packard）を用いて翌日に測定し、1450 MicroBeta（商標）シンチレーションおよび発光カウンタ（Wallac）で読む。

20

30

40

【0581】

b. AP1レポーターアッセイ（Gq関連受容体）

Gq刺激を検出するための方法は、それらのプロモータ中にAP1エレメントを含有する遺伝子の活性化を引き起こすためのGq依存性ホスホリパーゼCの公知の特性に依存す

50

る。Pathdetect (商標) AP-1 cis-Reporting System (Stratagene, Catalogue # 219073) を、リン酸カルシウム沈澱の成分が 410 ng pAP1-Luc、80 ng pCMV 受容体発現ベクター、および 20 ng CMV-SEAP であった以外は、CREB レポーターアッセイに関して前記したプロトコルに従って利用することができる (分泌されたアルカリ性ホスファターゼ発現プラスミド; アルカリ性ホスファターゼ活性を、トランスフェクトされた細胞の培地中で測定し、試料間のトランスフェクション効率の変動について制御する)。

【0582】

c. SRF-LUC レポーターアッセイ (Gq 関連受容体)

Gq 刺激を検出するための 1 つの方法は、それらのプロモータ中の血清応答因子を含有する遺伝子の活性化を引き起こすための Gq 依存性ホスホリパーゼ C の公知の特性に依存する。Pathdetect (商標) SRF-Luc-Reporting System (Stratagene) を利用して、例えば、COS7 細胞において Gq 共役活性についてアッセイすることができる。細胞は、製造業者の指示に従い、Mammalian Transfection (商標) Kit (Stratagene, Catalogue # 200285) を用い、系のプラスミド成分、および内因性または非内因性 GPCR をコードする示された発現プラスミドでトランスフェクトする。簡単に述べれば、410 ng SRF-Luc、80 ng pCMV 受容体発現プラスミド、および 20 ng CMV-SEAP を、製造業者の指示に従い、リン酸カルシウム沈澱中で合わせる。沈澱の半分を、無血清培地中の細胞上で 24 時間保持された、96 ウェルプレート中の 3 ウェルに同等に分配する。最後の 5 時間、細胞を、例えば、1 μ M の試験化合物と共にインキュベートする。次いで、細胞を溶解させ、製造業者の指示に従い、Luc-lite (商標) Kit (Packard, Cat. # 6016911) および「Trilux 1450 Microbeta」液体シンチレーションおよび発光カウンタ (Wallac) を用いてルシフェラーゼ活性についてアッセイする。データは、GraphPad Prism (商標) 2.0a (GraphPad Software Inc.) を用いて分析することができる。

【0583】

d. 細胞内 IP3 蓄積アッセイ (Gq 関連受容体)

第 1 日に、受容体 (内因性または非内因性) を含む細胞を 24 ウェルプレート上で、通常、 1×10^3 細胞/ウェル (しかしながら、この数字は最適化することができる) で平板培養することができる。第 2 日に、まず、50 μ l 無血清 DMEM ウェル中 0.25 μ g の DNA、および 50 μ l の無血清 DMEM/ウェル中 2 μ l のリポフェクタミンを混合することによってトランスフェクトすることができる。溶液をゆっくりと混合し、室温にて 15~30 分間インキュベートする。細胞を 0.5 ml PBS で洗浄し、400 μ l の無血清培地をトランスフェクション培地と混合し、細胞に加える。次いで、細胞を 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ にて 3~4 時間インキュベートし、次いで、トランスフェクション培地を除去し、1 ml/ウェルの正規の成長培地で置き換える。第 3 日に、細胞を ³H-ミオ-イノシトールで標識する。簡単に述べると、培地を取り出し、細胞を 0.5 ml の PBS で洗浄する。次いで、0.5 ml のイノシトール不含/無血清培地 (GIBCO BR L) を 0.25 μ Ci の ³H-ミオ-イノシトール/ウェルと共に加え、細胞を 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ にて 16~18 時間インキュベートする。第 4 日に、細胞を 0.5 ml の PBS で洗浄し、イノシトール不含/無血清培地 10 μ M パルギリン 10 mM 塩化リチウムまたは 0.4 mL のアッセイ培地を含有し、所望により、50 μ l の試験化合物を最終濃度の 10 μ M まで含有する 0.45 ml のアッセイ培地を加える。次いで、細胞を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートする。次いで、細胞を 0.5 ml PBS で洗浄し、200 μ l の新鮮な/氷冷停止溶液 (1 M KOH; 18 mM ホウ酸 Na; 3.8 mM EDTA) を加える/ウェル。溶液を 5~10 分間、または細胞が溶解するまで氷上に維持し、次いで、200 μ l の新鮮な/氷冷中和ゾルによって中和する (7.5% HCL)。次いで、溶解物を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し、1 ml のクロロホルム/メタノ

ール（１：２）を加える／チューブ。溶液を１５秒間ボルテックスし、上相をBiorad AG1-X8（商標）アニオン交換樹脂（１００～２００メッシュ）に適用する。まず、該樹脂を１：１．２５W／Vにて水で洗浄し、０．９mlの上相をカラムに負荷する。該カラムを１０mlの５mMミオ－イノシトールおよび１０mlの５mMホウ酸Na／６０mMのギ酸Naで洗浄する。イノシトールトリスフェートを、２mlの０．１Mギ酸／１Mギ酸アンモニウムと共に１０mlのシンチレーションカクテルを含有するシンチレーションバイアルに溶出する。１０mlの０．１Mギ酸／３Mギ酸アンモニウムで洗浄することによってカラムを再生し、ddH₂Oで２回すすぎ、水中４℃で貯蔵する。

【０５８４】

（実施例４）

融合タンパク質の調製

a. GPCR：G融合構築体

GPCR-Gタンパク質融合構築体の設計は以下の通り達成することができる：ラットGタンパク質Gsa（長い形態；Itoh, H. ら、83 PNAS 3776（1986））の５'および３'末端の双方は、その上にHindIII（５'-AAGCTT-3'）配列を含むように作製される。（フランキングHindIII配列を含む）正しい配列の確認の後、そのベクターのHindIII制限部位を用いるサブクローニングによって、全配列をpcDNA3.1（-）（Invitrogen, cat. no. V795-20）に往復させる。Gsa配列についての正しい向きは、pcDNA3.1（-）へのサブクローニング後に決定される。次いで、HindIII配列においてラットGsa遺伝子を含有する修飾されたpcDNA3.1（-）を確認し；このベクターは、現在、「ユニバーサル」Gsaタンパク質ベクターとして入手可能である。pcDNA3.1（-）ベクターは、HindIII部位の上流に種々のよく知られた制限部位を含有し、かくして、有利には、Gsタンパク質の上流に、例えば、内因性の構成的に活性なGPCRのコード配列を挿入する能力を提供する。この同一アプローチを用いて、他の「ユニバーサル」Gタンパク質ベクターを作り出すことができ、もちろん、当業者に知られた他の商業的に入手可能なまたは所有権が存在するベクターを利用することができ、重要な基準は、GPCRについての配列が、Gタンパク質の配列の上流にあり、かつそれに対してインフレームにあることである。

【０５８５】

a. Gq（６アミノ酸欠失）／Gi融合構築体

Gq（del）／Gi融合構築体はキメラGタンパク質であり、それにより、Gqタンパク質α-サブユニット（「Gαq」）の最初の６つのアミノ酸を欠失させ、GαqのC末端の最後の５つのアミノ酸をGαiサブユニットの対応するアミノ酸で置き換える。Gq（del）／Gi融合構築体は内因性（例えば）Gi共役受容体を、その非内因性Gタンパク質、（Gq（del）／Giの形態の）Gqに共役させ、従って、第２のメッセンジャー、例えば、トリフォスフェートまたはジアシルグリセロールまたはCa²⁺は、cAMP生産の代わりに測定することができる。

【０５８６】

（実施例５）

[³⁵S] GTPγSアッセイ

１．膜調製物

いくつかの実施形態において、標的GPCRを含み、かつ例えば、逆アゴニスト、アゴニストまたはアンタゴニストとしての候補化合物の同定で用いられる膜は好ましくは以下の通り調製される：

a. 材料

「膜掻き取り緩衝液」は２０mM HEPESおよび１０mM EDTA、pH 7.4を含み；「膜洗浄緩衝液」は２０mM HEPESおよび０．１mM EDTA、pH 7.4を含み；「結合緩衝液」は２０mM HEPES、１００mM NaClおよび１０mM MgCl₂、pH 7.4を含む。

10

20

30

40

50

【0587】

b. 手法

全ての材料は手法を通じて氷上に保持される。まず、培地を細胞の密集した単層から吸引し、続いて、10 ml の冷 PBS ですすぎ、続いて、吸引する。その後、5 ml の膜掻き取り緩衝液を加えて、細胞を掻き取り；これに続いて、細胞抽出物を 50 ml 遠心管に移す（20,000 rpm において、4℃で17分間遠心分離する）。その後、上清を吸引し、ペレットを 30 ml の膜洗浄緩衝液に再懸濁させ、続いて、20,000 rpm において4℃で17分間遠心分離する。次いで、上清を吸引し、ペレットを結合緩衝液に再懸濁させる。次いで、Brinkman Polyttron（商標）ホモジナイザを用いてこれを均質化する。（15～20秒間、全ての材料が懸濁液中に入るまでバーストする）。これを、本明細書においては、「膜タンパク質」という。

10

【0588】

2. ブラッドフォード（Bradford）タンパク質アッセイ

均質化に続いて、膜タンパク質濃度を、ブラッドフォードタンパク質アッセイを用いて決定する（タンパク質を約 1.5 mg/ml まで希釈し、アリコートし、後で用いるために凍結する（-80℃）ことができる；凍結するとき、使用のプロトコルは以下の通りである：アッセイの日に、凍結した膜タンパク質を室温で解凍し、続いて、ボルテックスし、次いで、Polyttronで約12×1,000 rpmにて約5～10秒間均質化する；複数の調製のためには、ホモジナイザは異なる調製物の均質化の間に徹底的に清浄化する必要がある）。

20

【0589】

a. 材料

（前記した）結合緩衝液；ブラッドフォード染料試薬；ブラッドフォードタンパク質標準は、製造業者の指示（Biorad, cat. no. 500-0006）に従って利用する。

【0590】

b. 手法

二連チューブを調製し、1つは膜を含み、および1つは対照「ブランク」としてのものである。各々は800 μl の結合緩衝液を含有した。その後、10 μl のブラッドフォードタンパク質標準（1 mg/ml）を各チューブに加え、10 μl の膜タンパク質を、次いで、丁度1つのチューブ（ブランクではない）に加える。その後、200 μl のブラッドフォード染料試薬を各チューブに加え、続いて、各々をボルテックスする。5分後、チューブを再度ボルテックスし、その中の材料をキュベットに移す。次いで、波長595 nm において、CECIL 3041 分光光度計を用いてキュベットを読む。

30

【0591】

3. 同定アッセイ

a. 材料

GDP 緩衝液は 37.5 ml の結合緩衝液および 2 mg GDP（Sigma, cat. no. G-7127）よりなり、続いて、結合緩衝液の一連の希釈により、0.2 μM GDP を得る（各ウェル中の GDP の最終濃度は 0.1 μM GDP であった）；候補化合物を含む各ウェルは、100 μl GDP 緩衝液（最終濃度 0.1 μM GDP）、結合緩衝液中の 50 μl の膜タンパク質、および結合緩衝液中の 50 μl [³⁵S] GTP γ S（0.6 nM）（10 ml 結合緩衝液当り 2.5 μl [³⁵S] GTP γ S）よりなる 200 μl の最終容量を有する。

40

【0592】

b. 手法

候補化合物は、好ましくは、96 ウェルプレートフォーマットを用いてスクリーニングする（これらは-80℃で凍結することができる）。膜タンパク質（対照としての、標的GPCRを排除する発現ベクターを含む膜）を懸濁液中に入るまで軽く均質化する。次いで、前記したブラッドフォードタンパク質アッセイを用いてタンパク質濃度を決定する。

50

次いで、膜タンパク質（および対照）を結合緩衝液中で0.25 mg/mlまで希釈する（最終アッセイ濃度、12.5 µg/ウェル）。その後、100 µl GDP緩衝液をWallac Seintistrip（商標）（Wallac）の各ウェルに加える。次いで、5 µlのピンツールを用いて、5 µlの候補化合物をそのようなウェルに移す（すなわち、200 µlの合計アッセイ容量中の5 µlは、候補化合物の最終スクリーニング濃度が10 µMとなるように1:40の比率である）。再度、汚染を回避するために、各移動工程の後に、ピンツールを、水（1×）エタノール（1×）および水（2×）を含む3つの貯蔵庫中ですすぐ必要があり、各すすぎの後に過剰の液体をツールから振盪する必要があり、紙およびキムワイプで乾燥する。その後、50 µlの膜タンパク質を各ウェルに加え（標的GPCRを含まない膜を含む対照ウェルも利用した）室温にて5～10分間プレーインキュベートした。その後、結合緩衝液中の50 µlの $[^3\text{H}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ （0.6 nM）を各ウェルに加え、続いて、室温にて攪拌器上で60分間インキュベートする（再度、本実施例においては、プレートをホイルで被覆した）。次いで、4000 RPMにおいてプレートを22℃にて15分間スピンすることによってアッセイを停止する。次いで、プレートを8チャンネルマニフォールドで吸引し、プレートカバーで密閉する。次いで、（製造業者の指示に従い）設定「Prot. #37」を用いてプレートをWallac 1450で読む。

10

【0593】

（実施例6）

環状AMPアッセイ

20

例えば、逆アゴニスト、アゴニスト、またはアンタゴニストとしての候補化合物を同定するための別のアッセイアプローチは、シクラーゼベースのアッセイを利用することによって達成される。候補化合物をそのように同定することに加えて、このアッセイアプローチは、前記実施例5に記載された $[^3\text{H}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ アプローチからの結果の確認を提供するための独立したアプローチとして利用することができる。

【0594】

修飾されたFlash Plate（商標）Adenylyl Cyclaseキット（New England Nuclear; Cat. No. SMP004A）を、好ましくは、以下のプロトコルに従って、標的GPCRのモジュレータとしての候補化合物の同定で利用する。

30

【0595】

標的GPCRでトランスフェクトされた細胞を、トランスフェクションからほぼ3日後に収穫する。20 mM HEPES、pH 7.4および10 mM MgCl_2 を含有する緩衝液中での懸濁した細胞の均質化によって膜を調製する。Brinkman Polyttron（商標）を用いて、均質化を氷上でほぼ10秒間行う。得られたホモジネートを49,000×gにおいて4℃にて15分間遠心する。次いで、得られたペレットを20 mM HEPES、pH 7.4および0.1 mM EDTAを含有する緩衝液に再懸濁させ、10秒間均質化し、続いて、49,000×gにおいて4℃にて15分間遠心分離する。次いで、利用するまで、得られたペレットを-80℃で貯蔵する。直接同定スクリーニングの日に、膜ペレットを室温にてゆっくりと解凍し、20 mM HEPES、pH 7.4および10 mM MgCl_2 を含有する緩衝液に再懸濁させて、0.60 mg/mlの最終タンパク質濃度を得る（再懸濁させた膜を用いるまで氷上に置く）。

40

【0596】

cAMP標準、および2 µCiのトレーサー（ $[^1\text{H}]\text{cAMP}$ （100 µl）～11 mlの検出緩衝液）を含む検出緩衝液を調製し、製造業者の指示に従って維持する。スクリーニングのためにアッセイ緩衝液を新たに調製し、該緩衝液は20 mM HEPES、pH 7.4、10 mM MgCl_2 、20 mM ホスホクレアチン（Sigma）、0.1 単位/mlのクレアチンホスホキナーゼ（Sigma）、50 µM GTP（Sigma）、0.2 mM ATP（Sigma）を含有する；次いで、アッセイ緩衝液を利用するまで氷上で貯蔵する。

50

【0597】

候補化合物を、好ましくは、40 μ l の膜タンパク質 (30 μ g / ウェル) および 50 μ l のアッセイ緩衝液と共に、例えば、96 ウェルプレートウェル (3 μ l / ウェル; 12 μ M 最終アッセイ濃度) に加える。次いで、この混合物を、軽く振盪しつつ、室温で 30 分間インキュベートした。

【0598】

インキュベーションに続き、100 μ l の検出緩衝液を各ウェルに加え、続いて、2 ~ 24 時間インキュベートする。次いで、(製造業者の指示に従い) 「Prot. #31」を用いてプレートを Wallac MicroBeta (商標) プレートリーダーでカウントする。

10

【0599】

例として、限定されないが、得られた説明的スクリーニングアッセイプレート (96 ウェルフォーマット) を図 1 に示す。各棒線は各ウェルで異なる化合物についての結果を表わし、「標的 GPCR」は、BR S-3 受容体と関連しない内因性の構成的に活性な Gs 共役 GPCR の Gs α 融合タンパク質構築体である。図 1 に示された結果は、各プレートの平均結果 (「m」) に基づく標準偏差も提供し、一次スクリーニングからの「リード」としての逆アゴニストの選択のための平均 + 2 つの任意の優先性は、少なくとも平均プレート応答から 2 標準偏差を差し引いたものだけパーセント応答を低下させる候補化合物の選択を含む。逆に、一次スクリーニングからの「リード」としてのアゴニストの選択のための任意の優先性は、少なくとも平均プレート応答 + 2 標準偏差だけパーセント応答を増加させる候補化合物を選択することを含む。これらの選択プロセスに基づいて、以下のウェル中の候補化合物は、各々、ウェル A2 および G9 中の該内因性 GPCR に対して推定逆アゴニスト (化合物 A) およびアゴニスト (化合物 B) として直接同定した。図 1 参照。明瞭性のために：これらの化合物は、この GPCR に対する内因性リガンドのいずれの知識なくしても直接同定されていることを注記する。化合物結合親和性ではなく、受容体機能に基づくアッセイ技術に焦点を当てることによって、この受容体 (化合物 A) の機能的活性を低下させ、ならびに受容体 (化合物 B) の機能的活性を増加させることができる化合物を確認することが可能である。

20

【0600】

(実施例 7)

30

細胞内カルシウム濃度の測定のための蛍光イメージングプレートリーダー (FLIPR) アッセイ

各クローン系からの標的受容体 (実験) および pCMV (陰性対照) の安定にトランスフェクトされた細胞を、翌日のアッセイのために、完全培養基 (10% FBS、2 mM の L-グルタミン、1 mM のピルビン酸ナトリウムを含む DMEM) にて、 5×10^4 細胞 / ウェルで、ポリ-D-リシン予備処理 96 ウェルプレート (Becton-Dickinson, #356640) に撒く。Fluo4-AM (Molecular Probe, #F14202) インキュベーション緩衝液ストックを調製するために、1 mg Fluo4-AM を 467 μ l の DMSO および 467 μ l プロオロン酸 (Molecular Probe, #P3000) に溶解させて、1 mM のストック溶液を得、これは -20 $^{\circ}$ C で 1 ヶ月間貯蔵することができる。Fluo4-AM は蛍光カルシウム指示染料である。

40

【0601】

候補化合物を洗浄緩衝液 (1 $\times$ HBSS / 2.5 mM プロベニシド / pH 7.4 の 20 mM HEPES) 中で調製する。

【0602】

アッセイの時点において、培養基をウェルから取り出し、細胞に pH 7.4 の 100 μ l の 4 μ M Fluo4-AM / 2.5 mM プロベニシド (Sigma, #P8761) / 20 mM HEPES / 完全培地を負荷する。37 $^{\circ}$ C / 5% CO₂ におけるインキュベーションを 60 分間進行させる。

50

【0603】

1時間のインキュベーションの後、F l u o 4 - A Mインキュベーション緩衝液を除去し、細胞を100 μ lの洗浄緩衝液で2回洗浄する。各ウェルに100 μ lの洗浄緩衝液が残る。プレートを37 $^{\circ}$ C / 5 % C O ₂ のインキュベータに60分間で戻す。

【0604】

F L I P R（蛍光イメージングプレートリーダー；M o l e c u l a r D e v i c d）は、30秒目に50 μ lの候補化合物を加え、さらに150秒間に候補化合物によって誘導された細胞内カルシウム濃度（[C a ²⁺]）の一過的な変化を記録するようにプログラムされている。合計蛍光変化カウントを用いて、F L I P Rソフトウェアを用いてアゴニスト活性を決定する。機器ソフトウェアは経口の読みを正規化して、ゼロにおける同等な初期の読みを与える。

10

【0605】

説明として、かつ限定されないが、当業者であれば、公知のアゴニストとの引き続いての接触によって誘導された細胞内（[C a ²⁺]）の一過的増加を阻害するその能力を評価することによって、候補化合物を受容体のアゴニストとしてスクリーニングすることができるのを認識するであろう。

【0606】

いくつかの実施形態において、標的受容体を含む細胞は、さらに、G α 1 5、G α 1 6、またはG q（d e l）G iキメラGタンパク質を含む。

【0607】

これまでののは、安定にトランスフェクトされた細胞を用いてアゴニスト活性についてのF L I P Rアッセイを提供しているが、当業者であれば、例えば、アンタゴニスト活性を特徴づけるためにアッセイを容易に修飾できるであろう。当業者であれば、別法として、一過的にトランスフェクトされた細胞を用いることができるであろうことを容易に認識するであろう。

20

【0608】

（実施例8）

M A Pキナーゼアッセイ

M A Pキナーゼ（マイトジェン活性化キナーゼ）をモニタリングして、受容体の活性化を評価することができる。M A Pキナーゼはいくつかのアプローチによって検出することができる。1つのアプローチはリン酸化状態、未リン酸化（不活性）またはリン酸化（活性）いずれかの評価に基づく。リン酸化されたタンパク質はS D S - P A G Eにおいてより遅い移動度を有し、従って、ウェスタンブロッティングを用いて未刺激タンパク質と比較することができる。別法として、リン酸化されたタンパク質に対して特異的な抗体が入手でき（N e w E n g l a n d B i o l a b s）、これを用いて、リン酸化されたキナーゼの増加を検出することができる。いずれかの方法において、細胞を試験化合物で刺激し、次いで、L a e m m l i緩衝液で抽出する。可溶性画分をS D S - P A G Eゲルに適用し、タンパク質を電気泳動によってニトロセルロースまたはI m m o b i l i nに移動させる。免疫反応性ビーズは、標準的なウェスタンブロッティング技術によって検出される。目に見える、または化学発光シグナルをフィルムに記録し、デンシトメトリーによって定量する。

30

40

【0609】

別のアプローチは、リン酸化アッセイを介するM A Pキナーゼ活性の評価に基づく。細胞を試験化合物で刺激し、可溶性抽出物を調製する。抽出物をガンマー³²P - A T P、A T P再生系、およびインスリン、またはP H A S - Iによって調節されるリン酸化された熱および酸安定化タンパク質などのM A Pキナーゼに対する特異的基質と共に30 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベートする。反応をH₃ P O₄の添加によって停止させ、試料を氷に移す。アリコートをし、リン酸化されたタンパク質を保持するW h a t m a n P 8 1クロマトグラフィ紙にスポットする。クロマトグラフィ紙を洗浄し、液体シンチレーションカウンタで³²Pについてカウントする。別法として、細胞抽出物を、ガンマー³²P - A

50

T P、A T P再生系、およびストレプトアビジンによってフィルタ支持体に結合したビオチニル化ミエリン塩基性タンパク質と共にインキュベートする。ミエリン塩基性タンパク質は活性化されたM A Pキナーゼに対する基質である。リン酸化反応を3 0℃にて1 0分間行う。次いで、抽出物を、リン酸化されたミエリン塩基性タンパク質を保持するフィルタを通して吸引することができる。フィルタを洗浄し、液体シンチレーションカウンティングによって^{3 2} Pについてカウントする。

【0 6 1 0】

(実施例 9)

メラノーマ保有細胞技術

メラノーマ保有細胞は下等脊椎動物で見出される皮膚細胞である。それはメラノソームといわれる色素沈着オルガネラを含有する。メラニン保有細胞は、Gタンパク質共役受容体(G P C R)活性化に際して微小管ネットワークに沿ってこれらのメラノソームを再分布させることができる。この色素移動の結果は、細胞の見掛けの明化または暗化である。メラニン保有細胞において、G i 共役受容体の活性化に由来する細胞内c A M Pレベルの減少は、メラノソームを細胞の中心へ移動させ、その結果、色の劇的な明化がもたらされる。次いで、c A M Pレベルが上昇すると、G s 共役受容体の活性化に続き、メラノソームは再分散され、細胞は再度暗色に見える。G q 共役受容体の活性化に由来するジアシルグリセロールレベルの増加もまた、この再分散を誘導することができる。加えて、該技術は、ある種の受容体チロシンキナーゼの研究にも適する。メラニン保有細胞の応答は受容体活性化から数分以内に起こり、その結果、単純で頑強な色変化がもたらされる。該応答は慣用的な吸光度マイクロプレートリーダーまたは現代のビデオイメージング系を用いて容易に検出することができる。他の皮膚細胞とは異なり、メラニン保有細胞は神経堤に由来し、シグナリングタンパク質の完全相補体を発現するように見える。特に、細胞は極端に広い範囲のGタンパク質を発現し、ほとんど全てのG P C Rを機能的に発現させることが可能である。

【0 6 1 1】

メラニン保有細胞を利用して、G P C Rに対する、天然リガンドを含めた化合物を同定することができる。この方法は、特異的刺激に応答してその色素を分散または凝集させ、次いで、G C P Rをコードする外因性クローンを発現することができる色素細胞系の試験細胞を導入することによって行うことができる。刺激体、例えば、メラトニンは色素沈着の初期状態を設定し、ここで、該色素は、G P C Rの活性化が色素分散を誘導するとき試験細胞内で凝集する。しかしながら、細胞を刺激体で刺激して、色素沈着の初期状態を設定し、ここで、G P C Rの活性化が色素凝集を誘導するとき、該色素は分散する。次いで、試験細胞を化合物と接触させ、細胞中の色素沈着が色素沈着の初期状態から変化したか否かを決定する。限定されないが、G P C Rに共役するリガンドを含めた候補化合物による色素細胞の分散は、ペトリ皿上で暗く見え、他方、色素細胞の凝集は明るく見える。

【0 6 1 2】

材料および方法は、米国特許第5, 4 6 2, 8 5 6号および米国特許第6, 0 5 1, 3 8 1号の開示に従うことができる。これらの特許の開示は、本明細書において参照によりその全体が組み込まれる。

【0 6 1 3】

細胞を、例えば、9 6 ウェルプレート中で平板培養する(プレート当たり1つの受容体)。トランスフェクションから4 8時間後に、各プレート上の細胞の半分を1 0 n Mメラトニンで処理する。メラトニンはメラニン保有細胞中の内因性G i 共役受容体を活性化し、該細胞の色素を凝集させるようにする。細胞の残りの半分は無血清培地0. 7 × L - 1 5 (G i b c o)に移す。1時間後、無血清培地中の細胞は色素分散状態のままであり、他方、メラトニン処理細胞は色素凝集状態にある。この時点において、細胞を用量応答の試験/候補化合物で処理する。平板培養したG P C Rが試験/候補化合物に結合するならば、メラニン保有細胞は、該化合物に応答して色変化を受けると予測されるだろう。受容体がG s またはG q 共役受容体のいずれかであれば、メラトニン凝集メラニン保有細胞は

色素分散を受けるだろう。対照的に、受容体が G i 共役受容体であれば、色素分散細胞は用量依存性色素凝集を受けると予測されるだろう。

【0614】

(実施例 10)

P R S - 3 受容体は細胞内 I P 3 蓄積を増加させる。

【0615】

C O S - 7 細胞を、内因性ヒト B R S - 3 をコードする c D N A を含有する p C M V 発現ベクターで、または p C M V ベクター単独で一過的にトランスフェクトした。細胞内 I P 3 蓄積を合計イノシトールリン酸の蓄積として読んだ。

【0616】

C O S - 7 細胞を 96 ウェルプレート中のウェル当たり 10,000 細胞で平板培養し、一晩付着させた。次いで、L i p o f e c t a m i n e (商標) 2000 (I n v i t r o g e n # 11668-027) を用い、C O S - 7 細胞を、0.5 または 1.3 n g / ウェルの B R S - 3 / p C M V で、または 13 n g / ウェルの空の p C M V で三回トランスフェクトした。約 15 時間後、トランスフェクトされた C O S - 7 細胞を完全培地 (10% F B S、1% L - グルタミン、および 1.5 g / L 炭酸水素ナトリウムを含有する D M E M) に戻し、細胞培養を 37 °C にて約 8 時間継続した。

【0617】

C O S - 7 細胞を、本明細書に記載するように、トランスフェクションから約 24 時間後に I P 3 アッセイで用いた。完全培地を、1.5 g / L 炭酸水素ナトリウムおよび 4 μ C i / m l [³ H] ミオ - イノシトール (P e r k i n E l m e r L i f e S c i e n c e) を補足した 100 μ l のイノシトール不含培地 (I n v i t r o g e n / G i b c o 処方 02-5092EA; イノシトール、炭酸水素ナトリウムおよびピルビン酸ナトリウムを含まず、D - グルコース、L - グルタミン、フェノールレッド、およびピリドキシン H C l を含有する D M E M) と交換し、細胞を 37 °C にて約 15 時間インキュベートした。次いで、培地を吸引によって除去し、I P 3 培地 (10 μ M パルギリンおよび 10 m M 塩化リチウムを補足した前記イノシトール不含培地) で置き換え、細胞を 37 °C で 3 時間インキュベートした。(B R S - 3 アゴニストとしての試験化合物をスクリーニングするためには、試験化合物をこの 3 時間のインキュベーションに含むであろう)。インキュベーションに続き、培地を吸引によって除去し、氷冷 0.1 M ギ酸を含有する緩衝液で置き換えた。次いで、プレートを -80 °C で一晩凍結して、ドライアイス上での最初の 30 分のインキュベーションに続いて完全な細胞溶解を達成した。

【0618】

完全な細胞溶解に続いて、アッセイプレートを 37 °C のオープン中で解凍した。次いで、解凍した内容物を、樹脂 (B i o r a d, A G 1 - X 8 100 ~ 200 メッシュ、ギ酸塩形態) を予め負荷した 96 ウェルフィルタプレート (M i l l i p o r e, M u l t i s c r e e n) に移した。真空マニフォールドを用いてプレートを濾過し、樹脂を水で複数回洗浄した。次いで、溶出緩衝液を適用し (200 μ l, 1.0 M ギ酸アンモニウム / 0.1 M ギ酸)、得られた溶出物を真空下で 96 ウェル収集プレートに収集した。溶出物 (200 μ l) のアリコート、4 m l のシンチレーション流体を含有するシンチレーションバイアルに移し、シンチレーションカウンタ (P e r k i n E l m e r L i f e S c i e n c e, O p t i p h a s e S u p e r m i x o r H i - S a f e 3) でカウントした。

【0619】

B R S - 3 は検出可能なレベルの構成的活性を呈し、C O S - 7 細胞中の I P 3 蓄積を増加させることが判明した。図 2 参照。同様な結果が、293 細胞を用いて得られた (示さず)。

【0620】

(実施例 11)

B R S - 3 における [D - T Y R ⁶, β A L A ¹¹, P H E ¹³, N L E ¹⁴] ボンベ

10

20

30

40

50

シン (6-14) のアゴニスト活性

[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン (6-14) のアゴニスト活性をBRS-3において特徴付けた。[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン (6-14) は表D中の化合物D34に対応する。

【0621】

A. FLIPRアッセイ

HeLa細胞を、ヒトBRS-3をコードするプラスミドDNAで安定にトランスフェクトし、蛍光イメージングプレートリーダー (FLIPR) アッセイで用いた。図3Aに示した代表的なアッセイにおいて、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン (6-14) は、FLIPRアッセイにおいて、約0.26 nMのBRS-3におけるEC₅₀を有することが判明した。

10

【0622】

B. メラニン保有細胞アッセイ

メラニン保有細胞を、ヒトBRS-3をコードするプラスミドDNAで一過的にトランスフェクトし、分散アッセイで用いた。図3Bで示した代表的なアッセイにおいて、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン (6-14) は、メラニン保有細胞分散アッセイにおいて、約0.26 nMのBRS-3におけるEC₅₀を有することが判明した。

【0623】

C. IP3アッセイ

HeLa細胞を、ヒトBRS-3をコードするプラスミドDNAで安定にトランスフェクトし、IP3蓄積アッセイで用いた。図3Cに示した代表的なアッセイにおいて、[D-Tyr⁶, βAla¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴] ボンベシン (6-14) は、IP3蓄積アッセイにおいて、約0.13 nMのBRS-3におけるEC₅₀を有することが判明した。

20

【0624】

(実施例12)

本発明の化合物による睡眠の促進を示すためのラット睡眠ポリグラフィプロトコル

BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的な睡眠ポリグラフィプロトコルを用いて (例えば、睡眠促進剤となるべき) 睡眠を促進するのに適した化合物であることを示すことができる。

30

【0625】

動物：雄性Sprague-Dawleyラット (225-350 g) (Harlan, San Diego, CA) を単独で収容し、食物 (Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604) および水に自由に近付けさせて、12時間：12時間の明／暗サイクル (午前6：30に明かりをつける) にて湿度 (30～70%) および温度 (20～22℃) 制御施設中に維持する。ラットを外科的処置の前に動物施設に少なくとも3日間収容させる。

【0626】

手法：

ラットをケタミン／キシラジン混合物で麻酔し、EEG (脳波図) および筋電図 (EMG) 記録のために外科的に調製する。外科的回復から2～3週間後に、ラットを少なくとも3日間ポリプロピレン試験ケージに慣らす。試験日に、ラットを試験槽に入れ、一晚慣らす。翌日の午前10時に、ラットに試験化合物 (BRS-3の逆アゴニストもしくはアンタゴニストなどの、BRS-3の活性を阻害する化合物) を投与し、記録装置と接続して、試験槽に戻して3時間置く。

【0627】

データ解析

EEGおよびEMGデータをデジタル化し、3時間の試験時間に渡って10秒のエポッ

40

50

クに貯蔵する。次いで、これらのデータを視覚的にスコアリングし、各10秒のエポックをノンREM睡眠、REM睡眠、または覚醒エピソードいずれかとして特徴付ける。3時間に渡る合計睡眠時間を、ビヒクル投与または試験化合物いずれかの後に各ラットについて計算する。次いで、睡眠のパーセント増加を各ラットについて導き出す。睡眠の持続を増加させる化合物は、睡眠を促進するのに適した化合物である。睡眠開始潜伏期間の低下、夜間の目覚めの回数の低下、およびREM睡眠に影響することのないデルタ波睡眠での時間量の延長の1以上を促進する化合物は、睡眠を促進するのに適した化合物である。睡眠の定着を促進する化合物は、睡眠を促進するのに適した化合物である。

【0628】

試験時間の持続は3時間よりも長くても短くてもよく、化合物投与の時間が午前10時以外でもよいことが明らかに意図される。また、睡眠ポリグラフィをラット以外の哺乳動物で行ってもよいことが明らかに意図される。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はマウスである。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はヒトである。

【0629】

(実施例13)

本発明の化合物による覚醒状態の促進を示すためのラット睡眠ポリグラフィプロトコル
BRS-3受容体の活性を刺激する本発明の化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的な睡眠ポリグラフィを用いて覚醒状態を促進するのに適した化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示すことができる。

【0630】

動物：雄性Sprague-Dawleyラット（225-350g）（Harlan, San Diego, CA）を単独で収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由に近付けさせ、12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（30～70%）および温度（20～22℃）で制御施設中に維持した。ラットを、外科的処置前に、少なくとも3日間動物施設に慣れさせる。

【0631】

手法：

ラットをケタミン／キシラジン混合物で麻酔し、EEGおよびEMG記録のために外科的に調製する。外科的回復から2～3週間後に、ラットを少なくとも3日間、ポリプロピレン試験ケージに慣れさせる。試験日に、ラットを試験槽に入れ、一晚慣れさせる。翌日の午前10時に、ラットに、試験化合物（例えば、BRS-3のアゴニストまたは部分アゴニストなどのBRS-3の活性を刺激する化合物）を投与し、記録装置に接続して、試験槽に戻して3時間置く。

【0632】

データ解析

EEG（脳波図）およびEMG（筋電図）データをデジタル化し、3時間の試験時間に渡って10秒のエポックに貯蔵する。次いで、これらのデータを視覚的にスコアリングし、各10秒のエポックをノンREM睡眠、REM睡眠、または覚醒エピソードいずれかとして特徴付ける。3時間に渡る合計覚醒時間を、ビヒクル投与または試験化合物いずれかの後に各ラットについて計算する。次いで、覚醒状態のパーセント増加を各ラットについて導き出す。

【0633】

試験時間の持続は3時間よりも長くても短くてもよく、および化合物投与の時刻は午前10時以外であってもよいことが明らかに意図される。また、睡眠ポリグラフィはラット以外の哺乳動物で行ってもよいことが明らかに意図される。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はマウスである。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はヒトである。

【0634】

(実施例14)

ラット視床下部背内側核(DMH)および他のサブ領域におけるGABA作動性ニューロンに対するBRS-3およびGAD67マーカーの共発現の分析

ラット視床下部背内側核(DMH)および他のサブ領域におけるGABA作動性ニューロンに対するBRS-3およびGAD67マーカーの共発現は、GAGA作動性ニューロンに対するマーカーであるGAD67に対するジゴキシゲニン(Dig)標識アンチセンスプローブと組合せて、BRS-3に対する放射性標識アンチセンスプローブを用いてインサイチュハイブリダイゼーションによって調査した。ラットBRS-3 cDNA配列(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号AF510984参照)のコード領域の5'-末端450ヌクレオチドに対応する450塩基対cDNA断片に対応するラットBRS-3プローブをpBSベクター(Stratagene, La Jolla, CA)に挿入した。ラットGAD67 cDNA配列(例えば、GenBank(登録商標)アクセッション番号M76177参照)のコード領域に由来する1300塩基対cDNA断片に対応するラットGAD67プローブをpBSベクター(Stratagene)に挿入した。インサイチュハイブリダイゼーションは実質的に後に記載するように行った。

10

【0635】

明サイクルの開始から1~2位時間後に、迅速な断頭によってラットを殺した。脳を摘出し、イソペンタン中で凍結し(-40℃)、-80℃で貯蔵した。視床下部からの連続の12μmセクションをクリオスタットで調製し、解凍し、スーパーフロスト+スライドに設置し、処理まで-80℃で貯蔵した。

20

【0636】

センスおよびアンチセンス³³P放射性標識プローブは、RNasin(40ユニット)、DTT(2mM)、ATP、CTPおよびGTP(0.33mM)、[α-³³P]-UTP(Perkin Elmer, 50μCi, NEG307 H001MC)、および適当なポリメラーゼ(T7 50ユニットまたはT3 20ユニット)を含有する転写緩衝液中の線状化プラスミドをインキュベートすることによってインビトロ転写によって作製した。プローブをDNase処理し、エタノール沈殿によって精製し、2×ハイブリダイゼーション緩衝液(8×SET、2×デンハルト、0.4%SDS、200mMジチオスレイトール(DTT)、500ug/ml tRNA、500ug/mlポリA、500ug/mlポリC)に再懸濁させた。

30

【0637】

アンチセンスジゴキシゲニン標識プローブは、RNasin(40ユニット)、DTT(2mM)、ジゴキシゲニン標識UTP(rNTPジゴキシゲニンRNA標識ミックス、Roche #1277073)を含有するヌクレオチドミックス、および適当なポリメラーゼ(T7 50ユニットまたはT3 20ユニット)を含有する転写緩衝液中で線状化プラスミドをインキュベートすることによってインビトロ転写によって作製した。プローブをDNase処理し、centricepカラム(Princeton Separations, #CS-901)を通して清浄化した。

40

【0638】

組織セクションをフリーザから除去し、15分間風乾した。セクションを、引き続いて、リン酸緩衝液(0.1M、pH7.4)中の4%パラホルムアルデヒド中で室温にて30分間固定し、1×PBS中で3回すすぎ、0.1Mトリエタノールアミン(TEA)、pH8.0中で2分間、次いで、0.25%無水酢酸を含有する同緩衝液中で軽くアセチル化した。次いで、スライドを1×PBS中で5分間すすぎ、次いで、等級化アルコール濃度を通して脱水し、風乾した。放射性標識プローブを2×ハイブリダイゼーション緩衝液中に希釈して、スライド当たり16×10⁶cpmの近似濃度を得た。サケ精子を20ug/スライドの最終濃度で加え、ジゴキシゲニン標識プローブを500ng/スライドの最終濃度まで加えた。デキストラン硫酸/ホルムアミド(20%)を加えて、2×ハイブ

50

リダイゼーション緩衝液とで1:1の比率を得た。希釈されたプローブをスライドに乗せ、カバーガラスをかけ、1×PBSで湿潤化したプラスチックトレイ中で55℃にて16～18時間インキュベートした。カバーガラスを1mM DTT/4×SSC(600mM塩化ナトリウムおよび60mMクエン酸ナトリウム、pH7.2)で浮かせ、引き続いて、セクションを4×SSC中10分間で1回洗浄し、37℃の水浴中でリボヌクレアーゼA(200ug/ml)中60分間インキュベートし、続いて、2×、1×、および0.5×SSC中で各々5分間すすいだ。セクションを0.1×SSCの最終ストリンジェンシーまで65℃にて1時間洗浄し、次いで、0.1×SSC中で2回洗浄し、次いで、TN(100mM Tris、pH7.5、150mM NaCl)中で5分間洗浄した。次いで、セクションを0.5%カゼイン/TNブロッキング溶液中に30分間入れ、次いで、0.5%カゼイン/TN溶液中に1:300希釈した抗ジゴキシゲニンAP抗体(Roche, #1093274)と共に2時間インキュベートした。次いで、セクションをTN中で、各々3回2分間洗浄し、次いで、TNM(100mM Tris、pH9.5、100mM NaCl、50mM MgCl₂)中で各々3回5分間洗浄した。最後の洗浄後に、セクションを、TNM中の発色反応(0.2mg/mlレバミソール、3.4ul/ml NBT(Roche #1383213)、3.5ul/ml BCIP(Roche #1383221))中でインキュベートし、20～30分間、0.22u滅菌濾過し、TE中で30分間反応を停止させた。0.1Mグリシンおよび0.5%トリトン-X100中で10分間セクションをインキュベートすることによって抗体をストリップし、水中で洗浄した。セクションを2.5%グルタルアルデヒド中で1～2時間固定し、水で洗浄し、次いで、風乾した。一旦セクションを乾燥し、それらをX線感受性フィルム(Bio-Max, Kodak, Eastman Kodak Co., Rochester, NY)に2～7日間暴露し、写真エマルジョン(Poly sciences, #17537)からのゲル形態である(Ilford Scientific K.5Dエマルジョン)中に浸漬し、乾燥し、曝露のレベルに応じて、乾燥剤を含むスライドボックス中で4℃にて4～8週間貯蔵した。製造業者の推奨(Kodak D19)に従った浸漬されたスライドの発色の後、セクションを水中でしっかりと洗浄し、風乾し、次いで、カバーガラスを載せて顕微鏡調査した。

【0639】

BRS-3およびGAD67 mRNA含有細胞の分布の画像は、Stereoinvestigator(登録商標)v6.55.2ソフトウェア(Microbrightfield, VT)を用いるビデオカメラ(NTSC 750CE)に接続されたOlympus BX51顕微鏡を用いて得た。非放射性リボプローブを紫色沈殿として明るい視野で可視化し、銀粒分布によって放射性プローブを暗い視野下で可視化した。プローブの各対について、3つの異なるセクションの左側および右側で分析を独立して行った。

【0640】

ラットにおける視床下部背内側核(DMH)でのBRS-3およびGAD67の発現を示す代表的な光学顕微鏡画像を図4中のパネルA～Cとして示す。BRS-3のみを発現するニューロン(白色矢印)、GAD67のみを発現するニューロン(塗りつぶした矢じり)、およびBRS-3およびGAD67を共発現するニューロン(黒色矢印)の存在が認められる。

【0641】

ラット中の視床下部背内側核(DMH)におけるBRS-3およびGAD67の発現の代表的なグラフ表示を図5に示し、ここで、図5Bは図5Aの部分の拡大である。BRS-3のみを発現するニューロンは十字(x)として示され、BRS-3およびGAD67を共発現するニューロンは丸印(●)として示される。GAD67のみを発現するニューロンは示さない。組織スライスの位置は、The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Paxinos and Watson, 4th Edition, 1998, Academic Press, San Diegoに従って、ブレグマ(Bregma)に対する座標を用いて示す。

【0642】

BRS-3の共発現のインサイチュハイブリダイゼーション分析の結果、およびBRS-3の検出可能な発現を呈する視床下部のサブ領域内のニューロンによる神経伝達物質またはマーカーの数を図6に示す。結果は、以下の視床下部サブ領域について示される：内側視索前核(MPO)、腹部内側視索前核(VMPO)、視索上核(SO)、弓状核(Arc)、弓状核後部(Arc後部)、視床下部傍室核(PVH)、視床下部背内側核(DMH)、視床下部側領域(LH)、内側扁桃体(MeA)、および扁桃体中心(CeA)。結果は腹側両面視束前核(VLPo)について示していない。というのは、BRS-3の発現はこのサブ領域で検出できなかったからである。以下の神経伝達物質またはマーカーは、BRS-3との共発現で検索された：コカインアンフェタミン調節転写体(CART) 10、グルタミン酸デカルボキシラーゼ67(GAD67)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)、オキシトシン(OT)、バソプレッシン(AVP)、ニューロペプチドY(NPY)、プロオピオメラノコルチン(POMC)、プロラクチン放出ペプチド(PrRP)、ヒスチジンデカルボキシラーゼ(HDC)、メラニン濃縮ホルモン(MCH)、およびハイボクレチン／オレキシンペプチド(Hcrt)。黒色ボックスは、共発現が見出されなかったことを示す。灰色のボックスは、神経伝達物質またはマーカーが視床下部サブ領域において正常に見出されないか、あるいは分析が行われなかったかのいずれかを示す。図6においては、結果は、示された神経伝達物質またはマーカーの共発現を有するその中のBRS-3発現ニューロンのパーセンテージとして示された視床下部サブ領域について示される。驚くべきことに、 20 GABA作動性ニューロンに対するマーカー、GAD67とのBRS-3の顕著な共発現が見出された(図6)。

【0643】

視床下部背内側核(DMH)の場合においては、例えば、その中のBRS-3発現ニューロンの約84%はGABA作動性ニューロン(GAD67を発現するニューロン)であることが判明した(図6)。

【0644】

(実施例15)

BRS-3モジュレータ(例えば、逆アゴニスト、アンタゴニスト、アゴニスト、または部分アゴニスト)活性についての酵母レポーターアッセイ 30

酵母細胞ベースのアッセイは文献において従前に記載されている(例えば、Miretら、J Biol Chem(2002)277:6881-6887;Campbellら、Bioorg Med Chem Lett(1999)9:2413-2418;Kingら、Science(1990)250:121-123;WO99/14344;WO00/12704;および米国特許第6,100,042号参照)。簡単に述べると、内因性酵母G-アルファ(GPA1)が欠失され、複数の技術を用いて構築されたGタンパク質キメラで置き換えられているように酵母細胞を作製した。加えて、内因性酵母アルファ細胞GPCR、Ste3は、選択された哺乳動物GPCRの相同発現を可能とするために欠失されている。酵母においては、真核生物細胞において保存されたフェロモンシグナリング変換経路(例えば、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ経路)の 40 エレメントはFus1の発現を駆動する。 β -ガラクトシダーゼ(LacZ)をFus1プロモータ(Fus1p)の制御下に置くことによって、システムが開発されており、それにより、受容体の活性化は酵素読み取りに導く。

【0645】

酵母細胞は、Agatepらによって記載された酢酸リチウム方法の適合によって形質転換される(Agatepら、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, El 50

s e v i e r)。簡単に述べれば、酵母細胞を酵母トリプトンプレート (Y T) 上で一晚成長させる。キャリア一本鎖 DNA (10 μ g)、2 μ g の 2 つの F u s 1 p - L a c Z 受容体プラスミドの各々 (1 つは U R A 選択マーカーを持ち、1 つは T R P を持つ)、2 μ g の、酵母発現ベクター (2 μ g 複製起点) 中の B R S - 3 (例えば、ヒト受容体)、および酢酸リチウム／ポリエチレングリコール／T E 緩衝液をエッペンドルフチューブにピペットで入れる。受容体を含有する／レポーター対照を含有しない酵母発現プラスミドは L E U マーカーを有する。酵母細胞をこの混合物に接種し、反応は 30 $^{\circ}$ C にて 60 分間進行する。次いで、酵母細胞を 42 $^{\circ}$ C にて 15 分間熱ショックを与える。次いで、細胞を洗浄し、選択プレート上に広げる。選択プレートは合成規定酵母培地から L E U、U R A および T R P (S D - L U T) を除いたものである。30 $^{\circ}$ C にて 2 ~ 3 日間インキュベートした後、次いで、選択プレート上で成長するコロニーを L a c Z アッセイで試験する。

10

【0646】

β -ガラクトシダーゼについての蛍光酵素アッセイを行うために、対象の B R S - 3 受容体を運ぶ酵母細胞を、液体 S D - L U T 培地中で不飽和濃度まで一晚成長させる (すなわち、細胞は依然として分裂しており、静止相にはいまだ到達していない)。それらを新鮮な培地中で最適なアッセイ濃度まで希釈し、90 μ l の酵母細胞を 96 ウェル黒色ポリスチレンプレート (C o s t a r) に加える。D M S O に溶解させ、かつ 10 % D M S O 溶液中で 10 倍濃度まで希釈した試験化合物をプレートに加え、プレートを 30 $^{\circ}$ C に 4 時間置く。4 時間後、 β -ガラクトシダーゼに対する基質を各ウェルに加える。これらの実験においては、フルオレセインジ (β -D-ガラクトピラノシド) を用い (F D G)、フルオレセインを放出する酵素に対する基質であり、蛍光読み取りを行う。500 μ M F D G / 2.5 % T r i t o n $\times$ 100 のウェル当たり 20 μ l を加える (細胞を透過性にするには潜在が必要である)。細胞と基質との 60 分間のインキュベーションの後、1 M 炭酸ナトリウムのウェル当たり 20 μ l を加えて、反応を停止させ、蛍光シグナルを増強させる。次いで、プレートを 485 / 535 nm において蛍光光度計で読む。

20

【0647】

空のベクターで形質転換された酵母細胞における場合を凌ぐ B R S - 3 形質転換酵母細胞における蛍光シグナルの減少は、試験化合物が、B R S - 3 受容体機能性を阻害する化合物 (例えば、B R S - 3 の逆アゴニストもしくはアンタゴニストである化合物) であることを示す。ある実施形態において、本発明の化合物は、バックグラウンドシグナル (ビヒクル単独の存在下で得られるシグナル) のそれを下回る蛍光シグナルの減少を与える。

30

【0648】

空のベクターで形質転換された酵母細胞における場合を凌ぐ B R S - 3 形質転換酵母細胞における蛍光シグナルの増加は、試験化合物が、B R S - 3 受容体機能性を刺激する化合物 (例えば、B R S - 3 のアゴニストまたは部分アゴニストである化合物) であることを示す。ある実施形態において、本発明の化合物は、バックグラウンドシグナル (ビヒクル単独の存在下で得られたシグナル) のそれを超える蛍光シグナルの増加を与える。

【0649】

(実施例 16)

受容体結合アッセイ

40

試験化合物は、本発明の G タンパク質共役受容体のリガンドであることが知られている化合物および該受容体の間の複合体の形成を低下させるその能力について評価することができる。ある実施形態において、公知のリガンドは放射性標識される。放射性標識された公知のリガンドをスクリーニングアッセイで用いて、化合物を同定／評価することができる。一般的な項目において、新たに合成された、または同定された化合物 (すなわち、試験化合物) は、放射性標識された公知のリガンドおよび受容体の間の複合体の形成を低下させるその能力によって、放射性標識された公知のリガンドの受容体への結合を低下させるその能力について評価することができる。

【0650】

他の態様において、試験化合物を放射性標識し、対象の G P C R を含む細胞へ、または

50

対象のGPCRを含む膜へ結合するその能力を評価することによって本発明の対象のGPCRのリガンドであることを示すことができる。

【0651】

試験化合物の不在下における放射性標識された公知のリガンドの特異的結合のレベル未満の試験化合物の存在下における放射性標識された公知のリガンドの特異的結合のレベルは、該放射性標識された公知のリガンドおよび該受容体の間のより少ない複合体が、試験化合物の不在下よりも試験化合物の存在下において該受容体が形成されることを示す。

【0652】

本発明のGタンパク質共役受容体のリガンドであることが公知の化合物および該受容体の間の複合体を検出するためのアッセイプロトコル

A. 受容体の調製

293細胞を、60ulのリポフェクタミン（15cm皿当たり）を用い、本発明のGタンパク質共役受容体をコードするポリヌクレオチドを含む10ug発現ベクターで一過的にトランスフェクトする。一過的にトランスフェクトされた細胞を、培地を変化させつつ、皿中で24時間成長させ（75%密集度）、10ml/皿のHepes-EDTA緩衝液（20mM Hepes + 10mM EDTA、pH7.4）で除去する。次いで、細胞をBeckman Coulter遠心分離機で17,000rpmにて20分間遠心する（JA-25.50ロータ）。引き続いて、ペレットを20mM Hepes + 1mM EDTA、pH7.4に再懸濁させ、50ml Dounceホモジナイザで均質化し、再度遠心分離する。上清を除去した後、結合アッセイで用いるまでペレットを-80℃で貯蔵する。アッセイで用いる場合、膜を氷上で20分間解凍し、次いで、10mLのインキュベーション緩衝液（20mM Hepes + 1mM MgCl₂、100mM NaCl、pH7.4）を加える。次いで、膜をボルテックスし、粗製膜ペレットを再懸濁させ、設定6において、Brinkmann PT-3100 Polyttronホモジナイザで15秒間均質化する。膜タンパク質の濃度は、BRLブラッドフォードタンパク質アッセイを用いて決定する。

【0653】

B. 結合アッセイ

全結合については、合計容量50ulの（50mM Tris HCl（pH7.4）、10mM MgCl₂および1mM EDTA；5～50ugタンパク質を含有するアッセイ緩衝液に希釈された）適切に希釈された膜を96ウェルポリプロピレンマイクロタイタプレートに加え、続いて、100ulのアッセイ緩衝液および50ulの放射性標識された公知のリガンドを加える。非特異的結合では、50ulのアッセイ緩衝液を100ulの代わりに加え、放射性標識されていないさらなる50ulの10uMの該公知のリガンドを加え、その後、50ulの該放射性標識された公知のリガンドを加える。次いで、プレートを室温で60～120分インキュベートする。結合反応を、Brandellの96ウェルプレートハーベスタと共にMicroplate Devices GF/C Unifilter濾過プレートを通す濾過アッセイプレートによって停止させ、続いて、0.9%NaClを含有する冷50mM Tris HCl、pH7.4で洗浄する。次いで、濾過プレートの底を密閉し、50ulのOptiphas Supermixを各ウェルに加え、プレートの頂部を密閉し、プレートをTrilux MicroBetaからシンチレーションカウンタでカウントする。該放射性標識された公知のリガンドおよび該受容体の間のより少ない複合体が、試験化合物の存在下で形成されるか否かを決定するために、100ulのアッセイ緩衝液を加える代わりに、100ulの適切に希釈された該試験化合物を適当なウェルに加え、続いて、50ulの該放射性標識された公知のリガンドを加える。

【0654】

（実施例17）

ペンチレンテトラゾール誘導発作からの保護

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて抗痙攣活性を有する化合物であ

10

20

30

40

50

ること（例えば、抗痙攣剤であること）を示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて抗痙攣活性を有する化合物であること（例えば、抗痙攣剤であること）を示すことができる。本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて抗偏頭痛活性を有する化合物であること（例えば、抗偏頭痛剤であること）を示すことができる。薬物（例えば、試験化合物またはジアゼパム）は、例えば、経口、腹腔内、脳室内、または静脈内投与することができることが明らかに意図される。以下のプロトコルは、マウス以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、マウス以外の哺乳動物はラットである。

10

【0655】

プロトコル I

動物：実験の開始において体重が20～22gの雄性B6.129X1-Brs3^{tm1Jfb}/Jマウス（BRS-3ノックアウトマウス；ストック番号004366）は、対照雄性C57BL/6Jマウス（ストック番号000664）と共に、Jackson Laboratory（Bar Harbor, ME）から購入する。マウスはケージ当たり4匹収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）制御施設に維持する。マウスを少なくとも3日間、試験前に、動物施設に慣れさせる。

20

【0656】

手法：

ペンチレンテトラゾール（Sigma Chemical Co.）を実験（BRS-3ノックアウトマウス単独およびBRS-3ノックアウトマウス＋ジアゼパム）および対照（対照マウス単独および対照マウス＋ジアゼパム）群のマウスに125mg/kgで皮下投与する。生存するマウスの数を、ペンチレンテトラゾールの投与から30分および60分後に各群について記録する。

30

【0657】

薬物投与：ジアゼパムを、ペンチレンテトラゾールの投与の60分前に投与する。ジアゼパムを、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。

【0658】

データ解析

データは、死滅から保護されたマウスのパーセンテージとして各群について示される。対照マウス単独群における死滅から保護されたマウスのパーセンテージと比較したBRS-3ノックアウトマウス単独群における死滅から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、抗痙攣活性を有する化合物であること（例えば、抗痙攣剤であること）を示す。対照マウス＋ジアゼパム群における死滅から保護されたマウスのパーセンテージと比較したBRS-3ノックアウトマウス＋ジアゼパム群において死滅から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が抗痙攣活性を有する化合物であること（例えば、抗痙攣剤であること）を示す。対照マウス単独群における死滅から保護されたマウスのパーセンテージと比較したBRS-3ノックアウトマウス単独群における死滅から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例え

40

50

ば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、抗偏頭痛活性を有する化合物であること（例えば、抗偏頭痛剤であること）を示す。対照マウス+ジアゼパム群において死滅から保護されたマウスのパーセンテージと比較したBRS-3ノックアウトマウス+ジアゼパム群における死滅から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、抗偏頭痛活性を有する化合物であること（例えば、抗偏頭痛剤であること）を示す。

【0659】

プロトコル I I

動物：実験の開始において体重が20～22gである雄性CFL1マウスはCharles River Laboratories (Wilmington, MA) から購入する。マウスはケージ当たり4匹収容し、食物 (Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604) および水に自由にアクセスさせつつ12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30で明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）制御施設に維持する。マウスを少なくとも3日間、試験前に動物施設に慣れさせる。

10

【0660】

手法：

ペンチレンテトラゾール (Sigma Chemical Co.) を実験（試験化合物単独および試験化合物+ジアゼパム）および対照（ビヒクル対照およびジアゼパム対照）群におけるマウスに125mg/kgにて皮下投与する。生存するマウスの数を、ペンチレンテトラゾールの投与から30分および60分後に各群について記録する。

20

【0661】

薬物投与：全ての薬物およびビヒクルを、ペンチレンテトラゾールの投与の60分前に投与する。薬物（例えば、試験化合物およびジアゼパム）を、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。該試験化合物はBRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物であると明らかに意図される。

【0662】

データ解析

データは、死滅から保護されたマウスのパーセンテージとして各群について示される。ビヒクル対照群における死滅から保護されたマウスのパーセンテージと比較した試験化合物単独実験群において死滅から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、実験群において投与された化合物が抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示す。ジアゼパム対照群において死滅から保護されたマウスのパーセンテージと比較した試験化合物+ジアゼパム実験群において死滅から保護されたマウスのパーセンテージは、実験群で投与された化合物が抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示す。ビヒクル対象群において死滅から保護されたマウスのパーセンテージと比較した試験化合物単独実験群において死滅から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、実験群で投与された化合物が抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示す。ジアゼパム対照群において死滅から保護されたマウスのパーセンテージと比較した試験化合物+ジアゼパム実験群において死滅から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、実験群で投与された化合物が抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示す。BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物が、抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物が、抗偏頭痛活性を有する化合物である（例

30

40

50

えば、抗偏頭痛剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。

【0663】

（実施例18）

電気ショック誘導発作からの保護

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて、抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3における逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示すことができる。本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3における逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示すことができる。薬物（例えば、試験化合物またはジアゼパム）は例えば、経口、腹腔内、脳室内、または静脈内投与することができることが明らかに意図される。以下のプロトコルは、別法として、マウス以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、マウス以外の哺乳動物はラットである。

10

【0664】

プロトコル I

20

動物：実験の開始において体重が20～22gである雄性B6.129X1-Brs3tm1Jfb/Jマウス（BRS-3ノックアウトマウス；ストック番号004366）は、対照雄性C57BL/6Jマウス（ストック番号000664）と共に、Jackson Laboratory（Bar Harbor, ME）から購入する。マウスをケージ当たり4匹収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由にアクセスさせつつ12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30で明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）制御施設に維持する。マウスを、少なくとも3日間、試験前に動物施設に慣れさせる。

【0665】

30

手法：

電気ショックは、Ugo Basile ECT, Unit 7801発作装置（Ugo Basile, Italy）、および0.9%生理食塩水に浸漬させた角膜電極を用い、実験（BRS-3ノックアウトマウス単独およびBRS-3ノックアウトマウス＋ジアゼパム）および対照（対照マウス単独および対照マウス＋ジアゼパム）群におけるマウスに投与される。マウスは30mAのショックを0.3秒間受ける。

【0666】

薬物投与：ジアゼパムを、電気ショックの投与の60分前に投与する。ジアゼパムを、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。

40

【0667】

データ解析

データは、発作の後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージとして各群について示される。対照マウス単独群における該後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージと比較したBRS-3ノックアウトマウス単独群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示す。対照マウス＋ジアゼパム群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージと比較して、BRS-3ノックアウトマウス＋ジアゼパム群において該後足伸筋成分から保

50

護されたマウスのより大きなパーセンテージが、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニストを有する化合物が抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示す。対照マウス単独群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージと比較して、BRS-3ノックアウトマウス単独群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示す。対照マウス+ジアゼパム群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージと比較して、BRS-3ノックアウトマウス+ジアゼパム群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示す。

10

【0668】

プロトコルII

動物：実験の開始において体重が20～22gである雄性CF1マウスは、Charles River Laboratories (Wilmington, MA) から購入する。該マウスはケージ当たり4匹収容し、食物 (Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604) および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6．30に明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）制御施設に維持する。マウスは、試験前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れさせる。

20

【0669】

手法：

Ugo Basile ECT, Unit 7801 発作装置 Ugo Basile, Italy) および0.9%生理食塩水に浸漬させた角膜電極を用い、電気ショックを実験（試験化合物単独および試験化合物+ジアゼパム）および対照（ビヒクル対照およびジアゼパム対照）群におけるマウスに投与する。マウスは30mAのショックを0.3秒間受ける。

【0670】

薬物投与：全ての薬物およびビヒクルは電気ショックの投与の60分前に投与する。薬物（例えば、試験化合物およびジアゼパム）は、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。該試験化合物はBRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物であることが明らかに意図される。

30

【0671】

データ解析

データは、発作の後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージとして各群について示される。ビヒクル対照群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージと比較して、試験化合物単独群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、実験群において投与された化合物が抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示す。ジアゼパム対照群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージと比較して、試験化合物+ジアゼパム群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、実験群において投与された化合物が抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示す。ビヒクル対照群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのパーセンテージと比較して、試験化合物単独群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、実験群において投与された化合物が抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛活性である）ことを示す。ジアゼパム対照群において該後足伸筋

40

50

成分から保護されたマウスのパーセンテージと比較して、試験化合物＋ジアゼパム群において該後足伸筋成分から保護されたマウスのより大きなパーセンテージは、実験群において投与された化合物が抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示す。BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物が、抗痙攣活性を有する化合物である（例えば、抗痙攣剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物は、抗偏頭痛活性を有する化合物である（例えば、抗偏頭痛剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。

10

【0672】

（実施例19）

ポルソルト（Porsolt）強制水泳試験

本モデルで測定された効果は、薬物の抗鬱病活性と相関付けられている。このモデルのパラダイムは、効果的な抗鬱病化合物が、マウスまたはラットに、ビヒクルのみを与えられたマウスまたはラットよりも水を満たしたシリンダから逃げようとより大きな試みをさせるようにすることである。

【0673】

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて抗鬱病活性を有する化合物である（例えば、抗鬱病剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて抗鬱病活性を有する化合物である（例えば、抗鬱病剤である）ことを示すことができる。試験化合物は、例えば、経口、腹腔内、脳室内または静脈内投与することができることが明らかに意図される。以下のプロトコルは、別法として、マウス以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、マウス以外の哺乳動物はラットである。以下のプロトコルは、別法として、ラット以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はマウスである。

20

【0674】

プロトコル I

動物：本実験で用いた動物は、実験の開始において体重が20～22gである、非ナীব雄B6.129X1-Brs3^{tm1Jfb}/Jマウス（BRS-3ノックアウトマウス；ストック番号004366）および対照非ナীব雄C57BL/6Jマウス（ストック番号000664）である（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）。マウスはケージ当たり4匹収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）制御施設に維持する。マウスは、試験前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れさせる。

30

【0675】

手法：

試験装置は6つの透明なPlexiglasシリンダ20cm（高さ）×10cm（幅）よりなる。シリンダには25℃の水で9cmまで満たす。各マウスを5～10分間の訓練セッションのためにシリンダに入れる。マウスを5分間の試験セッションのために24時間後に戻す。試験セッションを後のスコアリングのためにビデオテープに記録する。

40

【0676】

データ解析

スコアリングは、Visual Basicに書かれ、かつDOSで実行される時間サンプリングコンピュータプログラムを用いて各群についてなされる。5秒毎に、マウスを3つの挙動：不動、温和な水泳、または登りのうちの1つを示すものとして評点をつける

50

。次いで、これらのサンプリングスコアを試験セッションのパーセンテージに変換する。対照マウス群におけるマウスによってなされる、水で満たされたシリンダから逃避する試みと比較した、BRS-3ノックアウトマウス群においてマウスによってなされる、水で満たされたシリンダから逃避するより大きな試みは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が抗鬱病活性を有する化合物である（例えば、抗鬱病剤である）ことを示す。

【0677】

プロトコル I I

動物：本実験で用いた動物は、体重が280～350gの間の非ナীব雄性Sprague Dawleyラット（SASCO, St Louis）である。該ラットをケージ当たり2匹収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）制御施設に維持する。ラットを、試験前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れされる。

10

【0678】

手法：

試験装置は6つの透明なPlexiglasシリンダ40cm（高さ）×19cm（幅）よりなる。シリンダに25℃の水を18cmまで満たす。各ラットを15分間の訓練セッションのためにシリンダに入れる。ビヒクルまたは試験化合物いずれかの亜慢性または急性投与に続いて、実験（試験化合物）および対照（ビヒクル）群におけるラットを、5分間の試験セッションのために24時間後に戻す。試験セッションを後のスコアリングのためにビデオテープに記録する。

20

【0679】

薬物投与：亜急性投与は、訓練および試験の間の24時間の期間に薬物を3回投与することよりなる。該薬物は試験セッションの24時間、5時間および1時間前に投与する。急性投与は、試験セッションの1時間前に薬物を1回投与することよりなる。試験化合物を、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。該試験化合物は、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物であることが明らかに意図される。

30

【0680】

データ解析

スコアリングは、Visual Basicに書かれ、かつDOSで実行される時間サンプリングコンピュータプログラムを用いて各群においてなされる。5秒毎に、ラットを3つの挙動：不動、温和な水泳または登りのうちの1つを示すものとして評点が与えられる。次いで、これらのサンプリングスコアを試験セッションのパーセンテージに変換する。ビヒクル対照群においてラットにおいてなされる、水で満たされたシリンダから逃避する試みと比較して、試験化合物群においてラットによってなされる、水で満たされたシリンダから逃避するより大きな試みは、実験群において投与される化合物が抗鬱病活性を有する化合物（例えば、抗鬱病剤である）ことを示す。BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物は、抗鬱病活性を有する化合物である（例えば、抗鬱病剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。

40

【0681】

（実施例20）

高架式十字迷路

高架式十字迷路モデルは、開いた高架空間のマウスおよびラットの生来の恐怖を利用する。試験装置は、2つの開いたアームおよび2つの閉じたアームよりなる高架式十字迷路である。マウスまたはラットは、開いたアーム上よりも迷路の閉じたアーム上でより長い

50

時間を消費するように自然に選択されるが、効果的な抗不安化合物を試験の前にマウスまたはラットに投与すると、マウスまたはラットが開いたアームで消費する時間の量は増加する。

【0682】

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて、抗不安活性を有する化合物である（例えば、抗不安剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて、抗不安活性を有する化合物である（例えば、抗不安剤である）ことを示すことができる。薬物（例えば試験化合物またはジアゼパム）は、例えば、経口、腹腔内、脳室内、または静脈内投与できることが明らかに意図される。以下のプロトコルは、マウス以外の哺乳動物を用いて、別法として行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、マウス以外の哺乳動物はラットである。以下のプロトコルはラット以外の哺乳動物を用いて別法として行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はマウスである。

10

【0683】

プロトコル I

動物：本実験で用いる動物は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入された、実験の開始において体重が20～22gである、雄性B6.129X1-Brs3^{tm1Jfb}/Jマウス（BRS-3ノックアウトマウス；ストック番号004366）および対照雄C57BL/6Jマウス（ストック番号000664）である。該マウスはケージ当たり4匹収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）に維持する。マウスは、試験前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れさせる。

20

【0684】

手法：

実験（BRS-3ノックアウトマウス単独およびBRS-3ノックアウトマウス＋ジアゼパム）および対照（対照マウス単独および対照マウス＋ジアゼパム）群におけるマウスを、薬物の投与から30分後に試験する。マウスを、開いたアームの1つに面する迷路の中心に置く。マウスの移動を、コンピュータにインターフェース接続したフォトセルを用いて5分間の試験セッションに渡って追跡する。コンピュータは、各アームへの進入の数および各アームで消費された時間を測定する。

30

【0685】

薬物投与：ジアゼパムを試験セッションの30分前に投与する。ジアゼパムを、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。

【0686】

データ解析

対照マウス単独群におけるマウスによって開いたアームで消費された時間のパーセンテージと比較して、BRS-3ノックアウトマウス単独群におけるマウスによって開いたアームで消費された時間のより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が抗不安活性を有する化合物である（例えば、抗不安剤である）ことを示す。対照マウス＋ジアゼパム群におけるマウスによって開いたアームで消費された時間のパーセンテージと比較して、BRS-3ノックアウトマウス＋ジアゼパム群におけるマウスによって開いたアームで消費された時間のより大きなパーセンテージは、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、抗不安活性を有する化合物である（例えば、抗不安剤であ

40

50

る)ことを示す。

【0687】

プロトコル I I

動物：本実験で用いた動物は、280～350gの体重の雄性Sprague Dawleyラット(Harlan, UK)である。該ラットはケージ当たり2匹収容し、食物(Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604)および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗サイクル(午前6：30に明かりをつける)にて、湿度(40～60%)および温度(20～22℃)制御施設に維持する。ラットは、試験前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れさせる。

10

【0688】

手法：

実験(試験化合物単独および試験化合物＋ジアゼパム)および対照(ビヒクル対照およびジアゼパム対照)群におけるラットを薬物の投与から30分後に試験する。ラットを開いたアームの1つに面する迷路の中心に置く。ラットの移動を、コンピュータとインターフェース接続されたフォトセルを用いて5分間の試験セッションに渡って追跡する。コンピュータは、各アームへの進入の数および各アームで消費された時間を測定する。

【0689】

薬物投与：全ての薬物およびビヒクルを試験セッションの30分前に投与する。薬物(例えば、試験化合物およびジアゼパム)を、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg、または100mg/kgで投与する。該試験化合物は、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物であることが明らかに意図される。

20

【0690】

データ解析

ビヒクル対照群においてラットによって開いたアームで消費された時間のパーセンテージと比較して、試験化合物単独群においてラットによって開いたアームで消費された時間のより大きなパーセンテージは、実験群で投与された化合物が抗不安活性を有する化合物である(例えば、抗不安剤である)ことを示す。ジアゼパム対照群におけるラットによって開いたアームで消費された時間のパーセンテージと比較して、試験化合物＋ジアゼパム群におけるラットによって消費された時間のより大きなパーセンテージは、実験群で投与された化合物が抗不安活性を有する化合物である(例えば、抗不安剤である)ことを示す。BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物は、抗不安活性を有する化合物である(例えば、抗不安剤である)ことを示すことができることが明らかに意図される。

30

【0691】

(実施例21)

空間的水迷路

空間的水迷路は、空間的学習および記憶の試験として広く用いられてきた。マウスまたはラットを、泳ぐことによって水から、該水のちょうど水面下に潜ったプラットフォームへ逃避するように訓練する。プラットフォームは動物の目に見えないので、タンクの領域における目に見える迷路の手がかりを利用してプラットフォームを突き止める必要がある。空間的水迷路による試験は、本質的には、Collinsonら(J Neurosci (2002) 22:5572-5580)およびDawsonら(J Pharmacol Exp Ther (2006) 316:1335-1345)によって記載されているように行う。

40

【0692】

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、認識増強発生を有する化合物で

50

ある（例えば、認識増強剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を刺激する本発明の化合物、例えばBRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用いて、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示すことができる。薬物（例えば、試験化合物またはジアゼパムまたは $\alpha 5$ IA）は、例えば、経口、腹腔内、脳室内または静脈内投与することができることが明らかに意図される。以下のプロトコルは、別法として、マウス以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はマウスである。以下のプロトコルは、別法として、ラット以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はマウスである。

10

【0693】

プロトコル I

動物：本実験で用いた動物はJackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入された、実験の開始において体重が20~22gである、雄性B6.129X1-Brs3^{tm1Jfb}/Jマウス (BRS-3ノックアウトマウス；ストック番号004366) および対照雄C57BL/6Jマウス (ストック番号000664) である。該マウスはケージ当たり4匹収容し、食物 (Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604) および水に自由にアクセスさせつつ、自由に12時間：12時間の明／暗サイクル (午前6：30に明かりをつける) にて、湿度 (40~60%) および温度 (20~22℃) 制御施設に維持する。マウスは、試験の前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れさせる。

20

【0694】

手法：

実験 (BRS-3ノックアウトマウス単独およびBRS-3ノックアウトマウス+ジアゼパム、およびBRS-3ノックアウトマウス+ $\alpha 5$ IA (3- (5-メチルイソキサゾール-3-イル) -6- [(1-メチル-1, 2, 3-トリアゾール-4-イル) メチル-オキシ] -1, 2, 4-トリアゾロ [3, 4- α] フタラジン; Dawsonら, J Pharmacol Exp Ther (2006) 316:1335-1345)) および対照 (対照マウス単独および対照マウス+ジアゼパムおよび対照マウス+ $\alpha 5$ IA) 群におけるマウスには、薬物の投与から30分後に、最初のトライアルで毎日試験する。動物には10日間毎日4つのトライアルを受けさせる。

30

【0695】

薬物投与：ジアゼパムまたは $\alpha 5$ IAはトライアル1の30分前に投与する。ジアゼパムまたは $\alpha 5$ IAを、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。

【0696】

データ解析

節約率は、トライアル1潜伏性からトライアル2潜伏性を差し引くことによって得られる。BRS-3ノックアウトマウス単独群についての節約率と比較した、対象マウス単独群についてのより大きな節約率は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物は、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。BRS-3ノックアウトマウス+ジアゼパム群についての節約率と比較して、対照マウス+ジアゼパム群についてのより大きな節約率は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物は認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。BRS-3ノックアウトマウス+ $\alpha 5$ IA群についての節約率と比較して、対照マウス+ $\alpha 5$ IA群についてのより大きな節約率は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3におけるアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物が認識増強活性を有す

40

50

る化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。

【0697】

プロトコル I I

動物：本実験で用いた動物は体重が280～350gである雄性フーデットリスター系ラット（Charles River, UK Ltd）である。該ラットは、ケージ当たり2匹収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗周期（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）制御施設に収容する。ラットは、試験前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れさせる。

10

【0698】

手法：

実験（試験化合物単独および試験化合物＋ジアゼパムおよび試験化合物＋α5IA）および対照（ビヒクル対象およびジアゼパム対照およびα5IA対照）群におけるラットは、薬物の投与から30分後に最初のトライアルで毎日試験する。動物には10日間毎日4つのトライアルを受けさせる。

【0699】

薬物投与：全ての薬物およびビヒクルをトライアル1の30分前に投与する。薬物（例えば、試験化合物およびジアゼパムおよびα5IA）を、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。該試験化合物は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物であることが明らかに意図される。

20

【0700】

データ解析

トライアル1潜在性からトライアル2潜在性を差し引きすることによって節約率を得る。ビヒクル対照群についての節約率と比較して、試験化合物単独群についてのより大きな節約率は、実験群で投与した化合物が認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。ジアゼパム対照群についての節約率と比較して、試験化合物＋ジアゼパム群についてのより大きな節約率は、実験群で投与した化合物が認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。α5IA対照群についての節約率と比較して、試験化合物＋α5IA群についてのより大きな節約率は、実験群で投与された化合物が認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物は、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。

30

【0701】

（実施例22）

本発明の化合物によって睡眠を促進するまたは覚醒状態を促進する活性を示すためのラット睡眠ポリグラフィプロトコル

40

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、睡眠を促進する活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の睡眠ポリグラフィプロトコルを用い、睡眠を促進するのに適した化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示すことができる。

【0702】

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、覚醒状態を促進する活性を有する化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示すことができる。BRS-3

50

受容体の活性を刺激する本発明の化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の睡眠ポリグラフィプロトコルを用い、覚醒状態を促進するのに適した化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示すことができる。

【0703】

薬物（例えば、試験化合物またはジアゼパム）は、例えば、経口、腹腔内、脳室内または静脈内投与することができることが明らかに意図される。以下のプロトコルは、別法として、ラット以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はマウスである。

【0704】

動物：雄性Sprague-Dawleyラット（225～350g）（Harlan, San Diego, CA）は単独で収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（30～70%）および温度（20～22℃）制御施設に維持する。ラットは、外科的処置の前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れさせる。

【0705】

手法：

ラットをケタミン／キシラジン混合物で麻酔し、EEG（脳波図）および筋電図（EMG記録のために外科的に調製する。外科的処置の回復から2～3週間後に、ラットを少なくとも3日間、ポリプロピレン試験ケージに慣れさせる。試験の日に、ラットを試験槽に入れ一晩慣れさせる。翌日の午前10時に、ラットに試験化合物＋ジアゼパムまたはジアゼパム単独を投与し、記録装置に接続して、3時間の間、試験槽に戻す。

【0706】

薬物投与：薬物（例えば、試験化合物およびジアゼパム）を、例えば0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。

【0707】

データ解析

EEGおよびEMGデータをデジタル化し、3時間の試験時間に渡って10秒のエポックで貯蔵する。次いで、これらのデータを視覚的にスコアリングし、各10秒のエポックをノンREM睡眠、REM睡眠、または覚醒エピソードのいずれかとして特徴付ける。3時間の時間に渡っての合計睡眠時間を、ビヒクル投与または試験化合物のいずれかの後に各ラットについて計算した。次いで、睡眠のパーセント増加を各ラットについて誘導する。

【0708】

ジアゼパム対照と比較して睡眠の持続を増加させる化合物は、睡眠を促進するのに適した化合物である。ジアゼパム対照と比較して、睡眠開始潜伏期間の低下、夜間の覚醒の数の低下、およびREM睡眠に影響することないデルタ波睡眠の時間の量の延長の1以上を促進する化合物は、睡眠を促進するのに適した化合物である。ジアゼパム対照と比較して、睡眠の定着を促進する化合物は、睡眠を促進するのに適した化合物である。

【0709】

ジアゼパム対照と比較して、睡眠の持続を減少する化合物は、覚醒状態を促進するのに適した化合物である。ジアゼパム対照と比較して、睡眠開始潜伏期間の低下、夜間の覚醒の数の低下、およびREM睡眠に影響することのないデルタ波睡眠の時間の増加の延長の1以上を抑制する化合物は、覚醒状態を促進するのに適した化合物である。ジアゼパム対照と比較して、睡眠の定着を抑制する化合物は、覚醒状態を促進するのに適した化合物である。

【0710】

試験期間の持続は3時間よりも長くても短くてもよく、化合物投与の時間は午前10時

10

20

30

40

50

以外であってもよいことが明らかに意図される。また、睡眠ポリグラフィはラット以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物は非ヒト哺乳動物である。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はマウスである。ある実施形態において、ラット以外の哺乳動物はヒトである。

【0711】

(実施例23)

本発明の化合物によって睡眠を促進する、または覚醒状態を促進する活性を示すためのマウス睡眠ポリグラフィプロトコル

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、睡眠を促進する活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の睡眠ポリグラフィプロトコルを用い、睡眠促進活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示すことができる。

10

【0712】

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、覚醒状態を促進する活性を有する化合物である（例えば、覚醒促進剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を刺激する本発明の化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物は、以下の睡眠ポリグラフィプロトコルを用い、覚醒状態促進活性を有する化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示すことができる。

20

【0713】

薬物（例えば、ジアゼパム）は、例えば、経口、腹腔内、脳室内または静脈内投与することができることが明らかに意図される。以下のプロトコルは、別法として。マウス以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、マウス以外の哺乳動物はラットである。また、試験期間の持続は3時間よりも長くても短くてもよく、化合物投与の時間は午前10時以外であってもよいことが明らかに意図される。

【0714】

動物：本実験で用いた動物は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入された、実験の開始において体重が20~22gである雄性B6.129X1-Brs3^{tm1Jfb}/Jマウス（BRS-3ノックアウトマウス；ストック番号004366）および対照雄性C57BL/6Jマウス（ストック番号000664）である。該マウスは、ケージ当たり4匹収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水へ自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明/暗サイクル（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（40~60%）および温度（20~22℃）制御施設に維持する。マウスを、外科的処置の前に、動物施設に少なくとも3日間、慣れさせる。

30

【0715】

手法：

マウスをケタミン/キシラジン混合物で麻酔し、EEG（脳波図）および筋電図（EMG）記録のために外科的に調製する。外科的処置の回復から2~3週間後に、マウスをポリプロピレン試験ケージに少なくとも3日間、慣れさせる。試験の日に、マウスを試験槽に入れ、一晚慣れさせる。翌日午前10時に、マウスにジアゼパムまたはビヒクルを投与し、記録装置に接続して、試験槽に3時間戻す。

40

【0716】

薬物投与：ジアゼパムを、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。

【0717】

50

データ解析

E E GおよびE M Gデータをデジタル化し、3時間の試験期間に渡って10秒のエポックに貯蔵する。次いで、これらのデータを視覚的にスコアリングし、各10秒のエポックをノンREM睡眠、REM睡眠、または覚醒エピソードのいずれかとして特徴付ける。3時間の期間に渡っての合計睡眠時間を、ビヒクル投与または試験化合物のいずれかの後に各ラットについて計算した。次いで、睡眠のパーセント増加を各マウスについて誘導する。

【0718】

対照単独マウスと比較して、B R S-3ノックアウト単独マウスにおける睡眠の持続の増加は、B R S-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、B R S-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が睡眠促進活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示す。対照単独マウスと比較して、B R S-3ノックアウト単独マウスで観察された、睡眠開始潜伏期間の低下、夜間の覚醒の数の低下、およびREM睡眠に影響することのないデルタ波睡眠の時間の量の延長の1以上の促進は、B R S-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、B R S-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、睡眠促進活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示す。対照単独マウスと比較したB R S-3ノックアウト単独マウスで観察された睡眠の定着の促進は、B R S-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、B R S-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、睡眠促成活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示す。

10

20

【0719】

対照+ジアゼパムマウスと比較して、B R S-3ノックアウト+ジアゼパムマウスにおける睡眠の持続の増加は、B R S-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、B R S-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、睡眠促進活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示す。対照+ジアゼパムマウスと比較して、B R S-3ノックアウト+ジアゼパムマウスについて観察された、睡眠開始潜伏期間の低下、夜間の覚醒の数の低下、およびREM睡眠に影響することのないデルタ波睡眠の時間の量の延長の1以上の促進は、B R S-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、B R S-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、睡眠促進活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示す。対照+ジアゼパムマウスと比較して、B R S-3ノックアウト+ジアゼパムマウスで観察された睡眠の定着の促進は、B R S-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、B R S-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、睡眠促進活性を有する化合物である（例えば、睡眠促進剤である）ことを示す。

30

【0720】

対照単独マウスと比較して、B R S-3ノックアウト単独マウスにおける睡眠の持続の増加は、B R S-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、B R S-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物が、覚醒状態促進活性を有する化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示す。対照単独マウスと比較して、B R S-3ノックアウト単独マウスで観察された、睡眠開始潜伏期間の低下、夜間の覚醒の数の低下、およびREM睡眠に影響することのないデルタ波睡眠の時間の増加の延長の1以上の促進は、B R S-3の受容体の活性を刺激する化合物、例えば、B R S-3においてアゴニスト活性または部分アゴニストを有する化合物が、覚醒状態促進活性を有する化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示す。対照単独マウスと比較した、B R S-3ノックアウト単独マウスで観察された睡眠の定着の促進は、B R S-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、B R S-3においてアゴニスト活性または部分アゴニストを有する化合物が、覚醒状態促進活性を有する化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示す。

40

【0721】

50

対照+ジアゼパムマウスと比較して、BRS-3ノックアウト+ジアゼパムマウスにおける睡眠の持続の増加は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物が、覚醒状態促進活性を有する化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示す。対照+ジアゼパムマウスと比較して、BRS-3ノックアウト+ジアゼパムマウスにおいて観察された、睡眠開始潜伏期間の低下、夜間の覚醒の数の低下、およびREM睡眠に影響することのないデルタ波睡眠の時間の量の延長の1以上の促進は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物が、覚醒状態促進活性を有する化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示す。対照+ジアゼパムマウスと比較した、BRS-3ノックアウト+ジアゼパムマウスで観察された睡眠の定着の促進は、BRS-3受容体の活性を有する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物が覚醒状態促進状態を有する化合物である（例えば、覚醒状態促進剤である）ことを示す。

10

【0722】

（実施例24）

プレパルス阻害

統合失調症の兆候の1つは新規な感覚または認識刺激を濾過し、それを処理する能力の減少である。これは、プレパルス阻害（PPI）と呼ばれるパラダイムを用いることによって動物およびヒトの双方で示すことができる。強い突然の刺激が示されると、驚愕応答を誘導し、これは、動物の尻ごみを測定することによって動物においてモニタリングすることができる。驚愕刺激に弱いプレパルスが先行するとき、驚愕応答は阻害される。統合失調症患者は弱いまたは欠乏したPPIを示し、これは、阻害性機能または感覚運動ゲーティングの欠如を反映する。動物におけるプレパルス阻害は、薬物をスクリーニングして統合失調症を治療するためのモデルとして用いられてきた。弱いPPIの表現型が化合物によって動物モデルにおいて逆行できるならば、それは、該化合物を用いて統合失調症を治療できることを示す。C57BL/6Jなどのマウスのある種の緊張は、天然では貧弱なPPIを呈する（Ouagazzalら、Psychopharmacol（2001）156：273-283）。

20

【0723】

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、抗統合失調症活性を有する化合物である（例えば、抗統合失調症剤である）ことを示すことができる。本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、抗精神病活性を有する化合物である（例えば、抗精神病剤である）ことを示すことができる（例えば、Ouagazzalら、Psychopharmacol（2001）156：273-283参照）。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、抗統合失調症活性を有する化合物である（例えば、抗統合失調症剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を阻害する本発明の化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、抗精神病活性を有する化合物である（例えば、抗精神病剤である）ことを示すことができる。薬物（例えば、試験化合物またはジアゼパムマウス）は、例えば、経口、腹腔内、脳室内または静脈内投与できることが明らかに意図される。以下のプロトコルは別法として、マウス以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形態において、マウス以外の哺乳動物はラットである。

30

40

【0724】

プロトコル

動物：本実験で用いた動物は、実験の開始において体重が20~22gであるナイーブ雄性B6.129X1-Brs3^{tm1Jfb}/Jmマウス（BRS-3ノックアウトマウス；ストック番号004366）および対照ナイーブ雄性C57BL/6Jマウス（ストック番号000664）である（Jackson Laboratory, Bar H

50

arbor, ME)。該マウスはケージ当たり4匹収容し、食物 (Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604) および水に自由にアクセスさせつつ、12時間:12時間の明/暗サイクル (午前6:30に明かりをつける) にて、湿度 (40~60%) および温度 (20~22℃) 制御設備に維持する。マウスを、試験の前に、少なくとも3日間動物施設に慣れさせる。

【0725】

手法:

試験は、各々が、全ての音響刺激を生じる高周波数拡声器 (シリンダ上方28cm) を備えた通気した音減衰キュービクル中の Plexiglas プラットフォームに設けられた 5.1cm (外径) Plexiglas シリンダよりなる驚愕デバイス (SRLAB, San Diego Instruments, San Diego, CA) で行う。各槽の背景ノイズは70dBである。シリンダ内の運動は、Plexiglas 基部に取り付けられた圧電加速度計によって検出し、変換し、コンピュータによってデジタル化し、保存する。刺激開始で始め、1ミリ秒の持続の65回の読みを記録して、動物の驚愕振幅を得る。

【0726】

群 (BRS-3 ノックアウトマウス単独群、BRS-3 ノックアウトマウス+ジアゼパム群、対照マウス単独群、対照マウス+ジアゼパムマウス群、対照マウス+試験化合物群、対照マウス+試験化合物+ジアゼパム群) 当たり12匹のナীবマウスを試験する。各セッションは5分の順化期間で開始し、続いて5連続110dBトライアルを行う。これらのトライアルは分析には含めない。次いで、6つの異なるトライアルタイプを提示する: 驚愕パルス (ST110, 110dB/40ms)、単独で与える低プレパルス刺激 (P74, 74dB/20ms)、単独で与える高プレパルス刺激 (P90, 90dB/20ms)、驚愕パルスの開始の100ms前に与えられるP74またはP90 (各々、PP74およびPP90)、バックグラウンドノイズのみを示して (NST)、シリンダ中のベースライン運動を測定する最後のトライアル。全てのトライアルは10回適用し、ランダム順序で与え (P74およびP90はただ5回与える)、平均トライアル間隔 (ITI) は15秒 (10~20秒) である。

【0727】

薬物投与: 薬物 (試験化合物、ジアゼパム、試験化合物+ジアゼパム) を、試験セッションの30分前に投与する。試験化合物およびジアゼパムを、例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。該化合物は、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物であることが明らかに意図される。

【0728】

データ解析

対照マウス単独群と比較した、BRS-3 ノックアウトマウス単独群におけるより大きなパーセンテージのプレパルス阻害は、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、抗統合失調症活性を有する化合物である (例えば、抗統合失調症剤である) ことを示す。対照マウス+ジアゼパム群と比較してBRS-3 ノックアウトマウス+ジアゼパム群におけるより大きなパーセンテージのプレパルス阻害は、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、抗統合失調症活性を有する化合物である (例えば、抗統合失調症剤である) ことを示す。対照マウス単独群と比較して、対照マウス+試験化合物群におけるより大きなパーセンテージのプレパルス阻害は、実験群で投与された化合物が抗統合失調症活性を有する化合物である (例えば、抗統合失調症剤である) ことを示す。対照マウス+ジアゼパム群と比較して、対照マウス+試験化合物+ジアゼパム群におけるより大きなパーセンテージのプレパルス阻害は、実験群で投与された化合物が、抗統合失調症活性を有する化

合物である（例えば、抗統合失調症剤である）ことを示す。BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物が、抗統合失調症活性を有する化合物である（例えば、抗統合失調症剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。

【0729】

対照マウス単独群と比較して、BRS-3ノックアウトマウス単独群におけるより大きなパーセンテージのプレパルス阻害は、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物は、抗精神病活性を有する化合物である（例えば、抗精神病剤である）ことを示す。対照マウス+ジアゼパム群と比較して、BRS-3ノックアウトマウス+ジアゼパム群におけるより大きなパーセンテージのプレパルス阻害は、BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物が、抗精神病活性を有する化合物である（例えば、抗精神病剤である）ことを示す。対照マウス単独群と比較して、対照マウス+試験化合物におけるより大きなパーセンテージのプレパルス阻害は、実験群において投与された化合物が抗精神病活性を有する化合物である（例えば、抗精神病剤である）ことを示す。対照マウス+ジアゼパム群と比較して、対照マウス+試験化合物+ジアゼパム群におけるより大きなパーセンテージのプレパルス阻害は、実験群で投与された化合物が、抗精神病活性を有する化合物である（例えば、抗精神病剤である）ことを示す。BRS-3受容体の活性を阻害する化合物、例えば、BRS-3において逆アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を有する化合物である該試験化合物は、抗精神病活性を有する化合物である（例えば、抗精神病剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。

【0730】

（実施例25）

物体認識作業

ラットにおけるEnnaceurおよびDelacourによって元来開発された物体認識作業（Behavioural Brain Research, 31, 47-59, 1988）は、その環境において新規な物体を探索するげっ歯類の生来の傾向に依拠し、これを用い、動物が従前に遭遇した物体を思い出すか否かを決定することができる。従前に遭遇した（親しんだ）物体についての記憶は、新規な物体を探索するのに消費された時間と比較したこの物体を探索するのに消費された相対的時間によって測定することができる。新規な物体は、親しんだものよりも通常は余計に探索される。従って、動物が物体を思い出すと、該物体は新規な物体よりもあまり探索されないはずである。親しんだ物体が忘れられたとき、それは新規な物体と同程度に多く探索されるであろう。記憶は、試料の提示と新規な物体が提示された試験セッションとの間の保持間隔を調整することによって変調することができる。化合物の認識増強特性を評価するには、24時間保持間隔を用いることができる。この条件下では、対照マウスは、新規な物体に対して優先性を示さず、他方、認識増強化合物を注射したマウスは、新規な物体を探索するより時間を消費するであろう。より短い保持間隔を用いて、認識処理を損なう場合がある化合物を調べることができる（例えば、Nilssonら、Neurosci (2007) 149:123-130参照）。

【0731】

本発明の化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示すことができる。BRS-3受容体の活性を刺激する本発明の化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物は、以下の例示的なプロトコルを用い、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示すことができる。薬物（例えば、試験化合物またはジアゼパムまたはα5IA）は、例えば、経口、腹腔内、脳室内、または静脈内投与することができることが明らかに意図される。以下のプロトコルは別法として、マウス以外の哺乳動物を用いて行うことができることが明らかに意図される。ある実施形

態において、マウス以外の哺乳動物はラットである。

【0732】

プロトコル I

動物：本実験で用いた動物は Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した、実験の開始において体重が 20~22 g である雄性 B6.129X1-Brs3^{tm1Jfb}/J マウス (BRS-3 ノックアウトマウス; ストック番号 004366) および対照雄性 C57BL/6 J マウス (ストック番号 000664) である。該マウスはケージ当たり 4 匹収容し、食物 (Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604) および水に自由にアクセスさせつつ、12 時間：12 時間の明/暗でサイクル (午前 6.30 に明かりをつける) にて湿度 (40~60%) および温度 (20~22℃) 制御施設に維持する。マウスを試験前に動物施設に少なくとも 3 日間慣れさせる。

10

【0733】

手法：

試験領域は、基部におけるプラスチックインサート下に置かれた磁気ストリップを備えた暗い灰色のマット仕上げの ABS プラスチック (65×45×45 (H) cm) のオープンフィールドである。物体は、赤色プラスチック (Leg o) または灰色の金属複製品のいずれかで作製された小さなピラミッド (長さ 9.5 cm、高さ 5.7 cm) である。全ての物体は、オープンフィールドに取り付けるためのその基部上に薄い磁気ストリップを有する。該領域は、試験フロアレベルでほぼ 25 lux の天井光によって照明される。CCD ビデオカメラをオープンフィールドの上方に置き、隣接する部屋のモニターおよび VCR に接続する。マウスが親しんだ (F) および新規な (N) 物体を探索するのに消費した回数および時間の長さを実験者が手動で記録する。

20

【0734】

群：BRS-3 ノックアウトマウス単独、BRS-3 ノックアウトマウス+ジアゼパム、BRS-3 ノックアウトマウス+α5IA、対照マウス単独、対照マウス+ジアゼパムおよび対照マウス+α5IA。

【0735】

薬物投与：薬物 (例えば、ジアゼパムおよび α5IA) を、例えば、0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg または 100 mg/kg で投与する。

30

【0736】

プレ暴露：最初の日には動物は 5 分間の慣れセッションの間にオープンフィールドを探索する。

【0737】

訓練日：翌日、2 つの同一の物体を、オープンフィールドの反対のコーナー (壁から 10 cm) にさらなる 5 分間のセッションの間に提示する。

【0738】

訓練直後に、マウスに薬物またはビヒクルを注射する。マウスは試験のために、例えば、1 時間、4 時間、12 時間または 24 時間後に戻す。

40

【0739】

試験：先に提示された物体の 1 つを新しい物体で置き換え、動物に、再度、これらの 2 つの物体をさらなる 5 分間のセッションの間に探索させる。群内では、新しい物体が置かれたコーナーを動物間で交互にする。物体を 70% エタノールで徹底的に洗浄して、動物が匂いの手がかりを用いるのを防ぐ。

【0740】

スコアリング基準：基本的な測定は、新規および親しんだ物体の探索時間 (秒) である。探索は、1 cm 以下の距離において鼻を物体に触れさせ、または鼻を物体に向けるものと考えられる。新しい (N) および親しんだ (F) 物体に対する 2 回の探索間の差を、識別指標 ($d = N - F$) として採用する。認識スコアが探索の全レベルの差によって偏ら

50

いことを示すために、別の識別指標を用いることができる ($D = N - F / N + F$)。

【0741】

BRS-3ノックアウトマウス単独群についての識別指標と比較して、対照マウス単独群についてのより大きな識別指標は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物が、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。BRS-3ノックアウトマウス+ジアゼパム群についての認識指標と比較して、対照マウス+ジアゼパム群についてのより大きな識別指標は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物が、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。BRS-3ノックアウトマウス+ $\alpha 5$ IA群についての識別指標と比較して、対照マウス+ $\alpha 5$ IA群についてのより大きな識別指標は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物が、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。

10

【0742】

プロトコル I I

動物：本実験で用いた動物は、実験の開始において体重が20～22gである雄製C57BL/6Jマウスである（Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME）。該マウスはケージ当たり4匹収容し、食物（Harlan-Teklad Western Res., Orange, CA, Rodent Diet 8604）および水に自由にアクセスさせつつ、12時間：12時間の明／暗サイクル（午前6：30に明かりをつける）にて、湿度（40～60%）および温度（20～22℃）制御施設に維持する。マウスは試験前に、少なくとも3日間、動物施設に慣れさせる。

20

【0743】

手法：

試験領域は、基部におけるプラスチックインサート下におかれた磁気ストリップを備えた暗い灰色のマット仕上げのABS（65×45×45（H）cm）のオープンフィールドである。物体は、赤色プラスチック（Leg o）または灰色金属複製品のいずれかで作製された小さなピラミッド（長さは9.5cm、高さは5.7cm）である。全ての物体は、オープンフィールドに取り付けられたその基部上に薄い磁気ストリップを有する。該領域を、試験フロアレベルではぼ25luxの天井光によって照明する。CCDビデオカメラをオープンフィールドの上方に置き、隣の部屋のモニターおよびVCRに接続する。マウスが親しんだ（F）および新規な（N）物体を探索するのに消費した回数および時間の長さを実験者が手動で記録する。

30

【0744】

群：試験化合物、試験化合物+ジアゼパム、試験化合物+ $\alpha 5$ IA、ビヒクル対照、ジアゼパム対照、 $\alpha 5$ IA対照。

【0745】

薬物投与：薬物（例えば、試験化合物およびジアゼパムおよび $\alpha 5$ IA）を例えば、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、30mg/kgまたは100mg/kgで投与する。該試験化合物は、BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物であることが明らかに意図される。

40

【0746】

プレ暴露：最初の日には動物はオープンフィールドを5分間の慣れセッションの間に探索する。

【0747】

訓練の日：翌日、2つの同一の物体をオープンフィールドの反対コーナー（壁から10cm）にさらなる5分間のセッションの間に提示する。

【0748】

50

訓練の直後に、マウスに薬物またはビヒクルを注射する。マウスを、試験のために、例えば、1時間、4時間、12時間または24時間戻す。

【0749】

試験：従前に提示された物体の1つを新しい物体で置き換え、動物に、再度これらの2つの物体をさらなる5分間のセッションの間、探索させる。群内で、新しい物体が置かれたコーナーを動物間で交互にする。物体を70%エタノールで徹底的に洗浄して、動物が匂いの手がかりを用いるのを防ぐ。

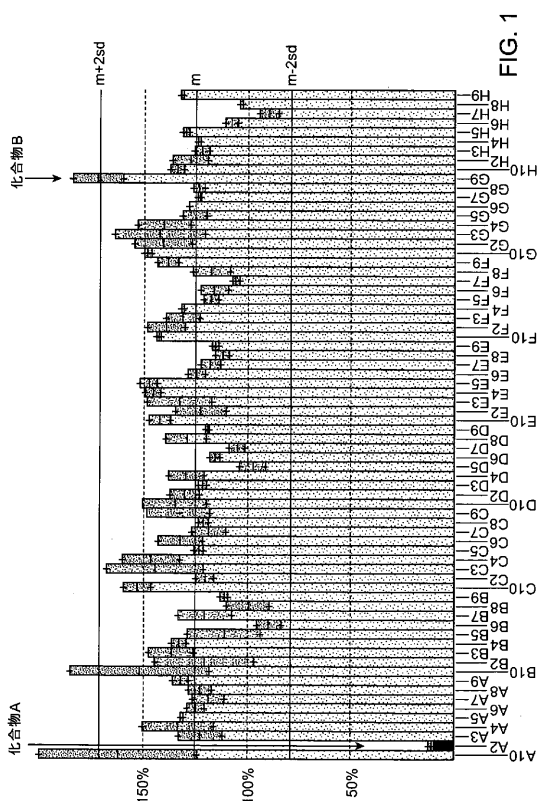
【0750】

スコアリング基準：基本的な測定は、新規および親しんだ物体の探索時間（秒）である。探索は、1cm以下の距離において鼻を物体に触れさせ、または鼻を物体に向けるものと考えられる。新しい（N）および親しんだ（F）物体に対する2回の探索間の差を、識別指標（ $d = N - F$ ）として採用する。認識スコアが探索の全レベルの差によって偏らないことを示すために、別の識別指標を用いることができる（ $D = N - F / N + F$ ）。

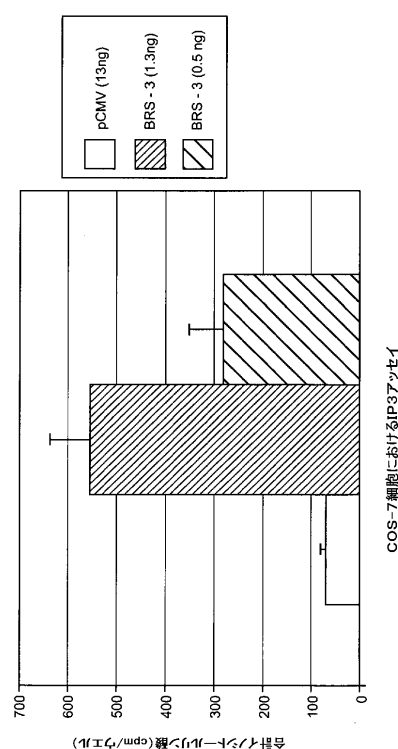
【0751】

ビヒクル対照群についての識別指標と比較して、試験化合物単独群についてのより大きな識別指標は、実験群で投与された化合物が、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。ジアゼパム対照群についての識別指標と比較して、試験化合物+ジアゼパム群についてのより大きな識別指標は、実験群で投与された化合物が認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。 $\alpha 5$ I A対照群についての識別指標と比較して、試験化合物+ $\alpha 5$ I A群についてのより大きな識別指標は、実験群で投与された化合物が認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示す。BRS-3受容体の活性を刺激する化合物、例えば、BRS-3においてアゴニスト活性または部分アゴニスト活性を有する化合物は、試験化合物が、認識増強活性を有する化合物である（例えば、認識増強剤である）ことを示すことができることが明らかに意図される。

【図1】



【図2】



【図 3】

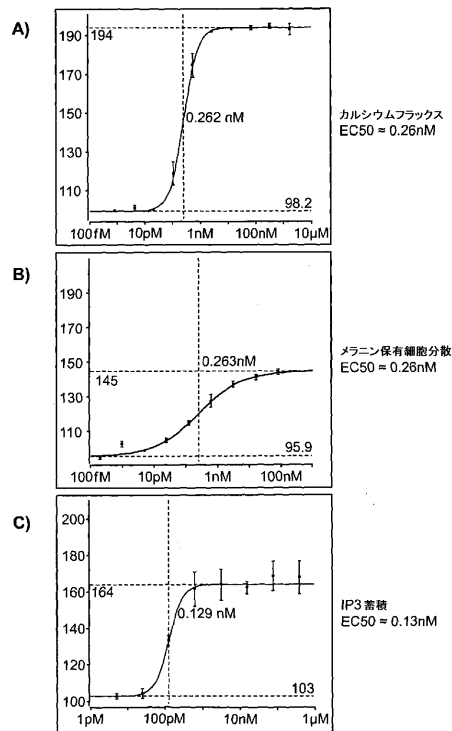
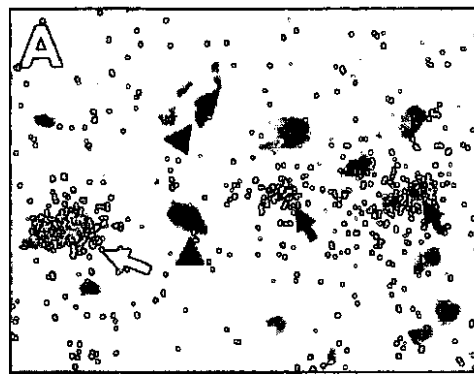
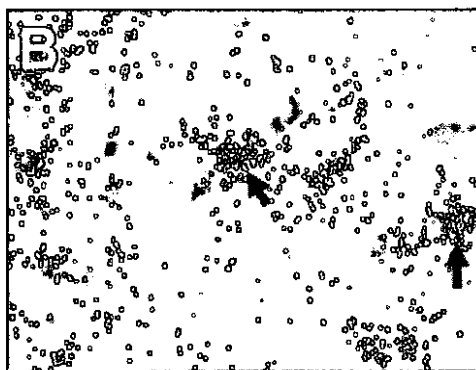
BRS-3における[D-Tyr⁶ β-Ala¹¹ Phe¹³ Nle¹⁴] ボンベシン(6-14)のアゴニスト活性

FIG. 3

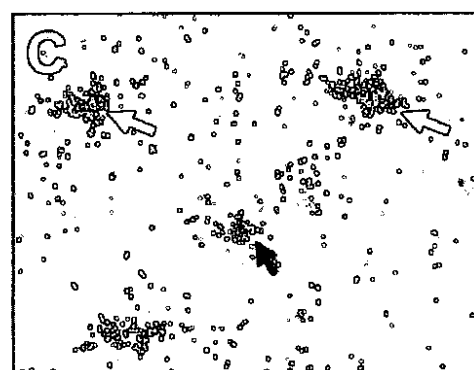
【図 4 A】



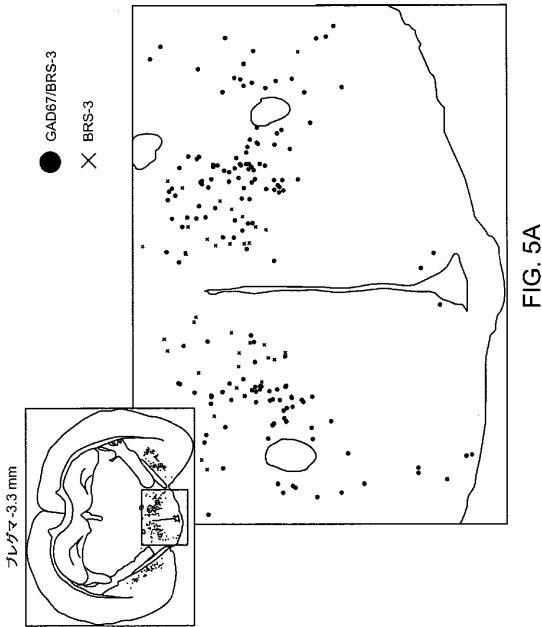
【図 4 B】



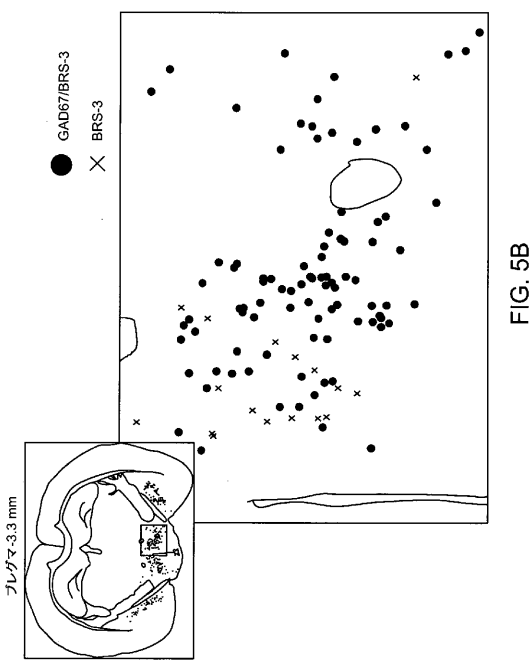
【図 4 C】



【図 5 A】



【図 5 B】



【図 6】

BRS-3の発出可能な発現を有する視床下部の異なるサブ領域におけるいくつかの神経伝達物質またはマーカーについてのmRNAとBRS-3 mRNAとの共発現

	CART	GAD67	CRH	TRH	OT	AVP	NPY	POMC	PRP	HDC	MCH	Hcrt
MPO/VMPO		73.0% (±14.5)										
SO												
Arc												
Arc post		88.2% (±2.4)								5.7% (±4.1)		
PVH	41.0% (±4.2)				6.1% (±4.6)							
DMH		84.4% (±2.4)										
Pe/LH		80.4% (±13.2)										
MeA/CeA		89.6% (±1.9)										

FIG. 6

【配列表】

2010515882000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/000116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/10 C07K7/08 G01N33/74		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/056532 A (BIOFOCUS DISCOVERY LTD [GB]; BARKER EMMA [GB]; CROSSLEY ROGER [GB]) 23 June 2005 (2005-06-23) cited in the application	18, 19, 37-44, 64, 65, 83-90
Y	the whole document	1-17, 20-36, 45-63, 66-82, 91-106
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 June 2008		Date of mailing of the international search report 23/06/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer C.F. Angioni

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/000116

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X:	MANTEY SAMUEL A ET AL: "Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AL, vol. 272, no. 41, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 26062-26071, XP002186411 ISSN: 0021-9258	18,19, 37-44, 64,65, 83-90
Y	the whole document	1-17, 20-36, 45-63, 66-82, 91-106
Y	WO 01/36471 A (ARENA PHARM INC [US]; CHEN RUOPING [US]; DANG HUONG T [US]; LOWITZ KEV) 25 May 2001 (2001-05-25) the whole document	1-17, 20-36, 45-63, 66-82, 91-106
A	KAMICHI S ET AL: "Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain" BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1032, no. 1-2, 25 January 2005 (2005-01-25), pages 162-170, XP004728257 ISSN: 0006-8993 the whole document	1-106
A	YAMADA K ET AL: "Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice" MOLECULAR PSYCHIATRY, BASINGSTOKE, GB, vol. 7, no. 1, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 113-117, XP002995957 ISSN: 1359-4184 the whole document	1-106
Y	WO 2005/011612 A (UNIV NEW YORK [US]; SMITH SHERYL [US]; WILLIAMS KEITH [US]) 10 February 2005 (2005-02-10) the whole document In particular: paragraph 3; p. 11-12, bridging paragraph; claims 7-12.	1-17, 20-36, 45-63, 66-82, 91-106
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/000116

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/060625 A (UNIV COLUMBIA [US]; KANDEL ERIC [US]; SHUMYATSKY GLEB [US]; BOLSHAKOV) 7 July 2005 (2005-07-07) the whole document	1-106
P,X	WO 2007/027225 A (ARENA PHARM INC [US]; CHU ZHI-LIANG [US]; LEONARD JAMES N [US]) 8 March 2007 (2007-03-08) the whole document	1-106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/000116**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 2-44 and 46-90 (in part)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 18-44 and 64-90 (in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008 /000116

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 2-17 and 46-63 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the in vitro method.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 2-44 and 46-90 (in part)

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy (claims 2-17 and 46-63)

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 18-44 and 64-90 (in part)

Present claims 18-44 and 64-90 relate to an extremely large number of possible compounds and the use thereof. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the compounds claimed, see pp. 96-102. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claims 18-44 and 64-90 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claim 18-44 and 64-90 was restricted to those claimed compounds which appear to be supported.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/000116

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005056532	A	23-06-2005	NONE	
WO 0136471	A	25-05-2001	AU 782959 B2 CA 2390547 A1 EP 1242448 A2 JP 2004517603 T NZ 518662 A	15-09-2005 25-05-2001 25-09-2002 17-06-2004 29-10-2004
WO 2005011612	A	10-02-2005	US 2007081943 A1	12-04-2007
WO 2005060625	A	07-07-2005	NONE	
WO 2007027225	A	08-03-2007	AU 2006285393 A1 CA 2605228 A1 CN 101166527 A EP 1871362 A2	08-03-2007 08-03-2007 23-04-2008 02-01-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	25/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/06
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18
A 6 1 P	25/20	(2006.01)	A 6 1 P	25/20
A 6 1 P	25/22	(2006.01)	A 6 1 P	25/22
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24
A 6 1 P	25/26	(2006.01)	A 6 1 P	25/26
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50 Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バグノル, ディディエー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 1, サン ディエゴ, カミニート コーブウッド
1 0 2 4 7

(72)発明者 グロッチェック, アンドリュー ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 9 1 0, チュラ ビスタ, パセオ エントラーダ 1
1 1 2

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB20 CB01 FB01 FB08
4B024 AA11 CA04 CA07 CA09 DA02 DA12 EA04 GA11 HA14
4B063 QA18 QQ07 QQ08 QQ13 QQ79 QR69 QR76 QR77 QR80 QS12
QS24 QX01
4C084 AA01 AA17 NA14 ZA022 ZA032 ZA052 ZA062 ZA082 ZA112 ZA122
ZA162 ZA182 ZA202 ZA222 ZA242 ZA592 ZC412 ZC422